



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

***IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE REGULACIÓN
POR HIERRO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN tvcp2 DE Trichomonas vaginalis***

TESIS QUE PRESENTA:

M. en C. LUIS ALBERTO RIVERA RIVAS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS EN
INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ROSSANA ARROYO VERÁSTEGUI

CIUDAD DE MÉXICO

OCTUBRE, 2020

ASESORES DE TESIS

Dra. Rosa Ma. Del Ángel Núñez de Cáceres

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV-IPN

Dr. José Luis Rosales Encina

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, Facultad de Estudios Superiores Iztacala,
Universidad Nacional Autónoma de México**

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

Este trabajo fue financiado parcialmente por el presupuesto del CINVESTAV, el donativo SEP-CINVESTAV 074 (a R.A.V.) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) donativos 523092 y 152023 (a R.A.V). L.A.R.R fue becario CONACyT, con el número de beca 338864.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a **Dios** por permitirme culminar con esta etapa en mi vida y formación académica, con salud y bienestar.

A la **Dra. Rossana Arroyo Verástegui** por haberme aceptado en su grupo de investigación, por confiar en mí, por apoyarme y darme ánimo cuando se veía más complicado el tema de publicar el artículo, por sus recomendaciones y críticas constructivas y dedicación a este trabajo.

A la **Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres**, al **Dr. José Luis Rosales Encina**, al **Dr. Jaime Ortega López** y al **Dr. Santiago Martínez Calvillo** por su apoyo a este trabajo con sus recomendaciones, críticas y observaciones constructivas, así como su disposición para asistir a mis seminarios.

A la **Q.F.B. Leticia Ávila González** por su apoyo técnico en el mantenimiento de los parásitos y las células HeLa, así como el montaje de técnicas y la enseñanza brindada a lo largo de estos años.

Al **Dr. Juan Ernesto Ludert León** por las facilidades otorgadas para el uso de su microscopio de epifluorescencia invertido.

Al **Dr. Jaime Ortega López** por las facilidades brindadas en su laboratorio para realizar experimentos de clonación en bacterias facilitadas por su equipo de trabajo.

A la **Dra. Elisa Figueroa Angulo** por su amistad y enseñanzas brindadas durante su estancia en el laboratorio, por su disposición a escuchar mis dudas e inquietudes y siempre darse un tiempo para mí. Mil gracias Elisa!

Al **Dr. Gerardo Reséndiz Cardiel** por su amistad y apoyo en la parte de biología molecular, así como por proporcionarme las células que se requirieron para la clonación de los fragmentos, por su tiempo y dedicación a este proyecto.

Al **Q.B.P. Carlos Vázquez Calzada** por sus enseñanzas en el uso y capacitación del microscopio confocal del departamento, por su amistad y las buenas pláticas que tuvimos.

A la **Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica** del CINVESTAV- Unidad Zacatenco, por las facilidades otorgadas para la realización de parte de los ensayos de identificación por espectrometría de masas de las proteínas nucleares y la realización de ensayos de qRT-PCR.

Al **Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular** por haberme aceptado en su programa de doctorado.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca de doctorado otorgada.

A mis compañeros de laboratorio **Esly, Gaby, Sebastián, Sarahí** por su gran amistad, por el gran ambiente de trabajo en el que estuvimos, por su apoyo, sus consejos, los buenos festejos y siempre estar ahí.

Al resto de compañeros del departamento de Infectómica: **Ángel, Alejandro** y muchos más con quienes hice una gran amistad y que hicieron más llevadera la estancia en el doctorado.

También a todo el personal técnico que estuvo apoyándome para la realización de este trabajo, como el **Sr. Víctor, Sr. Óscar, Sra. Marce, Martha Aguilar**. ¡Muchas gracias!

Agradezco también en este trabajo y esfuerzo a mi novia **Nadia Cristina López Vanegas** por su apoyo incondicional, por sus enseñanzas, por sus consejos, por tratar de hacerme una mejor persona y más completa, por nunca dejarme caer y siempre estar, por escucharme y por tanto amor. ¡Te amo, corazón!

Agradezco y dedico este trabajo y esfuerzo a mis padres: **J. Guadalupe Rivera Aguilar** y **Zenaida Rivas Ávila**, ya que sin el apoyo incondicional y confianza de ellos yo no habría podido estar aquí. Les agradezco por sus enseñanzas, por sus valores, por su guía, por haberme hecho valiente, aunque muera de miedo por dentro, por haberme enseñado a confiar en mí, por estar siempre para mí y hacer todos los esfuerzos por sacarme adelante, por todo el amor y todo el cariño. Los amo y esto va por ustedes.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

1. Introducción	1
1.1. Tricomoniasis	1
1.2. Tricomoniasis en México	2
1.3. Características de <i>Trichomonas vaginalis</i>	4
1.4. Cisteína proteinasas (CPs) de <i>T. vaginalis</i>	6
1.5. Mecanismos de patogenicidad de <i>T. vaginalis</i> y el papel de las cisteína proteinasas	8
1.5.1. Citoadherencia	8
1.5.2. Hemólisis	9
1.5.3. Citotoxicidad	9
1.5.4. Apoptosis	10
1.5.5. Evasión de la respuesta inmune	11
1.6. Factores ambientales que regulan mecanismos de patogenicidad	12
1.7. Transcripción de genes en <i>T. vaginalis</i>	14
1.7.1. Regulación transcripcional por hierro	15
1.7.2. Regulación postranscripcional por hierro	16

1.7.2.1. Sistema IRE/IRP como un mecanismo de regulación de la expresión de genes	16
1.7.2.2. Poliadenilación del mRNA como un mecanismo de regulación de la expresión génica	19
1.7.2.3. Mecanismo de poliadenilación alternativa	23
1.7.2.4. Maquinaria de poliadenilación en protozoarios	24
1.7.2.4.1. Poliadenilación en <i>T. vaginalis</i>	26
1.8. Antecedentes directos	28
2. Justificación	39
3. Hipótesis	39
4. Objetivo General	40
5. Objetivos Particulares	40
6. Estrategia General	41
7. Materiales y Métodos	42
7.1. Cultivo de parásitos en distintas condiciones de hierro	42
7.2. Cultivo de células HeLa en monocapas confluentes	42
7.3. Purificación de IgGs del suero anti-TvCP2r	43
7.4. Ensayo de interacción de parásitos crecidos en restricción de hierro para determinar la inducción de apoptosis a células HeLa	43

7.4.1. Ensayo de Anexina V-FITC para determinar inducción de apoptosis a células HeLa	44
7.4.2. Ensayo de escalera para identificar fragmentación de DNA	45
7.4.3. Ensayo de TUNEL para determinar inducción de apoptosis a células HeLa por fragmentación de DNA	46
7.5. Análisis bioinformático de las regiones regulatorias 5´- y 3´- del gen <i>tvcp2</i>	47
7.6. Extracción de RNA, síntesis de cDNA y ensayos de RT-PCR en presencia y ausencia de actinomicina D	49
7.6.1. Extracción de RNA total	49
7.6.2. Tratamiento con DNAsa I	50
7.6.3. Retrotranscripción	50
7.6.4. Amplificación por PCR del gen <i>tvcp2</i> y de las regiones regulatorias 5´- y 3´- <i>tvcp2</i>	51
7.7. Ensayo de RACE-3´ (“Rapid Amplification of cDNA Ends”) con RNA de parásitos crecidos en diferentes condiciones de hierro	54
7.8. Determinación de la vida media del mRNA del gen <i>tvcp2</i> en diferentes condiciones de hierro	55
7.9. Extracción de DNA plasmídico por método CTAB	56
7.10. Análisis <i>in silico</i> de la maquinaria de poliadenilación de <i>T. vaginalis</i>	57

7.10.1. Análisis <i>in silico</i> de ESTs, transcriptomas y proteomas reportados para identificar componentes putativos de la maquinaria de poliadenilación de <i>T. vaginalis</i>	57
7.10.2. Diseño de oligonucleótidos, PCR punto final y semicuantitativa para cada uno de los componentes putativos de la maquinaria de poliadenilación de <i>T. vaginalis</i>	58
7.10.3. Extractos citoplásmicos y nucleares de <i>T. vaginalis</i> para la identificación de los componentes de la maquinaria de poliadenilación de Tv por MS/MS	59
8. Resultados	61
8.1. Participación de TvCP2 en la inducción de apoptosis a células HeLa en condición de RH	61
8.2. Identificación <i>in silico</i> de posibles secuencias regulatorias en las regiones 5´- y 3´- del gen <i>tvcp2</i>	72
8.3. Vida media del mRNA <i>tvcp2</i> y el sitio de corte para poliadenilación en diferentes condiciones de hierro	78
8.4. Identificación <i>in silico</i> de la maquinaria de poliadenilación en <i>T. vaginalis</i> y su posible regulación por hierro	94
8.5. Analizar el efecto del hierro en la expresión de los componentes de la maquinaria de poliadenilación de <i>T. vaginalis</i> y su identificación por proteómica en extractos nucleares	101
9. Discusión	114

10. Sumario	130
11. Conclusiones	131
12. Modelo de funcionamiento de la maquinaria de poliadenilación en restricción y alto hierro	132
13. Perspectivas	134
14. Referencias	136
APÉNDICE	156

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia de la tricomoniasis en México	3
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Trichomonas vaginalis</i>	5
Figura 3. Procesamiento de las cisteína proteinasas del clan CA	7
Figura 4. Regulación coordinada dependiente de hierro de la expresión de los mRNA de ferritina (fer) y receptor de transferrina (TfR1) por interacciones IRE/IRP	17
Figura 5. Maquinaria de poliadenilación en mamíferos	21
Figura 6. Modelo de la maquinaria de procesamiento 3' de los pre-mRNA de <i>Entamoeba histolytica</i>	25
Figura 7. Esquema comparativo de las señales de procesamiento de la región 3'-UTR en animales, levaduras y <i>T. vaginalis</i>	27
Figura 8. Comparación de estructuras secundarias de elementos IRE atípicos de <i>T. vaginalis</i>	29
Figura 9. Identificación de proteínas de unión a RNA atípicos de <i>Trichomonas vaginalis</i>	32
Figura 10. Efecto del hierro en la expresión del gen <i>tvcp2</i>	33
Figura 11. Efecto del hierro sobre la cantidad de proteína TvCP2 en extractos totales de proteínas	34

Figura 12. Localización subcelular de TvCP2 en diferentes concentraciones de hierro	36
Figura 13. Inhibición de la citotoxicidad en condiciones de RH	37
Figura 14. Contexto genómico de <i>tvcp2</i>	48
Figura 15. Ensayo de Anexina V-FITC para demostrar la participación de TvCP2 en la inducción de apoptosis a células HeLa por parásitos en RH	62
Figura 16. Ensayo de escalera de DNA	66
Figura 17. Ensayo de TUNEL	69
Figura 18. Análisis <i>in silico</i> de la región regulatoria 5´- <i>tvcp2</i> para determinar sitios de unión de factores de transcripción	73
Figura 19. Análisis <i>in silico</i> de la región regulatoria 3´-<i>tvcp2</i> para buscar estructuras tallo-burbuja en la 3'-UTR	75
Figura 20. Expresión de <i>tvcp2</i> en RH y AH por qRT-PCR	79
Figura 21. Estabilidad y vida media del mRNA <i>tvcp2</i> en condiciones de RH y AH	81
Figura 22. Análisis <i>in silico</i> de la región regulatoria 3´-<i>tvcp2</i> para determinar la señal de poliadenilación	83
Figura 23. Oligonucleótidos específicos para el ensayo RACE-3	87
Figura 24. Ensayo de RACE-3´ para los mRNA de <i>tvcp2</i>	88

Figura 25. Análisis de las colonias obtenidas de la ligación del producto de PCR del ensayo RACE-3´	90
Figura 26. Análisis por restricción con la enzima <i>EcoRI</i> del DNA plasmídico de las clonas obtenidas del ensayo RACE 3´	91
Figura 27. Alineamiento de la secuencia de los amplicones obtenidos en el ensayo RACE-3´ para <i>tvcp2</i> en RH y AH	93
Figura 28. Modelo de la maquinaria de poliadenilación en humano y <i>Entamoeba histolytica</i>	96
Figura 29. Comparación de la maquinaria de poliadenilación de <i>T. vaginalis</i> comparada con la maquinaria de poliadenilación de otros organismos mediante análisis <i>in silico</i>	98
Figura 30. Comparación de la maquinaria de poliadenilación de <i>T. vaginalis</i> contra la maquinaria de poliadenilación en humano	100
Figura 31. Amplificación por RT-PCR punto final de la maquinaria de poliadenilación de <i>T. vaginalis</i>	102
Figura 32. Proteoma nuclear en RH	105
Figura 33. Clasificación funcional de las proteínas nucleares identificadas por MS/MS en extractos nucleares de parásitos crecidos en RH	107
Figura 34. Proteoma nuclear en AH	108
Figura 35. Clasificación funcional de las proteínas nucleares de parásitos cultivados en AH	110

Figura 36. Comparación de los proteomas nucleares de parásitos cultivados en RH y AH 111

Figura 37. Análisis de las señales de poliadenilación presentes en el mRNA *tvcp2* comparada con la secuencia canónica de la señal de poliadenilación en eucariotes superiores 126

Figura 38. Modelo del funcionamiento hipotético de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis* en el procesamiento del mRNA *tvcp2* en condiciones de RH y AH 132

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar componentes de la maquinaria de poliadenilación de <i>T. vaginalis</i>	53
Tabla 2. Determinación de señales de localización nuclear en las proteínas componentes de la maquinaria de poliadenilación de <i>T. vaginalis</i>	112
Tabla 3. Componentes de la maquinaria de poliadenilación de <i>T. vaginalis</i> identificados en el genoma	156
Tabla 4. Componentes de la maquinaria de poliadenilación de <i>T. vaginalis</i> identificados a nivel de transcrito	157
Tabla 5. Componentes de la maquinaria de poliadenilación de <i>T. vaginalis</i> identificados a nivel de proteína	158
Tabla 6. Proteínas asignadas identificadas por espectrometría de masas a partir del extracto nuclear de parásitos cultivados en restricción de hierro	159
Tabla 7. Proteínas asignadas identificadas por espectrometría de masas a partir del extracto nuclear de parásitos cultivados en alto hierro	168
Tabla 8. Proteínas no caracterizadas identificadas por espectrometría de masas a partir del extracto nuclear de parásitos cultivados en restricción de hierro	180
Tabla 9. Proteínas no caracterizadas identificadas por espectrometría de masas a partir del extracto nuclear de parásitos cultivados en alto hierro	184

LISTA DE ABREVIATURAS

aa: Aminoácidos

ACT: Actina

ACTN2: Actinina 2

ACTN3: Actinina 3

AH: Alto hierro

ATP: Adenosina trifosfato

BLAST: Herramienta Básica de búsqueda de alineación local (“Basic Local for Alignment Search Tool”)

CBB: Azul Brillante de Coomassie

CFI: Factor de corte I (Cleavage Factor I)

CFII: Factor de corte II (Cleavage Factor II)

CP: Cisteína proteinasa

CPSF: Factor de estimulación y corte para poliadenilación (Cleavage for Polyadenylation and Stimulation Factor)

CstF: Factor de estimulación de corte (Cleavage stimulation factor)

DAPI: Diaminofenilindol

DEPC: Dietilpirocarbonato

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNAg: DNA genómico

DPC: Contraste diferencial de fases

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

EST: “Expressed Sequence Tags”

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

GSP: Oligonucleótido específico de gen

IgG: Inmunoglobulina G

Inr: Elemento iniciador de la transcripción

IRE: “Iron responsive element”

IRP: “Iron regulatory protein”

LB: “Luria Broth”

Mb: Megabase

mRNA: RNA mensajero

MS/MS: Espectrometría de masas

NC: Nitrocelulosa

nt: Nucleótido

PAP: Poli (A) polimerasa

PBS: Amortiguador salino de fosfatos

PFO: Piruvato:Ferredoxin Oxidoreductasa

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RACE: Amplificación rápida de terminaciones de cDNA (Rapid Amplification of cDNA Ends)

RH: Restricción de hierro

RNA: Ácido ribonucleico

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción

SBA: Suero de bovino adulto

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida/dodecilsulfato de sodio

SP: Suero preinmune

TA: Temperatura ambiente

TCA: Ácido tricloroacético

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labelling

TYM: Medio Triptona, extracto de levadura y maltosa

VEC: Células epiteliales vaginales

WB: Western Blot

3'-UTR: Región no traducida 3'

5'-UTR: Región no traducida 5'

RESUMEN

Trichomonas vaginalis es el protozoario parásito responsable de la tricomoniasis en humanos; la infección de transmisión sexual, no viral, más común en el mundo. Este parásito tiene un degradoma abundante integrado en su mayoría por cisteína proteinasas (CPs). Algunas de estas CPs son factores de virulencia diferencialmente modulados por hierro al nivel transcripcional y posttranscripcional. La TvCP2 es una CP regulada negativamente por hierro que participa en la citotoxicidad hacia células HeLa. En este trabajo se determinó que la citotoxicidad hacia células HeLa es debido a la inducción de apoptosis que es un evento multifactorial en el que participa TvCP2. Debido a la relevancia que tiene la condición de bajo hierro en la patogenia de tricomonas y la participación de TvCP2, se hicieron análisis *in silico* de las regiones regulatorias 5' y 3' de *tvcp2* en busca de elementos regulatorios. Los resultados muestran un posible elemento tallo-burbuja y dos señales de poliadenilación en la región 3'-UTR del transcrito de *tvcp2*. Al hacer el análisis de RACE-3' se encontró que, dependiendo de las concentraciones de hierro en el cultivo, ambas señales de poliadenilación son utilizadas, en un posible proceso de poliadenilación alternativa, lo que resulta en una región 3'-UTR más larga en la condición de RH que en AH. A consecuencia de esto, los transcritos de *tvcp2* son más estables y generan una mayor traducción obteniéndose una mayor cantidad de proteína TvCP2. Para elucidar el mecanismo de regulación posttranscripcional mediante un posible mecanismo de poliadenilación alternativa mediada por hierro, se buscaron genes candidatos de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis*, no descrita a la fecha, por análisis *in silico* en la base de datos del genoma y de ESTs, y por análisis de transcriptomas y proteomas reportados en la literatura. Nuestros resultados muestran la presencia y expresión de

los elementos mínimos necesarios de la maquinaria de poliadenilación en *T. vaginalis* y presentan una regulación positiva por hierro a nivel de transcrito. Estos datos sugieren la presencia de un nuevo mecanismo de regulación por hierro de *tvcp2* a nivel posttranscripcional mediado por una poliadenilación alternativa en *T. vaginalis*.

ABSTRACT

Trichomonas vaginalis is a protozoan parasite responsible of human trichomoniasis, the most common, non-viral, sexually transmitted infection. This parasite has a large degradome, at least half of them are cysteine proteinases (CPs). Some of these CPs are virulence factors, which are differentially modulated by iron at transcriptional and posttranscriptional levels. One of these CPs is TvCP2, an iron down-regulated CP that plays an important role in the cytotoxicity towards HeLa cells. We determined that the cytotoxicity towards HeLa cells is due to apoptosis induction in which TvCP2 is participating. Due to the biological relevance of iron-restriction conditions in the parasite pathogenicity and the role of TvCP2 in it, we performed an *in silico* analysis of the 3' and 5' regulatory regions in the search of regulatory elements. We identified the presence of a putative stem-loop structure and two polyadenylation signals in the 3'-UTR of *tvcp2* transcripts. By 3'-RACE assays using cDNA from IR and HI parasites, the results revealed that both polyadenylation signals are used by the parasite depending of the iron concentrations in culture, suggesting a possible alternative polyadenylation process in the *tvcp2* transcripts, resulting in a longer 3'-UTR region in IR than in HI conditions. Thus, the *tvcp2* transcripts are more stable and a high translation rate resulting in an increase in the amount of TvCP2 protein. To elucidate the possible mechanism of regulation, by an *in silico* analysis candidate genes for the polyadenylation machinery, not described yet, were searched in the *T. vaginalis* genome database, supported by EST analysis, and analysis of previously reported transcriptomic and proteomic data. Our results showed the presence of the basic elements for the

polyadenylation machinery in *T. vaginalis* and might have a positive regulation by iron at mRNA level. These data suggest that the *tvcp2* iron regulation is related to a novel putative posttranscriptional mechanism mediated by an alternative polyadenylation in *T. vaginalis*.

1. Introducción

Trichomonas vaginalis es el agente causal de la tricomoniasis, la infección de transmisión sexual no viral más común en el mundo (Poole y col., 2013; Chang y col., 2016). Cada año se presentan más de 250 millones de nuevos casos a nivel mundial (WHO, 2012), de los cuales más del 80% son asintomáticos. Sin embargo, en algunas personas los síntomas pueden aparecer semanas o meses después de la infección inicial (Chang y col., 2016; Lord y col., 2016; WHO, 2012). La tasa de infección varía dependiendo de diferentes variables como los cuidados de la salud, estatus cultural, estado socioeconómico y promiscuidad del individuo (Hezarjaribi y col., 2015). Es importante destacar que el reporte al Sistema de Vigilancia Epidemiológica de nuevos casos de tricomoniasis no es obligatorio (no está bajo vigilancia epidemiológica en todo el mundo, incluyendo México), por lo que estos datos se encuentran subestimados, aunado al alto porcentaje (~80%) de pacientes asintomáticos.

1.1. Tricomoniasis

Las mujeres con infección por *T. vaginalis* presentan sintomatología variable, que empeora durante el ciclo menstrual (vaginitis, ardor, mal olor y descarga vaginal abundante, espumosa, verde-amarillenta) debido a la intensa infiltración leucocitaria (Menezes y col., 2016). En hombres, la infección por tricomonas generalmente se autolimita posiblemente por las concentraciones de zinc (>1.6 mM) en las secreciones prostáticas y seminales que tienen efecto tricomicida (Gimenes y col., 2014; Figueroa-Angulo y col., 2012).

La infección se ha asociado con serias complicaciones de salud como enfermedad pélvica atípica, partos prematuros, infertilidad, desarrollo de cáncer cérvico-uterino y prostático (Nazari y col., 2015; Brum-Vieira y col., 2015; Sutcliffe y col., 2006.), así como incremento en el riesgo de coinfección con el virus del VIH y de su transmisión (Kissinger, 2015).

1.2. Tricomoniasis en México

El Boletín Epidemiológico de la Secretaría de Salud en México, correspondiente a la semana 52 (29 de diciembre de 2019 al 4 de enero de 2020) incluye a las enfermedades de transmisión sexual más importantes en México y la tricomoniasis urogenital se ubica como la 3° causa, detrás de la candidiasis urogenital y la vulvovaginitis bacteriana, con 38 761 casos, mientras que el número de casos en la misma semana del 2018 fue de 43 204 y en el 2000 se registraron poco más de 200 000 casos nuevos (Figura 1). Esto representa una disminución relevante en la incidencia de la infección con el paso de los años, lo cual pudiera deberse a las medidas de prevención adoptadas por la epidemia del VIH/SIDA, como el uso de condón. Los estados con mayor tasa de incidencia fueron Veracruz, Puebla y Estado de México, concentrando poco más del 40% de los nuevos casos a nivel nacional.

Casos nuevos de tricomonosis en el periodo 2000-2019

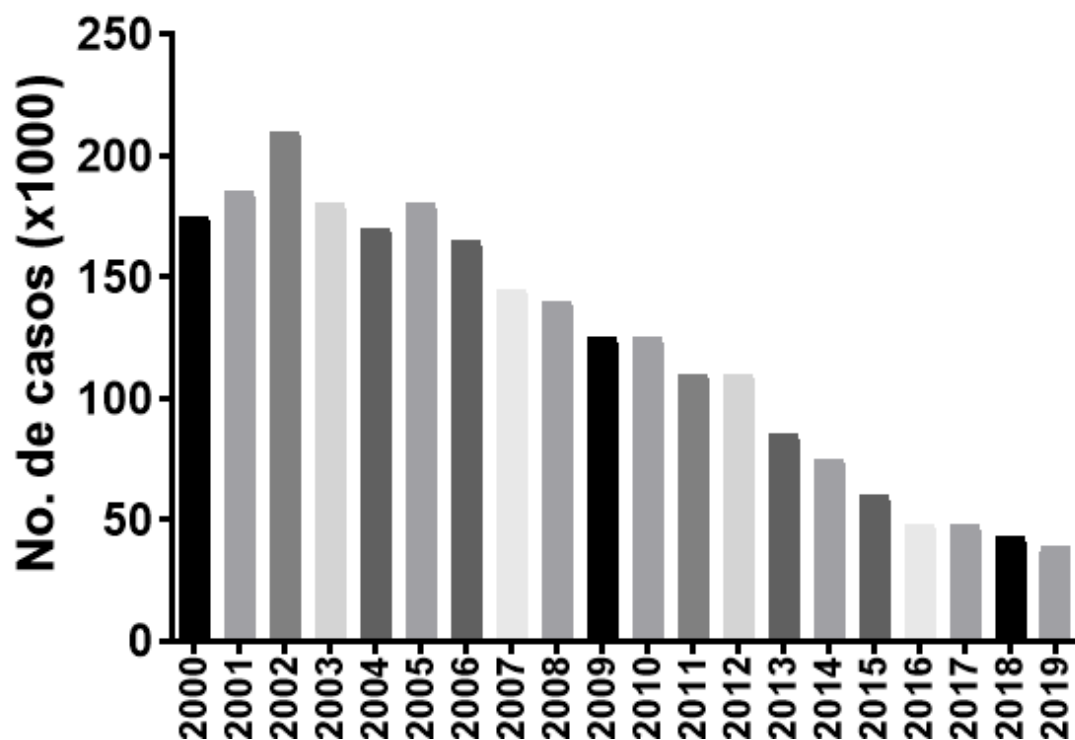


Figura 1. Incidencia de tricomoniasis en México. Estadística reportada desde el año 2000 hasta el 2019. (Modificado del Boletín Epidemiológico del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud).

1.3. Características de *T. vaginalis*

T. vaginalis es un protozooario parásito con un ciclo de vida muy simple comparado con otros protozoarios parásitos, ya que solo tiene un hospedero, que es el humano (Figura 2), que presenta una forma oval o redondeada (Doxtader y col., 2016), dependiendo de las condiciones de cultivo líquido *in vitro*. Sin embargo, en contacto con el epitelio vaginal sufre un drástico cambio, de una morfología oval a una ameboide, que utiliza para adherirse mejor al epitelio vaginal (Arroyo y col., 1993; 2015) y evitar ser eliminada en las secreciones vaginales. Este parásito presenta un solo núcleo y abundantes gránulos citoplásmicos, tiene 5 flagelos, uno de los cuales se encuentra adosado a la membrana ondulante, los cuales le dan al parásito su movilidad característica junto con el axostilo. Este parásito se reproduce por fisión binaria longitudinal, presenta dos estadios, pseudoquiste y trofozoíto. El nicho que coloniza es el tracto urogenital del humano (Nadler y col., 1988; Mielckzarek y col., 2016).

La principal fuente de nutrientes para la generación de energía en *T. vaginalis* son los carbohidratos que se metabolizan a través de un proceso fermentativo bajo condiciones aerobias o anaerobias (microaerofílicas). Los productos resultantes del metabolismo de carbohidratos además de adenosina trifosfato (ATP) incluyen acetato, lactato, malato, glicerol, H₂ y CO₂, si se mantiene al parásito en condiciones de anaerobiosis (Steinbüchel y Muller, 1986). En restricción de carbohidratos, los aminoácidos juegan un papel crucial en el mantenimiento del crecimiento y la supervivencia de *T. vaginalis* (Yoon y col., 1991), lo que se confirmó mediante un

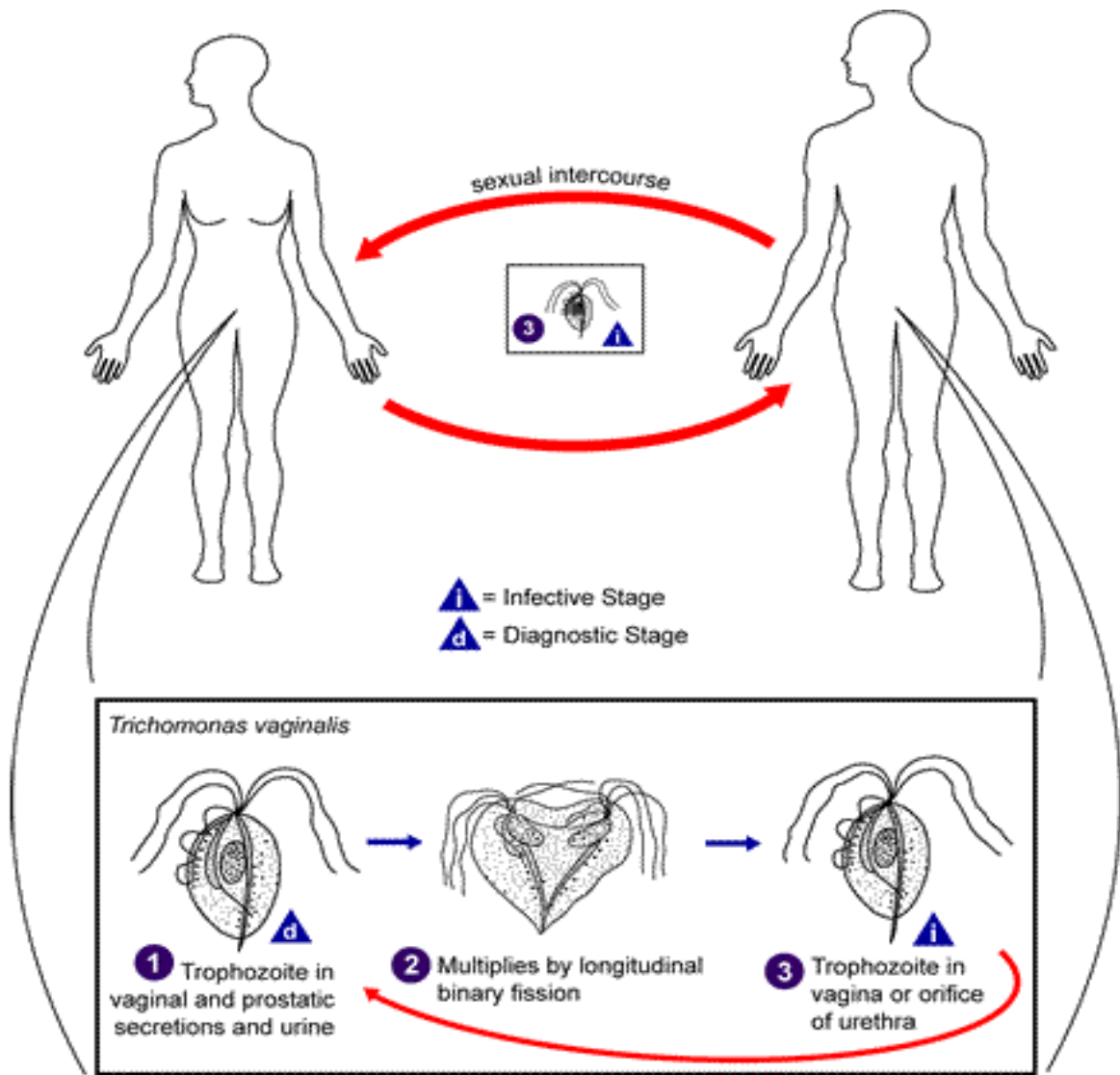


Figura 2. Ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis*. En el esquema se representa el ciclo de vida del parásito, el estadio de trofozoíto y la reproducción por fisión binaria longitudinal. (Tomado de <http://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/>).

análisis transcriptómico de parásitos crecidos en restricción y alta glucosa (Huang y col., 2014).

1.4. Cisteína proteinasas (CPs) de *T. vaginalis*

Las proteinasas, también llamadas proteasas, son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos (Sajid y col., 2002), se clasifican de acuerdo con el aminoácido que se encuentra en el sitio catalítico como: cisteína, serina, treonina, ácido glutámico, ácido aspártico y metaloproteasas (Rawlings y col., 2014).

T. vaginalis presenta uno de los degradomas más grande entre los protozoarios. De acuerdo con el reporte del genoma de *T. vaginalis*, este parásito presenta más de 440 genes que codifican para proteasas, de los cuales 220 corresponden a proteasas del tipo cisteína (CPs) (Carlton y col., 2007). Sin embargo, solo 23 se han detectado por zimografía en doble dimensión, las cuales al realizar la identificación por espectrometría de masas solo corresponden a nueve productos génicos diferentes (Neale y col., 1990; Ramón-Luing y col., 2010).

Las CPs están subdivididas en familias de acuerdo con la similitud de secuencia que guardan entre ellas y a la especificidad de la degradación de pequeños sustratos peptídicos. Estas proteasas se agrupan en clanes (CA, CD, CE, CF, CL, CM, CN, CO, CP, CQ) que comparten un ancestro en común. En *T. vaginalis* los clanes más comunes con un mayor nivel de expresión son el CA y el CD, nombrados comúnmente como de tipo papaína y de tipo legumaína, respectivamente debido a la alta homología en la secuencia que guardan con las

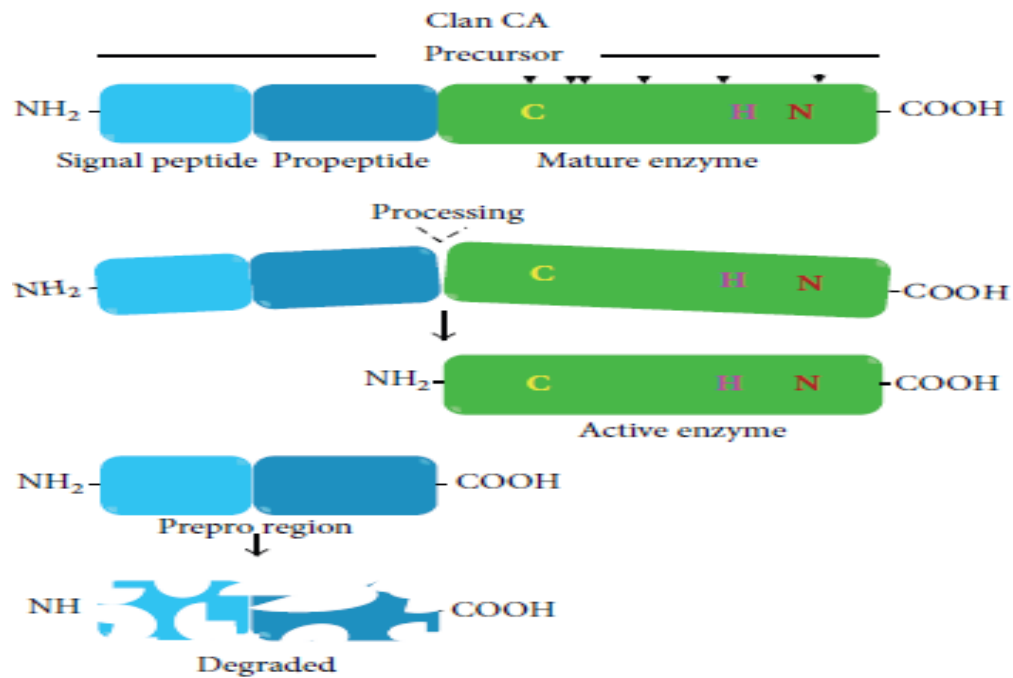


Figura 3. Procesamiento de las cisteína proteinasas del clan CA. En este esquema se muestra el procesamiento necesario para la activación de las CPs del clan CA o del tipo papaína (Tomado de Arroyo y col., 2015).

proteasas presentes en *Carica papaya* y en *Canavalia ensiformis* (una leguminosa), respectivamente.

Las CPs de tipo papaína (o clan CA) se sintetizan como precursores o zimógenos que carecen de actividad proteolítica y requieren de un procesamiento para adquirir la función catalítica en su forma madura. Estas proteasas presentan en su secuencia tres regiones definidas: “pre” (que en algunas proteasas presenta un péptido señal), propéptido o “pro” y la secuencia de la enzima madura. Para activarse se necesita que se remuevan las regiones “prepro”, dejando la región de la enzima madura activa (Figura 3; Arroyo y col., 2015).

1.5. Mecanismos de patogenicidad de *T. vaginalis* y el papel de las cisteína proteinasas

1.5.1. Citoadherencia

T. vaginalis utiliza varios mecanismos de patogenicidad para establecer y mantener una infección activa; de manera inicial, la citoadherencia a las células epiteliales vaginales es crucial para el inicio de la infección. El parásito se adhiere a la mucosa vaginal o cervical (Lehker y col., 2000), cambia drásticamente su morfología hacia una forma ameboide (Arroyo y col., 1993), expresa múltiples adhesinas (AP120, AP65, AP51, AP33 y AP23) (Arroyo y col., 1992; Moreno-Brito y col., 2005; Meza-Cervantez y col., 2011) que en conjunto con proteínas del citoesqueleto (microfilamentos y microtúbulos), glucoconjugados de matriz extracelular (Crouch y Alderete, 1999), así como lipofosfoglicano (LPG) (Bastida-Corcuera y col., 2005) y la actividad de CPs (Arroyo y Alderete, 1989) como la

TvLEGU-1 (Rendón-Gandarilla y col., 2013), le permiten al parásito mantenerse adherido al epitelio vaginal evitando ser arrastrado por el flujo vaginal (Mendoza-López y col., 2000; Hernández-Gutiérrez y col., 2004).

1.5.2. Hemólisis

La hemólisis es un mecanismo de patogenicidad que le permite a *T. vaginalis* obtener nutrientes (lípidos y hierro) presentes en los eritrocitos. Este mecanismo de patogenicidad es dependiente de contacto (Dailey y col., 1991; Fiori y col., 1993) y el nivel de actividad β -hemolítica en aislados frescos correlaciona con la sintomatología clínica (Dailey y col., 1991). En este mecanismo de patogenicidad se han reportado a varias moléculas de *T. vaginalis* entre las que se encuentran proteínas formadoras de poros, fosfolipasa A (Fiori y col., 1999; Lubick y col., 2004), así como la participación de CPs a través de un mecanismo dependiente de contacto y localización en la membrana del parásito, como la TvCP4 regulada positivamente por hierro (Solano-González y col., 2007; Cárdenas-Guerra y col., 2013).

1.5.3. Citotoxicidad

Cuando las condiciones de nutrientes son escasas en el ambiente vaginal, sobre todo de hierro y glucosa, el parásito adapta sus factores de virulencia disminuyendo la expresión de adhesinas y expresando CPs que actúan como factores de virulencia de manera dependiente o independiente de contacto. Cuando la citotoxicidad es dependiente de contacto, el resultado es fagocitosis, citólisis y destrucción de monocapas celulares (Figuroa-Angulo y col., 2012). Cuando es independiente de contacto, las CPs TvCP2, TvCP12, TvCP39 y TvCP65 se secretan

al entorno vaginal. Estas proteasas tienen afinidad a la superficie de las células cervicales y del epitelio vaginal resultando en la inducción de citotoxicidad (Hernández-Gutiérrez y col., 2004; Sommer y col., 2005; Ramón-Luing y col., 2011; Cuéllar-Silva, tesis de maestría, 2012; Rivera-Rivas y col., 2020).

1.5.4. Apoptosis

Como se mencionó anteriormente, algunas de las CPs de *T. vaginalis* contribuyen a la patogénesis del parásito al ser secretadas hacia la mucosa vaginal. Estas CPs participan en la alteración y posible degradación de uniones intercelulares (Lubick y Burgess, 2004) que llegan hasta la destrucción de las monocapas de células epiteliales vaginales (VEC) *in vitro*, ocasionando apoptosis (Sommer y col., 2005). Kummer y col., (2008) demostraron la presencia de 4 cisteína proteinasas (CP2, CP3, CP4 y CPT) en los productos de secreción, referidas como CP30 de secreción y que son reguladas negativamente por hierro a nivel de proteína y actividad proteolítica, las cuales son capaces de inducir apoptosis en cultivos primarios de células epiteliales vaginales humanas (Sommer y col., 2005). El nivel de destrucción de las células hospederas se correlaciona directamente con la actividad enzimática de la CP30 de secreción (Kummer y col., 2008). Recientemente, en el laboratorio se caracterizó la participación de TvCP2 en citotoxicidad en condiciones de restricción de glucosa mediante la inducción de apoptosis a monocapas de células HeLa (Miranda-Ozuna y col., 2019).

1.5.5. Evasión de la respuesta inmune

Durante la infección por *T. vaginalis*, el parásito se enfrenta a cambios cíclicos y drásticos en el microambiente vaginal, por lo que evolutivamente ha desarrollado estrategias para su defensa y para evadir la respuesta inmune del hospedero. A la fecha, se han descrito múltiples mecanismos de evasión de la respuesta inmune: a) Degradación de inmunoglobulinas por CPs como la TvCP39 que se involucra en la degradación de IgA, IgG e IgM (Hernández-Gutiérrez y col., 2004). b) Mimetismo molecular, que ocurre por el recubrimiento de la membrana del parásito con proteínas que guardan homología con proteínas del hospedero; tal es el caso de algunas adhesinas (AP65, AP51 y AP33) que muestran homología con enzimas metabólicas como la enzima málica y la succinil-CoA sintetasa, en sus subunidades β y α , respectivamente. Con esta protección, el parásito evita ser reconocido como un agente extraño por el sistema inmune del hospedero (Figueroa-Angulo y col., 2012). c) Degradación del complemento, una de las vías más eficaces en la eliminación de parásitos. A este respecto, *T. vaginalis* ha desarrollado resistencia al complemento mediada por una CP regulada positivamente por hierro que degrada al componente C3b del complemento (Alderete y col., 1995; Lehker y col., 2000); sin embargo, aún no se ha identificado a la CP responsable de esta actividad. d) Variación antigénica en la superficie del parásito que puede ayudar a tricomonas a escapar del sistema inmune y sobrevivir en el hospedero (Alderete, 1988). Además, *T. vaginalis* puede recubrirse con moléculas del hospedero, como albúmina para no ser reconocido por el sistema inmune (Figueroa-Angulo y col., 2012).

1.6. Factores ambientales que regulan los mecanismos de patogenicidad

El **hierro** es un catión divalente que juega un papel relevante en la fisiología y morfología de *T. vaginalis*, debido a que es esencial en su supervivencia, metabolismo y multiplicación en cultivo. El requerimiento de hierro en su forma ferrosa es alto (250-300 μ M) (Gorrell, 1985; Lehker y col., 1992; Ortíz-Estrada y col., 2015). El hierro actúa como un factor modulador de mecanismos de patogenicidad conocidos y algunos otros aún por conocer. De manera inicial, el hierro induce cambios biológicos en el parásito; en alto hierro se vuelven ameboides y muy adhesivos y el crecimiento es más acelerado, mientras que los parásitos crecidos en condiciones de bajo hierro, son muy poco o nada adhesivos, su morfología es redondeada y se multiplican más lentamente. Además, la regulación de la expresión de las proteinasas cambia tanto a nivel de RNA como de proteína y de actividad proteolítica, evidenciada por cambios en los patrones proteicos dependientes de las concentraciones de hierro en las que se crecieron las tricomonas (Arroyo y col., 2015). Estos cambios afectan propiedades de virulencia como citoadherencia, hemólisis, resistencia al complemento, inducción de apoptosis en la célula blanco y citotoxicidad (Figueroa-Angulo y col., 2012).

El **zinc** es otro oligoelemento que modula la expresión de factores de virulencia en *T. vaginalis*. Las concentraciones normales de zinc en el fluido prostático fluctúan entre 4.5 y 7 mM, suficiente para tener un efecto tricomonocida que resuelve la infección (Krieger y col., 1982). Cuando las concentraciones de zinc se encuentran reducidas (<1.6 mM) en algunos pacientes el parásito logra sobrevivir (Krieger, 1995; Puente-Rivera y col., 2017). A estas concentraciones el zinc reduce

la tasa de crecimiento e induce cambios en el proteoma, expresando diferencialmente 27 proteínas (Quintas-Granados y col., 2013). Esta expresión diferencial en el proteoma de *T. vaginalis* en presencia de zinc puede jugar un papel clave en la sobrevivencia del parásito en el ambiente adverso del tracto genitourinario masculino, en comparación con el ambiente vaginal más permisivo (Figuroa-Angulo y col., 2012; Puente-Rivera y col., 2017).

Para la generación de energía y el consecuente mantenimiento de la infección crónica por *T. vaginalis*, la fuente de carbono es muy importante. La **glucosa** es el principal recurso de energía utilizando tanto en condiciones de aerobiosis como anaerobiosis, por lo cual, la restricción de glucosa es un estrés metabólico que induce la expresión de mecanismos de supervivencia, como la inducción de autofagia o citotoxicidad y la consiguiente patogenicidad (Huang y col., 2014) que se puede evidenciar mediante la expresión diferencial de CPs que participan en citotoxicidad (TvCP39, TvCP12 y TvCP2) reguladas negativamente por glucosa (Miranda-Ozuna y col., 2019).

En cultivos de *T. vaginalis* crecidos en restricción de glucosa hay disminución en la tasa de crecimiento del parásito (Miranda-Ozuna y col., 2016) y aumento en la tasa de supervivencia de los parásitos en cultivo hasta por 96 h (Huang y col., 2014). Esto muestra que la restricción de glucosa activa mecanismos de supervivencia (Huang y col., 2014). Muchas de estas respuestas se deben a cambios en la expresión de genes particulares por diversos mecanismos de regulación a nivel transcripcional y posttranscripcional y a veces hasta el nivel posttraduccional (León-

Sicairos y col., 2004; Solano-González y col., 2007; Torres-Romero y Arroyo., 2009; Arroyo y col., 2015; Sánchez-Rodríguez y col., 2018; Rivera-Rivas y col., 2020).

1.7. Transcripción de genes en *T. vaginalis*

T. vaginalis posee uno de los genomas más grandes entre los protistas parásitos, con alrededor de 160 Mb que codifican para alrededor de 46 000 proteínas (Smith y col., 2011a). Por estudios transcriptómicos se han obtenido alrededor de 100 000 secuencias expresadas (EST) en parásitos cultivados en diferentes condiciones como: diferentes fases del ciclo celular, de crecimiento, de restricción de nutrientes o de patogénesis. El análisis de estos datos sugiere que la expresión de genes está altamente regulada en el parásito por controles de transcripción rigurosos (Figueroa-Angulo y col., 2012).

Acerca de la regulación de la transcripción basal de genes en *T. vaginalis*, se conoce aún muy poco. Sin embargo, análisis del genoma del parásito predicen que más del 75% de los genes codificantes de proteínas usan un elemento iniciador (Inr) parecido al de metazoarios, como promotor basal y una secuencia altamente conservada [TCA+1Py(T/A)] en el sitio de inicio de la transcripción. Este promotor puede ser reconocido por IBP39, un factor de transcripción específico de *T. vaginalis* además de factores de transcripción generales, como TvTBP1 y TvTBP2 y que se asocian a la RNA polimerasa II (Parra-Marín y col., 2019). Usualmente, los genes que codifican para factores de virulencia presentan una o dos copias del elemento promotor Inr; el que se encuentra más distal es el funcional (Smith y col., 2011a; Smith y col., 2011b).

1.7.1. Regulación transcripcional por hierro

T. vaginalis es un parásito que tiene un alto requerimiento de hierro (250 μ M) y tiene la capacidad de adaptarse a las concentraciones cambiantes de hierro en el medio ambiente, mediante la regulación de la expresión de sus genes y de las proteínas que codifican, impactando directamente las funciones en las que participan. El primer mecanismo de regulación por hierro descrito a nivel transcripcional se identificó al caracterizar la regulación positiva por hierro del gen *ap-65* que codifica para la adhesina AP65. En este gen se identificó la presencia de un elemento de respuesta a hierro, al cual se pueden unir proteínas nucleares (factores de transcripción tipo Myb) que potencian la transcripción del gen *ap-65* en respuesta a hierro (Tsai y col., 2002). Además, se identificaron otros tres motivos de respuesta a hierro que tienen comportamientos diferenciales dependientes de las concentraciones de hierro (MRE-1, MRE-2r y MRE-2f) y a los cuales también se unen proteínas Myb (Myb1, Myb2 y Myb3), cuya localización nuclear tiene lugar debido a la acción de proteínas de la familia de las ciclofilinas (TvCyP1, TvCyP2), las cuales favorecen su importe nuclear, el cual es regulado por hierro. Una vez en este compartimento, las proteínas Myb regulan por sinergia o antagonismo debido a competencia por la unión con los elementos de respuesta a hierro provocando el incremento o decremento en los niveles de transcripción del gen *ap-65* (Ong y col., 2004; Ong y col., 2007; Hsu y col., 2009; Martin y col., 2018; Hsu y col., 2020). Sin embargo, llama la atención que este mecanismo de respuesta positiva a hierro solo se ha detectado en este gen.

1.7.2. Regulación postranscripcional por hierro

1.7.2.1. Sistema paralelo IRE/IRP como un mecanismo de regulación de la expresión de genes

Los mecanismos para el control posttranscripcional para la síntesis de proteínas generalmente están mediados por interacciones específicas RNA-proteína. En mamíferos, la homeostasis del hierro es regulada por mecanismos de regulación posttranscripcional mediados por interacciones RNA-proteína entre proteínas citoplásmicas regulatorias de hierro (IRP-1 e IRP-2) con estructuras tipo tallo-burbuja conocidas como elementos de respuesta a hierro (IREs) que se encuentran en las regiones no traducidas (UTRs) de los mRNA que codifican para proteínas involucradas en la homeostasis del hierro, reguladas por hierro y que son blancos de un mecanismo de regulación conocido como sistema IRE/IRP (Figura 4) (Wang y col., 2011; Sánchez y col., 2011). Estas interacciones RNA-proteínas tiene dos tipos de resultados: 1) Cuando las concentraciones de hierro son bajas, las IRPs se unen a los IREs y el efecto regulador depende de la posición del elemento IRE en la secuencia del mRNA blanco: Si el IRE está localizado en el 5'-UTR, la unión de la IRP inhibirá el inicio de la traducción y el nivel de la proteína caerá. Si el IRE se localiza en el 3'-UTR, la unión de la IRP protegerá al mRNA de la degradación, promoviendo una mayor estabilidad y vida media del mRNA, con lo que la traducción se verá incrementada y por tanto el nivel de proteína. 2) Cuando el hierro se encuentra en exceso, la actividad de unión a RNA de las proteínas IRP se inactiva, la IRP2 se degrada, mientras que la IRP1 se une a un complejo 4Fe-4S

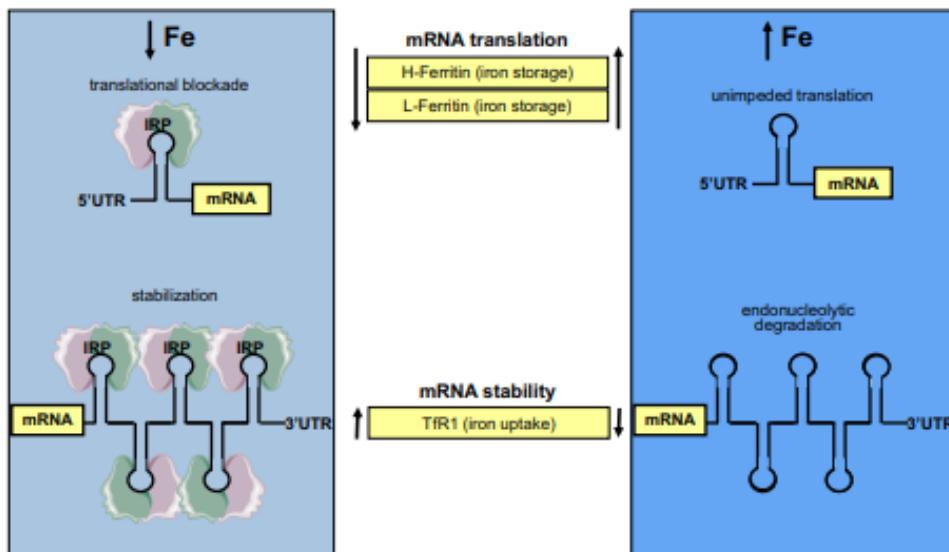


Figura 4. Regulación coordinada dependiente de hierro de la expresión de los mRNA de ferritina (fer) y receptor de transferrina (TfR1) por interacciones IRE/IRP. La restricción de hierro promueve la unión de IRPs (proteínas citosólicas) a los IRE presentes en las regiones no traducidas de los mRNA de ferritina y TfR1. Tomado de Wilkinson y Pantopoulos, 2014.

para actuar como una aconitasa citosólica activa; ya que se clasifica como una proteína multifuncional (Jeffery, 2009). Cuando las proteínas IRP no se unen a los IRE, como es el caso en el que las concentraciones de hierro son altas, para los mRNA que tienen los IRE en la región 5'-UTR su traducción no se ve impedida y esto hace que haya una mayor cantidad de proteína; mientras que en los mRNA que tienen los IRE en la región 3'-UTR su estabilidad se ve disminuida, haciendo que su vida media se acorte y por lo tanto se degraden más rápidamente y esto hace que haya una menor traducción y por lo tanto una menor cantidad de proteína (Figura 4; Wilkinson y Pantopoulos, 2014).

T. vaginalis no presenta ciclo de Krebs y por lo tanto carece de una proteína multifuncional con actividad de aconitasa (Torres-Romero y Arroyo, 2009). Sin embargo, hay dos estructuras tallo-burbuja tipo IRE atípicas identificadas y caracterizadas en los mRNA de dos CPs que participan en la virulencia de tricomonas y que se regulan diferencialmente por hierro al nivel posttranscripcional, la TvCP4 (positiva) y la TvCP12 (negativa). Además, *T. vaginalis* presenta proteínas citoplásmicas que son capaces de unir tanto a los IREs típicos de mamíferos (IRE-fer) como a los IREs atípicos de estas dos CPs de *T. vaginalis*, lo cual sugiere la existencia de un mecanismo posttranscripcional de regulación por hierro mediado por interacciones RNA-proteína, paralelo al sistema IRE/IRP de mamíferos (Solano-González y col., 2007; Torres-Romero y Arroyo, 2009; Figueroa-Angulo y col., 2015).

1.7.2.2. Poliadenilación del mRNA como un mecanismo de regulación de la expresión génica

Los extremos 3' de todos los mRNA eucariontes están poliadenilados (tienen colas de poliA). Esta modificación tiene influencia en el transporte del mRNA del núcleo al citoplasma, en la estabilidad y en la traducción del mensajero (Lewis y col., 1995; Proudfoot y col., 2002). El proceso celular de la poliadenilación involucra múltiples proteínas que actúan en el mecanismo de poliadenilación en dos pasos. El primero involucra el reconocimiento específico del sitio de corte determinado por la unión de diversos factores de poliadenilación a elementos presentes en la secuencia del 3'-UTR del mRNA, tanto proximales como distales. En mamíferos, la señal proximal es el hexanucléotido **AAUAAA** que está localizado en la región 3'-UTR del mRNA a 10-30 nucleótidos río arriba del sitio de corte para poliadenilación y la señal distal son elementos ricos en uridinas (Colgan y col., 1997). El segundo paso involucra la polimerización de la cola de adenosinas a una longitud específica, por ejemplo ~150-250 en mamíferos y ~55-90 en levaduras (Brown y col., 1998).

El sitio de corte para poliadenilación en células de mamíferos es reconocido por un **factor específico de corte y poliadenilación (CPSF**, por sus siglas en inglés) multiproteico integrado por las proteínas CPSF-100, CPSF-30, CPSF-160, CPSF-73, Fip1 y WDR33. Este complejo multiproteico recluta e interactúa con el **factor de estimulación de corte (CstF**, por sus siglas en inglés) que es otro complejo multiproteico integrado por CstF-77, CstF-50 y CstF-64. La unión de estos dos complejos multiproteicos recluta los **factores de corte (CF**, por sus siglas en inglés) que reconocen el sitio de corte y presentan actividad de endonucleasa. Estos

factores de corte están integrados por las proteínas CFI-25 y CFI-59 que representa el **factor de corte I (CFI)** y el **factor de corte II (CFII)** formado por las proteínas Pcf11 y Clp1. También participan **proteínas accesorias** como simplekina y la poli (A) “binding protein” 1 (PABPN1). Estos factores de corte interactúan con la señal de corte, ejerciendo la actividad de endonucleasa, posicionando a la **poli (A)**

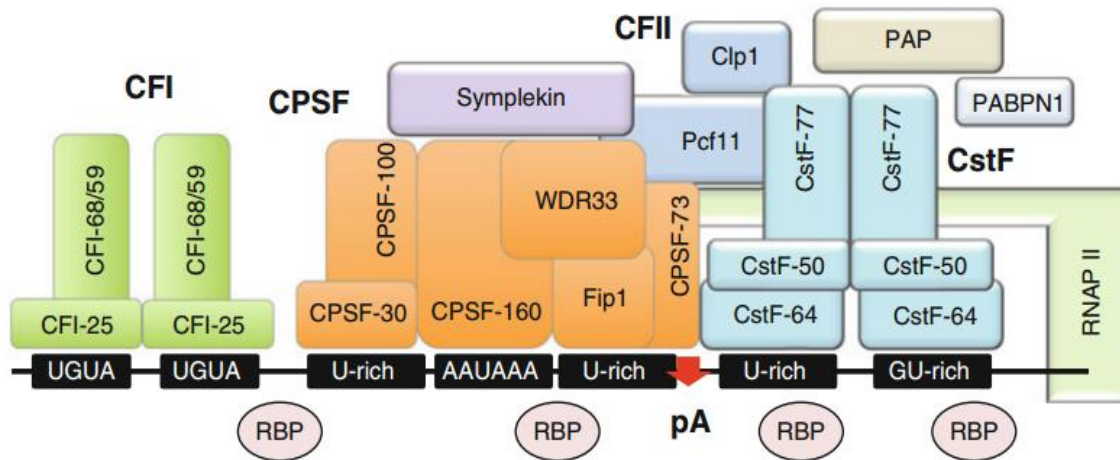


Figura 5. Maquinaria de poliadenilación en mamíferos. Las líneas negras representan el pre-mRNA (5'-3') sintetizado por la RNA polimerasa II. Las cajas negras representan los elementos en el mRNA que son reconocidos como elementos necesarios para la poliadenilación. AAUAAA representa la señal de poliadenilación y la flecha en color rojo el sitio de corte. (Tomado de Proudfoot y col., 2002).

polimerasa (PAP) para iniciar la adición de la cola de poli (A) de manera templado independiente (Colgan y col., 1997; Mandel y col., 2008; Whale y col., 1996).

La **señal de poliadenilación** es el primer elemento identificado por la maquinaria de poliadenilación (Proudfoot y Brownlee, 1976). El reconocimiento de este motivo se lleva a cabo por la proteína **CPSF-160** como parte del complejo CPSF (Di Giammartino y col., 2011), reclutando el resto de la maquinaria, siendo este reconocimiento el primer paso crucial en el mecanismo de poliadenilación. Una vez unido el complejo CPSF a la señal de poliadenilación, otra proteína de este complejo denominada **CPSF-73** reconoce el motivo consenso del **sitio de corte** y por su actividad de endonucleasa corta el pre-mRNA en este sitio. En mamíferos existe un orden de preferencia para realizar el corte el cual es el siguiente: A>U>C>>G (Chen y col., 1995), por lo que el corte puede ocurrir en varias posiciones, pero con variaciones mínimas alrededor del sitio de corte. A través de la subunidad **CstF-64**, con actividad de unión a RNA, se reconoce el **elemento distal rico en uridinas** que al reclutar al resto del complejo CstF actúa como un ancla que permite la correcta orientación de la poli (A) polimerasa (PAP) (Pérez-Canadillas y Varani, 2003), para que se inicie la adición de adeninas de manera templado-independiente. La proteína **simplekina** accesoria sirve como un **punte** **que une el complejo CPSF y el CstF**, dando estabilidad al proceso (Hoffman y col., 2016). La proteína de unión a poli (A) (PABPN1) actúa como un regulador de la longitud de la cola de poli (A) al finalizar la interacción de la PAP con el complejo CPSF, dando fin al proceso de poliadenilación (Figura 5; Kerwitz y col., 2003; Kuhn y col., 2009).

1.7.2.3. Mecanismo de poliadenilación alternativa

En numerosos organismos eucariontes se ha reportado la presencia de extremos 3'-UTR alternativos (Elkon y col., 2013; Tian y col., 2013). Esto es debido a la presencia de múltiples señales de poliadenilación alternativas en los pre-mRNAs. La poliadenilación alternativa del mismo gen puede generar diferentes proteínas o mRNAs maduros con diferentes 3'-UTRs. El principal efecto de la presencia de poliadenilación alternativa es que haya diferentes grados de **estabilidad** del mRNA, así como diferentes niveles de **eficiencia de traducción**, o que se favorezca alguna **localización subcelular** en particular (Shi, 2012). Este proceso depende de los estímulos ambientales a los que se enfrente la célula.

Dos modelos de poliadenilación alternativa se han propuesto, el primero llamado "**First come, first served**" que hace referencia a la presencia de dos señales de poliadenilación, en la cual se ve favorecido el uso de la primera señal debido a la proximidad y a que el uso de esta señal resulta en una mayor eficiencia en el alargamiento, llegando así al término de la síntesis de un mRNA en un menor tiempo. Este mecanismo de poliadenilación es el preferentemente usado cuando los organismos se encuentran en condiciones fisiológicas (Pinto y col., 2011; Yu y col., 2013).

Bajo este principio en el que se ve favorecido el uso de la primera señal de poliadenilación en condiciones fisiológicas surge la pregunta: ¿En qué momento se lleva a cabo el uso de la señal de poliadenilación distal? Para esto se ha planteado un segundo mecanismo en el cual la segunda señal de poliadenilación presenta una **mayor afinidad** por los componentes de la maquinaria (Yao y col., 2013; Lackford

y col., 2014). Esto se debe a la presencia de las señales canónicas o equivalentes de las señales de poliadenilación necesarias para llevar a cabo este proceso (Figura 5). En este mecanismo se ha mostrado que la **concentración de los componentes** de la maquinaria de poliadenilación juega un papel regulatorio muy importante. Por ejemplo, proteínas como **CstF64** (encargada de reconocer el elemento distal rico en uridinas) en el pre-mRNA IgM en células B de humano presenta baja afinidad por el elemento proximal cuando la proteína se encuentra en altas concentraciones, lo cual lleva al uso de la señal distal para el inicio de la poliadenilación (Takagaki y col., 1996; Takagaki y Manley, 1998).

1.7.2.4. Maquinaria de poliadenilación en protozoarios

En *Entamoeba histolytica* por análisis *in silico* se detectó la presencia de elementos pertenecientes a la maquinaria de procesamiento del extremo 3' de los pre- mRNA (López-Camarillo y col., 2005). En este estudio se describió que su genoma contiene 16 genes cuyos productos proteicos son homólogos a miembros de la maquinaria de poliadenilación descrita en otros organismos, entre los que se encuentran 4 subunidades del complejo protéico EhCPSF (160, 100, 73 y 30 kDa), además de las proteínas EhFIP1 y EhPAP, las tres subunidades de EhCstF (77, 64 y 50 kDa), las dos subunidades de EhCFIm (CIP1 y PCF11), así como factores accesorios como EhMpe1, EhPfs2, EhSsu72 y EhPC4. Sin embargo, no se reportó la presencia de genes homólogos a simplekina, CFIm59 y CFIm68, ni a sus

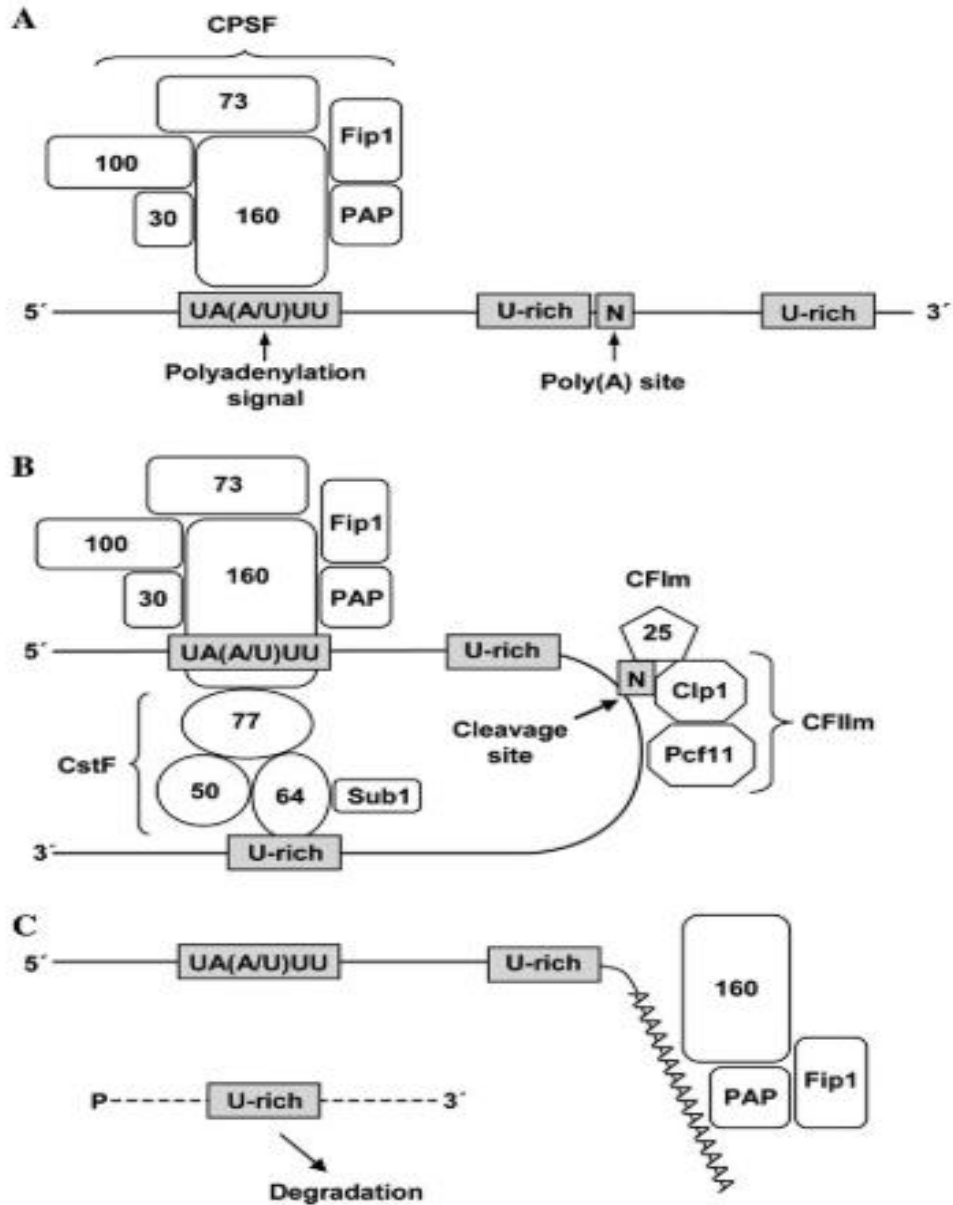


Figura 6. Modelo de la maquinaria de procesamiento 3' de los pre-mRNA de *E. histolytica*. A) Complejo CPSF unido a la señal de poliadenilación, B) Complejo CstF unido a la secuencia rica en U, C) Complejos CFIm y CFII que permiten el corte para poliadenilación. Tomado de López-Camarillo y col., 2005.

homólogos Pta1p y Hrp1p de levadura, aunque si se encontró un homólogo a CFIm25 (Figura 6; López-Camarillo y col., 2010).

1.7.2.4.1. Poliadenilación en *T. vaginalis*

La señal de poliadenilación de *T. vaginalis* consta de un tetranucleótido **UAAA** que puede o no estar sobrelapado al codón de paro UAA; a 10-30 nucleótidos río abajo se encuentra una región **rica en A** correspondiente al sitio de corte y a menos de 30 nucleótidos de distancia de ésta se encuentra el elemento distal, una secuencia **rica en U** (Figura 7; Espinosa y col., 2002; Fuentes-Barrera y col., 2012).

Sin embargo, no hay reportes acerca de las proteínas que integran la maquinaria de poliadenilación ni de la presencia de un mecanismo de poliadenilación alternativa y su posible función como elemento regulador posttranscripcional de la expresión de genes en *T. vaginalis*, ni mucho menos estar relacionada con la posible regulación diferencial por hierro.

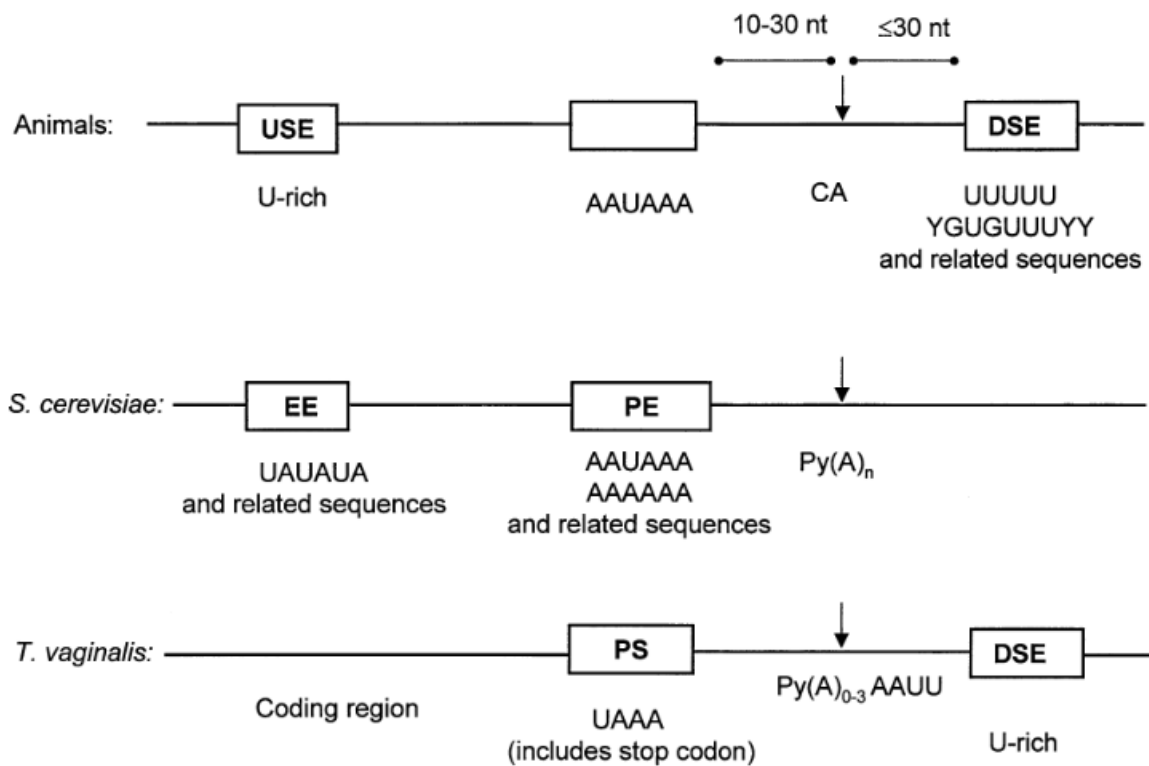


Figura 7. Esquema comparativo de las señales de procesamiento de la región 3'-UTR en animales, levaduras y *T. vaginalis*. Las posibles secuencias de los elementos regulatorios se encuentran debajo de las correspondientes cajas. Las flechas verticales indican los sitios de corte (Tomado de Espinosa y col., 2002).

1.8. Antecedentes directos

En *T. vaginalis*, se han identificado estructuras tipo IRE en mRNA de CPs que son reguladas positiva o negativamente por hierro. Tal es el caso del gen *tvcp4* regulado positivamente por hierro a nivel postranscripcional, el cual presenta una estructura tipo IRE atípica en la región 5' del mRNA. Este elemento es atípico, ya que su secuencia es diferente al IRE reportado en el gen de ferritina de humano, considerada como canónica. Sin embargo, esta estructura tiene la capacidad de unir específicamente a la IRP1 recombinante de humano, a IRPs presentes en extractos citoplásmicos de células HeLa y a proteínas citoplásmicas de *T. vaginalis* crecidas en condiciones restringidas de hierro (Solano-González y col., 2007; Calla-Choque y col., 2014; Figueroa-Angulo y col., 2015).

También se identificó al gen *tvcp12* regulado negativamente por hierro al nivel posttranscripcional. La estabilidad de su mRNA varía en función de la concentración de hierro al cual esté expuesto el parásito; su mRNA es más estable en condiciones de restricción de hierro que en alto hierro. La estructura tipo IRE identificada en la región 3'-UTR de los transcritos de *tvcp12* también es atípica, no se parece al IRE-*tvcp4* y tiene afinidad por IRPs de humano, así como por proteínas de unión a RNA citoplásmicas atípicas presentes en extractos citoplásmicos de tricomonas crecidas en bajo hierro (Figura 8; León-Sicairos y col., 2004; Torres-Romero y Arroyo, 2009; Figueroa-Angulo y col., 2015; León-Sicairos y col., 2020 en revisión).

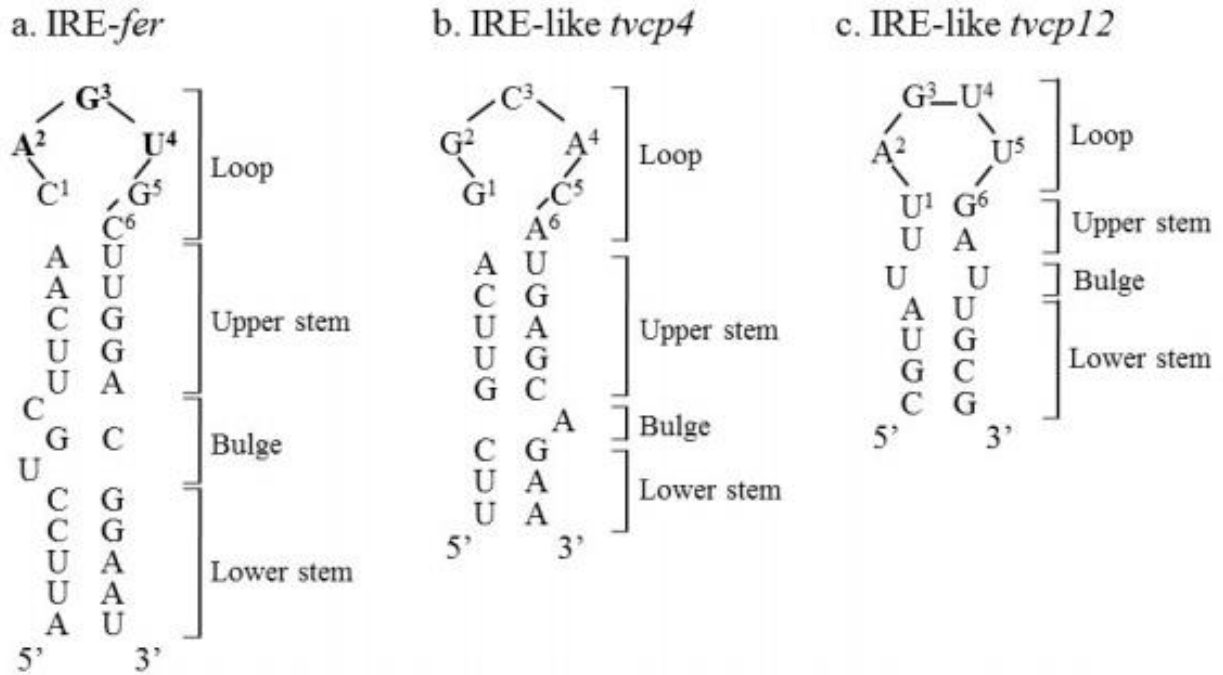


Figura 8. Comparación de estructuras secundarias de elementos IRE atípicos de *T. vaginalis* con el IRE canónico o tipo (IRE-*fer*). A) Elemento de respuesta a hierro consenso (IRE-*fer*) localizado en la región 5'-UTR del mRNA de la cadena pesada de la ferritina humana. B) Estructura de un IRE atípico de *T. vaginalis* localizado en la región 5' del mRNA *tvcp4*. C) Estructura de un IRE atípico de *T. vaginalis* localizada en la región 3'-UTR del mRNA de *tvcp12* (Tomado de Figueroa-Angulo y col., 2015).

En mamíferos, las proteínas con función de unión a estas estructuras tallo-burbuja de RNA generalmente son proteínas multifuncionales IRP o tipo aconitasa. Sin embargo, el análisis *in silico* del genoma de *T. vaginalis* revela la ausencia de genes que codifiquen para proteínas IRP o aconitasas (Carlton y col., 2007; Gorrell y col., 1985). A pesar de ello, los resultados obtenidos por ensayos funcionales de “crosslinking”, REMSA y Northwestern blot usando las sondas de IRE-*tvcp4* e IRE-*tvcp12* marcadas radiactivamente e incubadas con extractos citoplásmicos de parásitos crecidos en condiciones de alto y bajo hierro mostraron la presencia de proteínas con afinidad por RNA, de 135, 110, 60 y 45 kDa identificadas por espectrometría de masas como TvACTN3, TvACTN2, TvHSP70 y TvACT, respectivamente (Figuroa-Angulo y col., 2015). Las funciones canónicas de estas proteínas son de unión a actina, como las actininas 2 y 3 (TvACTN2 y TvACTN3), chaperona en el caso de TvHSP70 y de proteína de citoesqueleto como la actina (TvACT) (Loyevsky y col., 2001; Arroyo y col., 2015; Calla-Choque y col., 2014; Figuroa-Angulo y col., 2015).

Una de estas proteínas atípicas de unión a RNA de 135 kDa presente en los extractos citoplásmicos de tricomonas crecidas en condiciones de restricción de hierro, se identificó por MS a la actinina 3 (TvACTN3), como una proteína de unión a RNA de *T. vaginalis*. TvACTN3 puede participar en la regulación a nivel posttranscripcional por hierro mediante un sistema paralelo al sistema IRE/IRP típico, al menos en el caso de las estructuras tipo IRE ya reportadas (Torres-Romero y Arroyo, 2009; Calla-Choque y col., 2014; Figuroa-Angulo y col., 2015). La HSP70 es una proteína ubicua altamente conservada a través de la evolución. Esta proteína

tiene diversas funciones, aunque la principal es como chaperona que ayuda en el proceso de ensamblaje y correcto plegamiento de proteínas durante su maduración (Kampinga y col., 2010). En *T. vaginalis*, se encontró que la TvHSP70 citoplásmica también se une a RNA e interactúa con las estructuras tipo IRE de *tvcp4* y *tvcp12*, lo cual puede regular la expresión diferencial por hierro de estas proteasas (Figuroa-Angulo y col., 2015; Figura 9). La caracterización molecular como proteínas de unión a RNA de TvACTN2 y TvACT no se ha realizado aún. Sin embargo, se propone que las cuatro proteínas formen un complejo multiproteico que interactúa con los IREs en condiciones de bajo hierro (Figura 9 Arroyo y col., 2015; Solano-González y col., 2007; León-Sicairos y col., 2004; Figuroa-Angulo y col., 2015).

Como parte de mi trabajo de maestría, la cisteína proteinasa TvCP2 se caracterizó funcionalmente y se estudió su expresión en diferentes concentraciones de hierro en cultivo (0, 20 y 250 μ M; restricción, normal y alto, respectivamente). Por ensayos de Transcriptasa Reversa- Reacción en Cadena de la polimerasa (RT-PCR) se evaluó la expresión del gen *tvcp2* en condiciones de restricción, normal y alto hierro, encontrando mayor expresión del transcrito *tvcp2* en condiciones de restricción de hierro (Figura 10).

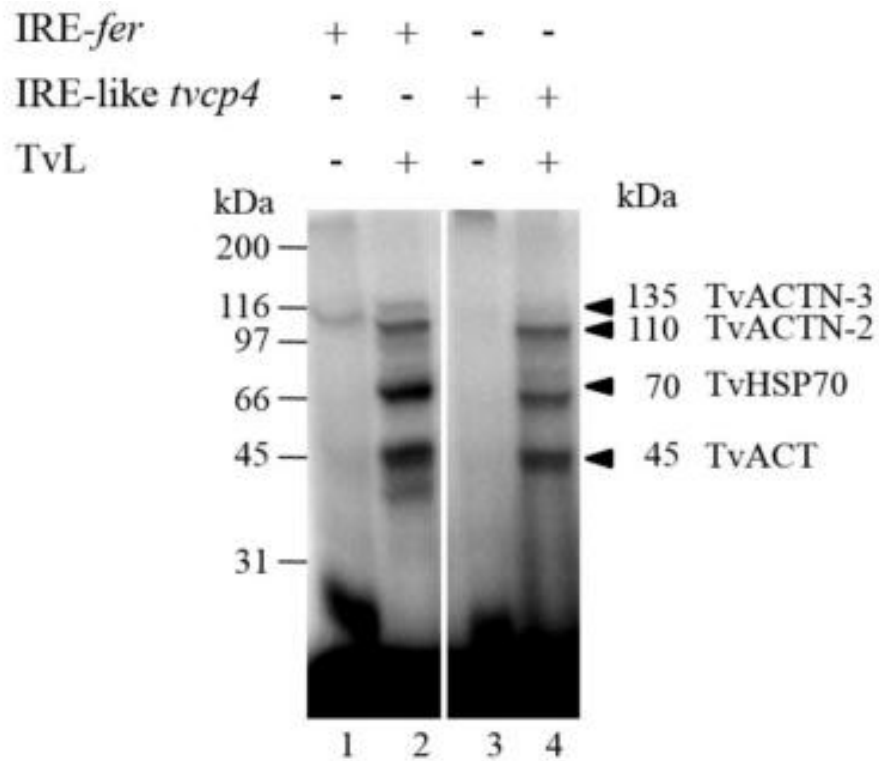


Figura 9. Identificación de proteínas de unión a RNA atípicas de *T. vaginalis*. Ensayo de “UV crosslinking” utilizando las sondas IRE-*fer* e IRE-*tvcp4* marcadas con ^{32}P , en contacto con extractos citoplásmicos de *T. vaginalis* crecidas en condiciones de restricción de hierro. Se muestran las proteínas que interactúan con RNA en estas condiciones y que fueron identificadas por MS (Tomado de Figueroa-Angulo y col., 2015).

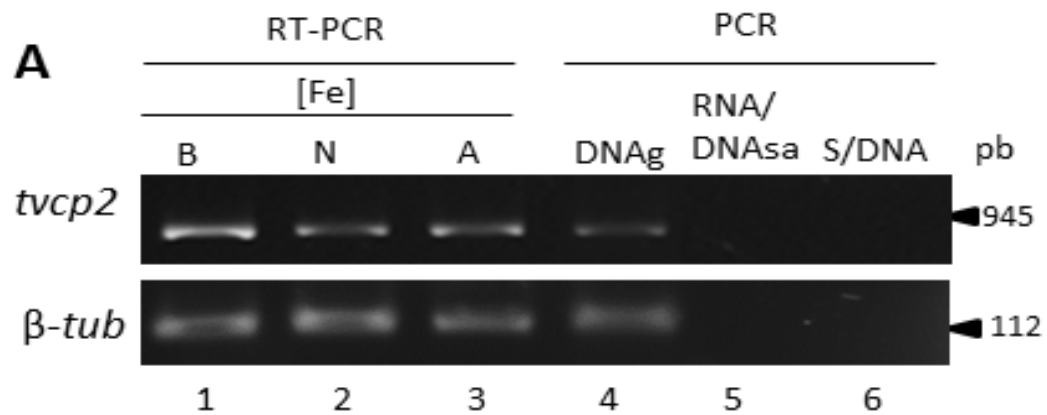


Figura 10. Efecto del hierro en la expresión del gen *tvcp2*. Ensayo de RT-PCR en el que se obtiene el amplicón de 945 pb esperado para el gen *tvcp2* en las condiciones de restricción, normal y alto hierro (B, N y A, respectivamente). El amplicón de β -tubulina se usó como control de carga. Este resultado muestra mayor expresión del gen *tvcp2* en condiciones de restricción de hierro (Tomado de Rivera-Rivas, Tesis de Maestría, 2016).

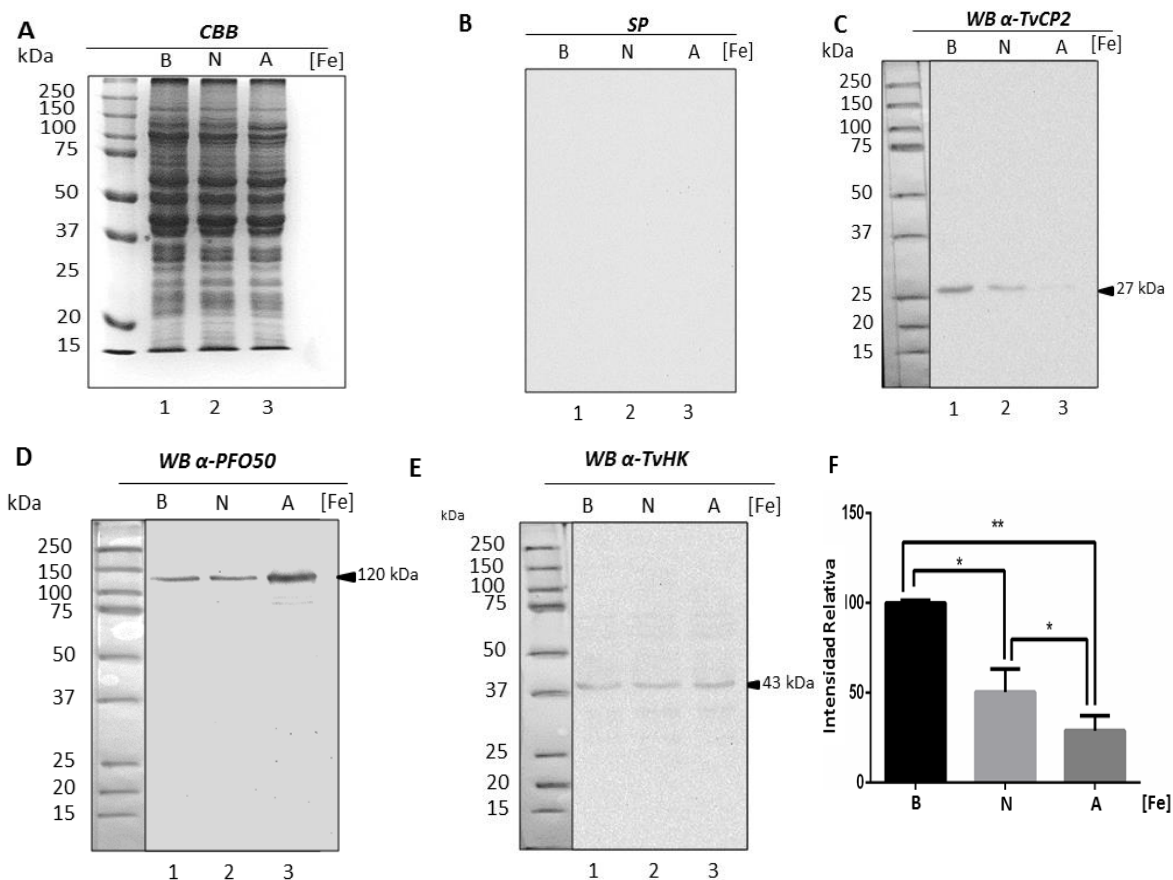


Figura 11. Efecto del hierro sobre la cantidad de proteína TvCP2 en extractos totales de proteínas. A) Perfil de proteínas de parásitos crecidos en las condiciones de restricción (B), normal (N) y alto hierro (A) en un gel de poliacrilamida al 12% teñido con Azul de Coomassie. B) Ensayo de WB con el suero preinmune (SP), como control negativo. C) Ensayo de WB con el anticuerpo α -TvCP2. D) Ensayo de WB con el anticuerpo α -TvPFO, como control de respuesta positiva a hierro. E) Ensayo de WB con el anticuerpo α -EhHK, como control de carga, ya que la cantidad de proteína TvHK no cambia por hierro. F) Análisis densitométrico de la cantidad de proteína TvCP2 en las distintas condiciones de hierro. Estos datos muestran el efecto negativo del hierro a nivel de la proteína TvCP2. (Tomado de Rivera-Rivas, Tesis de Maestría, 2016).

Por ensayos de Western Blot (WB) de proteínas provenientes de parásitos crecidos en diferentes concentraciones de hierro utilizando un anticuerpo anti-TvCP2r y extractos de proteínas totales y resistentes a proteasas, en condiciones de bajo hierro se observó que hay una mayor cantidad de proteína TvCP2 que en alto hierro (Figura 11). Estos datos son consistentes con el efecto negativo del hierro al nivel del transcrito de *tvcp2*.

Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo anti-TvCP2r mostraron la localización subcelular de TvCP2 en el parásito. La figura 12 muestra la localización de la marca de TvCP2 puntiforme en la membrana plasmática (no permeabilizados) así como en el citoplasma (permeabilizados) de los parásitos. El hierro modifica la abundancia de la marca de TvCP2. La marca puntiforme de TvCP2 en citoplasma puede corresponder a una localización lisosomal, en vesículas de secreción o a ambas.

Además, se encontró que TvCP2 participa en la inducción de citotoxicidad hacia monocapas de células HeLa. Al realizar ensayos de inhibición de la citotoxicidad con anticuerpos anti-TvCP2r, entre monocapas confluentes de células HeLa incubadas con parásitos pretratados con IgGs purificadas α -TvCP2r, se observó que el anticuerpo redujo la destrucción de la monocapa por las tricomonas tratadas con el anticuerpo inmune de manera concentración-dependiente, llegando a una inhibición de la citotoxicidad de alrededor de 55% con 300 μ g/ml de IgG α -

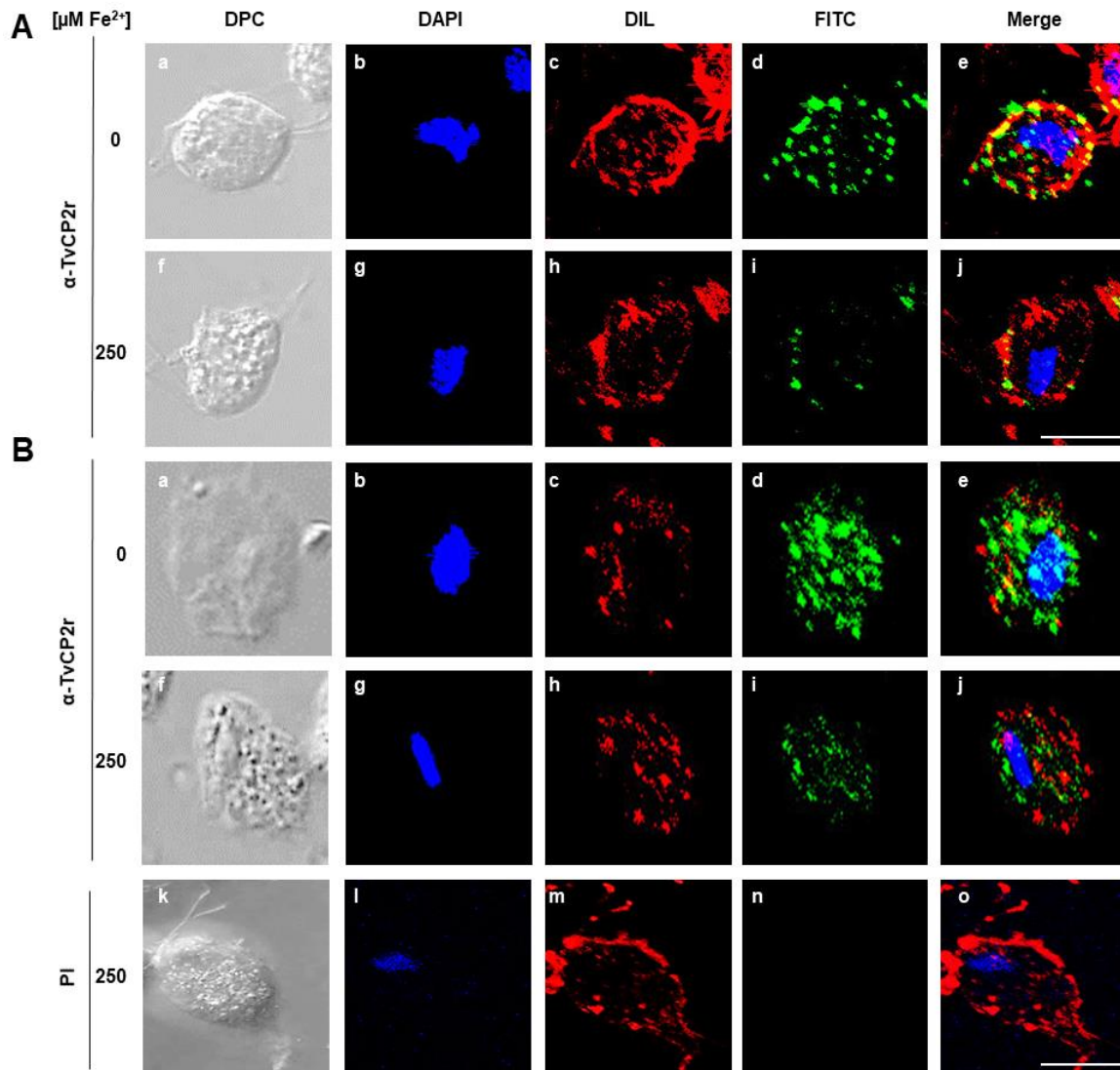


Figura 12. Localización subcelular de TvCP2 en las diferentes concentraciones de hierro.

Ensayos de inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo anti-TvCP2r en parásitos no permeabilizados (A) y permeabilizados (B) crecidos en condiciones de restricción (0) y alto (250 μM) hierro. La imagen de contraste diferencial de fases (DPC; a, f, k), tinción de núcleos (DAPI; b, g, l), tinción de membrana plasmática (DIL; c, h, m), marca de TvCP2 (FITC; d, i, n) y el traslape (e, j, o). Como control negativo se utilizaron parásitos no permeabilizados incubados solo con el suero preinmune (PI; k, l, m, n, o). Barra= 20 μm .

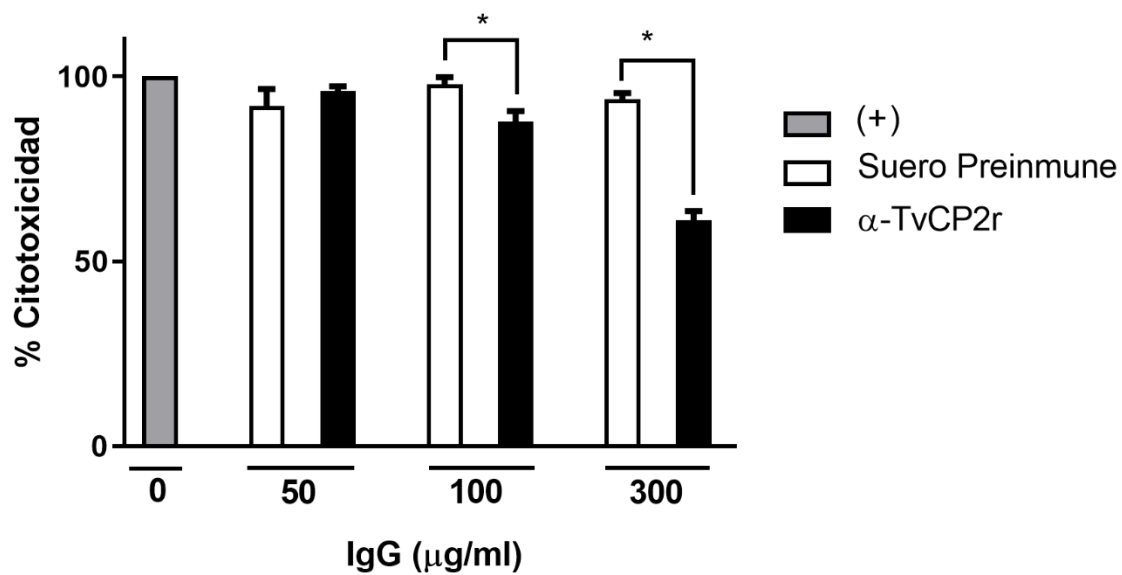


Figura 13. Ensayo de inhibición de la citotoxicidad. En esta figura se muestra el ensayo de inhibición de la citotoxicidad realizado con el anticuerpo α -TvCP2. A) Las gráficas corresponden al ensayo con parásitos del aislado CNCD 147 crecidos en condiciones de restricción de hierro.

TvCP2r, comparado con las IgGs del suero preinmune que muestra 10% de inhibición a las concentraciones probadas. Estos resultados indican que TvCP2 participa de manera individual en la inducción de citotoxicidad a células HeLa (Figura 13).

En conjunto, estos resultados muestran que el hierro tiene un efecto negativo sobre la TvCP2, lo cual impacta en la citotoxicidad. También sugiere un mecanismo de regulación por hierro de la expresión de *tvcp2*, posiblemente al nivel posttranscripcional que puede ser mediado: a) Por interacciones RNA-proteína mediante un sistema paralelo al IRE-IRP a través de estructuras tipo IRE que incrementen la estabilidad del mensajero en restricción, pero no en altas concentraciones de hierro. b) Por un **mecanismo de poliadenilación alternativa** que también favorece la estabilidad y consiguiente traducción del mRNA de TvCP2 en la condición de restricción de hierro, promoviendo una mayor cantidad de proteína en restricción que en alto hierro (Figuras 11 y 12) y además un mayor efecto citotóxico del parásito en restricción de hierro hacia monocapas de células HeLa (Figura 13).

2. Justificación

La cisteína proteinasa TvCP2 regulada negativamente por hierro participa en la patogenia de *T. vaginalis*, particularmente en la citotoxicidad a monocapas de células HeLa. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo por el cual el hierro regula la expresión de este gen, por lo que es importante identificarlo y caracterizarlo para entender mejor la biología y la patogenia del parásito.

3. Hipótesis

La cisteína proteinasa TvCP2 que participa en la inducción de apoptosis a células hospederas inducida por restricción de hierro, presenta una expresión génica negativa mediada por hierro al nivel postranscripcional modulando la estabilidad del mRNA debido a: 1) la presencia de estructuras tallo-burbuja tipo IRE; o 2) por una poliadenilación alternativa, que en restricción de hierro se favorece la traducción del mRNA *tvcp2*, hay una mayor cantidad de TvCP2 y un incremento en la citotoxicidad de tricomonas hacia células HeLa.

4. Objetivo General

Determinar la participación de TvCP2 en la inducción de apoptosis hacia la célula hospedera en condiciones de restricción de hierro e identificar y caracterizar el mecanismo de regulación a nivel postranscripcional mediado por hierro del gen *tvcp2*.

5. Objetivos particulares

1. Demostrar la participación de TvCP2 en la inducción de apoptosis a células HeLa en restricción de hierro.
2. Identificar *in silico* posibles secuencias regulatorias en las regiones 5´ y 3´ del gen *tvcp2*.
3. Determinar la vida media del mRNA y el sitio de corte para poliadenilación del gen *tvcp2* en diferentes condiciones de hierro.
4. Identificar *in silico* genes, transcritos y proteínas correspondientes a la maquinaria de poliadenilación en *T. vaginalis*.
- 5.- Analizar el efecto del hierro en la expresión a nivel de transcrito y su identificación por análisis proteómicos de los componentes de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis*.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Cultivo de parásitos en distintas condiciones de hierro

El aislado CNCD 147 de *T. vaginalis* se cultivó en condiciones estándar en 30 ml de medio TYM (Tryptona-extracto de levadura-maltosa) suplementado con 10% de suero bovino de adulto (SBA) y con un inóculo inicial de 1×10^7 parásitos por 24 h a 37°C. Para el cultivo en distintas condiciones de hierro, al medio TYM se le añadieron 150 μ M de 2,2'-dipiridilo o 250 μ M de sulfato ferroso amoniacal para el cultivo de restricción de hierro (RH; 0 μ M) o de alto hierro (AH; 250 μ M), respectivamente y se incubó toda la noche. Al día siguiente, se agregó 10% de SBA, se inocularon los parásitos (3.5×10^7 u 8×10^6 , respectivamente) y se incubaron durante 24 h a 37°C. Para parásitos utilizados para determinar la estabilidad del mRNA, se hizo un cultivo en RH y AH durante 12 h, se le agregó actinomicina D (50 μ g/ml) y se tomaron alícuotas de 1×10^7 parásitos del cultivo a diferentes tiempos (0, 6, 12, 18 y 24 h) después de iniciado el tratamiento con actinomicina D y se extrajo el RNA.

7.2. Cultivo de células HeLa en monocapas confluentes

A placas de 6, 24 o 96 pozos se agregaron 1×10^6 , 3×10^5 o 3.5×10^4 células/pozo en 1 ml, 500 μ l o 100 μ l de medio DMEM completo, respectivamente y se incubaron durante 20 h a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% para obtener monocapas confluentes de células HeLa. Las monocapas confluentes se lavaron 3× con PBS pH 7 frío para eliminar las células no adheridas las cuales también se utilizaron para los diferentes ensayos de apoptosis.

7.3. Purificación de IgG del suero anti-TvCP2r

A partir de 1 ml de suero de conejo anti-TvCP2r se purificaron las IgGs por precipitación con ácido caprílico (Sánchez-Rodríguez y col., 2018). Para ello, se añadieron 2 volúmenes de acetato de sodio 60 mM pH 5.2 y 75 μ l de ácido caprílico al suero y se agitó a temperatura ambiente (TA) por 30 min. La mezcla se centrifugó a 7 200 rpm por 10 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante, se le añadió sulfato de amonio al 50% de saturación (0.94 gr para el volumen de 3 ml), se dejó en agitación constante 2 h a 4 °C y se centrifugó a 7 200 rpm por 30 min. El precipitado conteniendo las IgGs se resuspendió en 500 μ l de PBS estéril y se cuantificó la cantidad de proteínas por el método de Bradford. Las IgGs anti-TvCP2r se utilizaron en los ensayos de inhibición de la inducción de la apoptosis. De igual manera se purificaron las IgGs de 1 ml de suero preimmune (PI) para usarlas como control negativo en los ensayos de inhibición.

7.4. Ensayo de interacción de parásitos crecidos en restricción de hierro para determinar inducción de apoptosis a células HeLa

Para medir la inducción de apoptosis por *T. vaginalis*, se utilizaron monocapas confluentes de células HeLa crecidas en placas de 6, 24 o 96 pozos, las cuales interaccionaron por 1 h a 37°C en atmosfera de CO₂ al 5% con parásitos en una relación 5:1 parásito:célula (5×10^6 , 1.5×10^6 ó 1.75×10^5 parásitos, según las placas que se utilizaron) crecidos en condiciones de RH y pretratados con 300 μ g/ml de IgGs anti-TvCP2r en medio de interacción (DMEM:TYM quelado con 150 μ M de 2-2'-dipiridilo y sin suero, relación 2:1) durante 20 min. Como controles se utilizaron monocapas de células HeLa en su medio de cultivo, monocapas de células

HeLa en medio de interacción, cultivos de parásitos y de células HeLa, interacción de células HeLa con parásitos crecidos en RH pretratados con 300 µg/ml de IgG de suero preinmune y la interacción de células HeLa con parásitos sin tratamiento como control positivo. Como control positivo para la detección de inducción de apoptosis por fragmentación de DNA y TUNEL en los dos tipos celulares, se utilizaron células HeLa y parásitos crecidos en RH incubados con H₂O₂ al 5% durante 30 min y 1 h.

7.4.1. Ensayo de Anexina V-FITC para determinar inducción de apoptosis a células HeLa

Para el ensayo de anexina V, después de la interacción de parásitos crecidos en RH (preincubados con IgGs anti-TvCP2r o de suero preinmune (SP) o sin tratamiento) con las monocapas de células HeLa (placas de 96 pozos) por 1 h a 37°C, las monocapas se lavaron 3 veces con PBS pH 7 y 3 veces con el amortiguador de unión de anexina V (AVBB) del kit Annexin V-FITC (BD Pharmingen). Las células adheridas se incubaron con la anexina V-FITC (dilución 1:10) en un volumen de 25 µl/pozo por 15 min a TA, se lavaron 3 con AVBB y las células adheridas a los pozos se observaron en un microscopio invertido de epifluorescencia del Dr. Juan Ernesto Ludert (agradecemos que nos permitió utilizarlo). La fluorescencia también se cuantificó por espectrofluorimetría (SpectraMax Gemini EM) para tener datos cuantitativos adicionales a los datos cualitativos de las imágenes obtenidas. Este experimento se realizó por triplicado técnico y biológico con resultados similares.

7.4.2. Ensayo de escalera para identificar fragmentación de DNA

Para este ensayo las interacciones parásitos:células se realizaron en placas de 6 pozos. Después de la interacción se les retiró el sobrenadante a las monocapas y se centrifugó a 5 000 rpm por 5 min. La pastilla de células recuperadas y las células que permanecieron adheridas a la placa se lisaron con 500 µl de amortiguador de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 5 mM, Tritón X-100 al 0.2%), se añadió 2 µl de RNAsa A (50 µg/ml) y se incubó 30 min a 4 °C, se centrifugó 30 min a 13 000 rpm y el sobrenadante se dividió en dos alícuotas de 250 µl. A cada una se le añadió 50 µl de NaCl 5 M frío, se dio vórtex 10 s, se agregó 600 µl de etanol absoluto y 150 µl de acetato de sodio 3 M pH 5 y se precipitó a -80 °C por 1 h. Los tubos se centrifugaron a 13 000 rpm por 20 min, se descartó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 400 µl de amortiguador de extracción (Tris HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 5 mM), se añadieron 2 µl de RNAsa A libre de DNAsas (50 µg/ml), se incubó 2 h a 37°C, se agregó 40 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y 40 µl de amortiguador de resuspensión (Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 100 mM, NaCl 250 mM), se incubó 18 h a 50 °C en agitación y se hizo extracción fenol:cloroformo con 250 µl de fenol equilibrado y 250 µl de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13 000 rpm por 5 min. La fase acuosa se transfirió a tubos nuevos y se precipitó con 1 ml de etanol absoluto y 40 µl de acetato de sodio 3 M, se mezcló por inversión, se precipitó 1 h a -80 °C, se centrifugó a 13 000 rpm por 20 min y la pastilla de DNA se resuspendió en 15 µl de agua inyectable estéril. El DNA obtenido se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2.5%. Este ensayo se realizó por triplicado biológico con resultados similares.

7.4.3. Ensayo de TUNEL para determinar inducción de apoptosis a células HeLa por fragmentación de DNA

Para confirmar la participación de TvCP2 en la inducción de apoptosis a células HeLa en RH, también se realizó el ensayo de TUNEL (“Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labelling”). Luego de la interacción de parásitos (con o sin pretratamiento con IgGs anti-TvCP2r o de SP) con células HeLa crecidas sobre cubreobjetos en placas de 24 pozos, se utilizaron tanto células recuperadas del sobrenadante de la interacción como las remanentes que quedaron adheridas a los cubreobjetos. Las células del sobrenadante se recuperaron por centrifugación a 14 000 rpm por 1 min. Estas células y las remanentes en los cubreobjetos se fijaron con 500 µl de formaldehído al 4% durante 10 min, se permeabilizaron con 500 µl de Tritón X-100 al 2.5% durante 5 min a TA. Para utilizar el kit para detección de apoptosis “DeadEnd Fluorometric TUNEL System” (Promega), las células en las laminillas y las células recuperadas se lavaron tres veces con PBS pH 7, se incubaron con amortiguador de equilibrio 1× (100 µl/laminilla), durante 15 min, se descartó el amortiguador y se incubaron con 50 µl de la mezcla de nucleótidos marcados con FITC durante 1 h a 37 °C. Las células se lavaron con amortiguador de lavado (2x SSC) durante 15 min y 3 veces con PBS pH 7. Tanto las células en suspensión como las de las laminillas se analizaron por microscopía confocal (Zeiss). Este ensayo fue realizado por duplicado biológico con resultados similares.

7.5. Análisis bioinformático de las regiones regulatorias 5´ y 3´ del gen *tvcp2*

Para determinar la presencia de elementos reguladores presentes en ambas regiones, se realizó un análisis bioinformático por comparación mediante alineamientos múltiples de la secuencia genómica de *tvcp2* (que incluyó las regiones regulatorias 5´ y 3´) y con los diferentes ESTs (“Expressed sequence tags”) que se han reportado en diferentes condiciones de cultivo de parásitos y que se encuentran en la base de datos del genoma de *T. vaginalis* (<http://www.trichdb.org>).

Inicialmente, se delimitó la longitud de las regiones regulatorias a analizar tomando en cuenta la longitud de la región intergénica en ambos sentidos 5´ y 3´ (Figura 14). Debido a la cercanía de los genes contiguos en el “contig” se incluyeron 98 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción como la región regulatoria 5´-*tvcp2* y 189 pb río abajo del codón de paro como la región regulatoria 3´-*tvcp2* y se realizó el alineamiento con los ESTs reportados en distintas condiciones de cultivo para el gen *tvcp2* con el número de acceso TVAG_057000, encontrándose 823 ESTs. Para el caso de la región regulatoria 5´ se buscó la secuencia consenso del sitio de inicio de la transcripción (Inr), los motivos regulatorios a los cuales se une la maquinaria basal de la transcripción (Liston y Jonhson, 1998) y la presencia de elementos de respuesta a hierro reportados para el gen *ap-65-1* (Tsai y col., 2002). Para determinar el sitio de inicio de la transcripción y los sitios de unión de factores de transcripción reportados experimentalmente se utilizó el software MATCH (Kel y col., 2003). Además, se utilizaron los ESTs reportados para TvCP2 obtenidos a partir de la base de datos del genoma de *T. vaginalis* (<http://www.trichdb.org>) (Carlton y col., 2007).

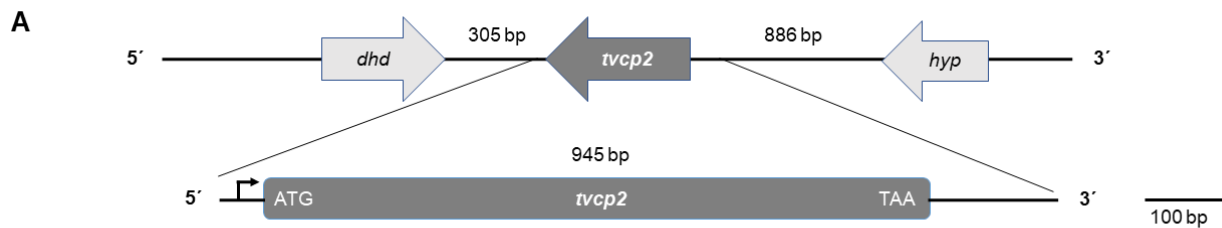


Figura 14. Contexto genómico de *tvcp2*. A) Ubicación del gen *tvcp2* en el contig DS113412. Se encuentra flanqueado hacia el extremo 5' por el gen que codifica para una dihidroorotato deshidrogenasa (*dhd*) y separado por una región intergénica de 305 pb. Hacia el extremo 3' está flanqueado por un gen que codifica para una proteína hipotética (*hyp*) y separado por una región intergénica de 886 pb. El gen *tvcp2* es de 945 pb y para los análisis *in silico* se tomaron 98 pb de la región regulatoria 5', mientras que de la región regulatoria 3' se tomaron 189 pb.

Respecto a la región regulatoria 3'-*tvcp2*, se analizaron los ESTs encontrados en la base de datos del genoma (<http://www.trichdb.org>), se buscaron las secuencias regulatorias tales como la señal de poliadenilación, el sitio de corte y el elemento distal rico en T por comparación con las secuencias consenso reportadas previamente (Figura 5; Espinosa y col., 2002). Además, se buscaron elementos tipo IRE, que como característica principal tienen la formación de estructuras tallo-burbuja que son capaces de interaccionar con proteínas de unión a RNA utilizando el software MFold 3.5 (Zuker y col., 2003), con un ΔG negativo, lo cual sugeriría que termodinámicamente sería más factible la formación de esta estructura *in vivo*.

7.6. Extracción de RNA, síntesis de cDNA y ensayos de RT-PCR en presencia y ausencia de actinomicina D.

7.6.1. Extracción de RNA total

Para extraer el RNA total de parásitos (2.0×10^7) crecidos en diferentes condiciones de hierro, se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml nuevo, se centrifugaron a 1 800 rpm por 5 min a 4°C, se desechó el sobrenadante, se adicionó 1 ml de trizol y 0.2 ml de cloroformo, se mezcló 15× por inversión, se incubó por 3 min a TA, se centrifugó a $8\ 000 \times g$ por 20 min a 4°C, se recolectó la fase acuosa, se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml nuevo y se precipitó el RNA con 0.5 ml de alcohol isopropílico (2-propanol), se incubó 15 min a TA y se centrifugó a $8\ 000 \times g$ 25 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó con mucho cuidado, la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 75% en agua DEPC (Dietilpirocarbonato) y se centrifugó

a $8\,000 \times g$ por 10 min a 4°C . El sobrenadante se desechó con mucho cuidado y el tubo se dejó destapado por 10 min a TA para que se evaporara el etanol. La pastilla de RNA se resuspendió en 30 μl de H_2O DEPC y la muestra se cuantificó por densidad óptica a 260 nm en Nanodrop, se hicieron alícuotas de 10 μg y se almacenaron a -70°C hasta su uso. Las muestras se analizaron en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1 \times /DEPC.

7.6.2. Tratamiento con DNAsa I

Para eliminar el DNA genómico (DNAg) contaminante, a 10 μg de RNA obtenido en cada condición de hierro se trató con DNAsa I libre de RNAsas (New England Biolabs), se agregó 4 μl del amortiguador de reacción 10 \times , 1 μl de DNAsa I (2000 U/ml) y se completó el volumen a 40 μl con agua estéril; se incubó a 37°C durante 10 min, se añadió 1 μl de EDTA 0.5 mM y se llevó a un volumen final de 100 μl con agua inyectable. La enzima se inactivó a 75°C por 10 min. El RNA se precipitó con 250 μl de etanol absoluto y 10 μl de acetato de sodio 3 M en agua DEPC a -70°C toda la noche.

7.6.3. Retrotranscripción

La pastilla de 10 μg de RNA total tratado con DNAsa I de parásitos crecidos en concentraciones altas, normales y restricción de hierro, se resuspendió en 14 μl de agua libre de RNAsas (se separaron 3 μl para utilizarlos como control) se adicionó 1 μl de Primer Oligo dT (Invitrogen) y las reacciones se incubaron a 65°C durante 5 min, se agregaron 4 μl de amortiguador de reacción 5 \times , 2 μl de mezcla de dNTPs 10 mM, 1 μl de la enzima inhibidora de RNAsas “RiboLock” (200 U/ μl), 1 μl

de la retrotranscriptasa Revert Aid M-MOLV RT (200 U/ μ l) y se llevó a un volumen final de 20 μ l; la reacción se mezcló, se dio un “spin” y se incubó durante 1 h a 42°C. La enzima se inactivó a 70°C durante 10 min, se colocó en hielo y el cDNA obtenido se cuantificó en Nanodrop a 260 nm.

7.6.4. Amplificación por PCR del gen *tvcp2* y los componentes putativos de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis*

Para una reacción de amplificación, en tubos Eppendorf nuevos para PCR se agregó 500 ng de cDNA de parásitos crecidos en las diferentes condiciones de hierro, 0.2 μ l de la enzima *Taq* polimerasa, 5 μ l de amortiguador para PCR 10 \times , 2 μ l de MgCl₂ 50 mM, 1 μ l de desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's) 0.2 mM y 1 μ l de cada uno de los oligonucleótidos (oligos; directo y reverso). Para el fragmento de 322 pb del gen *tvcp2* los oligos utilizados fueron: directo 5'-GGG CTA ACG ATG AGG TTA AGG-3'; reverso 5'-GGC GAA TTC TTA GAG AGC CTT TGG AAG GAT AGT TCA G-3'. Para amplificar los componentes putativos de la maquinaria de poliadenilación se agregaron 500 ng de cDNA de parásitos crecidos en las diferentes condiciones de hierro, 0.2 μ l de *Taq* polimerasa, 2 μ l de amortiguador para PCR 10 \times , 0.8 μ l de MgCl₂, 0.4 μ l de dNTP's y 0.4 μ l de cada uno de los oligonucleótidos de los componentes de la maquinaria de poliadenilación. Los oligos utilizados se enlistan en la tabla 1. Como control positivo de RT-PCR se preparó una reacción de 50 μ l que se le añadió 500 ng de DNAg. Como controles negativos se prepararon reacciones con RNA tratado con DNAsa I como molde y sin DNA. Las condiciones de PCR que se utilizaron para amplificar el fragmento de 322 pb del gen *tvcp2* fueron: 95 °C por 2 min y 20 ciclos de 95 °C por 1 min, 55 °C

por 35 s, 72 °C por 80 s y 1 ciclo de 72 °C por 7 min. Las condiciones de PCR para amplificar los componentes de la maquinaria de poliadenilación fueron: 95 °C por 2 min y 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 90 s y un ciclo de 72 °C por 7 min. Para el caso de los genes *cpsf160b* y *pfs2a* fueron las siguientes: 95 °C por 2 min y 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 60 °C por 1 min, 72 °C por 90 s y un ciclo de 72 °C por 7 min. Las reacciones de PCR se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Como control de carga se amplificó el gen β -tubulina (Dos Santos y col., 2015) bajo las siguientes condiciones de PCR: 1 ciclo a 95 °C por 2 min, 30 ciclos a 95 °C por 1 min, 55 °C por 35 s, 72 °C por 80 s y un ciclo de 72 °C por 7 min. Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1% y 2% con bromuro de etidio (0.5 μ g/ μ l) en amortiguador TBE 1 \times a 60 V durante 60 min.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar componentes de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis*.

Nombre Oligo	Secuencia ^a	Tamaño de amplicón (pb) ^b
TvCPSF 160 (077030)-Fw	TgA CgT TgA CgA ATA CgC gA	113
TvCPSF 160 (077030)-Rv	CCT ggg TCA CAg CCT TgA TT	
TvCPSF 160 (532720)-Fw	TTA ACA ggA ATC gCg CAA CC	129
TvCPSF 160 (532720)-Rv	TgT CAT CAg TCT ggT CAA ATg g	
TvCPSF 73 (363680)-Fw	AgA ACT CCA gCC AAA TCg CA	140
TvCPSF 73 (363680)-Rv	ggA Agg AgC CAT Cgg gTT Ag	
TvCPSF 30-Fw	TgC gTC CAT ggT gAT CgT Tg	261
TvCPSF 30-Rv	Tgg ACC ATC Cgg ACA AAA TCC	
TvPAPa (127020)-Fw	ACg gAT ACT TTg gTg gCg TT	264
TvPAPa (127020)-Rv	ACg TTg TTg CgC TTC TTT gg	
TvPAPa (187910)-Fw	gAA gCC ggC ATg TTC CAA TC	142
TvPAPa (187910)-Rv	gCT ggA AAA TgC TCg CCA AA	
TvCstF 77-Fw	TTg CCA gCT TCA CAA ggA CA	187
TvCstF 77-Rv	ggT CTT TCT Tgg ggC TTC gT	
TvCstF 64-Fw	ACA ATC TgA gCC AgA gCC Ag	281
TvCstF 64-Rv	TAC CgT gCT CgA TgA ACA gC	
TvCstF 50-Fw	CAT ACA gAC ATC gTC CCg CA	139
TvCstF 50-Rv	TAT CgT Cgg TAT ggC CgT Tg	
TvClp1 (162880)-Fw	Agg AgA gCT TgC TCC AAA gAC	250
TvClp1 (162880)-Rv	ggA ATC TgC ACC ggA Agg AA	
TvClp1 (317830)-Fw	AgC TCA TCg TgA TCg CTA CA	262
TvClp1 (317830)-Rv	ACC TAA AgC Tgg CAT TCC CC	
TvPfs2 (121040)-Fw	TgA TCT ggA CAC ATT CCg gC	167
TvPfs2 (121040)-Rv	gCg gTC ggT Agg AgA gAT Tg	
TvPfs2 (002920)-Fw	AAC gCA ATT ACC gCC ACA Ag	288
TvPfs2 (002920)-Rv	gCA CCg CAA TAA ACg TCT CC	
TvPC4/Sub11-Fw	gCA Agg ATg ATg AAT ggC TTC C	124
TvPC4/Sub11-Rv	TCA Agg TTA CCA CCA AgA gCA	
TvSsu72-Fw	ACg TCA AAA TgC CTg gTg CT	196
TvSsu72-Rv	AAg TgT AgC ggg gTT gAA AgT	
TvCFIm25-Fw	AAT TAC AAA TgC CAg gCg gA	100
TvCFIm25-Rv	AAT TCA CCT TCg ACA ATg Cgg	

^{a, b}La secuencia de los oligos y el tamaño esperado del amplicón. Los oligonucleótidos fueron diseñados utilizando el software Primer Blast.

7.7. Ensayos de RACE-3' ("Rapid Amplification of cDNA Ends") con RNA de parásitos crecidos en diferentes concentraciones de hierro.

A partir del RNA tratado con DNAsa I, se procedió a realizar la síntesis de cDNA, el cual presenta una variación respecto a la síntesis tradicional, ya que se cambió el primer oligo dT que se usa, por el oligonucleótido que permite retrotranscribir solo los mRNA con colas de poliA, cuya secuencia fue: 5'GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3', que se denomina Oligo RACE-3' AP, el cual se ancló en los extremos poliadenilados de los mRNA que se retrotranscribieron en cDNA, con el cual se hicieron reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos específicos para el gen *tvcp2*. Como oligonucleótido directo y reverso se usó el primer RACE-3' AUAP (Reverse), cuya secuencia es 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' (que se ancla en la región que se encuentra adyacente a las colas de poli (A) después de la retrotranscripción) y un oligonucleótido anidado específico para el gen *tvcp2*. En este caso, se diseñaron dos oligonucleótidos, denominados GSP1 y GSP2 ("Gene Specific Primer"), que anclan en regiones que son únicas para el gen *tvcp2*. El oligo GSP2 (anidado) se ancla en la secuencia que codifica para el péptido diferencial de la proteína TvCP2. Las secuencias de estos oligonucleótidos anidados fueron: 5'-GGCTGGCCATCCAAGGCTA-3' para GSP1 y 5'-GGGCTACGATGAGGTTAAGG-3' para GSP2. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando el mismo programa de amplificación que para el gen *tvcp2* completo, solo que en vez de utilizar 20 ciclos se usaron 30 para obtener la mayor cantidad posible de amplicones. El producto de PCR de cada una de las condiciones de hierro se clonó en el vector

pGEM-T Easy, se transformaron bacterias competentes *E. coli* DH5 α , se seleccionaron clonas candidatas, se extrajo DNA plasmídico para verificar la presencia del inserto y se enviaron a secuenciar para poder analizar la región 3'-UTR del gen *tvcp2* obtenida experimentalmente en las diferentes condiciones de hierro.

7.8. Determinación de la vida media del mRNA del gen *tvcp2* en diferentes condiciones de hierro.

Para determinar la vida media del mRNA del gen *tvcp2* de parásitos crecidos en condiciones de RH y AH se trataron con 50 μ g/ml de actinomicina D para bloquear la transcripción de genes cuando alcanzaron la fase semi-logarítmica (12 h) y se aisló RNA total de parásitos en estas condiciones a los tiempos 0, 6, 12, 18 y 24 h después de dicho bloqueo transcripcional. Los niveles de expresión de los genes *tvcp2* y β -*tubulina* se midieron por RT-PCR utilizando los oligos específicos para cada gen y se utilizaron las condiciones de amplificación antes descritas. La intensidad de las bandas que se observaron en los geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio se cuantificó mediante un análisis densitométrico con el programa "Quantity One". La cantidad de pixeles obtenida para el transcrito de tubulina sin tratamiento se tomó como el 100% para cada condición estudiada. Los niveles de mRNA del gen *tvcp2* se normalizaron con respecto a la cantidad de transcritos de tubulina en cada condición. La vida media experimental del mRNA (el tiempo en el cual la mitad de los transcritos permanecen intactos) se determinó mediante la interpolación de los datos graficados en una escala semilogarítmica, correspondiente a las cantidades de mRNA del gen *tvcp2* detectados en los

diferentes tiempos después del tratamiento con actinomicina D. La vida media del mRNA del gen *tvcp2* se obtuvo a partir de la mejor línea después de la transformación logarítmica por regresión lineal de los datos obtenidos en el análisis densitométrico de los productos de amplificación de ambos genes, con la ecuación de decaimiento $t_{1/2} = \ln 2 / K$, donde K es la constante de decaimiento (Belasco y Braweman, 1993).

7.9. Extracción de DNA plasmídico por método CTAB

Las colonias candidatas que se obtuvieron se analizaron previamente por “PCR colony” en búsqueda de los fragmentos clonados del ensayo RACE-3´-. Para esto se extrajo DNA plasmídico por el método CTAB (Del Sal y col., 1998) a partir de cultivos de 50 ml en medio LB y ampicilina (100 µg/ml) a 37°C por 24 h a 200 rpm. La pastilla de bacterias obtenida se resuspendió en 1 ml de amortiguador STET (sacarosa al 8%, Tritón X-100 al 0.1%, EDTA 50 mM pH 8 y Tris-HCl 50 mM pH 8) y se añadió 10 µl de RNAsa A (50 µg/ml). La suspensión se dividió en 6 alícuotas de 200 µl y a cada una de ellas se le añadió 4 µl de lisozima (50 µg/ml) y se agitó suavemente por 10 min. Al final de este paso se observó un moco. Luego las muestras se hirvieron por 45 s y se centrifugaron 10 min a 14 000 rpm. La pastilla se removió con un palillo de dientes y al sobrenadante se le añadieron 8 µl de cetiltrimetilamonio (CTAB) 5%, se mezcló bien y se centrifugó 5 min a 14 000 rpm. La pastilla que se obtuvo se resuspendió en 300 µl de NaCl 1.2 M por vortexeo vigoroso hasta su resuspensión, se volvió a precipitar con 750 µl de etanol absoluto frío, se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min y la pastilla se lavó con 750 µl de etanol al 70% y se volvió a centrifugar a 14 000 por 10 min. El sobrenadante se descartó y

la pastilla se resuspendió en 50 µl de agua inyectable estéril. El DNA obtenido se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y por digestión con la enzima de restricción *EcoRI*.

7.10. Análisis de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis*

7.10.1. Análisis *in silico* de señal de localización nuclear, ESTs, transcriptomas y proteomas reportados para identificar los componentes putativos de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis*

Para determinar la presencia y los componentes de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis*, desconocida hasta este momento, se partió de la identificación de esta maquinaria en el parásito protozario *E. histolytica* (López-Camarillo y col., 2005) utilizando a los componentes de la maquinaria de poliadenilación de *E. histolytica* comparados con los reportados en humano y *Saccharomyces cerevisiae*. En base a esto, se utilizaron las secuencias de aminoácidos (aa) de los componentes de la maquinaria de poliadenilación que se describieron y se hizo BLAST contra el genoma de *T. vaginalis*, del cual se obtuvieron candidatos para cada componente de la maquinaria putativa de poliadenilación de *T. vaginalis*. A partir de estos candidatos se generó una base de datos que se fue filtrando al realizar los análisis de datos posteriores. Las secuencias de aa de los candidatos se analizaron contra los datos reportados en la base de ESTs en diferentes condiciones de cultivo de *T. vaginalis* para determinar si estos candidatos tienen expresión a nivel de transcrito detectada experimentalmente, así como los datos reportados en los transcriptomas disponibles para *T. vaginalis* reportados en la literatura y finalmente comparar con

los datos proteómicos en las diferentes condiciones que también se han reportado. Con estos análisis se logró identificar y confirmar la expresión de los integrantes de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis* a nivel de transcrito y de proteína.

Utilizando la secuencia de aminoácidos de estas proteínas se hizo la predicción de posibles secuencias de localización nuclear, para predecir si los genes que se identificaron realmente pudieran tener, al menos *in silico*, una forma de ser translocados al núcleo que es donde finalmente tendrían su actividad en la maduración de mRNAs de *T. vaginalis*. Esto se realizó introduciendo estas secuencias en el software cNLS Mapper (<http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/>). Como secuencias válidas se tomaron las que presentaran un score >2 y la búsqueda se realizó en las secuencias de aa completa de cada proteína (Kosugi y col., 2009).

7.10.2. Diseño de oligonucleótidos, PCR punto final semicuantitativa para cada uno de los componentes putativos de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis*

Una vez que se tuvieron los componentes candidatos de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis*, se procedió a hacer el diseño de oligonucleótidos específicos para amplificación por PCR. Los oligonucleótidos se diseñaron con el software PRIMER-Blast en el cual se introdujo la secuencia de cada uno de los genes de los componentes putativos de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis*, se limitó a que los oligos tuvieran una $T_m < 65$ °C, que fueran específicos, que amplifiquen un producto esperado de <250 pb y que tuvieran una longitud máxima de 25 nucleótidos. En la tabla 1 se muestran los oligonucleótidos diseñados, así como las secuencias de nt. Estos oligonucleótidos se utilizaron para evaluar el

efecto del hierro en la expresión de cada uno de los genes que codifican a los componentes de la maquinaria de poliadenilación por RT-PCR semicuantitativa.

7.10.3. Extractos nucleares de *T. vaginalis* en RH y AH para identificación de los componentes de la maquinaria de poliadenilación de Tv por MS/MS

Parásitos crecidos en condiciones de RH y AH (1×10^8) se lavaron dos veces con PBS frío, pH 7; la pastilla se resuspendió en 250 μ l de amortiguador de extracción (HEPES 10 mM, pH 7.6, $MgCl_2$ 3 mM, KCl 40 mM, NP40 0.5% y glicerol 5%) frío, se adicionaron los inhibidores de proteasas TLCK (N- α -p-tosil-L-lisina-clorometil-cetona) 7.5 mM y leupeptín 1.6 mM. La mezcla se homogenizó con vórtex por 15 s y se incubó 10 min a 4°C, repitiendo esto una vez más, se agregó a un tubo Eppendorf de 1.5 ml nuevo y se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min más a 4°C, se recuperó el sobrenadante (correspondiente a los extractos citoplásmicos) y se almacenaron a -70°C por una semana, en alícuotas de 50 μ l. La pastilla que resultó (núcleos), se resuspendió en 150 μ l del amortiguador de extracción para preparar el extracto nuclear. La concentración de proteínas en los extractos citoplásmicos y nucleares se cuantificó por el método de Bradford, se cargaron 50 μ g de proteínas provenientes del extracto nuclear en un gel de acrilamida al 12% dejando que las proteínas entraran solamente al gel concentrador. El gel se tiñó con Azul de Coomassie al 0.2%. La banda de proteínas nucleares concentradas se cortó y se envió a la Unidad de Proteómica del CINVESTAV (Zacatenco e Irapuato) para su identificación por espectrometría de masas mediante la metodología de “shotgun” de complejidad media para la identificación de proteínas presentes en el extracto

nuclear, en busca de proteínas de los componentes de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis*.

8. RESULTADOS

8.1. Demostrar la participación de TvCP2 en la inducción de apoptosis a células HeLa en RH

Para demostrar la participación de TvCP2 en la inducción de apoptosis como mecanismo de muerte por el cual se induce la citotoxicidad a células hospederas, se utilizaron dos estrategias experimentales. La primera fue la detección de la externalización de fosfatidilserina en la membrana de las células remanentes de la interacción Tv/HeLa, para lo cual se realizaron experimentos de anexina V, la cual tiene afinidad por la fosfatidilserina que se muestra externalizada en la membrana de células apoptóticas. En este experimento se utilizaron como controles negativos: a) Monocapas de células HeLa sin tratamiento y b) Monocapas de células HeLa incubadas con medio de interacción DMEM:TYM quelado con 2-2'-dipiridilo. Como control positivo se utilizaron monocapas de células HeLa interaccionadas con parásitos crecidos en RH. La participación de TvCP2 en la inducción de apoptosis se evaluó por el pretratamiento de los parásitos crecidos en RH con concentraciones crecientes de IgG purificadas del suero anti-TvCP2r (50, 100 y 300 µg/ml) y de suero preinmune como control. Enseguida, los parásitos se incubaron con monocapas de células HeLa durante 1 h a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5%. En la figura 15 se muestra el resultado representativo de la incubación de los remanentes de las interacciones con la anexina V-FITC. En el panel A se muestra un gráfico en el que se analizó por espectrofluorimetría la fluorescencia obtenida de las interacciones por triplicado técnico, en la cual se observa la señal de las monocapas con bajo hierro cuya señal se tomó como 100% de inducción de apoptosis. Las intensidades

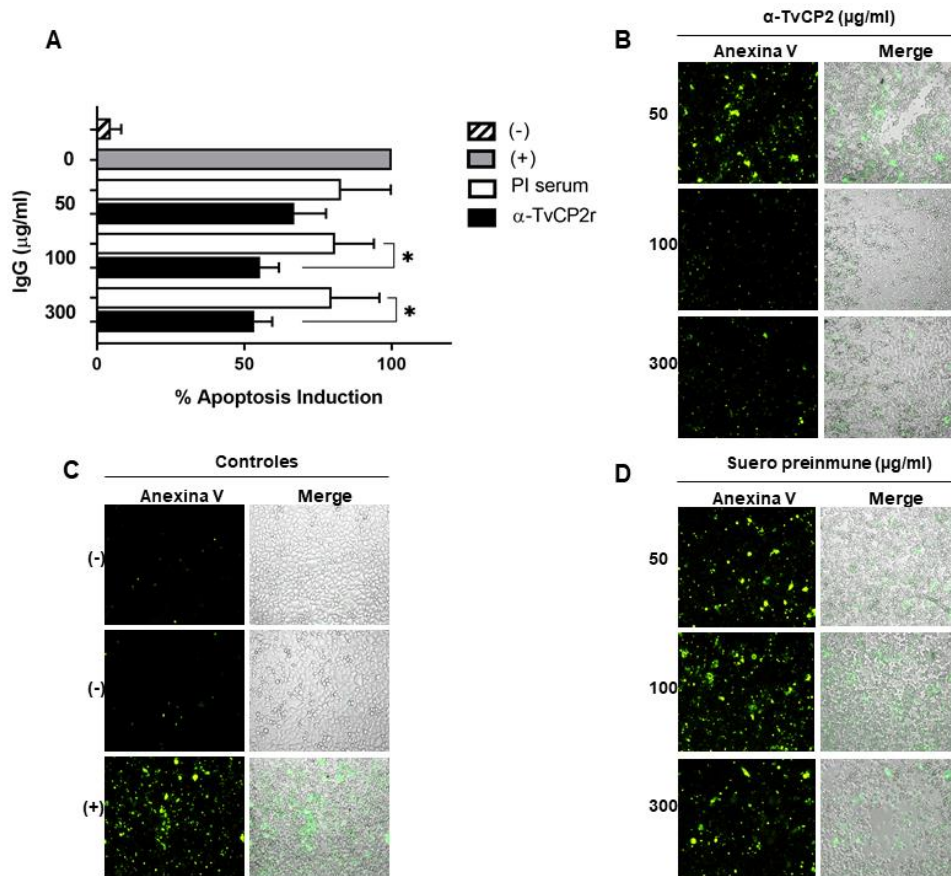


Figura 15. Ensayo de Anexina V-FITC para demostrar la participación de TvCP2 en la inducción de apoptosis a células HeLa por parásitos en RH. A) Gráfica de la intensidad de fluorescencia obtenida de monocapas de células HeLa así como los remanentes de la interacción de *T. vaginalis* crecidos en RH preincubados con concentraciones de 0, 50, 100 y 300 µg/ml de IgGs provenientes de suero PI y suero anti-TvCP2r. B) Imágenes representativas tomadas por microscopía de epifluorescencia del fenómeno de inhibición de la inducción de apoptosis al utilizar IgGs anti-TvCP2r. C) Imágenes representativas de los controles negativos (Monocapa y monocapa con medio de interacción) y positivo (monocapa incubada con parásitos crecidos en RH). D) Imágenes representativas de la inducción de apoptosis al utilizar IgG provenientes de suero preimmune como control.

obtenidas después de la interacción con parásitos cultivados en RH y preincubados con IgGs del Ac anti-TvCP2r y de suero preimmune (PI). Con el suero PI se observó una cierta disminución de la inducción de citotoxicidad de alrededor de un 15% que se mantiene en todas las concentraciones utilizadas. Con las IgGs anti-TvCP2r se observa una disminución de la inducción de apoptosis de manera concentración-dependiente hasta 45% de inhibición de la inducción de apoptosis al utilizar 300 µg/ml de IgGs. Estas diferencias son significativas respecto al control de suero PI. En el panel B se muestra una imagen representativa por microscopía de epifluorescencia de los campos que se observaron de cada concentración de IgGs anti-TvCP2r, que muestra la señal de anexina V y el traslape de la imagen de fluorescencia con campo claro. En esta imagen se muestra una gran intensidad en la señal verde de anexina V acompañada de un gran daño a la monocapa de células, mismas que disminuyen conforme se aumentó la concentración de IgG anti-TvCP2r. En el panel C se muestran los campos correspondientes a los controles de monocapa de células HeLa y monocapa de células HeLa incubadas con el medio de interacción, así como el control positivo de monocapa de células HeLa incubada con parásitos crecidos en la condición de RH, en el cual se muestra una gran intensidad de la señal verde y un gran daño a la monocapa de las células HeLa. En el panel D se muestran los campos correspondientes a las diferentes concentraciones utilizadas de IgGs de suero PI utilizadas como control de especificidad, en los que se observa la marca verde de anexina V y el daño a las monocapas que no fue inhibido por estas IgGs.

La segunda estrategia para determinar la participación de TvCP2 en la inducción de apoptosis a células hospederas fue mediante ensayos que demuestran el daño al DNA de la célula. En esta estrategia se plantearon dos tipos de experimentos. El primero de ellos fue la verificación directa del daño al DNA por parte de moléculas del parásito. Para esto se realizó el ensayo de escalera de DNA, el cual involucra la extracción de DNA luego de la interacción de parásitos con las monocapas de células HeLa, mismo que fue tratado con proteinasa K y RNAsa A para eliminar restos de proteínas y RNA, como se describió en la metodología. Este DNA se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2.5% para comprobar su integridad. En la figura 16 se muestra una imagen representativa del ensayo de escalera de DNA. En el carril 1 se muestra el DNA genómico de células HeLa sin interaccionar, en el cual se aprecia su integridad. Como control se incubaron monocapas de células HeLa con H₂O₂ al 5% durante 30 y 60 min (carriles 2 y 3), en los que se muestra una disminución en la cantidad de DNA de alto peso y se observa la presencia de un barrido de DNA que se desprende de la banda de alto peso, así como bandas débiles en tamaños entre 500 y 200 pb, que pareciera como una escalera, lo que muestra el daño al DNA por el tratamiento con el H₂O₂. En el carril 4 se muestra DNA genómico obtenido de parásitos crecidos en RH, en el que se muestra que también hay integridad de su material genómico, la cual disminuye drásticamente y se convierte en un barrido por el tratamiento con H₂O₂ al 5% a 30 y 60 min. En el carril 7 se muestra el DNA obtenido de la interacción de parásitos crecidos en bajo hierro con las células HeLa, en el que se observa DNA genómico de alto peso y también un barrido que se desprende de esta banda de alto peso, lo que sugiere el daño al DNA de la célula hospedera por parte del parásito. En el carril

8 los parásitos se preincubaron con IgGs de suero preinmune (control negativo) y no se observan diferencias significativas respecto a la condición sin IgGs. En el carril 9 se muestra el efecto del pretratamiento de los parásitos con IgGs anti-TvCP2r, en el que se observa protección del DNA genómico al tener una mayor cantidad de DNA de alto peso y una disminución en el barrido, que permitió definir la escalera de DNA. Este experimento sugiere la participación de TvCP2 en la inducción de apoptosis a células HeLa y a pesar de ser inhibida por el uso de IgGs específicas, se mantiene un cierto daño al DNA, posiblemente debido a otras moléculas del parásito que no fueron inhibidas con las IgGs anti-TvCP2r, sugiriendo que la inducción de apoptosis es un proceso multifactorial.

El segundo ensayo para verificar el daño al DNA y la participación de TvCP2 en la inducción de apoptosis fue por medio del kit “DeadEnd TUNEL Fluorometric System” (Promega). Luego de la interacción de parásitos y células, así como los controles de células y parásitos con H₂O₂, los remanentes de la interacción, así como las células que quedaron en el sobrenadante de la interacción, se analizaron por el método de TUNEL. En la figura 17 se muestra el resultado del análisis del ensayo de TUNEL. En el panel A se muestra a células remanentes de la monocapa de células HeLa incubada con el medio de interacción y que no muestra señal fluorescente verde de TUNEL, como se esperaba. Las monocapas de células HeLa y parásitos crecidos en bajo hierro tratados con H₂O₂ al 5% a 30 y 60 min utilizados como controles positivos de la reacción muestran una fuerte señal de TUNEL e indica inducción de apoptosis por daño al DNA. El panel B muestra el análisis de

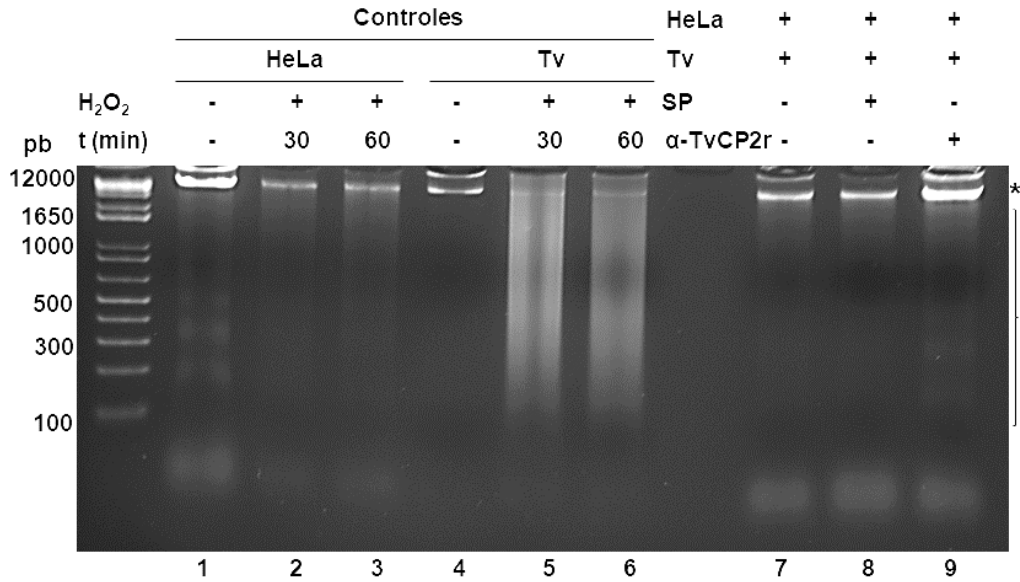
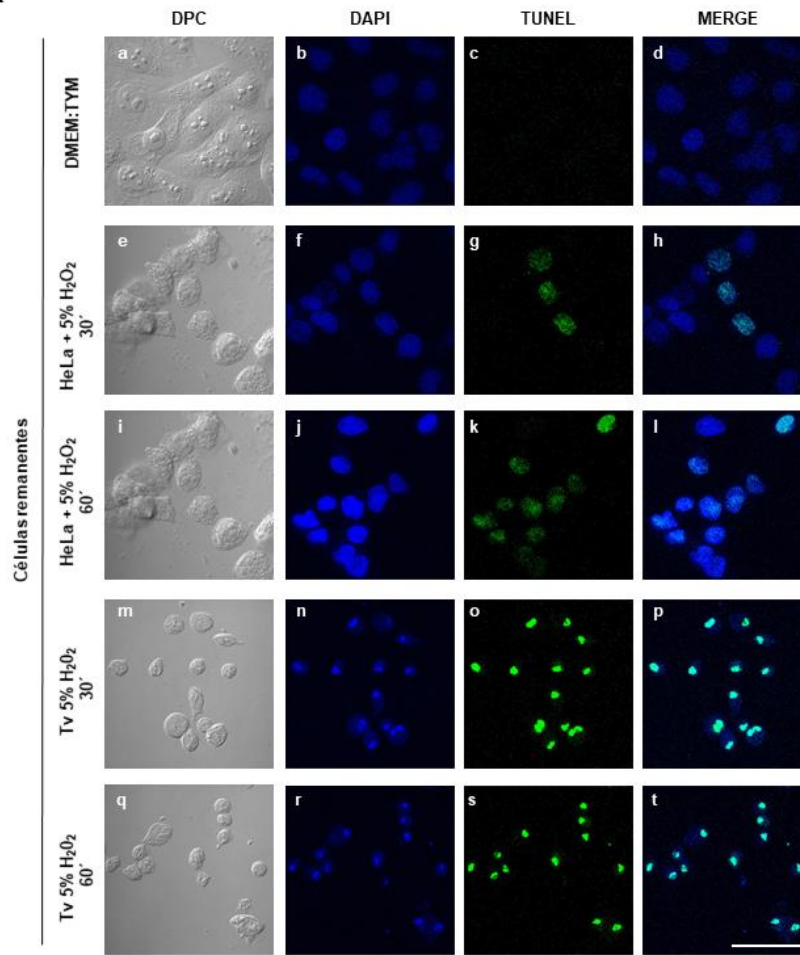
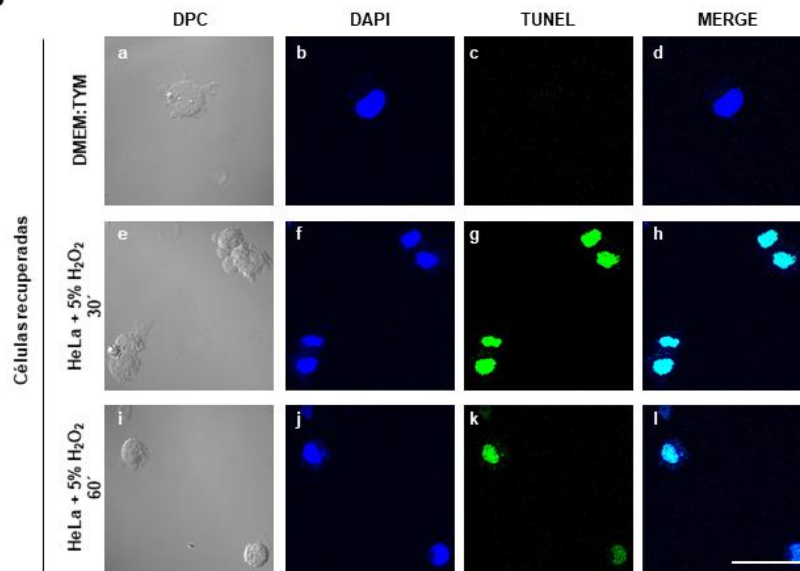


Figura 16. Ensayo de escalera de DNA. Ensayo representativo de la inhibición de la degradación de DNA por TvCP2. Carril 1: DNA genómico de células HeLa sin tratamiento. Carril 2 y 3: DNA de células HeLa tratadas con H₂O₂ al 5% por 30 y 60 min usados como control positivo de inducción de apoptosis. Carril 4: DNA genómico de parásitos crecidos en condiciones de RH. Carril 5 y 6: DNA de parásitos tratados con H₂O₂ al 5% por 30 y 60 min usados como control positivo. Carril 7: DNA obtenido después de la interacción de parásitos crecidos en RH con monocapas de células HeLa. Carril 8: DNA obtenido de la interacción de parásitos pretratados con 300 μ g/ml de IgGs de suero PI. Carril 9: DNA obtenido de la interacción de parásitos pretratados con 300 μ g/ml de IgGs anti-TvCP2r. Marcadores de peso molecular de 1 Kb. Este ensayo fue realizado por duplicado biológico con resultados similares.

TUNEL en células recuperadas del sobrenadante, del medio de interacción que no muestra señal verde, así como de las recuperadas del sobrenadante de la incubación con H₂O₂ al 5% como control positivo, que también muestran una intensa señal verde que indica daño al DNA. En el panel C se muestran células remanentes de la monocapa de células HeLa que no muestran señal de TUNEL, como se esperaba, células remanentes de la interacción de parásitos de bajo hierro con células HeLa, en la cual se observa un gran daño a la monocapa y los remanentes muestran señal positiva de TUNEL. Este mismo efecto se observó en las células incubadas con parásitos pretratados con IgGs de suero PI. Los resultados obtenidos con parásitos pretratados con IgGs anti-TvCP2r muestran que la monocapa conserva su integridad, aunque se observan algunos huecos de células que se desprendieron y los parásitos se encuentran interaccionando directamente con las células HeLa. A pesar de eso, las células no presentaron señal positiva a TUNEL. En el panel D se analizan las células que se recuperaron de los sobrenadantes. De la monocapa de células HeLa se logró recuperar una célula que muestra ligera señal positiva de TUNEL, que podría ser del recambio natural de la monocapa, mientras que las células recuperadas de la interacción HeLa:Tv muestran señal positiva de TUNEL, al igual que las del suero PI, mientras que las que se recuperaron de la interacción con parásitos pretratados con IgGs anti-TvCP2r muestran una señal débil de TUNEL. Estos resultados en conjunto confirman la participación de TvCP2 en la inducción de apoptosis a células hospederas. Sin embargo, al no haber una inhibición completa de este mecanismo de patogenicidad, se sugiere la participación de otras moléculas en este proceso multifactorial. La participación de TvCP2 en la inducción de apoptosis favorecida por las condiciones de RH en el cultivo

posiblemente derivado de una mayor cantidad de proteína en esta condición sugiere la presencia de un mecanismo de regulación de la expresión de este gen que se ve favorecida por la condición de RH. Es por esto que el proyecto a partir de aquí se enfocará en la identificación y caracterización de un posible mecanismo de regulación de la expresión del gen *tvcp2* medido por hierro.

A**B**

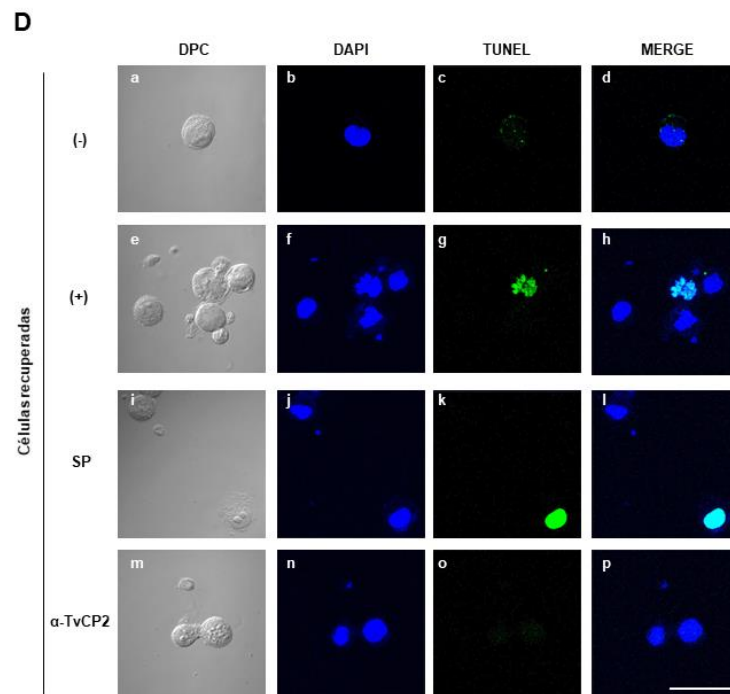
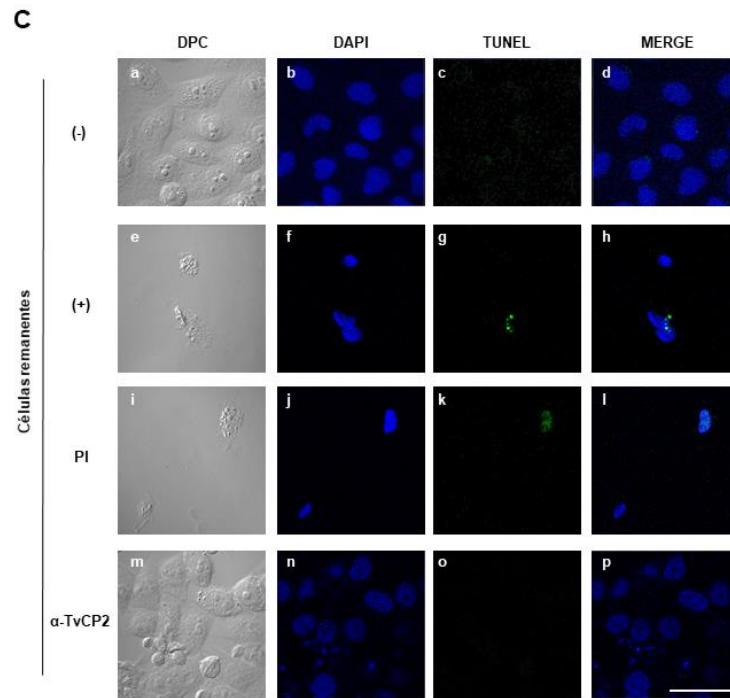


Figura 17. Ensayo de TUNEL. Ensayo de TUNEL para el análisis de inducción de apoptosis por *Trichomonas vaginalis* a células HeLa. Este ensayo fue realizado en células remanentes (A) y recuperadas del sobrenadante (B) en células HeLa incubadas con medio de interacción (control negativo) así como células HeLa y parásitos incubados con H₂O₂ al 5% por 30 y 60 min (control positivo). Este ensayo fue realizado también en células remanentes (C) y recuperadas de sobrenadante (D) de monocapas de células HeLa sin tratamiento (control negativo), después de la interacción con parásitos crecidos en RH y preincubados con IgG provenientes de suero preinmune y suero anti-TvCP2r. Contraste Diferencial de Fases (DPC; a, e, i, m, q), los núcleos de todas las células fueron teñidos con DAPI (en azul; b, f, j, n, r); la señal fluorescente de TUNEL (en verde; c, g, k, o, s) y la mezcla de los canales (d, h, l, p, t). Este experimento fue realizado por duplicado biológico con resultados similares. Las laminillas fueron analizadas por microscopía confocal (Zeiss). Barra= 20 µm.

8.2. Identificar *in silico* posibles secuencias regulatorias en las regiones 5´ y 3´ del gen *tvcp2*.

Para buscar un posible mecanismo de regulación por hierro en *tvcp2*, en primera instancia se realizó el análisis *in silico* de las regiones promotoras del gen *tvcp2* (TVAG_057000). La región regulatoria 5´ de 98 pb que se encuentra flanqueando al gen *tvcp2* se analizó en el *software* MATCH 1.0. La Figura 18 muestra la predicción de un sitio de inicio de la transcripción que tiene identidad con la secuencia consenso del *Inr* reportado previamente en *T. vaginalis* (Smith y col., 2011a) a 11 nt río arriba del sitio de inicio de la traducción (ATG). A 18 nt río arriba del ATG se encontró un sitio de unión para la proteína Myb2, así como a 23 nt río arriba del ATG una secuencia que tiene identidad con la secuencia consenso del Motivo 3. Dichos motivos forman parte del promotor mínimo requerido para la transcripción basal de genes en Tv, por lo que son secuencias que pueden reclutar a la maquinaria de la transcripción para tener una expresión basal del gen *tvcp2*, en cualquier condición. Asimismo, se extendió el análisis 500 nt río arriba del promotor para buscar elementos lejanos que pudieran responder a hierro, tal como se ha descrito con anterioridad para el gen *ap65-1*, regulado positivamente por hierro al nivel transcripcional (Ong y col., 2004). El *software* predijo la presencia de un sitio de unión para la proteína GATA-1, localizado a 193 nt río arriba del sitio de inicio de la transcripción, así como un sitio para Oct-1 a 354 nt río arriba del ATG. Estos dos motivos funcionan como elementos promotores lejanos que también son capaces de reclutar a la maquinaria basal de la transcripción; sin embargo, aún no se ha reportado su papel en la regulación de la transcripción debido a condiciones

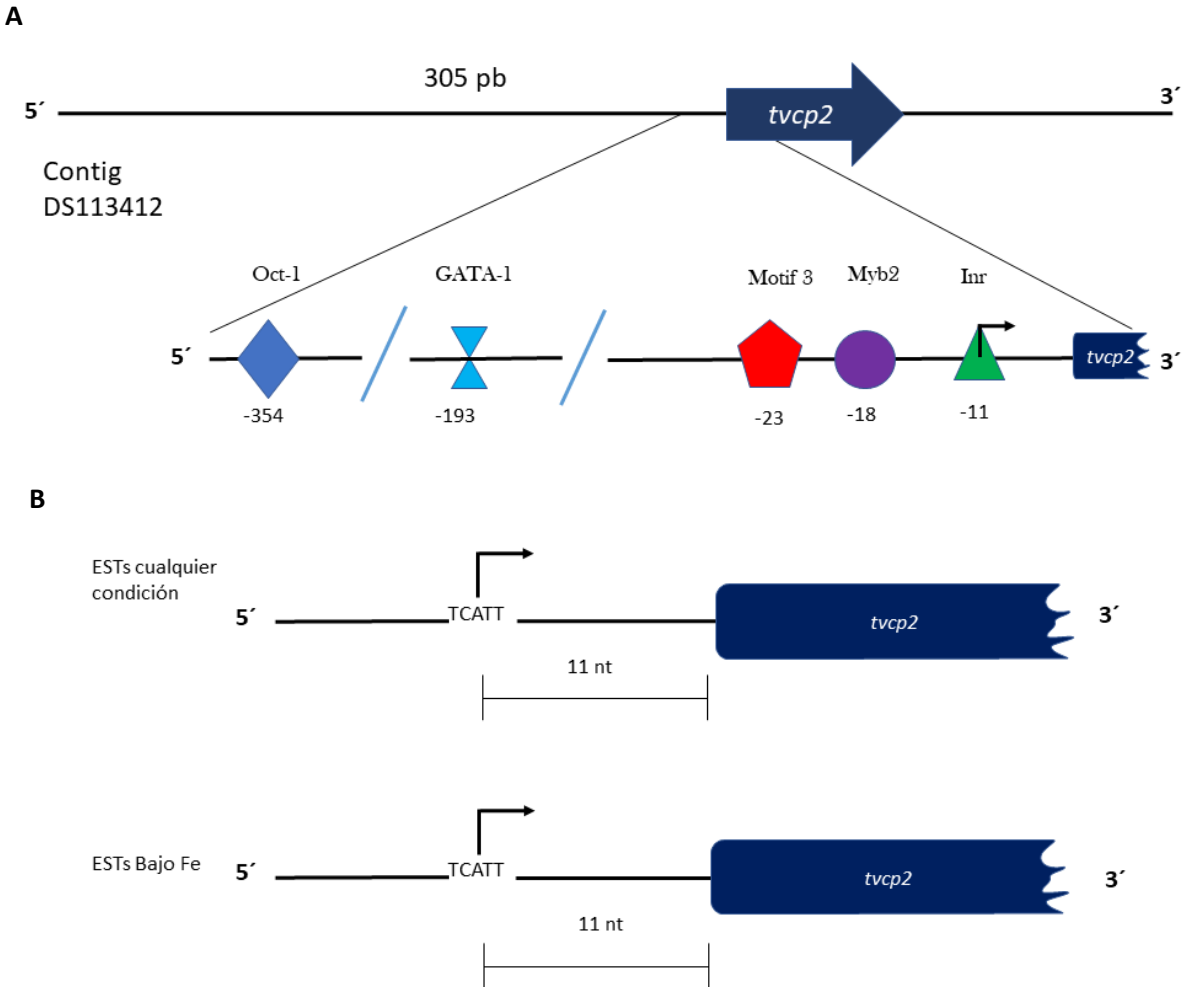


Figura 18. Análisis *in silico* de la región regulatoria 5' del gen *tvcp2* para determinar sitios de unión de factores de transcripción. A) Análisis *in silico* de la región regulatoria 5' del gen *tvcp2* en el que muestra la presencia de sitios de unión de factores de transcripción basales que permiten la transcripción basal del gen. B) Análisis de las secuencias EST reportadas para el gen *tvcp2* en condición de bajo hierro comparada con otras condiciones de cultivo (adhesión a fibronectina, adhesión a células VEC, baja glucosa, condiciones normales, trofozoíto, pseudoquiste inducido por frío, etc) para verificar el sitio de inicio de la transcripción.

cambiantes de hierro en Tv.

Los datos obtenidos del análisis *in silico* sugieren que no hay elementos de respuesta a hierro en la región regulatoria 5'-*tvcp2* y que por lo tanto a nivel transcripcional no hay una regulación por hierro en la expresión de este gen. Por lo que se analizó la región regulatoria 3' para la búsqueda de elementos regulatorios que respondan a hierro.

Para el análisis de la región regulatoria 3' se analizaron 200 nt río abajo del codón de paro (UAA) que presenta el mRNA *tvcp2* por medio del *software* MFold 3.5 que ayuda a la predicción de la formación de estructuras secundarias en secuencias de RNA.

La Figura 19 muestra el análisis de la región regulatoria 3'-*tvcp2* en la que se encontró una estructura tallo-burbuja de 19 nt ubicada inmediatamente después del codón de paro y con un $\Delta G = -2.40$. Esta estructura tallo-burbuja se comparó con otras estructuras previamente reportadas en mensajeros regulados negativamente por hierro, como el IRE presente en el mRNA del Receptor de Transferrina en humanos (Wilkinson y Pantopoulos, 2014) y el IRE-*tvcp12* previamente reportado en *T. vaginalis* (León-Sicairos y col., 2004). Al hacer la comparación en la estructura tallo-burbuja de *tvcp2* se observa que no hay homología de secuencia con las previamente reportadas. Sin embargo, se encontraron motivos como el U-A en la base de la cabeza de la estructura, los cuales brindan estabilidad termodinámica a la estructura. Además, se encontró el motivo U-U-G, que corresponde a un dominio de estabilización de estructuras tallo-burbuja reportadas en IRE de protozoarios.

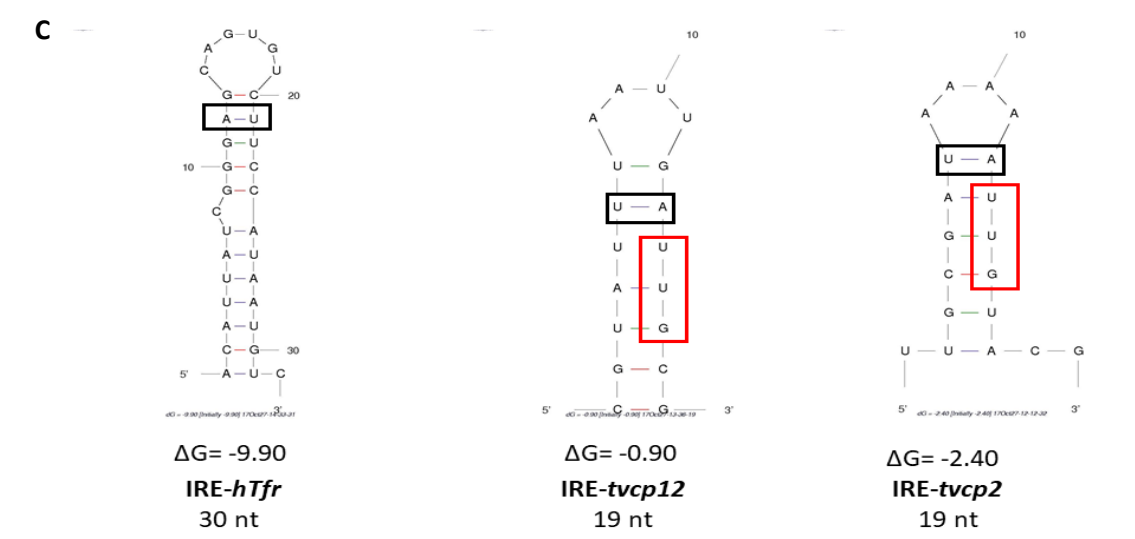
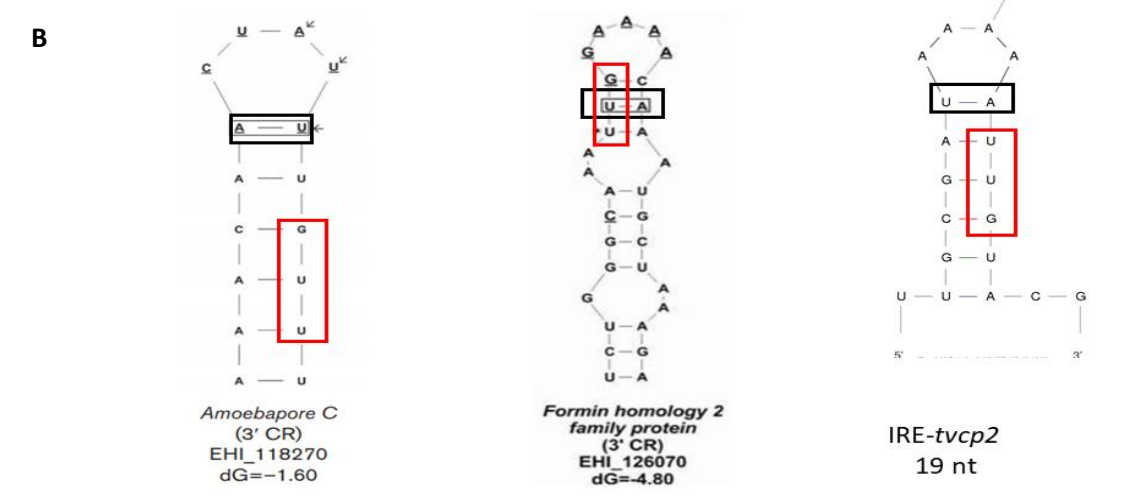
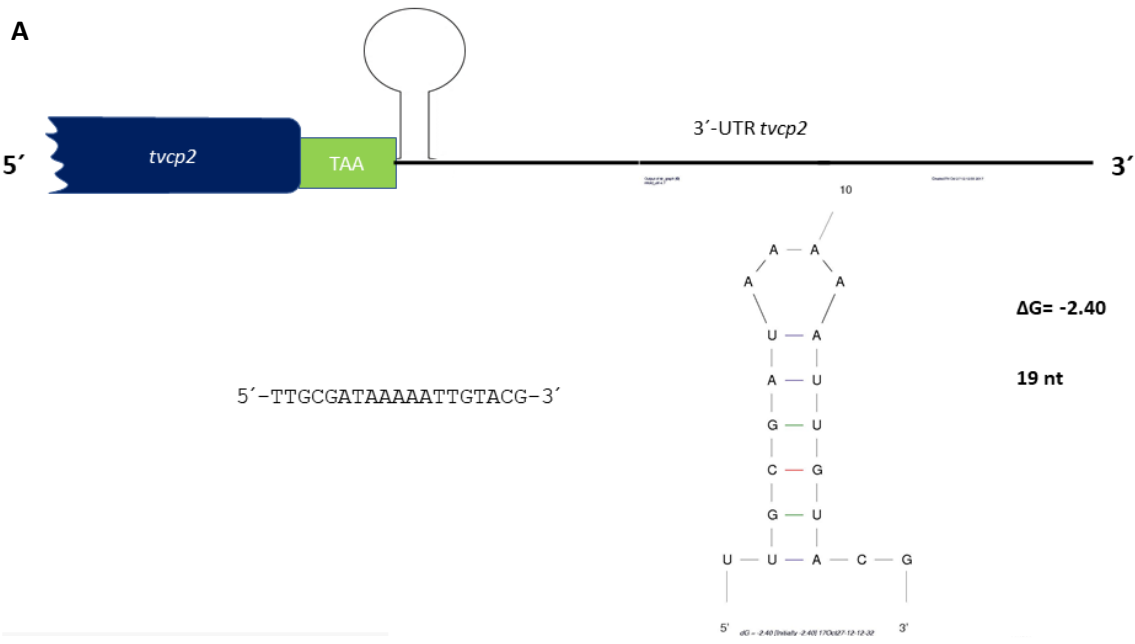


Figura 19. Análisis *in silico* de la región regulatoria 3' de *tvcp2*. A) Análisis de la región regulatoria 3'-*tvcp2* con el software MFold 3.1 para la identificación de estructuras tallo-burbuja. Se muestra la estructura tallo-burbuja encontrada. B) Comparación de la estructura tallo-burbuja encontrada en el mRNA *tvcp2* con otras estructuras previamente reportadas como IRE-hTfr y el IRE-*tvcp12*. C) Comparación de la estructura tallo-burbuja del mRNA *tvcp2* con IREs putativos reportados en *E. histolytica* (Amebaporo C y formina).

Estos datos fueron comparados con estructuras tallo-burbuja reportadas previamente en *E. histolytica*. Las estructuras con las cuales se comparó la estructura tallo-burbuja encontrada en *tvcp2* fueron las presentes en los mRNA del amebaporo C y de la formina (Soto-Castro y col., 2017).

En estas estructuras también se encuentra presentes los dominios A-U y el de estabilización reportado en protozoarios. Este análisis por comparación sugiere que la estructura tallo-burbuja encontrada en el mRNA *tvcp2* podría ser funcional y participar en un mecanismo de regulación a nivel postranscripcional por hierro mediado por el sistema paralelo al IRE/IRP previamente descrito para tricomonas (Solano-González y col., 2007; León-Sicairos y col., 2004).

8.3. Determinar la vida media del mRNA *tvcp2* y el sitio de corte para poliadenilación en diferentes condiciones de hierro

Para corroborar la posible regulación de *tvcp2* al nivel posttranscripcional se verificó la regulación negativa por hierro a nivel de transcrito por qRT-PCR (previamente evaluado por RT-PCR punto final en el trabajo de maestría). La Figura 20 muestra una expresión 2 veces mayor de transcritos de *tvcp2* en la condición de RH respecto a AH. Esto confirma los datos obtenidos previamente en el que se determinó que en la condición de RH hay una mayor cantidad de transcritos *tvcp2* y que coincide con el aumento en la cantidad de proteína y la relevancia en los mecanismos de patogenicidad de *T. vaginalis*. Estos resultados apoyan la presencia de un mecanismo de regulación por hierro al nivel posttranscripcional.

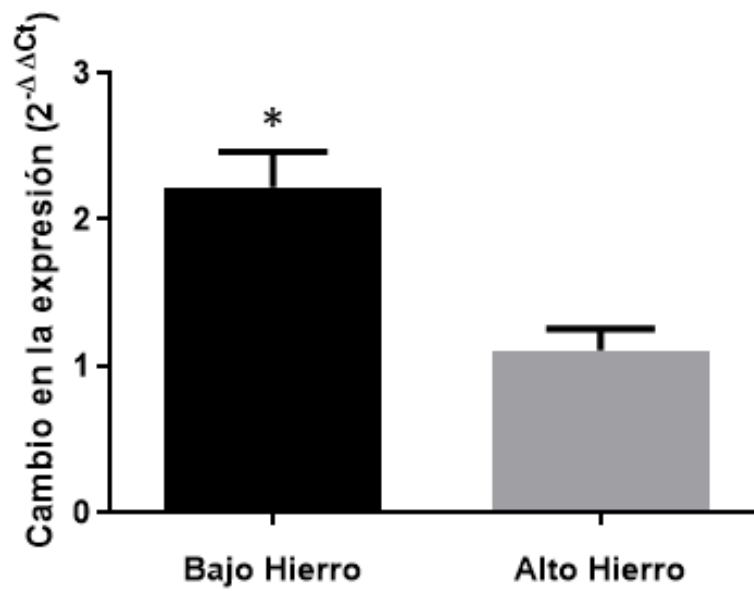


Figura 20. Análisis de la expresión de *tvcp2* en RH y AH por qRT-PCR. Análisis de la expresión de los transcritos en condiciones de RH y AH por qRT-PCR. El ensayo de cuantificación del cambio en la expresión se realizó por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y col., 2001), por comparación con transcritos de β -tubulina en las mismas condiciones de hierro.

Para confirmar la presencia de un mecanismo de regulación a nivel posttranscripcional por hierro para *tvcp2*, se evaluó la estabilidad del mRNA a través de la determinación de la vida media del mRNA *tvcp2* en condiciones de RH y AH mediante el uso del bloqueador transcripcional actinomicina D, como se describe en la metodología. Este bloqueador transcripcional impide la síntesis de nuevos transcritos y permite el análisis de los transcritos ya sintetizados y así seguir su estabilidad por medio de una cinética a 1, 3, 6 y 12 h posttratamiento. La Figura 21A muestra en un tiempo inicial diferencias en la cantidad de transcrito entre RH y AH y que además conforme transcurrió el tiempo de la cinética, los mensajeros de *tvcp2* en RH se mantuvieron estables al no mostrar degradación, aún más allá de las 12 h de tratamiento con el bloqueador transcripcional. En contraste, en los transcritos *tvcp2* de AH se observó una cantidad inicial disminuida, respecto a la condición de RH, aunado a que se observó la pérdida de transcritos *tvcp2* a las 6 y 12 h después del tratamiento con actinomicina, lo que sugiere un decaimiento en la estabilidad del mRNA *tvcp2* en la condición de AH. Los transcritos de β -tubulina se utilizaron como control los cuales se mantuvieron estables hasta las 12 h después del bloqueo transcripcional e independiente de la condición de hierro.

Al hacer el análisis densitométrico de las bandas y graficar las intensidades obtenidas en una gráfica semi-logarítmica, se observa que los transcritos de *tvcp2* en RH se mantienen estables, con una vida media de >12 h, mientras que hay una disminución de la cantidad de los transcritos de *tvcp2* en la condición de AH y su estabilidad se redujo hasta llegar un 3% respecto a los de RH en tiempo inicial. La vida media de los transcritos de *tvcp2* en AH fue de 3.6 h.

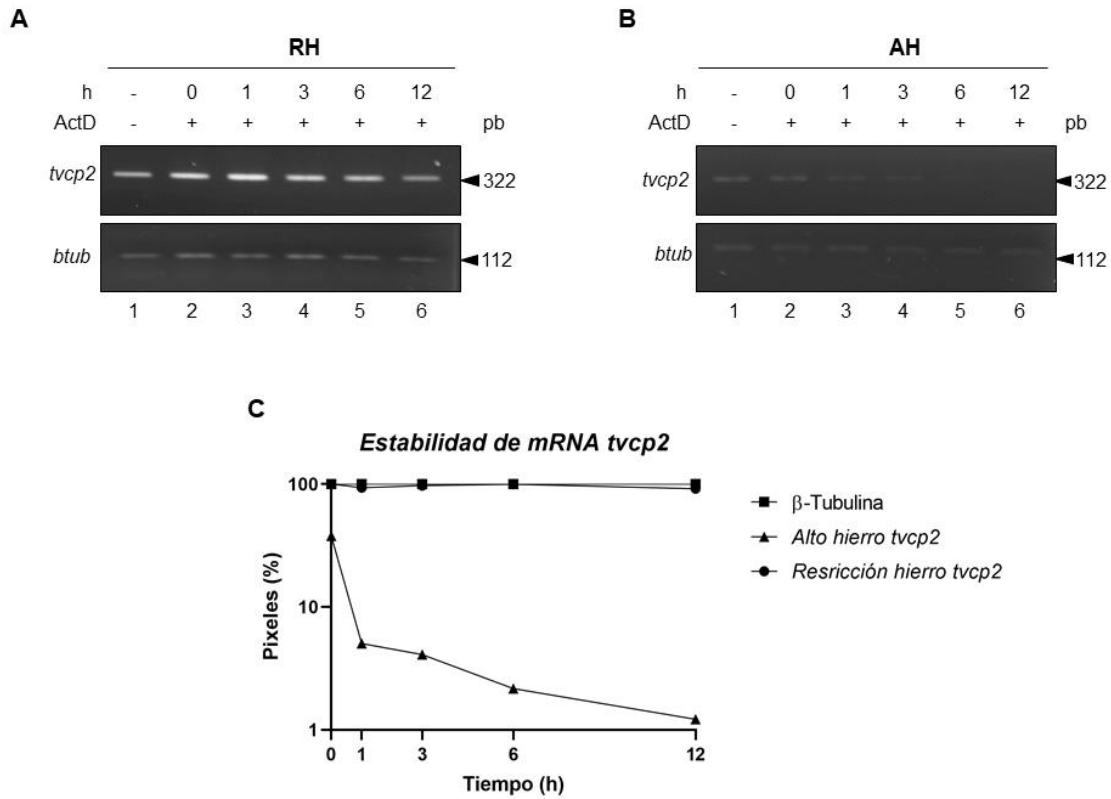


Figura 21. Ensayo de estabilidad y determinación de la vida media del mRNA *tvcp2* en condiciones de RH y AH. A) Gel de agarosa al 2% en el cual se corrieron los productos de PCR obtenidos de la amplificación del fragmento de *tvcp2* a partir de cDNA obtenido de parásitos tratados con Actinomicina D a tiempos de 0, 1, 3, 6 y 12 h postratamiento y cultivados en condiciones de RH y AH. B) Gráfico (escala semi-logarítmica) del análisis densitométrico de las bandas obtenidas de *tvcp2* en RH y AH, así como las obtenidas para β -*tubulina*, para el cálculo de la vida media del mRNA *tvcp2*.

Este resultado muestra que hay una estabilidad diferenciada entre condiciones de hierro para los transcritos de *tvcp2*, por lo que se infiere que hay un mecanismo que actúa a nivel postranscripcional que afecta la estabilidad de los mRNA de *tvcp2*. Por lo que se volvió a reanalizar *in silico* la región regulatoria 3' del gen, en busca de la señal de poliadenilación y el sitio de corte de *tvcp2* en los ESTs y transcriptomas en diferentes condiciones de cultivo en busca de más secuencias regulatorias en las que pudiera tener algún efecto del hierro y modular su expresión génica.

En la región regulatoria 3'-*tvcp2* se buscaron las secuencias reportadas previamente por Espinosa y col., 2002 necesarias para la poliadenilación de los mRNA. En la Figura 22 se muestra el contexto genómico de la señal de poliadenilación reportado por Espinosa y se compara mediante un esquema con lo encontrado a nivel de secuencia genómica en *tvcp2*. La señal de poliadenilación en *tvcp2* se encuentra acoplada al codón de paro. A 35 nt río abajo se encuentra una secuencia que tiene homología con la secuencia consenso del sitio de corte para poliadenilación reportada (Espinosa y col., 2002) y a 16 nt río debajo de éste, se encuentra un elemento distal rico en T.

Al analizar con mayor detalle la secuencia que corresponde al posible sitio de corte, se observó que ahí se encuentra la secuencia para otra posible señal de poliadenilación. Por lo que se siguió analizando los nucleótidos río abajo de la segunda señal de poliadenilación y se encontró a 27 nt río debajo de la segunda señal de poliadenilación otra secuencia putativa para un segundo sitio de corte para poliadenilación. Además, a 7 nt río abajo del segundo sitio de corte se encontró un

A



B

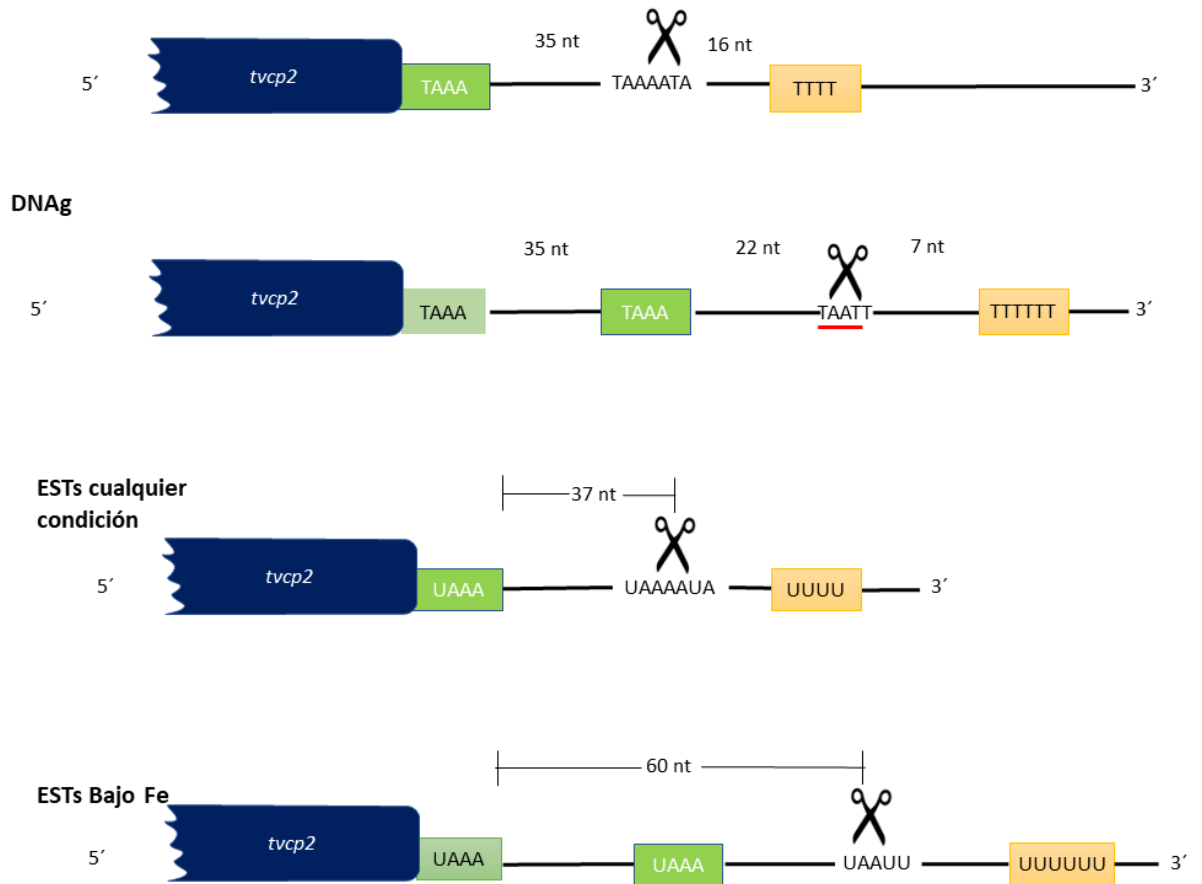


Figura 22. Análisis *in silico* de la región regulatoria 3´- *tvcp2* para la búsqueda de señales de poliadenilación. A) Análisis *in silico* de la región regulatoria 3´-*tvcp2*, a nivel de secuencia genómica, en la que se comparó su secuencia con las secuencias consenso del contexto genómico de la señal de poliadenilación en *T. vaginalis*. B) Análisis de ESTs reportados para el gen *tvcp2* que incluyen la región regulatoria 3´-*tvcp2*. Los ESTs analizados provienen de parásitos en diferentes condiciones de cultivo (por ejemplo, baja glucosa, condiciones normales, adhesión a fibronectina, adhesión a células VEC, pseudoquiste inducido por frío, etc.). Estos se compararon con los ESTs reportados en la condición de RH.

segundo elemento distal rico en T. Este análisis orienta hacia la presencia de un posible fenómeno de poliadenilación alternativa, hasta la fecha no descrito en *T. vaginalis*. La funcionalidad de las dos posibles señales de poliadenilación detectadas a nivel genómico en *tvcp2* se buscó a nivel transcriptómico mediante el análisis de las secuencias EST reportadas para el gen *tvcp2* en la base de datos del genoma de tricomonas. Encontramos que los 48 ESTs de bajo hierro presentan un 3'-UTR más largo (60 nt) en comparación con los 220 ESTs reportados para las demás condiciones de cultivo de parásitos (37 nt) (baja glucosa, contacto con células VEC, adhesión a fibronectina, trofozoíto, frío, cultivo no sincronizado y sincronizado, condiciones normales). Los resultados de este análisis *in silico* de ESTs sugieren que *in vivo* ambas señales de poliadenilación del gen *tvcp2* se utilizan, posiblemente mediante un proceso de poliadenilación alternativa dependiente de las condiciones de cultivo de las tricomonas. Los datos se apoyan en la presencia transcritos con 2 diferentes longitudes de 3'-UTR y diferente estabilidad de los mRNA *tvcp2* dependiente de la concentración de hierro en el cultivo mostrado en las Figuras 21 y 22.

Para confirmar la presencia de una poliadenilación alternativa promovida con las concentraciones de hierro, se realizó un experimento de RACE-3' utilizando RNA de parásitos crecidos en RH y AH, el cual permitió determinar el sitio de corte para poliadenilación de *tvcp2*, haciendo uso en la reacción de RT-PCR anidada con un oligonucleótido (oligo) adaptador que actúa como sonda para captar los transcritos poliadenilados del gen *tvcp2* en específico mediante otro par de oligos que anclan en secuencias divergentes de la región codificante del gen *tvcp2*.

En la Figura 23 se muestra el diseño de estos oligos y la secuencia en la cual hibridan. Enseguida, se realizó la extracción de RNA de parásitos crecidos en condiciones de RH y AH (Figura 20A), se hizo el tratamiento con DNAsa I y se sintetizó el cDNA. Este cDNA se utilizó para realizar la amplificación de los transcritos específicos de *tvcp2*.

En la Figura 24B se muestra el resultado de la amplificación utilizando ambos oligos específicos. Al utilizar el oligo específico 1 se tiene la amplificación de varias bandas entre 300 y 1000 pb y que se logra una mayor especificidad al utilizar el oligo específico 2 para *tvcp2*; por lo que se observa la presencia de 2 bandas de 1000 pb que se conservó de la amplificación inicial y una segunda banda de 400 pb en la condición de bajo hierro, mientras que en la condición de alto hierro se tiene una sola banda de 400 pb.

Los productos de PCR se ligaron al vector de tránsito pGEM-T Easy (Promega) y se transformaron bacterias *E. coli* quimiocompetentes de la cepa DH5 α . De la transformación se obtuvieron 150 colonias del amplicón de RH y 130 colonias del amplicón de AH. Estas clonas se evaluaron por PCR de colonia utilizando el oligo específico 2 y el oligo que ancla en el codón de paro para monitorear si las clonas presentan el inserto.

>TVAG_057000 | Trichomonas vaginalis G3 | Clan CA, family C1, papain-like cysteine peptidase | CDS | length=945

```
5' ATGTTTGCTTCTTGCTTTCTGGCGCTACAAGCAACGTCCTCAAGCATGAGGAGAAGGCCTTCCTTGCCTACATGC
GTGAGACAGGCAACTTCTTACAGGCGATGAGTACCATTCCGCCTTGGCATCTACCTTGCCAACAAGCGTCTTGTTC
AGGAACACAACGCTGCTAACAAAGGGCTTCAAGCTTGGACTCAACAAGCTCGCTCACCTTACACAGTCCGAATACAGAT
CTCTTCTTGTGCTAAGAGACTCGGACAGAAGTCTGGCAACTTCTTCAAGTGGGATGCTCCAGCCAACGACGCTGTGCA
CTGGCGTGACAAGGGCATTGTCAACAAGATCAAGGATCAGGGTCAGTGGCGCTCCTGCTGGGCTTTCTCTGCCATCCA
GGCTCCGAATCCCGCTATGCTCAGGCTAACAAAGCAGCTCCTCGATCTCGCCGAACAGAACATCGTTGATTGCGTTAC
ATCCTGCTATGGCTGCAACGGTGGCTGGCCATCCAAGGCTATCGACTACGTTGTCAAGCACCAGGCTGGCAAGTTCAT
GTCACAGCTGACTACCCATACACAGCTCGCGATGGCACATGCAAGTTCATGCTTCCAAGTCTGTCGGTTTAACAAA
GGGCTACGATGAGGTTAAGGACACAGAGGCTGAACTCGCTAAGGCTGCTTCCAAGGGTGTTGTCTCCGTCTGCATCGA
TGCTTCCACTACTCCTTCCAGCTTTACACATCTGGCATCTATGATGAACCATCCTGCTCTGCCTGGAACCTCGATCA
CGCTGTCGGCCTTGTGGCTACGGCACAGAGGGCTCAAAGAATACTGGATCGTCCGCAACTCCTGGGGCACATCTTG
GGTGAGCAGGGCTACATCCGCATGATCAAGGACAAGTCCAACCAGTGGCGCATTGCTTCTGAAGCTATCCTTCCAAA
GGCTCTCTAA-3'
```

GSP1-tvcp2

GSP2-tvcp2

Oligo Fw-tvcp2

Oligo Rv-tvcp2

GSP1-tvcp2/Rv-tvcp2= 456 pb
GSP2-tvcp2/Rv-tvcp2= 322 pb

Figura 23. Diseño de oligonucleótidos específicos para el ensayo de RACE-3'. Resaltado en color gris y acuamarina se muestran los oligos diseñados previamente por Lorenzo-Benito, tesis de maestría, 2011, que amplifican al gen completo *tvcp2*. Resaltado en color verde se muestra el oligo específico 1 y en amarillo se muestra el oligo específico 2. Estos oligos anclan en las secuencias más divergentes respecto a otras CPs de *T. vaginalis*, con lo que se hace específico el ensayo de RACE-3'.

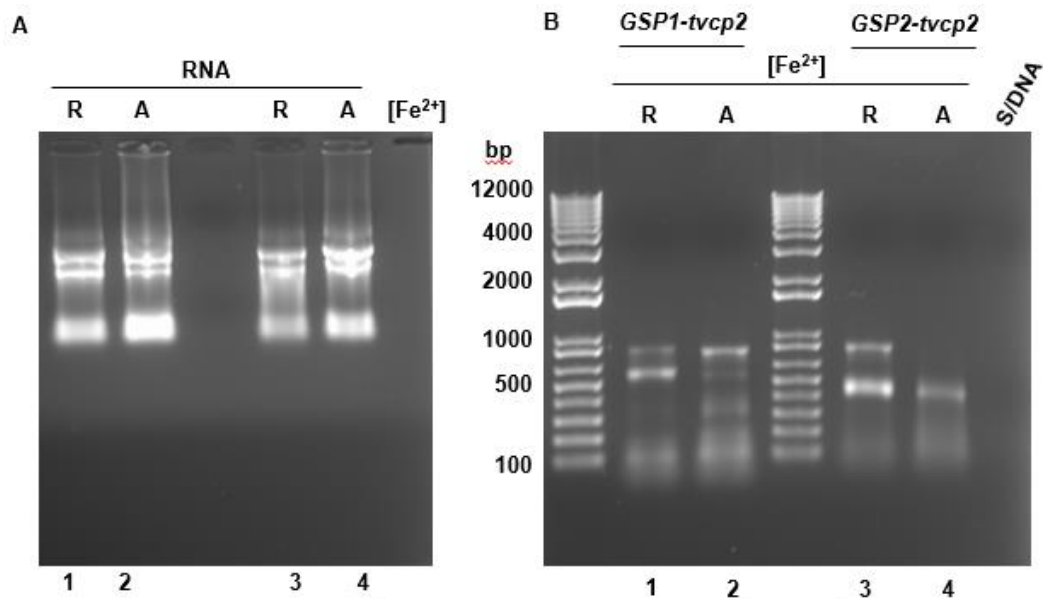


Figura 24. Ensayo de RACE-3' para los mRNA de *tvcp2* en RH y AH. A) Análisis de la integridad del RNA obtenido de parásitos crecidos en condiciones de RH y AH en geles de agarosa/DEPC al 1%. Se obtuvieron 2 lotes de RNA de cultivos de parásitos independientes de los cuales se sintetizó cDNA utilizado como templado. B) Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la amplificación por PCR punto final de los transcritos de *tvcp2* mediante PCR anidada, primero con el oligo específico 1 (GSP1, carriles 1 y 2) y luego con el oligo específico 2 (GSP2, carriles 3 y 4).

En la Figura 25 se muestra en análisis por PCR de colonia de las clonas obtenidas. De las 20 clonas analizadas en la condición de RH, solamente 2 no contenían inserto, mientras que en las colonias de la condición de AH, 9 de las 20 colonias analizadas no presentaron inserto. Como control positivo (carril 8) se utilizó DNA genómico.

A partir de este ensayo de PCR de colonia, se seleccionaron las clonas que poseen el inserto del producto de PCR del RACE-3', se extrajo DNA plasmídico y se analizó por digestión con la enzima de restricción *EcoRI*, ya que los sitios de *EcoRI* en el vector de transito utilizado son los que se encuentran flanqueando el sitio múltiple de clonación y permitió la evaluación rápida de la presencia del inserto con una sola digestión. En la Figura 25 se observa la liberación del inserto en el tamaño esperado de ~500 pb en todas las clonas analizadas de RH, mientras que en las de AH se observa la presencia de insertos de diferentes tamaños entre 500 y 200 pb. Los plásmidos obtenidos de estas clonas fueron secuenciados en el Laboratorio Nacional de Genómica del Instituto de Ecología, UNAM. En la Figura 27 se muestra el alineamiento de las clonas que se secuenciaron. En total se secuenciaron 12 plásmidos obtenidos de la condición de RH y 10 de la de AH. De las secuencias de RH se encontró en 10 de las 12 clonas que la cola de poli (A) se añadió en un sitio de corte más alejado y por tanto en un 3'-UTR más largo. En el caso de AH se observó este fenómeno en 5 de las 10 clonas analizadas; los 5 restantes mostraron la adición de la cola de poli (A) en un sitio de corte que resulta en un 3'-UTR más corto.

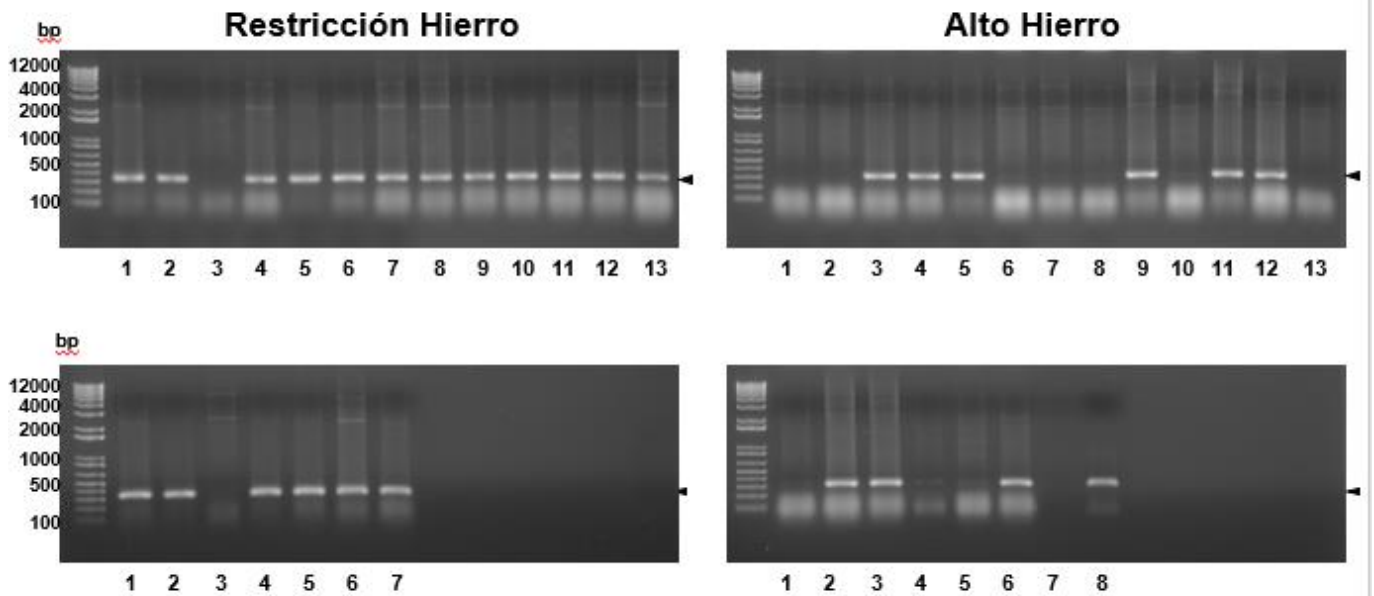


Figura 25. Análisis de las colonias obtenidas de la ligación del producto de PCR del RACE 3' por PCR de colonia. Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación por PCR punto final de los fragmentos clonados del producto de PCR proveniente del ensayo RACE-3' en condición de RH (A) y AH (B).

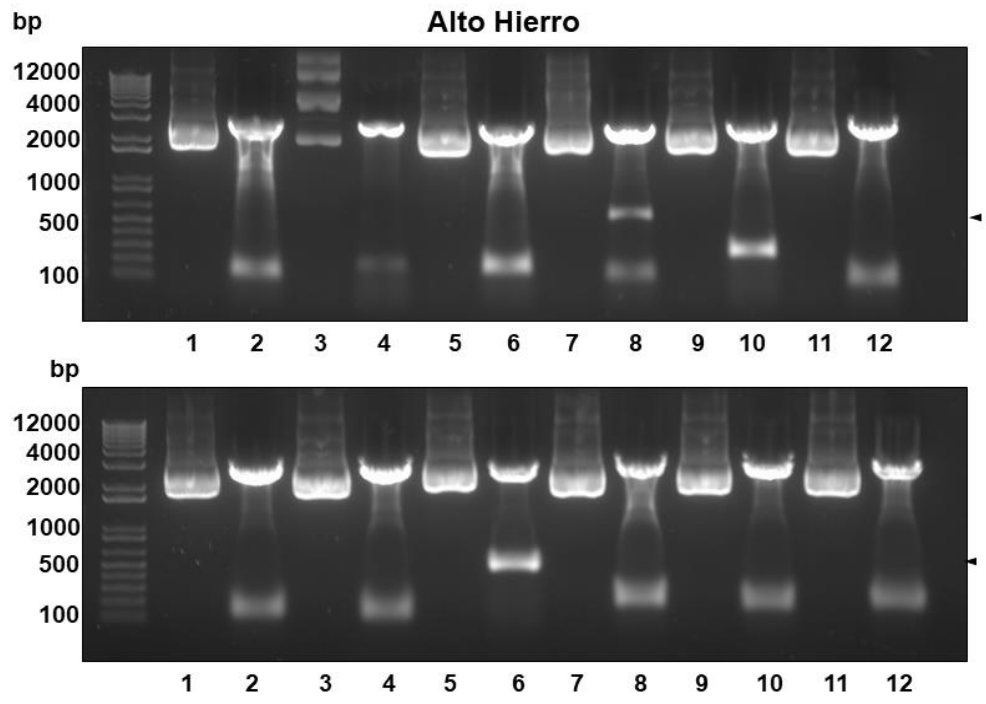
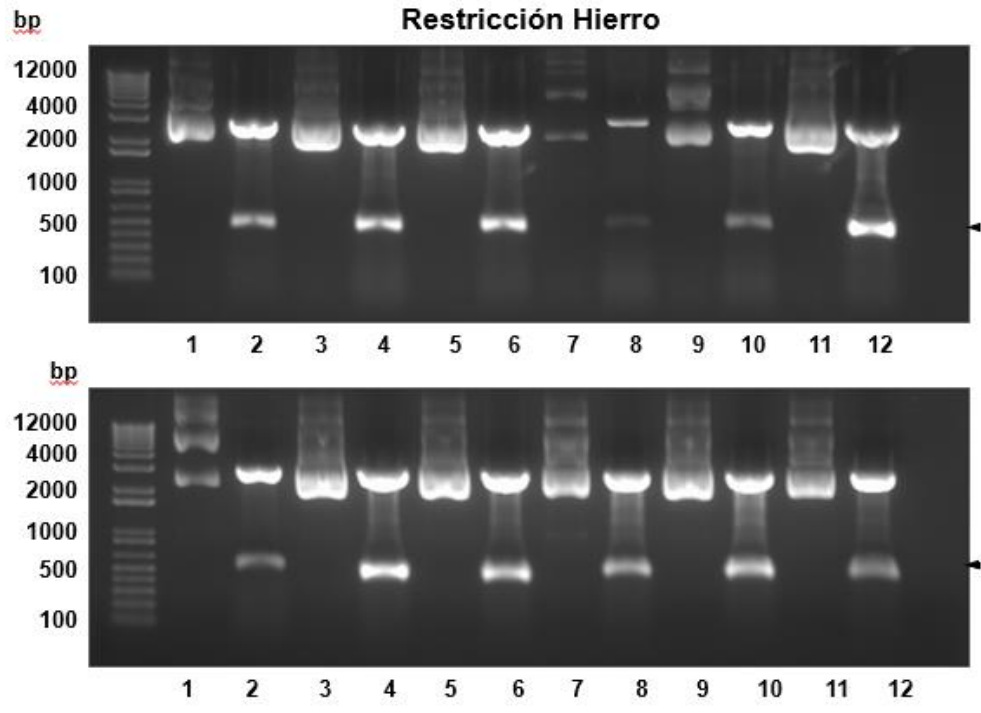


Figura 26. Análisis por digestión con *EcoRI* de DNA plasmídico de las clonas obtenidas del ensayo RACE-3´. Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de digestión con la enzima de restricción *EcoRI* del DNA plasmídico de las clonas positivas que contienen el producto del ensayo RACE-3´ para el mRNA *tvcp2* en condiciones de RH y AH.

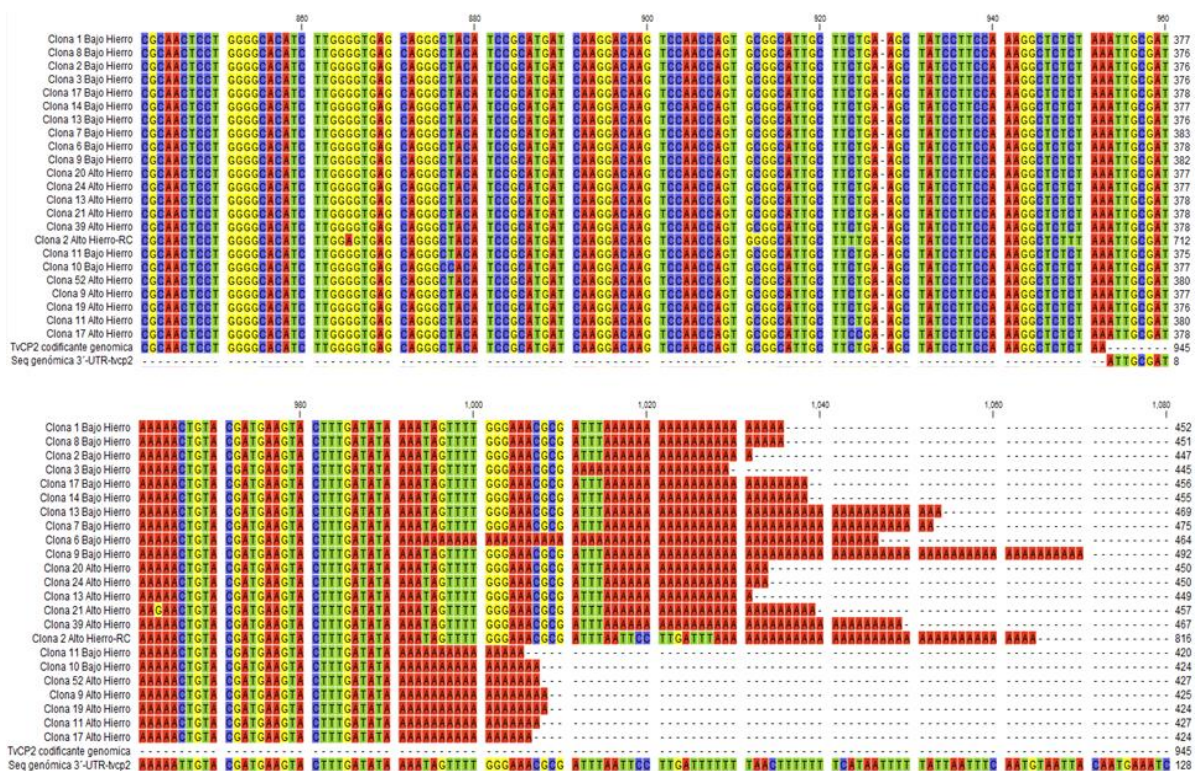


Figura 27. Alineamiento del resultado de la secuenciación de los plásmidos obtenidos del ensayo RACE-3' para *tvcp2* en RH y AH. Alineamiento de las secuencias de las clonas obtenidas en condiciones de restricción y alto hierro. Las secuencias fueron comparadas con la secuencia codificante de *tvcp2*, así como con la secuencia genómica del 3'-UTR-*tvcp2*.

El haber encontrado diversidad en cuanto a la elección del sitio de corte para poliadenilación en ambas condiciones de hierro sugiere que este fenómeno no es absoluto y sugiere que hay una tendencia a utilizar los sitios de corte de manera diferenciada. Esto se puede explicar a través del ensayo de estabilidad del mRNA *tvcp2* en el cual en la condición de AH a las 6 y 12 h después del bloqueo transcripcional se disminuye drásticamente la cantidad de transcritos pero estos no desaparecen por completo, lo cual probablemente esos transcritos podrían corresponder a transcritos con el 3'-UTR más largo y ser transcritos más estables que sean los que al final de un cultivo de 24 h en alto hierro permiten la traducción de la proteína en alto hierro, pero en menor cantidad que en RH. Este resultado en conjunto con lo obtenido en los análisis *in silico*, sugieren la participación de un mecanismo de regulación a nivel postranscripcional mediado por hierro de la expresión del gen *tvcp2* y que este puede ser a través de interacciones RNA-proteína mediante una estructura tallo-burbuja o bien a través de un mecanismo de poliadenilación alternativa. Debido a esto se planteó analizar la maquinaria de poliadenilación en *T. vaginalis* y ver la posible modulación por hierro de algunos de sus componentes para llevar a cabo la poliadenilación alternativa.

8.4. Identificación *in silico* de la maquinaria de poliadenilación en *T. vaginalis*

Espinosa y col., 2002 describieron el contexto genómico de la señal de poliadenilación y las secuencias consenso que funcionan para el reclutamiento de la maquinaria de poliadenilación en *T. vaginalis*. Esta maquinaria está presente en el parásito, ya que presenta transcritos poliadenilados funcionales. Sin embargo, a la fecha aún no se han descrito los componentes que integran dicha maquinaria y

menos la regulación de su función por diferencias en las condiciones de nutrientes en el microambiente como podrían ser glucosa o hierro.

Es por esto que se hizo un análisis *in silico* para identificar los posibles componentes de la maquinaria de poliadenilación en tricomonas. El primer acercamiento fue revisar los componentes que tienen las maquinarias de poliadenilación en humano y en *E. histolytica* (Ospina-Villa y col., 2020) los cuales se muestran en la Figura 28.

La maquinaria de poliadenilación en humano, la mejor descrita, se divide en cuatro complejos: 1) CPSF (“Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor”), integrado por las proteínas CPSF160, CPSF100, CPSF73, CPSF30, WDR33, FIP, Simplekina, Poli (A) Polimerasa α , β y γ . 2) CstF (“Cleavage stimulation factor”), integrado por las proteínas CstF77, CstF64, CstF50, PABP-2, PP1 α y RBPP6. 3) CFIm (“Cleavage Factor I m”) integrado por las proteínas CFIm72, CFIm68, CFIm59 y CFIm25. 4) CFII m (“Cleavage Factor II m”), integrado por las proteínas CLP1 y PCF11. Lo reportado para *E. histolytica* es que tiene una maquinaria con menos elementos para llevar a cabo la poliadenilación de sus transcritos. En la figura 28 se observa la ausencia de elementos como simplekina, poli (A) polimerasa β y γ , así como CstF50 y componentes del complejo CFIm como CFIm72, CFIm68, CFIm59. En el caso del complejo CFIm, solo se encuentra descrita la proteína EhCFIm25, que es precisamente la proteína involucrada en la actividad de exonucleasa y que lleva a cabo el corte para poliadenilación. Este dato sugiere que hay una maquinaria de poliadenilación críptica, con los elementos mínimos necesarios para llevar a cabo

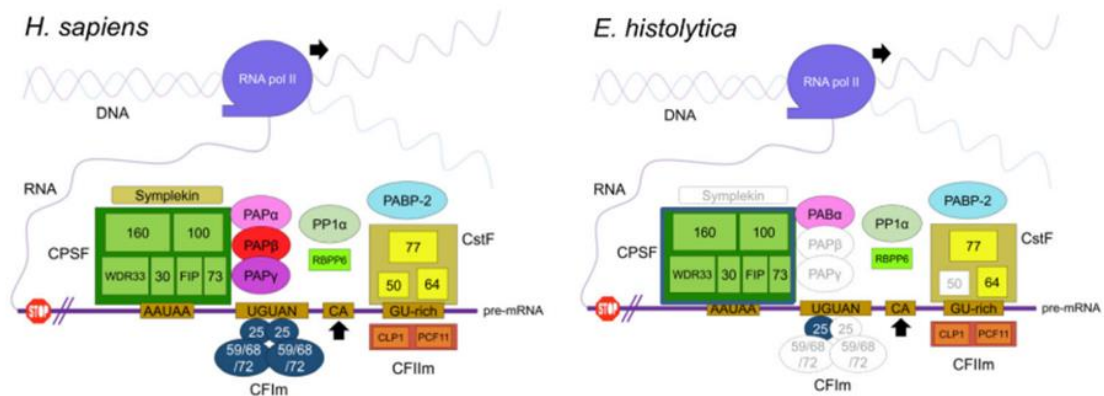


Figura 28. Modelo de la maquinaria de poliadenilación en humano y en *E. histolytica*. Modelo en el que se compara la maquinaria de *E. histolytica* respecto a la de humano, en la cual se muestra a los componentes del complejo CPSF (complejo que reconoce la señal de poliadenilación y lleva adosada la poli (A) polimerasa), del complejo CstF (complejo que reconoce el elemento distal rico en U), del complejo CFIm (complejo encargado del reconocimiento del sitio de corte y que por su actividad de exonucleasa lleva a cabo el corte para poliadenilación) y el complejo CFIlm (complejo que también reconoce el elemento distal rico en U y que actúa como andamio para el correcto ensamblaje del resto de la maquinaria de poliadenilación). En el caso de *E. histolytica* se observa la ausencia de algunos componentes de los diferentes complejos proteicos de la maquinaria de poliadenilación. Tomado de Ospina-Villa y col., 2020.

esta función y que posiblemente constituya un ancestro evolutivo de lo que se encuentra en eucariontes superiores.

Con los números de acceso de los genes que participan como integrantes de la maquinaria de poliadenilación de *E. histolytica*, se realizó la búsqueda de homólogos en la base de datos del genoma de *T. vaginalis*, por medio de BLAST para buscar genes que pudieran codificar para las proteínas de la maquinaria de poliadenilación. Este análisis *in silico* (Figura 29; Suplementario 1) resultó en la identificación a nivel genómico de 13 de los componentes de la maquinaria de poliadenilación (la de humano cuenta con 22 proteínas componentes en total). Inclusive para algunos de estos genes se encontró más de una copia. Tal es el caso de TvCPSF160, TvCPSF73, TvCPSF30, TvCstF50, TvCIP1 y TvPAP. A partir de estos datos se generó una base de datos con la información de cada gen encontrado como candidato a la maquinaria de poliadenilación de Tv. A estos genes seleccionados se le revisó su expresión a nivel de transcrito en la base de datos de los ESTs reportados para cada gen. También se buscó en los transcriptomas reportados para Tv: en baja y alta glucosa (Huang y col., 2014), bajo y alto hierro (Horváthová y col., 2007), adherencia a fibronectina (Huang y col., 2012) y adherencia a células VEC (De Jesús y col., 2007). Del análisis de la literatura correspondiente se encontraron transcritos para TvCPSF160, TvCPSF100, TvPAP, TvCstF77, TvCstF64, TvCstF50, TvRBPP6, TvCFIm25, TvCIP1 y TvPCF11. Con estos datos se buscó la expresión de estos genes candidatos a nivel de proteína en los proteomas de Tv para identificar a los componentes que se expresan y tienen actividad en la maquinaria de poliadenilación.

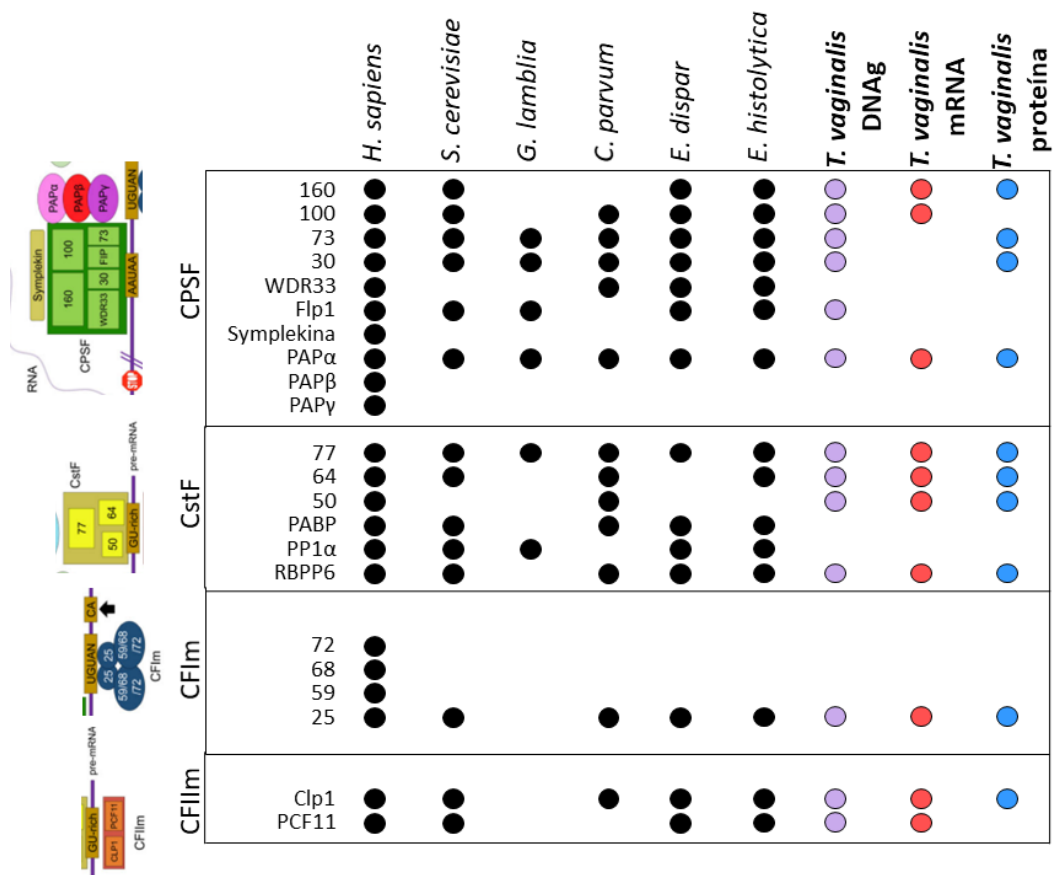


Figura 29. Análisis *in silico* de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis* comparada con la maquinaria de poliadenilación de otros organismos. En esta tabla se muestran los componentes de la maquinaria de poliadenilación para *H. sapiens*, *S. cerevisiae*, *G. lamblia*, *C. parvum*, *E. dispar* y *E. histolytica*. Los genes, los transcritos y las proteínas de tricomonas encontrados homólogos a la maquinaria reportada para *E. histolytica*, utilizando herramientas bioinformáticas como BLAST y reportes en la literatura. Imagen de la maquinaria de poliadenilación modificada de Ospina-Villa y col., 2020.

Para esto, se hizo una revisión en la literatura que reporta los proteomas para Tv en condiciones de baja y alta glucosa (Huang y col., 2014), bajo y alto hierro (De Jesús y col., 2007), adherencia a fibronectina (Huang y col., 2012), adherencia a células VEC (De Jesús y col., 2007), así como el proteoma de trofozoíto y pseudoquiste (Dias-Lopes y col., 2018). Este análisis muestra la identificación a nivel de proteína de los componentes de la maquinaria de poliadenilación de Tv constituida en el **complejo CPSF** por TvCPSF160, TvCPSF73, TvCPSF30, TvPAP; en el **complejo CstF** por TvCstF77, TVCstF64, TvCstF50 y TvCIP1; en el **complejo CFIm** por TvCFIm25 y las **proteínas accesorias** TvSsu72, TvPfs2, TvPC4/Sub11, (Figura 30).

Es interesante notar que hubo homólogos encontrados a nivel genómico y a nivel de transcrito, pero la proteína no se identificó en los proteomas revisados. En cambio, algunos genes homólogos identificados como CPSF73 y CPSF30, aunque no se encontraron en los transcriptomas ni en las secuencias EST reportadas, sí se identificaron, pero en los proteomas. Esto podría sugerir que muchos de estos homólogos tienen un nivel de transcripción muy bajo en comparación con otros genes, por lo que resultan indetectables. Lo mismo podría pasar con los homólogos que no se identificaron a nivel de proteína, lo que sugiere que son componentes muy escasos y no es posible identificarlos por MS en un extracto de proteínas totales del parásito. Por lo que se recomienda realizar un fraccionamiento celular para separar el núcleo y así buscar enriquecer las proteínas nucleares para su identificación por MS.

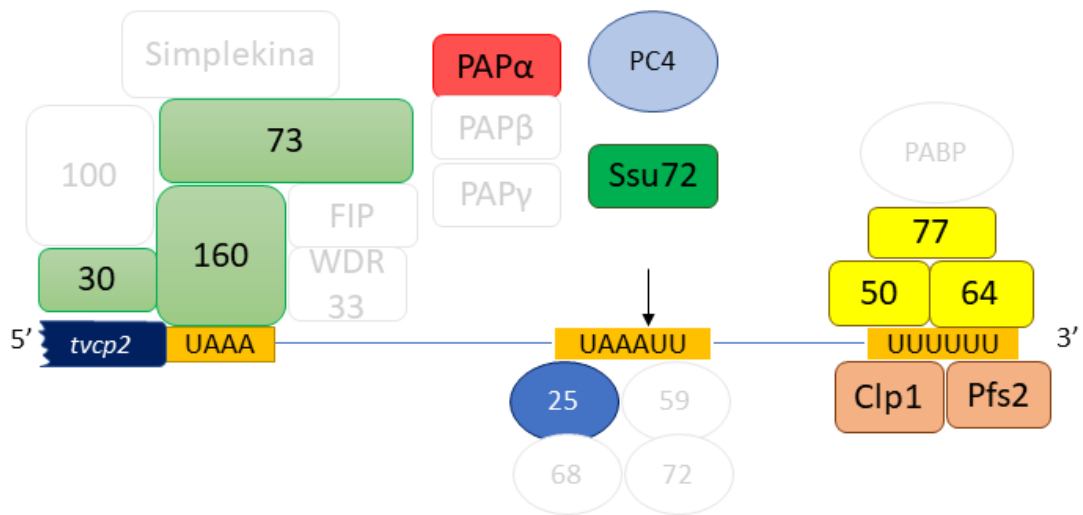


Figura 30. Comparación de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis* contra la maquinaria de poliadenilación en humano. Esquema en el que se representa la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis*. Los componentes que no presentan color son los que están ausentes en el parásito respecto al humano.

8.5. Analizar el efecto del hierro en la expresión de los componentes de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis* y su identificación por proteómica en extractos nucleares

Para evaluar a nivel de transcrito la expresión de los componentes de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis* en condiciones de restricción y alto hierro por medio de RT-PCR punto final por duplicado biológico, utilizando oligonucleótidos específicos que amplifican fragmentos de <300 pb y cDNA sintetizado a partir de RNA proveniente de parásitos crecidos en ambas condiciones de cultivo. Los resultados expresados en la Figura 31 muestran una regulación positiva por hierro a nivel global en los integrantes de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis*. Al hacer el análisis por complejos se observa lo siguiente: el complejo CPSF (encargado de reconocer la señal de poliadenilación) integrado en *T. vaginalis* por dos genes *cpsf160*, *cpsf73*, *cpsf30* y dos genes de *pap* mostró que ambos genes *cpsf160* están regulados positivamente por hierro, mientras que *cpsf73* y *cpsf30* muestran tendencia a una mayor cantidad de transcritos en la condición de alto hierro; sin embargo, no hay diferencias significativas, mientras que ambos genes *pap* (poli A polimerasa) no muestran diferencias en su expresión. En el complejo CstF (encargado de reconocer el elemento distal rico en U) integrado en *T. vaginalis* por *cstf77*, *cstf64* y *cstf50* se observó que los genes *cstf77* y *cstf50* muestran una mayor expresión en la condición de alto hierro con diferencia estadísticamente significativa, mientras que el gen *cstf64* mostró la misma tendencia; sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa.

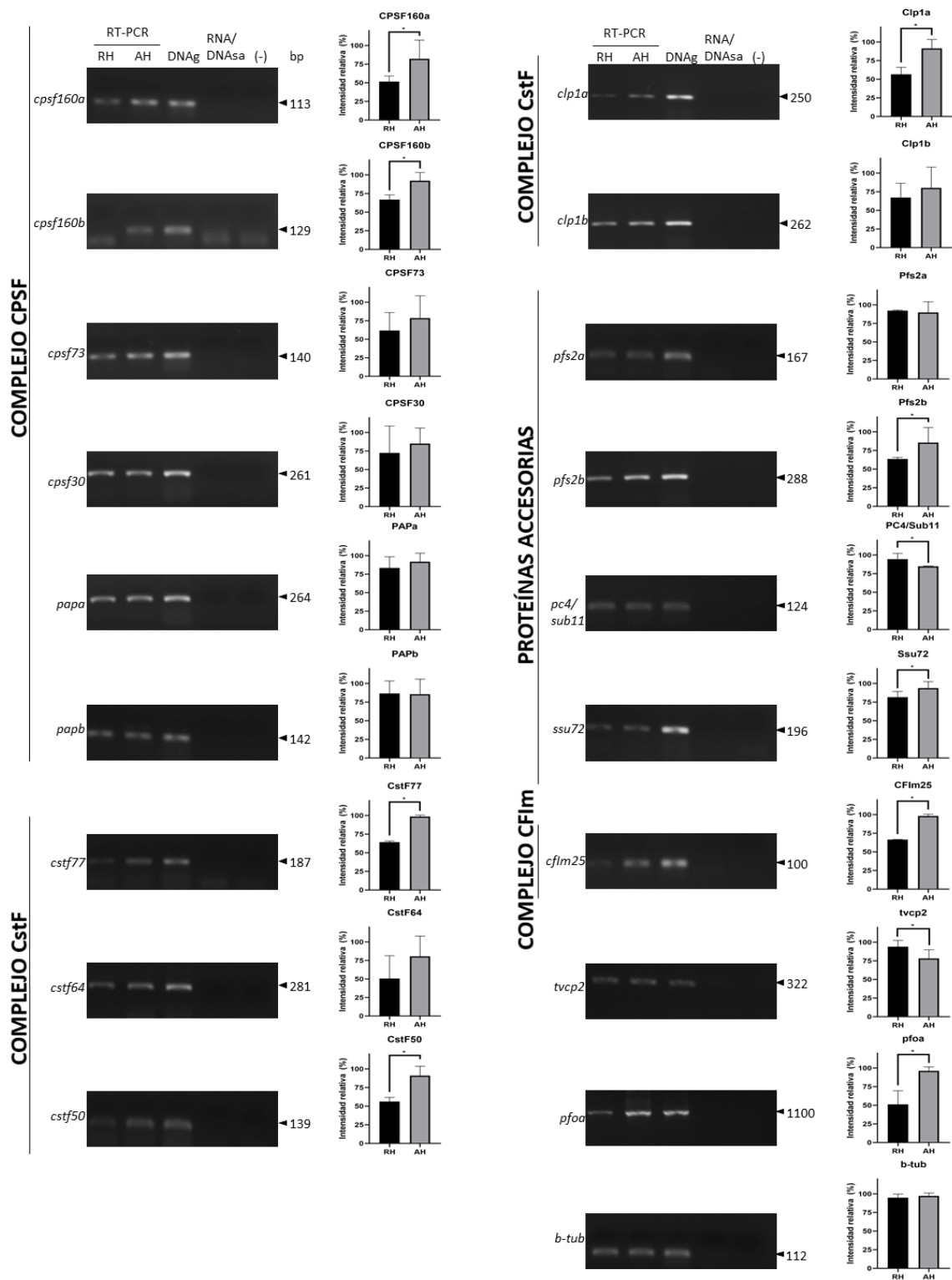


Figura 31. Amplificación por RT-PCR punto final de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis*. Amplificación de fragmentos de los genes que codifican para las proteínas integrantes de la maquinaria de poliadenilación, agrupados en los complejos que forman, utilizando cDNA sintetizado a partir de RNA proveniente de parásitos crecidos en condiciones de restricción (RH) y alto hierro (AH). Como control positivo de amplificación se amplificó cada gen con DNA genómico del aislado CNCD147. Como controles negativos se utilizó una reacción con RNA tratado con DNAsa y otra reacción sin DNA. Como control de la condición de hierro se amplificó a los genes *tvcp2* y *pfoa* (gen regulado negativa y positivamente por hierro, respectivamente) y el el gen *b-tub* se utilizó como control de carga. Se realizó el análisis densitométrico de las bandas obtenidas de cada gen en el duplicado biológico y se analizó las diferencias estadísticamente por el método de análisis de varianzas (ANOVA) usando el software GraphPad Prism 8. Los asteriscos indican diferencia significativa.

El complejo CFIm integrado por *cflm25* mostró los siguientes resultados: el gen *cflm25* presentó una mayor expresión en la condición de alto hierro y el análisis densitométrico no muestra diferencias significativas. Adicionalmente, los componentes accesorios de la maquinaria de poliadenilación *pc4/sub11*, *ssu72* y dos genes de *clp1* presentaron los siguientes resultados: El gen *pc4/sub11* fue el único gen de los analizados que mostró una mayor expresión en parásitos crecidos en RH que en AH y cuya diferencia es estadísticamente significativa. En cambio, el gen *ssu72* mostró una ligera mayor expresión en la condición de alto hierro. Al igual que el gen *clp1a*, mientras que el gen *clp1b* tiene una tendencia de mayor expresión en la condición de alto hierro, pero no es tan evidente y el análisis densitométrico no muestra diferencias significativas. Como control de regulación negativa por hierro se amplificó un fragmento de 322 pb del gen *tvcp2* (Rivera-Rivas y col., 2020) y como control de regulación positiva por hierro se amplificó un fragmento de 1.1 kb del gen *pfoa* (Meza-Cervantez y col., 2011). Como control de carga se amplificó el gen *btub*. Los controles muestran la expresión previamente reportada, dando validez al material utilizado para el análisis de expresión a nivel de transcrito.

La búsqueda de los componentes de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis* se continuó desde otra perspectiva. Para lo cual se realizó un análisis proteómico a partir de extractos nucleares de *T. vaginalis* crecidas en RH y AH por MS/MS, mediante el método de “shotgun de complejidad media”, el cual permitió la identificación de una mayor cantidad de proteínas.

Los resultados de espectrometría de masas muestran la identificación de 435 proteínas en el extracto nuclear de *T. vaginalis* crecidas en RH, de las cuales 93

Proteínas identificadas en extractos nucleares en restricción de hierro

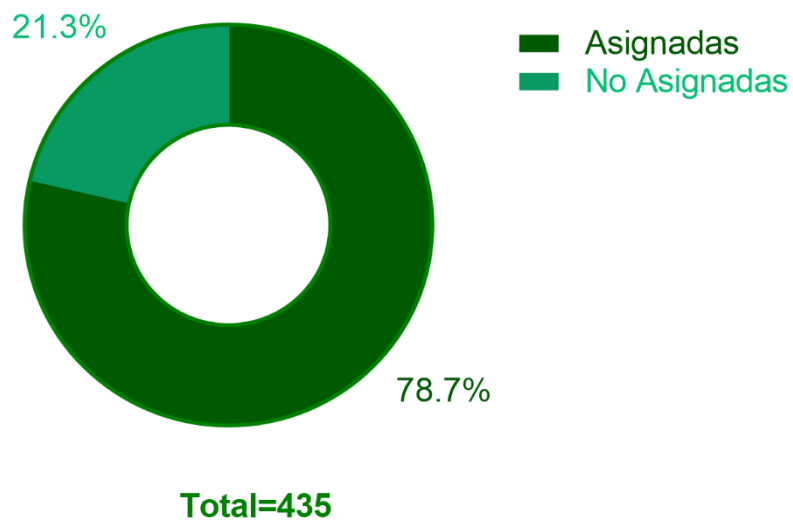


Figura 32. Proteoma nuclear en RH. Porcentaje de proteínas nucleares asignadas y no asignadas del total de proteínas identificadas por MS/MS en el extracto nuclear de RH. La gráfica de pastel muestra el porcentaje de proteínas asignadas y no asignadas respecto al total de proteínas identificadas.

corresponden a proteínas hipotéticas o no asignadas (21.3%) y 342 proteínas corresponden a proteínas asignadas (78.7%) (Figura 32).

Las proteínas asignadas que se identificaron se clasificaron en 15 grupos de acuerdo a su función (Figura 33). La distribución de las proteínas identificadas fue la siguiente: 17 de citoesqueleto, 30 metabólicas, 6 histonas, 69 corresponden a proteínas ribosomales, 19 que participan en señalización, 9 en el procesamiento del RNA, 6 proteínas que tienen unión a DNA, 8 que participan en la degradación y reciclaje de proteínas, 11 en el plegamiento de proteínas, 5 ATPasas, 11 proteínas que participan en la traducción de mRNAs, 2 proteasas del tipo metaloproteasas, 25 proteínas que funcionan en el tráfico vesicular, 2 adhesinas, 3 proteínas que pertenecen al sistema antioxidante y 14 proteínas con otras funciones. Los datos particulares de cada proteína identificada se concentraron en el apéndice #1. La mayoría de las proteínas identificadas corresponden a típicas proteínas nucleares.

Clasificación de proteínas nucleares identificadas en restricción de hierro

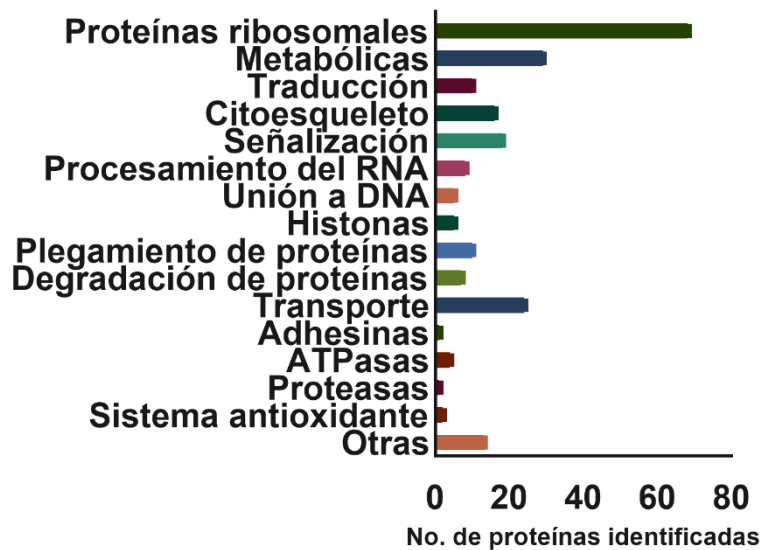


Figura 33. Clasificación funcional de las proteínas nucleares identificadas por MS/MS en extractos nucleares de parásitos crecidos en RH. Clasificación de las proteínas asignadas de acuerdo a su función.

Proteínas identificadas en extractos nucleares en alto hierro

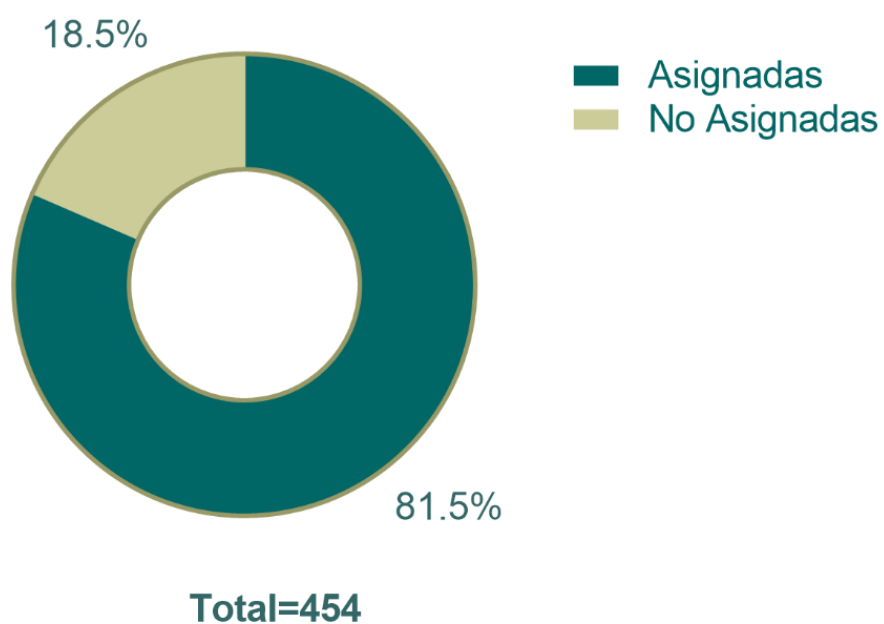


Figura 34. Proteoma nuclear en AH. Contiene proteínas nucleares asignadas e hipotéticas del total de proteínas identificadas por MS/MS. Gráfica de pastel que muestra el porcentaje de proteínas asignadas e hipotéticas respecto al total de identificadas.

Las proteínas identificadas por espectrometría de masas en el extracto nuclear de AH fueron 454, de las cuales 84 correspondieron a proteínas no asignadas (18.5%) y 370 a proteínas asignadas (81.5%) (Figura 34).

Las proteínas asignadas se clasificaron en 15 grupos de acuerdo a su función. La distribución fue la siguiente: 26 de las proteínas identificadas correspondieron a proteínas del citoesqueleto, 77 metabólicas, 70 ribosomales, 15 que participan en la traducción de mRNAs, 8 ATPasas, 17 que participan en el plegamiento de proteínas, 11 que participan en la degradación y reciclaje de proteínas, 5 en el procesamiento del RNA, 29 que participan en señalización, 4 que se unen a DNA, 30 de tráfico vesicular, 2 histonas, 1 proteasa, 1 adhesina , 4 proteínas del sistema antioxidante y 11 con otras funciones (Figura 35; Apéndice #2).

Los proteomas nucleares de RH y AH se compararon. Ambas condiciones comparten 117 proteínas, 318 fueron exclusivas de la condición de RH y 342 de la condición de AH (Figura 36).

Adicionalmente realizamos un análisis *in silico* de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis* para identificar la presencia de secuencias de localización nuclear en cada uno, utilizando el software cNLS Mapper (Kosugi y col., 2009). Los resultados muestran que todos los componentes presentan al menos una señal de localización nuclear ya sea monopartita (PKKKRKV) o bipartita canónica (KRPAATKKAGQAKKKK) (Marfori y col., 2011) Los resultados de cada proteína se muestran en la tabla 2.

Clasificación de proteínas nucleares identificadas en alto hierro

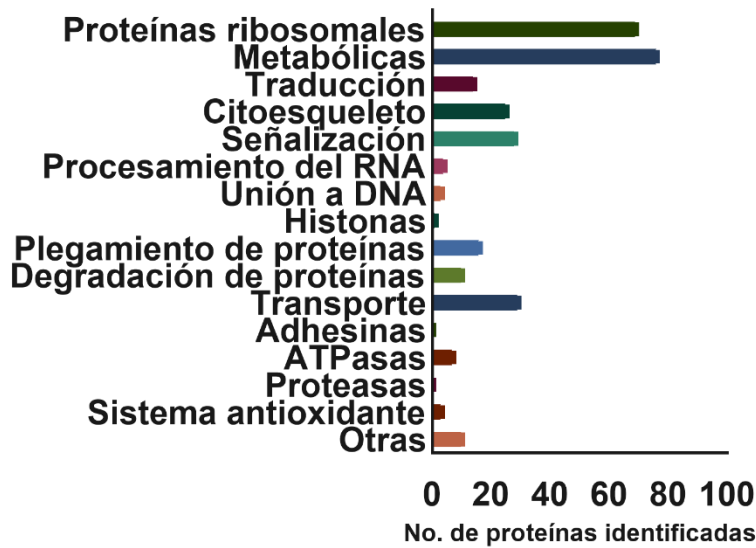


Figura 35. Clasificación funcional de las proteínas nucleares de parásitos cultivados en AH.

Clasificación de las proteínas asignadas identificadas por MS/MS, de acuerdo a su función.

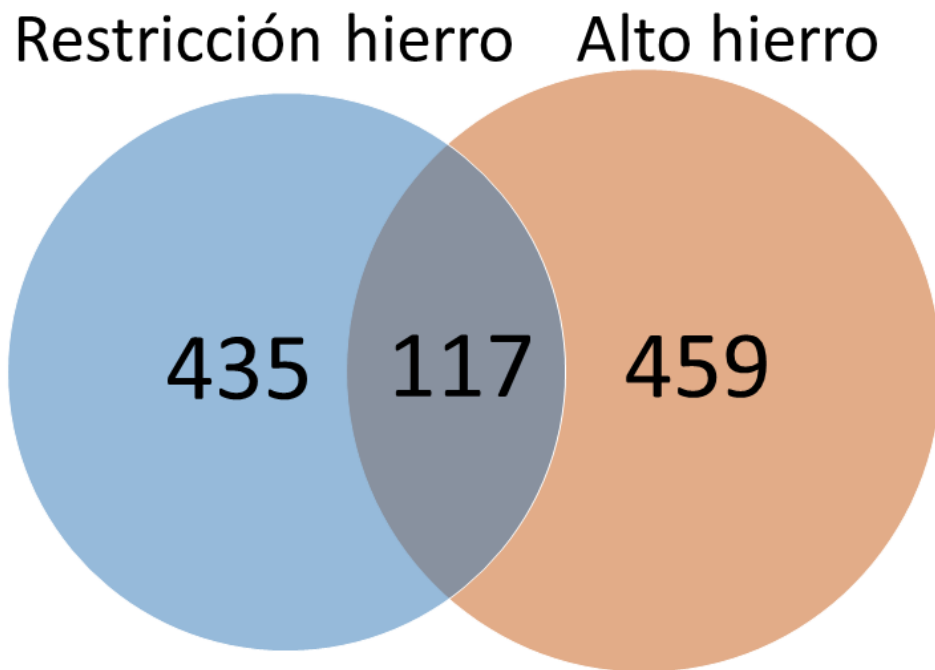


Figura 36. Comparación de los proteomas nucleares de parásitos cultivados en RH y AH. La cantidad de proteínas nucleares compartidas en las dos condiciones de cultivo (RH y AH) se muestran en color morado, las de RH se muestran en color azul y las de AH en café.

Tabla 2. Determinación de señales de localización nuclear en las proteínas componentes de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis*.

Proteína	No.	Secuencia de motivo de localización nuclear ^b	Localización (aa)	Score
TvCPSF160a	2	PPLKKKETVL ^c	238	3
		KNVIDDCDMLIDKIEDMPDHLKFAT ^d	1250	3.1
TvCPSF160b	1	RQYMKRRFAIV ^c	1438	4.5
TvCPSF73	3	GEDKLTVMPLFAFQEVRSCIIILKYHRKRV ^d	7	2.6
		KYKRKRVMMLDCGIHPAYENFGGLPFIDAIDP ^d	30	2.5
		KVECDKQDERLELELNELATTLHEFCQP ^d	6.45	2.7
TvCPSF30	2	GDKCKRKHTP ^c	121	3
		EFKFESVLKEVDQNEENDLKDYINKLSKKD ^d	15	5.6
TvPAPa	1	RPLSTKIENPQVINRKKIPDFCFPNRKKKPSK ^d	461	4.1
TvPAPb	1	TNKELLEKGELLTPFEKQVIELIKKTCS ^d	6	4
TvCstF77	1	RSKPNLSLEDIMAAYDYALDKVGLDIKACP ^d	89	4
TvCstF64	1	RLFIRNLPSKVEEKELVKEFSKMGEITDCKVIRTE ^d	8	2.2
TvCstF50	1	FYPPKLTLEIEQNGEIANHELDLQSLDSTTN ^d	22	2.5
TvClp1a	1	RLSLGDVVKLKVVVEGVVWVWLFQWQIPELETFRDES ^d	15	2.2
TvClp1b	1	DPIRKRFDSDSEARFLLTPGQSITLSVDSG ^d	9	2
TvPfs2a	1	FEKKNLIEMINYFFDEEPQERPQNNMRQP ^d	5	2.8
TvPfs2b	2	IWKIRDREYYQHYILDHAQQERSSKDIAT ^d	156	3.9
		DPTKKLLASCSDDKTITIWRFERANPIIL ^d	312	3.1
TvPC4	1	RIQVHKFKGKILFDRIELYCKDDEWLPGKKGISL ^d	32	4.8
TvSsu72	1	KEILSKMESENNQYYEEQGLIKMLRDD ^d	62	4.1
TvCFlm25	1	RIHKLSNYRFGASEDEEEEEKAHTDRMEKIKEIFA ^d	4	3.3

^aNúmero de señales de localización nuclear presentes en las proteínas de la maquinaria de poliadenilación de tricomonas encontradas a través del software cNLS Mapper (Kosugi y col., 2009).

^bSecuencia de la/s señal/es de localización nuclear encontradas en la secuencia de aminoácidos de las proteínas que componen la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis*. ^cSecuencias que tienen homología con la secuencia monopartita canónica de eucariontes superiores. ^dSecuencias que tienen homología con la secuencia bipartita canónica de eucariontes superiores.

9. DISCUSIÓN

T. vaginalis es un parásito protozoario que se enfrenta a concentraciones cambiantes de nutrientes durante el ciclo menstrual, tales como hierro y glucosa (Arroyo y col., 2015). Los cambios drásticos en las concentraciones de nutrientes modulan diferencialmente la expresión de factores de virulencia, tales como adhesinas (Moreno-Brito y col., 2005; Meza-Cervantez y col., 2011) y CPs (Miranda-Ozuna y col., 2019). Estas CPs han sido relacionadas con mecanismos de patogenicidad del parásito, como por ejemplo en la citotoxicidad a monocapas de células HeLa por CPs como TvCP39, TvCP65, TvCP12 y TvCP2 (Ramón-Luing y col., 2011; Álvarez-Sánchez y col., 2000; León-Sicairos y col., 2004; Miranda-Ozuna y col., 2019; Rivera-Rivas, trabajo de maestría, 2016).

Hasta ahora, no se había profundizado en el posible mecanismo de muerte que causa el parásito hacia las células hospederas. Los resultados obtenidos en el objetivo 1 de este trabajo se describe la participación de TvCP2 en la inducción de apoptosis a las células HeLa, lo cual sugiere que este podría ser el mecanismo de muerte que sufren las células HeLa debido a la interacción con *T. vaginalis*. Lo cual es consistente con lo reportado previamente sobre la CP30 como producto de secreción de *T. vaginalis* regulado negativamente por hierro y que participa en la inducción de apoptosis a células epiteliales vaginales (Sommer y col., 2005; Kummer y col., 2008). Dicha fracción de CP30 de secreción está integrada por 4 cisteína proteinasas (TvCP2, TvCP3, TvCP4 y TvCP39). Sin embargo, en este punto se desconocía de manera individual la contribución de las proteinasas que integran la fracción CP30 de secreción en la actividad citotóxica.

Para que una molécula del parásito, como la TvCP2, se le pueda considerar una proteína citotóxica implicada en la inducción de apoptosis como mecanismo de muerte inducido por *T. vaginalis* a las células HeLa es necesario que esta molécula se localice en la membrana plasmática de parásito y/o en sus productos de secreción (Arroyo y Alderete, 1995; Álvarez-Sánchez y col., 2000). Previamente, hemos reportado la localización de TvCP2, en las condiciones de RH y AH, en citoplasma con un patrón puntiforme similar a vesículas, en la membrana plasmática del parásito y en secreciones vaginales de pacientes con tricomoniasis. Esto podría deberse a que TvCP2 se encuentra en los productos de secreción *in vitro* del parásito en ambas condiciones de hierro (Rivera-Rivas y col., 2020). En conjunto, esta información muestra que TvCP2 cumple las condiciones para comportarse como un factor citotóxico. La participación de TvCP2 en citotoxicidad se confirmó al inhibir a la TvCP2 nativa con IgGs anti-TvCP2r, las cuales bloquearon a la proteína presente en membrana plasmática del parásito y la de secreción, logrando disminuir la citotoxicidad y la inducción de apoptosis a monocapas de células HeLa de manera concentración dependiente, similar a lo obtenido con el producto de secreción CP30 (Sommer y col., 2005; Kummer y col., 2008).

T. vaginalis posee algunas CPs que son moduladas negativamente por hierro y que se han caracterizado como proteasas citotóxicas a monocapas de células HeLa, tales como TvCP12 y TvCP39 (León-Sicairos y col., 2004; Cuellar-Silva, 2011, Tesis de maestría; Ramón-Luing y col., 2011). Sin embargo, ninguna de éstas se ha relacionado con el mecanismo de muerte celular por inducción de apoptosis a células HeLa. Previamente se demostró que TvCP2 produce citotoxicidad por

inducción de apoptosis a monocapas de células HeLa al utilizar parásitos crecidos en condiciones de restricción de glucosa (Miranda-Ozuna y col., 2019), con lo que se determina que TvCP2 es una molécula relevante en los mecanismos de patogenicidad de *T. vaginalis*, que se encuentra modulada negativamente por restricción de nutrientes y que esta modulación favorece la acción citotóxica del parásito debido a que induce apoptosis a monocapas de células HeLa. Debido a esto, la condición de restricción de hierro tiene relevancia en la patogenia de *T. vaginalis* y particularmente en la expresión y actividad de TvCP2 como una proteína citotóxica.

Por lo que en el presente trabajo se caracterizó el mecanismo de regulación de la expresión de TvCP2 por hierro, ya que la restricción de hierro promueve una mayor expresión de TvCP2 y su consecuente incremento en la citotoxicidad del parásito.

Para buscar un posible mecanismo de regulación de la expresión de TvCP2 mediada por hierro, se hicieron análisis *in silico* de la región 5' para identificar posibles motivos de respuesta a hierro (Ong y col., 2004). Derivado de esta búsqueda, se encontró el sitio de inicio de la transcripción y motivos que permiten la transcripción basal del gen *tvcp2*. Sin embargo, no se encontró ningún motivo con homología al reportado previamente para el gen *ap65-1* que es un motivo de respuesta positiva a hierro y que promueve la expresión de este gen en altas concentraciones de hierro, lo cual era de esperarse, ya que la expresión de *tvcp2* se regula negativamente por hierro. A la fecha, no se han identificado motivos presentes en la región 5'-UTR que respondan negativamente a hierro.

Respecto a la región regulatoria 3'-*tvcp2*, se hizo un análisis *in silico* en el cual se buscó la presencia de estructuras tallo-burbuja, como el caracterizado previamente en TvCP12, otra CP de *T. vaginalis* que participa en la inducción de citotoxicidad a monocapas de células HeLa. En este mecanismo de regulación postranscripcional negativa mediado por hierro en el que participa una estructura tallo-burbuja en la región 3'-UTR del mRNA *tvcp12* que interacciona con proteínas citoplásmicas de unión a RNA atípicas (Figueroa-Angulo y col., 2015), favoreciendo la estabilidad del mRNA y propiciando una mayor traducción de TvCP12 en la condición de restricción de hierro (León-Sicairos y col., 2004). En el análisis *in silico* se encontró la presencia de una estructura tallo-burbuja en la región 3'-UTR-*tvcp2* que al compararla con estructuras tallo-burbuja en mRNA regulados negativamente por hierro en eucariontes superiores y en otros protozoarios como *E. histolytica* mostró la presencia de dos motivos conservados entre las estructuras tallo-burbuja, el motivo **U-A** en la base de la burbuja y el motivo **G-U-U** presente en el tallo de estructuras tallo-burbuja de mRNA de protozoarios (Torres-Romero y Arroyo, 2009). El hallazgo de estos motivos conservados en la estructura tallo-burbuja encontrada en la región 3'-UTR del mRNA *tvcp2* sugiere que sea una estructura funcional que podría ayudar a incrementar la estabilidad del mRNA *tvcp2*.

Para confirmar la participación de un mecanismo postranscripcional mediado por hierro involucrado en la expresión de *tvcp2*, se analizó la estabilidad del mRNA de *tvcp2* de parásitos crecidos en condiciones de RH y AH, a diferentes tiempos postratamiento con Actinomicina D. El resultado mostró una estabilidad incrementada en los transcritos de *tvcp2* de parásitos crecidos en condiciones de

RH, con una vida media mayor a las 12 h; mientras que los transcritos en AH mostraron menor estabilidad, ya que tienen una vida media de 3.6 h. Esto sugiere que en la condición de bajo hierro existe algún mecanismo que favorece una mayor expresión de TvCP2 al encontrar mRNAs más estables. Estos datos son acordes a lo previamente reportado para los mRNA *tvcp12* cuyos mensajeros son más estables en bajo que en alto hierro (León-Sicairos y col., 2004). Además, el efecto negativo del hierro sobre la expresión de TvCP2 a nivel de mRNA se corroboró por qRT-PCR, la cual resultó en una expresión de alrededor de dos veces más en la condición de RH respecto a la de AH, lo cual resulta consistente con lo previamente obtenido durante el trabajo de maestría (Rivera-Rivas, tesis de maestría, 2016) por RT-PCR punto final.

Debido a la mayor estabilidad de los transcritos de *tvcp2* en RH, se buscó la señal de poliadenilación del mensajero de *tvcp2*, siguiendo el contexto genómico reportado por Espinosa y col., 2002. En el 3'-UTR-*tvcp2* se encontraron dos señales de poliadenilación, dos sitios de corte para poliadenilación y dos elementos distales ricos en uridinas, los cuales por ensayos de RACE-3' se corroboró que ambos son funcionales; con una tendencia del 80% a utilizar la señal de poliadenilación distal en la condición de RH, lo cual genera un 3'-UTR más largo y más estable que favorecería una mayor traducción del mRNA *tvcp2* en esta condición. Lo cual se soporta experimentalmente, ya que por WB se observa mayor cantidad de TvCP2 en RH que en AH (Figuras 10 y 20). Esta tendencia del uso de la segunda señal de poliadenilación en los transcritos de AH es solo del 30%. Lo cual puede explicar la presencia de baja cantidad de proteína TvCP2 en la condición de AH por ensayos

de WB (Rivera-Rivas, tesis de maestría, 2016; Rivera-Rivas y col., 2020), posiblemente debido a la presencia de baja proporción de mRNA *tvcp2* con el 3'-UTR más largo. Previamente se ha reportado la aparición de más de una señal de poliadenilación en los genes tales como la beta- succinil CoA sintetasa (β -SCS), en la que no ha sido descrita la funcionalidad de ambas señales de poliadenilación. Otro ejemplo de doble señal de poliadenilación se reportó en la metionina liasa gamma para la cual se utilizan ambas señales de poliadenilación, corroborando su funcionalidad (Espinosa y col., 2002).

Este tipo de variación en el uso de las señales de poliadenilación se denomina poliadenilación alternativa (Elkon y col., 2013), la cual es un mecanismo de regulación de la expresión de genes que puede influir directamente en la estabilidad de los RNA mensajeros, favoreciendo la traducción (Di Giammartino y col., 2011) e inclusive modificar la región codificante, favoreciendo alguna localización subcelular en la proteína sintetizada (Turner y col., 2018). En el caso del mRNA *tvcp2*, se puede inferir por comparación con los modelos de poliadenilación alternativa (Turner y col., 2018) que se tiene una **poliadenilación alternativa de tipo tándem**, en la cual una o más señales de poliadenilación ubicadas en la región regulatoria 3'- del gen de interés resulta en tamaños diferentes de la región 3'-UTR, con cambios en la estabilidad del mRNA sin modificar la secuencia codificante. Este modelo propuesto de poliadenilación alternativa en tandem es consistente con los cambios observados en la estabilidad del mRNA, la mayor cantidad de proteína y el consecuente incremento en la citotoxicidad del parásito en la condición de RH.

El fenómeno de poliadenilación alternativa se regula por algunos de los factores que integran la maquinaria de poliadenilación, tales como CFIm25 (Najaf Abadi y col., 2019), CPSF160 (Yang y col., 2016), o CPSF73 (López-Camarillo y col., 2005), lo cual permite la selección de una señal de poliadenilación en cierta condición, teniendo como producto un mRNA con diferentes grados de estabilidad. Sin embargo, en *T. vaginalis* aún no se ha descrito la maquinaria de poliadenilación ni su participación en un mecanismo de regulación tal como la poliadenilación alternativa, ni mucho menos que pueda estar modulada por factores ambientales como el hierro.

Debido a esto, como parte de este proyecto, también se buscó la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis* y se identificaron algunos candidatos que al ser modulados diferencialmente por hierro pudieran estar participando en la regulación de la poliadenilación alternativa de los mRNA *tvcp2* mediada por hierro. Por su cercanía evolutiva, se utilizó como base la maquinaria de poliadenilación previamente descrita para *E. histolytica* (López-Camarillo y col., 2005). Al utilizar las secuencias de cada uno de los integrantes reportados por análisis BLAST en la base de datos del genoma de *T. vaginalis* (www.trichdb.org), se encontraron los primeros candidatos, de los cuales hay algunos que se encontraron hasta 3 copias génicas (ubicadas en diferentes contigs). Mientras que hubo componentes que no se encontró ningún gen que tuviera homología con los previamente reportados para *E. histolytica*. A su vez, se comparó lo obtenido en el análisis del genoma de *T. vaginalis* con las maquinarias de poliadenilación reportadas para otros parásitos protozoarios como *Cryptosporidium parvum* (Mazurie y col., 2013), *Giardia lamblia*

(Franzén y col., 2013) comparados con la maquinaria del humano, encontrando diferencias en la expresión de los componentes de las maquinarias de poliadenilación de los diferentes microorganismos, ausencia de algunos de los elementos presentes en la maquinaria de humano, o totalmente ausentes en la maquinaria de protozoarios como la de *G. lamblia* la más críptica, ya que solamente posee las proteínas necesarias para el reconocimiento de la señal de poliadenilación y los motivos que permiten el andamiaje del resto de la maquinaria. Respecto a esto, *T. vaginalis* no tiene una maquinaria tan críptica como la de *G. lamblia*, pero sí lo es respecto a la maquinaria de *E. histolytica*, ya que hay componentes de la maquinaria (como CPSF100) que sí posee, pero *T. vaginalis* no. Asimismo, no es tan completa como la que presentan los humanos. La maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis* tiene las proteínas esenciales que reconocen los motivos y señales de poliadenilación en el mRNA y algunas proteínas accesorias. Los datos obtenidos del análisis *in silico* de la búsqueda de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis* muestra que a nivel de genes se tiene a la mayoría de los genes que codifican para componentes de la maquinaria de poliadenilación, estando ausentes los que codificarían para PAB β , PAP γ , PABP, los integrantes del complejo CFIm (72, 68 y 59). Esto en comparación con la maquinaria de *E. histolytica* resulta en una maquinaria más compacta, ya que *E. histolytica* sí presenta genes para WDR33, PABP y PP1 α . En cambio, al compararla con la de *G. lamblia* se muestra que *T. vaginalis* tiene una maquinaria de poliadenilación más robusta, ya que a diferencia de *G. lamblia* si presenta genes para CPSF160, así como para CstF64 y CstF50, lo que resulta en una mayor cantidad de componentes en la maquinaria de *T. vaginalis* que en *G. lamblia*, pero menos que en *E. histolytica*,

lo cual podría reforzar la posición evolutiva que cada uno de estos protozoarios ocupa.

El análisis de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis* se extendió mediante revisión extensa en transcriptomas y proteomas reportados hasta la fecha. Cabe señalar que a nivel de transcrito hubo algunos genes que no encontramos su expresión; sin embargo, se encontraron en los proteomas reportados por Dias-Lopes y col., 2018, en los estadios de trofozoíto y pseudoquiste inducidos por AH y RH.

Con los candidatos de la maquinaria de poliadenilación encontrados en los análisis proteómicos reportados se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar fragmentos de <300 pb por RT-PCR punto final para determinar el impacto del hierro en la expresión de los genes correspondientes. Los resultados nos muestran una regulación positiva por hierro a nivel global de los 16 genes putativos que componen la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis*. Excepto el gen que codifica para la proteína accesoria PC4/Sub11 (que es un activador de la poli (A) polimerasa), el cual se observó una regulación negativa por hierro. Este resultado toma sentido, dado que en la condición de alto hierro (o abundancia de nutrientes) aumenta la tasa de crecimiento del parásito, por lo que requeriría un nivel de actividad transcripcional más elevado. Por lo que con los datos obtenidos por RT-PCR y densitometría no podemos concluir acerca de que la poliadenilación alternativa en mRNAs tales como el *tvcp2* se deba a una mayor expresión a nivel de transcrito de los componentes de la maquinaria de poliadenilación. Se requiere

realizar más estudios al respecto, ya que el hierro puede influir en el mecanismo de importe y exporte nuclear de estos factores entre otras posibilidades.

Con base a esto elaboramos una hipótesis en la cual se plantea que la regulación de la concentración nuclear de los componentes que integran la maquinaria de poliadenilación en *T. vaginalis* esté dada por el importe de estas proteínas desde el citoplasma al núcleo, ya sea que el punto de regulación sea a través de modificaciones postraduccionales que favorezcan su importe nuclear o esté dado por las proteínas componentes del poro nuclear y que estas sean responsivas a hierro, lo cual favorezca el importe al núcleo de los componentes de la maquinaria de poliadenilación e incremente su concentración en su sitio de acción, logrando saturar el sitio correspondiente a la primera señal de poliadenilación y entonces en la condición de AH tener la poliadenilación estándar. Por lo tanto, el fenómeno de poliadenilación alternativa se presenta en RH cuando la cantidad de transcrito y de proteína de los componentes de la maquinaria de poliadenilación se sintetizan en baja cantidad y se importan también en poca cantidad al núcleo. Las proteínas que reconocen la señal de poliadenilación se unirán primero al segundo motivo con mayor afinidad y entonces el resto de la maquinaria se ensamblará a partir de esta. Por lo que, en la condición de RH el transcrito *tvcp2* tendrá una 3'-UTR más larga. El este mecanismo propuesto es similar al caso de la cadena pesada de la inmunoglobulina M (IgM) en humanos, ya que esta existe en dos formas (forma membranal y forma secretoria) y esto es causado por un mecanismo de poliadenilación alternativa. La forma membranal es debido a la selección del sitio distal de poliadenilación y la forma secretoria por la

selección del sitio proximal acompañada de un fenómeno de splicing. Al estimular células B primarias con LPS se observa un cambio en la selección de la señal de poliadenilación acompañado de un incremento en los niveles de la proteína CstF64 y esto induce la selección de la primera señal de poliadenilación, dando como resultado una mRNA trunco (que pierde la región que codifica para el dominio transmembranal) y que tiene un 3'-UTR más corto (Takagaki y col., 1996; Takagaki y Manley, 1998; Di Giammartino y col., 2011).

Además, se propone que hay diferencias en “fuerza” entre las señales de poliadenilación, debido a variaciones de la señal de poliadenilación canónica y en los nucleótidos adyacentes (Tian y col., 2013). Mientras que la señal de poliadenilación canónica (AAUAAA) está presente en los mRNAs con un único sitio de poliadenilación, las variantes ocurren en mensajeros con múltiples sitios de poliadenilación y frecuentemente la que tiene mayor similitud con la canónica aparece río debajo de las variantes (Beaudoing y col., 2010). Por ejemplo, en análisis de genomas completos de más de 10,000 mRNAs humanos mostraron que alrededor de un tercio de estos tienen una señal de poliadenilación proximal no canónica, rodeada frecuentemente con nucleótidos U y GU río debajo de la señal de poliadenilación comparada con la señal de poliadenilación canónica, implicando que la unión de los factores de poliadenilación (CPSF y CstF) pueda compensar la ausencia del hexanucleótido consenso (Nunes y col., 2010).

Extrapolando esta idea a lo que vemos en *T. vaginalis*, se realizó la comparación de ambas señales de poliadenilación encontradas en el mRNA *tvcp2*. A pesar de que la secuencia consenso para *T. vaginalis* reportada es UAAA

(Espinosa y col., 2002), revisamos los nucleótidos adyacentes a las encontradas (Figura 37).

En el caso de la primera señal de poliadenilación que está acoplada al codón de paro, previamente tiene los nucleótidos AC y posterior a la señal de poliadenilación se encuentran los nucleótidos UU, quedando toda esa región de la siguiente manera: **UCUAAA**UU. Por otro lado, la segunda señal de poliadenilación previamente tiene los nucleótidos UA y posterior a la señal de poliadenilación se encuentran los nucleótidos AU, quedando esa región de la siguiente manera: **UAUAAA**AU, que se asemeja más a la secuencia canónica de poliadenilación de eucariontes superiores (AAUAAA) y por lo tanto la maquinaria de poliadenilación tendría mayor afinidad por esta (Figura 37). Esto es consistente con lo previamente reportado de que las señales de poliadenilación proximales son “más débiles” respecto a las distales y que la mayor cantidad de factores de la maquinaria de poliadenilación facilitaría el uso de la señal proximal (Di Giammartino y col., 2011), tal como estaría ocurriendo en la condición de alto hierro, en la cual los componentes de la maquinaria se encontrarían en mayor cantidad y favorecerían el uso de la señal de poliadenilación proximal en el mRNA *tvcp2*.

Adicionalmente, también se ha estudiado en células con baja actividad mitótica como las células neuronales en las que se sugiere que tienen un nivel de proliferación disminuido que estos linajes celulares presentan transcritos con 3'-UTRs más largos, respecto a los mismos transcritos provenientes de células con proliferación mayor (Di Giammartino y col., 2011). En el caso de *T. vaginalis*, se conoce que es un parásito que incrementa su proliferación en condiciones ricas en

...AAAGGCUCUCUAAAUUGCGAUAAAAUUGUACGAUGAAGUACUUUGAUUAAAAUAGUUUUGGGAAACG
CGAUUUAAUUCCTTGAUUUUUUUUAACUUUUUUUCAUAA...|

Figura 37. Análisis de las señales de poliadenilación presentes en el mRNA *tvcp2* comparada con la secuencia canónica de la señal de poliadenilación en eucariontes superiores. Fragmento de la secuencia codificante y el 3'-UTR del mRNA *tvcp2*. En color amarillo se muestra ambas señales de poliadenilación. La primera señal está acoplada al codón de paro y la segunda acoplada al primer sitio de corte para poliadenilación. En color turquesa se muestran los sitios de corte para poliadenilación y el color gris se muestra los elementos distales ricos en U. Subrayado se muestra las secuencias adyacentes a las señales de poliadenilación que se compararon con la canónica consenso en eucariotes superiores (AAUAAA).

nutrientes, tales como alto hierro, y que cuando hay restricción de nutrientes, la tasa de división disminuye drásticamente, pasando de tener una división cada 4 h en alto hierro a tener una división cada 12 hrs en condiciones de restricción de hierro (Arroyo y col., 2015), por lo que el resultado obtenido con el transcrito *tvcp2* en condiciones de bajo hierro en el que el 3'-UTR se encuentra alargado pueda tener también una tasa de proliferación disminuida y que el 3'-UTR se acorte mientras la proliferación del parásito se ve incrementada. Más estudios con otros mRNAs mensajeros de *T. vaginalis* tendrán que ser analizados para evaluar si hay correlación entre la poliadenilación alternativa y la tasa de proliferación celular del parásito debido a restricción de nutrientes.

Otro factor a considerar sería también si el importe hacia el núcleo de los componentes de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis* podría estar regulado por hierro y entonces regular la concentración nuclear de los factores de poliadenilación y su actividad. Previamente se ha reportado para la proteína Myb3 (un factor de transcripción que se ha reportado favorece la expresión del gen *ap65-1* en la condición de alto hierro) que su importe nuclear está regulado positivamente por hierro a través de la activación de protein cinasas y otras proteínas que favorecen la fosforilación y ubiquitinación de Myb3, lo cual acelera su importe hacia el núcleo en la condición de alto hierro (Hsu y col., 2014).

Asimismo, se realizó un análisis proteómico de extractos nucleares de parásitos crecidos en condiciones de RH y AH con la idea de enriquecer los componentes nucleares e identificar los componentes de la maquinaria de poliadenilación en el aislado (CNCD147) que se trabaja en el laboratorio.

El resultado encontrado nos muestra composiciones cambiantes de las proteínas que se encuentran en la fracción nuclear en ambas condiciones de hierro. Sobre todo, se observó un incremento en las proteínas metabólicas translocadas a núcleo en la condición de alto hierro, así como de las proteínas de citoesqueleto. Sin embargo, las proteínas que componen a la maquinaria de poliadenilación no se identificaron en este análisis proteómico. Esto puede ser debido a que se tenga una escasa cantidad de estos componentes, aun teniendo un concentrado de proteínas nucleares, pero que se puede ver enmascarado por las proteínas más abundantes que residen en núcleo, o las que se importan temporalmente dependiendo de la condición de hierro. Esto es consistente con la información reportada en los proteomas de extractos de trofozoítos y pseudoquites (Dias-Lopes y col., 2018), donde si se logró identificar a los componentes de la maquinaria de poliadenilación. También reportan que las cantidades encontradas de estos componentes están en el orden de femtogramos, indicando que son de las proteínas menos abundantes. A pesar de esto, su función en la poliadenilación está presente aún en esas concentraciones tan bajas.

De esta manera se podría explicar este tipo de regulación posttranscripcional mediada por hierro, la cual es un proceso multifactorial, que está dada posiblemente por la concentración de los componentes de la maquinaria de poliadenilación, su importe al núcleo, su afinidad por las señales de poliadenilación y la fuerza de las propias señales de poliadenilación para reclutar a los componentes de la maquinaria de poliadenilación.

Sin embargo, se deberán realizar más estudios para conocer a profundidad la naturaleza de las señales de poliadenilación encontradas y el rol que puedan jugar en la selección de sitios alternativos de poliadenilación, así como el papel particular de cada uno de los candidatos encontrados en este estudio, la regulación por hierro a nivel de proteína de la maquinaria de poliadenilación y el mecanismo de importe nuclear y si este se ve favorecido también por hierro.

10. SUMARIO

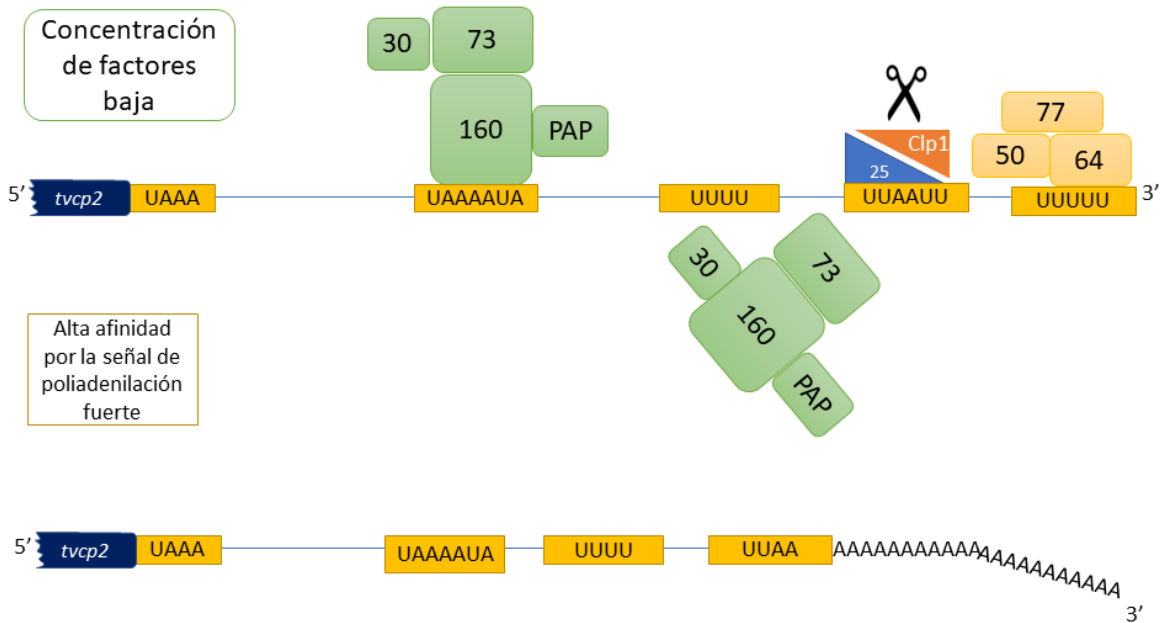
T. vaginalis es un protozooario parásito del tracto genitourinario masculino y femenino, en el que se enfrenta a condiciones cambiantes como las concentraciones de hierro durante el ciclo menstrual, además de otros factores del microambiente vaginal como microbiota, respuesta inmune, etc. (Figueroa-Angulo y col., 2012). El cambio en las concentraciones de hierro promueve la modulación de los factores de virulencia. Uno de estos factores es TvCP2, una cisteína proteinasa de tipo catepsina L regulada negativamente por hierro que participa en la citotoxicidad a monocapas de células HeLa. Los resultados del presente trabajo muestran que la citotoxicidad es mediada por la inducción de apoptosis a células HeLa. Estos resultados muestran la relevancia biológica para el parásito de la condición de restricción de hierro, ya que la regulación negativa por hierro de *tvcp2* se da través de un mecanismo de regulación a nivel posttranscripcional de poliadenilación alternativa, debido a que nuestros resultados muestran la presencia de dos señales de poliadenilación en el extremo 3'-UTR-*tvcp2* las cuales son funcionales de manera alterna dependiente de las concentraciones de hierro que favorece el incremento en la traducción de TvCP2 y su consecuente incremento en la patogenia de *T. vaginalis* en RH (Figura 38).

11. CONCLUSIÓN

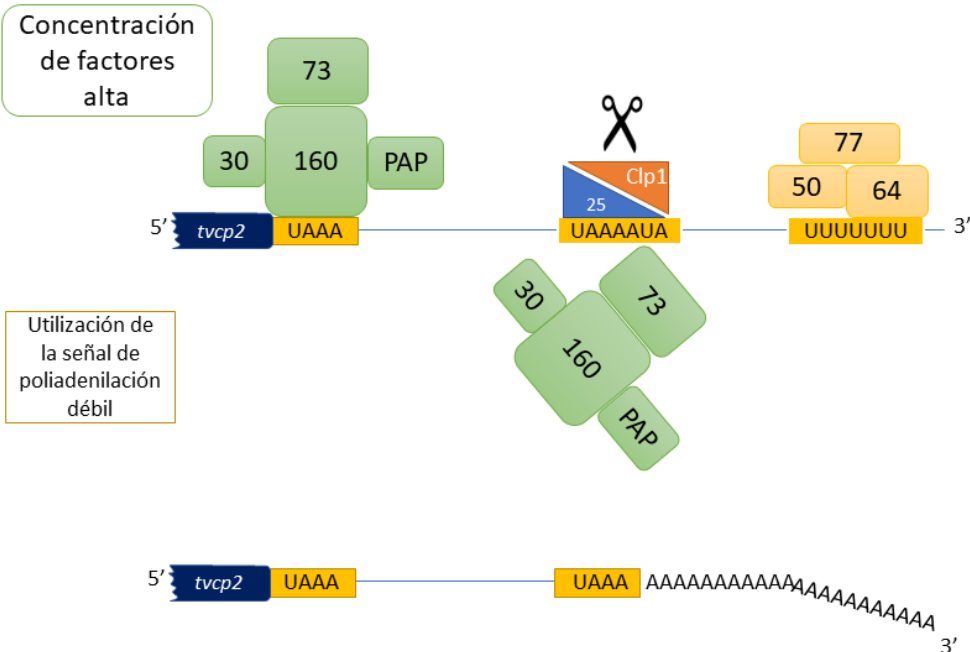
La cisteína proteinasa TvCP2 se regula negativamente por hierro a través de un mecanismo de poliadenilación alternativa que favorece un incremento en los niveles de traducción de TvCP2 y su consecuente incremento en la citotoxicidad a monocapas de células HeLa, mediada por la inducción de apoptosis en RH. Sin embargo, no se descarta que la estructura tallo-burbuja encontrada en el 3'-UTR-*tvcp2* también participe en la regulación de la expresión de *tvcp2* y actúe de manera coordinada con la poliadenilación alternativa contribuyendo en la estabilidad del transcrito de *tvcp2* en RH. Asimismo, se describen los componentes de la maquinaria de poliadenilación y su regulación positiva por hierro a nivel de transcrito de la mayoría de éstos.

12. Modelo del funcionamiento de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis* en bajo y alto hierro

A



B



C

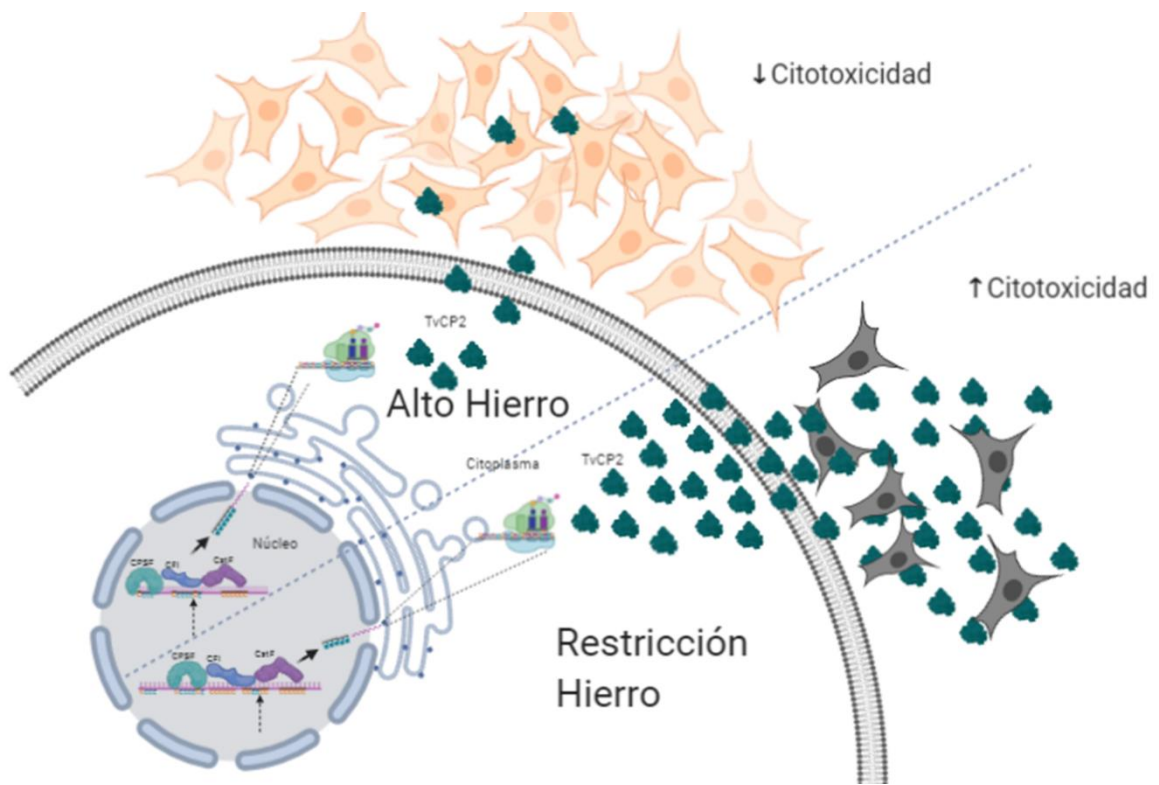


Figura 38. Modelo del funcionamiento hipotético de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis* en el procesamiento del mRNA *tvcp2* en condiciones de RH y AH y su participación en la patogenia del parásito. La función de la maquinaria de poliadenilación puede estar regulada por hierro a nivel cantidad de proteína lo cual en la condición de restricción de hierro (A) permite que se favorezca la selección de la segunda señal de poliadenilación debido a que tiene mayor afinidad por esta (mayor similitud a la secuencia consenso hexamérica en eucariontes superiores) y añade la cola de poli (A) en el segundo sitio de corte. Mientras que en la condición de AH (B) aumenta la concentración de todos los factores de poliadenilación lo cual favorece la unión a la primera señal de poliadenilación “más débil” haciendo que ahora la maquinaria se acople en la primera señal de poliadenilación y añada la cola de poli (A) en el primer sitio de corte. El producto final son regiones 3'-UTR más largas en la condición de restricción de hierro respecto a las de alto hierro. C) Modelo de funcionamiento del mecanismo de poliadenilación alternativa y su participación en la patogenia del parásito a células HeLa. En AH se reconoce la primera señal de poliadenilación, se madura el mRNA y este se exporta del núcleo. Tiene una vida media disminuida y está menos tiempo disponible para ser traducido, lo cual resulta en una menor cantidad de TvCP2 citoplásmica y una menor citotoxicidad del parásito a la monocapa de células HeLa. En RH se reconoce la segunda señal de poliadenilación, se madura el mRNA y se exporta del núcleo. Tiene una vida media incrementada y está más tiempo disponible para ser traducido, lo cual resulta en una mayor cantidad de TvCP2 citoplásmica y una mayor citotoxicidad del parásito a la monocapa de células HeLa. Modelo creado con BioRender.com

13. PERSPECTIVAS

1) Estudiar el mecanismo de inducción de apoptosis a células HeLa mediada por TvCP2.

2) Caracterizar las proteínas integrantes de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis* para determinar su participación en la regulación de la expresión de *tvcp2*, así como de otros factores de virulencia del parásito mediada por hierro.

3) Determinar el(los) componente(s) de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis* que son críticos para que se lleve a cabo la poliadenilación alternativa dependiente de hierro en el parásito.

4) Estudiar la posible participación del mecanismo de poliadenilación alternativa como un mecanismo de regulación de la expresión de otros factores de virulencia en parásitos crecidos en condiciones de restricción de nutrientes tales como glucosa.

5) Analizar la participación de proteínas que favorezcan el importe nuclear para la translocación de los componentes de la maquinaria de poliadenilación en respuesta a hierro.

6) Estudiar la funcionalidad y posible participación de la estructura tallo-burbuja tipo IRE atípica encontrada en el extremo 3'-UTR-*tvcp2* en la regulación de la expresión de TvCP2 mediada por restricción de hierro.

14. REFERENCIAS

- Alderete, J. F., & Garza, G. E.** (1988). Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence. *Infect Immun.* 56(1):28-33
<https://doi.org/10.1128/iai.56.1.28-33.1988>
- Alderete, J. F., Provenzano, D., Lehker, M. W.** (1995). Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. *Microb Pathog.* 19(2); 93-103.
<https://doi.org/10.1006/mpat.1995.0049>
- Álvarez-Sánchez, M. E., Ávila-González, L., Becerril-García, C., Fattel-Facenda, L. V., Ortega-López, J., Arroyo, R.** (2000). A novel cysteine proteinase CP65 of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microb Pathog.* 28(4): 193-202.
<https://doi.org/10.1006/mpat.1999.0336>
- Arroyo, R., Alderete, J. F.** (1989). *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial-cells. *Infect Immun.* 57(10): 2991-2997. <https://doi.org/10.1128/iai.57.10.2997.1989>
- Arroyo, R., Engbring, J., & Alderete, J. F.** (1992). Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol.* 6(7):853-62.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01536.x>
- Arroyo, R., González-Robles, A., Martínez-Palomo, A., Alderete, J.F.** (1993). Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesión synthesis follows cytoadherence. *Mol Microbiol.* 7(2):299-309.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01121.x>

Arroyo, R., Alderete, J. F. (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. PMID:8580681

Arroyo, R., Cárdenas-Guerra, R. E., Figueroa-Angulo, E. E., Puente-Rivera, J., Zamudio-Prieto, O., Ortega-López, J. (2015). *Trichomonas vaginalis* cysteine proteinases: Iron response in gene expression and proteolytic activity. *Biomed Res Int.* 2015:946787. <https://doi.org/10.1155/2015/946787>

Bastida-Corcuera, F. D., Okumura, C. Y., Colocoussi, A., Johnson P. J. (2005). *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan mutants have reduced adherence and cytotoxicity to human ectocervical cells. *Eukaryot Cell*; 4(11): 1951-8. <https://doi.org/10.1128/EC.4.11.1951-1985.2005>

Beaudoing, E., Gautheret, D. (2001). Identification of alternate polyadenylation sites and analysis of their tissue distribution using EST data. *Genome Res.* 11(9):1520-6. <https://doi.org/10.1101/gr.190501>

Belasco, J. G., & Brawerman, G. (1993). Experimental Approaches to the Study of mRNA Decay. In Control of Messenger RNA Stability. *Acad Press.* 3-12. ISBN 9780120847822. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-091652-1.50022-0>

Brown, C. E. y Sachs, A. B. (1998) Poly (A) tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation. *Mol Cell Biol.* 18(11): 6548-59. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.11.6548>

Brum-Vieira, P., Feijo-Silva, N. L., Wilges-Kist, L., de Oliveira, G. M., Bogo, M. R. et.al. (2015). Iron from haemoglobin and haemin modulates nucleotide hydrolysis in *Trichomonas vaginalis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 110(2): 201-208. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140320>

- Calla-Choque, J. S., Figueroa-Angulo, E. E., Ávila-González, L., & Arroyo, R.** (2014). α -actinin TvACTN3 of trichomonas vaginalis is an RNA-binding protein that could participate in its posttranscriptional iron regulatory mechanism. *Biomed Res Int.* 2014:424767. <https://doi.org/10.1155/2014/424767>
- Cárdenas-Guerra, R. E., 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. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.09.002>
- Carlton, J. M., Hirt, R. P., Silva, J. C. et.al.** (2007). Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science.* 315(5809): 207-12. <http://doi.org/10.1126/science.1132894>
- Chang, P-C., Hsu, Y-C., Hsieh, M-L., Huang, S-T., Huang, H-C., Chen, Y.** (2016). A pilot study on *Trichomonas vaginalis* in women with recurrent urinary tract infections. *Biomed J.* 39(4):289-94. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2015.11.005>
- Colgan, D. F., Manley, J. L.** (1997). Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev.* 11(21), 2755–2766. <https://doi.org/10.1101/gad.11.21.2755>
- Chen, F., Macdonald, C. C., & Wilusf, J.** (1995). Cleavage site determinants in the mammalian polydenylation signal. *Nucleic Acids Res.* 23(14):2614-20. <https://doi.org/10.1093/nar/23.14.2614>
- Crouch, M. L., & Alderete, J. F.** (1999). *Trichomonas vaginalis* interactions with fibronectin and laminin. *Microbiology.* 145(10): 2835-43. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-10-2835>

Cuéllar Silva, Patricia Areli. (2012). Participación de la cisteína proteinasa TvCP12 en la virulencia de *Trichomonas vaginalis*. Tesis de maestría, CINVESTAV.

Dailey, D. C., & Alderete, J. F. (1991). The phenotypically variable surface protein of *Trichomonas vaginalis* has a single, tandemly repeated immunodominant epitope. *Infect Immun.* 59(6):2083-8. <https://doi.org/10.1128/iai.59.6.2083-2088.1991>

De Jesus, J. B., Cuervo, P., Junqueira, M., Britto, C., E Silva-Filho, F. C., Soares, M. J., Cupolillo, E., Fernandes, O., & Domont, G. B. (2007). A further proteomic study on the effect of iron in the human pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Proteomics.* 7(12):1961-72. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600797>

Del Sal, G., Manfioletti, G., & Schneider, C. (1989). The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *BioTechniques.* 7(5):514-20. PMID: 2699240

Dias-Lopes, G., Wiśniewski, J. R., De Souza, N. P., Vidal, V. E., Padrón, G., Britto, C., Cuervo, P., & De Jesus, J. B. (2018). In-Depth Quantitative Proteomic Analysis of Trophozoites and Pseudocysts of *Trichomonas vaginalis*. *J Proteome Res.* 17(11):3704-3718. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00343>

Di Giammartino, D. C., Nishida, K., & Manley, J. L. (2011). Mechanisms and Consequences of Alternative Polyadenylation. *Mol Cell.* 43(6):853–866. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.017>

Dos Santos, O., De Vargas-Rigo, G., Frasson, A. P., Macedo, A. J., Tasca, T. (2015). Optimal reference genes for gene expression normalization in *Trichomonas vaginalis*. *PLoS One.* 10(9): e0138331. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138331>

Doxtader, E. E., Elsheikh, T. M. (2016). Diagnosis of Trichomoniasis in Men by Urine Cytology. *Cancer Cytopathol.* 125(1):55-59.

<https://doi.org/10.1002/cancyto.21778>

Elkon, R., Ugalde, A.P., Agami, R. (2013). Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. *Nat. Rev. Genet.* 14(7):496-506.

<https://doi.org/10.1038/nrg3482>

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): 81-6. [https://doi.org/10.1016.s.378-1119\(02\)00476-6](https://doi.org/10.1016.s.378-1119(02)00476-6)

Figuroa-Angulo, E. E., Rendón-Gandarilla, F. J., Puente-Rivera, J., Calla-Choque, J. S., Cárdenas-Guerra, R. E., Ortega-López, J., Quintas-Granados, L. I., Álvarez-Sánchez, M. E., Arroyo, R. (2012). The effects of environmental factor on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect.* 14(15): 1411-27.

<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.09.004>

Figuroa-Angulo, E. E., Calla-Choque, J. S., Mancilla-Olea, M. I., Arroyo, R. (2015) RNA-Binding proteins in *Trichomonas vaginalis*: Atypical Multifunctional Proteins. *Biomolecules* 5 (4): 3354-95. <https://doi.org/10.3390/biom5043354>

Fiori, P. L., Rappelli, P., Rocchigiani, A. M., & Cappuccinelli, P. (1993). *Trichomonas vaginalis* haemolysis: Evidence of functional pores formation on red cell membranes. *FEMS Microbiol Lett.* 109(1):13-8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06136.x>

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06136.x>

Fiori, P. L., Rappelli, P., & Addis, M. F. (1999). The flagellated parasite *Trichomonas vaginalis*: New insights into cytopathogenicity mechanisms. *Microbes Infect.* 1(2):149-56. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(99\)80006-9](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(99)80006-9)

- Franzén, O., Jerlström-Hultqvist, J., Einarsson, E., Ankarklev, J., Ferella, M., Andersson, B., & Svärd, S. G.** (2013). Transcriptome Profiling of *Giardia intestinalis* Using Strand-specific RNA-Seq. *PLoS Comput Biol.* 9(3):e1003000. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003000>
- Fuentes, V., Barrera, G., Sánchez, J., Hernández, R., López-Villaseñor, I.** (2012). Functional Analysis of Sequence Motifs Involved in the Polyadenylation of *Trichomonas vaginalis* mRNAs. *Eukaryot Cell*, 11(6):725-34. <https://doi.org/10.1128/EC.05322-11>
- Gimenes, F., Souza, R. P., Bento, J. C., Teixeira, J. J., Maria-Engler, S. S., Bonini, M. G., Consolaro, M. E** (2014). Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens. *Nat Rev Urol.* 11(12):672-87. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2014.285>
- Gorrell, T. E.** (1985). Effect of culture medium iron content on the biochemical composition and metabolism of *Trichomonas vaginalis*. *J Bacteriol.* 161(3):1228-30. <https://doi.org/10.1128/JB.161.3.1228-1230.1985>
- Hezarjaribi, H. Z., Fakhar, M., Shokri, A., Teshnizi, S. H., Sadough, A., Taghavi, M.** (2015). *Trichomonas vaginalis* infection among Iranian general population of women: a systematic review and meta-analysis. *Parasitol Res.* 114(4): 1291-300. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4.93-3>
- Hernández-Gutiérrez, R., Avila-González, L., Ortega-López J., Cruz-Talonia, F., Gómez-Gutiérrez, G., Arroyo, R.** (2004). *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Exp Parasitol.* 107(3-4):125-35. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.05.004>.

Hoffman, Y., Bublik, D. R., P. Ugalde, A., Elkon, R., Biniashvili, T., Agami, R., Oren, M., & Pilpel, Y. (2016). 3'UTR Shortening Potentiates MicroRNA-Based Repression of Pro-differentiation Genes in Proliferating Human Cells. *PLoS Genet.* 12(2):e1005879. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005879>

Horváthová, L., Šafaříková, L., Basler, M., Hrdý, I., Campo, N. B., Shin, J. W., Huang, K. Y., Huang, P. J., Lin, R., Tang, P., & Tachezy, J. (2012). Transcriptomic identification of iron-regulated and iron-independent gene copies within the heavily duplicated *Trichomonas vaginalis* genome. *Genome Biol Evol.* 4(10):1017-29. <https://doi.org/10.1093/gbe/evs078>

Huang, K-Y., Huang, P-J., Ku, F-M., Lin, R., Alderete, J. F., Tang, P. (2012). Comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Trichomonas vaginalis* following adherence to fibronectin. *Infect Immun;* 80(11): 3900-11. <https://doi.org/10.1128/IAI.00611-12>

Huang, K. Y., Chen, Y. Y. M., Fang, Y. K., Cheng, W. H., Cheng, C. C., Chen, Y. C., Wu, T. E., Ku, F. M., Chen, S. C., 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. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.08.008>.

Hsu, H. M., Ong, S. J., Lee, M. C., & Tai, J. H. (2009). Transcriptional regulation of an iron-inducible gene by differential and alternate promoter entries of multiple Myb proteins in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell.* 8(3):362–72. <https://doi.org/10.1128/EC.00317-08>.

Hsu, H. M., Chu, C. H., Wang, Y. T., Lee, Y., Wei, S. Y., Liu, H. W., Ong, S. J., Chen, C., & Tai, J. H. (2014). Regulation of nuclear translocation of the Myb1

transcription factor by TvCyclophilin 1 in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *J Biol Chem*. 289(27):19120-36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.549410>

Hsu, H. M., Huang, Y. H., Aryal, S., Liu, H. W., Chen, C., Chen, S. H., Chu, C. H., & Tai, J. H. (2020). Endomembrane Protein Trafficking Regulated by a TvCyP2 Cyclophilin in the Protozoan Parasite, *Trichomonas vaginalis*. *Sci Rep*. 10(1):1275. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58270-6>

Jafari Najaf Abadi, M. H., Shafabakhsh, R., Asemi, Z., Mirzaei, H. R., Sahebnasagh, R., Mirzei, H., & Hamblin, M. R. (2019). CFIm25 and alternative polyadenylation: Conflicting roles in cancer. *Cancer Lett*. 459:112–121. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.114430>

Jeffery, C. J. (2009). Moonlighting proteins - An update. *Mol Biosyst*. 5(4):345-50. <https://doi.org/10.1039/b900658n>

Kampinga, H. H., Craig, E. A. (2010). The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(8):579-92. <https://doi.org/10.1038/nrm2941>

Kissinger, P. (2015). Epidemiology and Treatment of Trichomoniasis. *Curr Infect Dis Rep*. 17(6):484. <https://doi.org/10.1007/s11908-015-0484-7>

Kel A. E., Gossling E., Reuter I., Cheremushkin E., Kel-Margoulis O. V., Wingender E. (2003) MATCHTM: A tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences. *Nucleic Acid Res*. 31(13): 3576-9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg585>

Kerwitz, Y., Kühn, U., Lilie, H., Knoth, A., Scheuermann, T., Friedrich, H., Schwarz, E., & Wahle, E. (2003). Stimulation of poly(A) polymerase through a direct

interaction with the nuclear poly(A) binding protein allosterically regulated by RNA. *EMBO J.* 22(14):3705-14. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg347>

Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M., & Yanagawa, H. (2009). Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin. *J Biol Chem.* 284(1). <https://doi.org/10.1074/jbc.M807017200>

Krieger, J. N., Rein, M. F. (1982). Zinc sensitivity of *Trichomonas vaginalis* in vitro studies and clinical implications, *J Infect Dis.* 146(3): 341-5. <https://doi.org/10.1093/infdis/146.3.341>

Krieger, J.N., (1995). Trichomoniasis in men: old issues and new data. *Sex Transm Dis;* 22(2): 83-96. PMID: 7624817

Kühn, U., Gündel, M., Knoth, A., Kerwitz, Y., Rüdell, S., & Wahle, E. (2009). Poly(A) tail length is controlled by the nuclear Poly(A)-binding protein regulating the interaction between Poly(A) polymerase and the cleavage and polyadenylation specificity factor. *J Biol Chem.* 284(34):22803-14. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.018226>

Kummer, S., Hayes, G. R., Gilbert, R. O., Beach, D. H., Lucas, J. J., & Singh, B. N. (2008). Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron. *Microb Pathog.* 44(3):197-203. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.09.004>

Lackford, B., Yao, C., Charles, G.M., et al. (2014). Fip1 regulates mRNA alternative polyadenylation to promote stem cell self-renewal. *EMBO J.*, 33(8):878-889. <https://doi.org/10.1002/emboj.201386537>

- Lehker M. W., Alderete, J. F.** (1992). Iron regulates growth of *Trichomonas vaginalis* and the expression of immunogenic trichomonad proteins. *Mol Microbiol*, 6(1): 123–32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb00844.x>.
- Lehker, M. W., & Alderete, J. F.** (2000). Biology of trichomonosis. *Curr Opin Infect Dis*. 13(1):37-45. <https://doi.org/10.1097/00001432-200002000-00007>
- León-Sicairos, C. R., León-Félix, J., & Arroyo, R.** (2004). tvcp12: A novel *Trichomonas vaginalis* cathepsin L-like cysteine proteinase-encoding gene. *Microbiology*. 150(5):1131-38. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26927-0>
- Lewis, J.D., Gunderson, S. I., Mattaj, I. W.** (1995) The influence of 5' and 3' end structures on pre-mRNA metabolism. *J Cell Sci Suppl.*, 19, 13-19. https://doi.org/10.1242/jcs.1995.supplement_19.2.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 25(4):402-8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Liston, D. R., & Johnson, P. J.** (1998). Gene transcription in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol Today*. 14(7): 261–265. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(98\)01264-2](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(98)01264-2)
- López-Camarillo, C., Orozco, E., Marchat, L. A.** (2005). Entamoeba histolytica: Comparative genomics of the pre-mRNA 3' end processing machinery. *Exp Parasitol*. 110(3):184-90. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.02.024>
- López-Camarillo, C., Hernández de la Cruz, O. N., Vivas, J. G., Retana, J. F., Valdez, M. P., Rosas, I. L., Alvarez-Sánchez, E., & Marchat, L. A.** (2010). Recent insights in pre-mRNA 3'-end processing signals and proteins in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Infectious Disord Drug Targets*. 10(4):258-65. <https://doi.org/10.2174/187152610791591575>

Lord, E., Newnham, T., Dorrel, L., Jesuthasan, G., Clarke, L., Jeffery, K., Sherrard, J. (2016). Detecting asymptomatic *Trichomonas vaginalis* in females using the BD ProbeTec *Trichomonas vaginalis* Qx nucleic acid amplification test. *Int J STD AIDS*. 28(4):357-361. <https://doi.org/10.1177/0956462416649888>

Loyevsky, M., LaVaute, T., Allerson, C. R., Stearman, R., Kassim, O. O., Cooperman, S., Gordeuk, V. R., Rouault, T. A. (2001). An IRP-like protein from *Plasmodium falciparum* binds to a mammalian iron-responsive element. *Blood*, 98(8):2555-62. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.8.2555>

Lubick K.J., Burgess D.E. (2004) Purification and analysis of a phospholipase A2-like lytic factor of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun*. 72(3):1284–1290. <https://doi.org/10.1128/iai.72.3.1284-1290.2004>.

Mandel, C. R., Bai, Y., Tong, L. (2008). Protein factors in pre-mRNA processing. *Cell Mol Life Sci*. 65(7-8):1099-122. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7474-3>

Martin, T., Lou, Y. C., Chou, C. C., Wei, S. Y., Sadotra, S., Cho, C. C., Lin, M. H., Tai, J. H., Hsu, C. H., & Chen, C. (2018). Structural basis of interaction between dimeric cyclophilin 1 and Myb1 transcription factor in *Trichomonas vaginalis*. *Sci Rep*. 8(1):1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23821-5>

Mazurie, A. J., Alves, J. M., Ozaki, L. S., Zhou, S., Schwartz, D. C., & Buck, G. A. (2013). Comparative genomics of cryptosporidium. *Int J Genomics*. 2013:832756. <https://doi.org/10.1155/2013/832756>

Menezes, C. B., Tasca, T. (2016). Trichomoniasis immunity and the involvement of the purinergic signaling. *Biomed J*. 39(4):234-43. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2016.06.007>

Mendoza-López, M., R., Becerril-García, C., Fattel-Facenda, L., V., Ávila-González, L. et.al. (2000). CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun.* 68(9):4907-12. <https://doi.org/10.1128/iai.68.9.4907-4912.2000>.

Mielczarek, E., Blaszkowska, J. (2016). *Trichomonas vaginalis*: pathogenicity and potential role in human reproductive failure. *Infection.* 44(4):447–58. <https://doi.org/10.1007/s15010-015-0860-0>

Miranda-Ozuna, J. F. T., Hernández-García, M. S., Briebe, L. G., Benítez-Cardoza, C. G., Ortega-López, J., González-Robles, A., & Arroyo, R. (2016). The glycolytic enzyme triosephosphate isomerase of *Trichomonas vaginalis* is a surface-associated protein induced by glucose that functions as a laminin- and fibronectin-binding protein. *Infection and Immunity.* <https://doi.org/10.1128/IAI.00538-16>

Miranda-Ozuna, J. F. T., Rivera-Rivas, L. A., Cárdenas-Guerra, R. E., Hernández-García, M. S., Rodríguez-Cruz, S., González-Robles, A., Chavez-Munguía, B., & Arroyo, R. (2019). Glucose-restriction increases *Trichomonas vaginalis* cellular damage towards HeLa cells and proteolytic activity of cysteine proteinases (CPs), such as TvCP2. *Parasitology.* 146(9):1156-66. <https://doi.org/10.1017/S0031182019000209>

Nadler, S. A., Honigberg, B. M. (1988). Genetic differentiation and biochemical polymorphism among trichomonads. *J Parasitol.* 74(5): 797-804. PMID: 3418458,

Nazari, N., Zangeneh, M., Moradi, F., Bozorgomid, A. (2015). Prevalence of Trichomoniasis Among Women in Kermanshah, Iran. *Iran Red Crescent Med J.* 17(3): e23617. <https://doi.org/10.5812/ircmj.23617>

Neale, K. A., Alderete, J. F. (1990). Analysis of the proteinases of representative *Trichomonas vaginalis* isolates. *Infect Immun.* 58(1): 157-62.

<https://doi.org/10.1128/IAI.58.1.157-162.1990>

Marfori, M., Mynott, A., Ellis, J.J., Mehdi, A. M., Saunders, N. F. W., Curmi, P. M., Forwood, J. K., Boden, M., Kobe, B. (2011). Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochim Biophys Acta.* 1813(9), 1562-77.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.013>

Meza-Cervantez, P., González-Robles, A., Cárdenas-Guerra, R. E., Ortega-López, J., Saavedra, E. et.al. (2011). Pyruvate: ferredoxin oxidoreductase (PFO) is a surface-associated cell-binding protein in *Trichomonas vaginalis* and is involved in trichomonad adherence to host cells. *Microbiology.* 157(12): 3469:82.

<https://doi.org/10.1099/mic.0.053033-0>

Moreno-Brito, V., Yáñez-Gómez, C., Meza-Cervantez, P., Ávila-González, L., Rodríguez, M. A., Ortega-López, J., González-Robles, A., Arroyo, R. (2005). A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. *Cell Microbiol.* 7(2): 245-58. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00455.x>.

Nunes, N., M., Li, W., Furger, A. (2010). A functional human Poly(A) site requires only a potent DSE and a A-rich upstream sequence. *EMBO J.* 29(9):1523-36.

<https://doi.org/emboj.2010.42>.

Ong, S. J., Huang, S. C., Liu, H. W., & Tai, J. H. (2004). Involvement of multiple DNA elements in iron-inducible transcription of the ap65-1 gene in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol.* 52(6):1721–30.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04088.x>

Ong, S. J., Hsu, H. M., Liu, H. W., Chu, C. H., & Tai, J. H. (2007). Activation of multifarious transcription of an adhesion protein ap65-1 gene by a novel Myb2 protein in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *J Biol Chem*, 282(9):6716-25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610484200>

Ortíz-Estrada, G., Calderón-Salinas, V., Shibayama-Salas, M., León-Sicairos, N., & De La Garza, M. (2015). Binding and endocytosis of bovine hololactoferrin by the parasite *Entamoeba histolytica*. *BioMed Res Int*. 2015:375836. <https://doi.org/10.1155/2015/375836>

Ospina-Villa, J. D., Tovar-Ayona, B. J., López-Camarillo, C., Soto-Sánchez, J., Ramírez-Moreno, E., Castañón-Sánchez, C. A., & Marchat, L. A. (2020). mRNA Polyadenylation Machineries in Intestinal Protozoan Parasites. *J Eukaryot Microbiol*. 63(7):306-20. <https://doi.org/10.1111/jeu.12781>

Parra-Marín, O., Rosas-Hernández, L., López-Pacheco, K., Franco, B., Ibáñez-Escribano, A., Hernández, R., & López-Villaseñor, I. (2019). An in vitro characterisation of the *Trichomonas vaginalis* TATA box-binding proteins (TBPs). *Parasitol Res*. 118(10):3019-31. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06438-z>

Pérez-Canadillas, J. M., Varani, G. (2003). Recognition of GU-rich polyadenylation regulatory elements by human CstF-64 protein. *EMBO J*. 22(11): 2821-30. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg259>

Pinto, P.A., Henriques, T., Freitas, M.O., et al. (2011). RNA polymerase II kinetics in polo polyadenylation signal selection. *EMBO J*, 30(12):2431-44. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.156>

Poole, D. N., McClelland, R. S. (2013). Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. *Sex Transm Infect.* 89(6): 418-22. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2013-0511075>

Proudfout, N. J., Brownlee, G. G. (1976). 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature.* 263(5574): 211-4. <https://doi.org/10.1038/263211a0>

Proudfoot, N. J., Fritsh, E. F., Dye, M. J. (2002) Integrating mRNA processing with transcription. *Cell.* 108(4):501-12. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00617-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00617-7)

Puente-Rivera, J., Villalpando, J. L., Villalobos-Osnaya, A., Vázquez-Carrillo, L. I., León-Ávila, G., Ponce-Regalado, M. D., López-Camarillo, C., Elizalde-Contreras, J. M., Ruiz-May, E., Arroyo, R., & Alvarez-Sánchez, M. E. (2017). The 50 kDa metalloproteinase TvMP50 is a zinc-mediated *Trichomonas vaginalis* virulence factor. *Mol Biochem Parasitol.* 217(32–41). <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2017.09.001>

Quintas-Granados, L. I., Villalpando, J. L., Vázquez-Carrillo, L. I., Arroyo, R., Mendoza-Hernández, G., & Álvarez-Sánchez, M. E. (2013). TvMP50 is an immunogenic metalloproteinase during male trichomoniasis. *Mol Cell Proteomics.* 12(7):1953-64. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.022012>

Ramón-Luing, L. A., Rendón-Gandarilla, F. J., Cárdenas-Guerra, R. E. et. al. (2010). Immunoproteomics of the active degradome to identify biomarkers for *Trichomonas vaginalis*. *Proteomics.* 10(3): 435-44. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900479>

Ramón-Luing, L. D. L. Á., Rendón-Gandarilla, F. J., Puente-Rivera, J., Ávila-González, L., & Arroyo, R. (2011). Identification and characterization of the

immunogenic cytotoxic TvCP39 proteinase gene of *Trichomonas vaginalis*. *Int J Biochem Cell Biol.* 43(10):1500-11. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.07.001>

Rawlings, N. D., Waller, M., Barret, A. J., Bateman, A. (2014). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 42(database issue): 503-509. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt953>.

Rendón-Gandarilla, F. J., Ramón-Luing, L de L., Ortega-López, J., Rosa de Andrade, I., Benchimol, M., Arroyo, R. (2013). The TvLEGU-1, a legumain-like cysteine proteinase, plays a key role in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Biomed Res Int.* 2013:561979. <https://doi.org/10.1155/2013/561979>

Rivera-Rivas, Luis Alberto. (2016). Caracterización funcional de la cisteína proteinasa TvCP2 de *Trichomonas vaginalis*. Tesis de maestría, CINVESTAV.

Rivera-Rivas, L. A., Lorenzo-Benito, S., Sánchez-Rodríguez, D. B., Miranda-Ozuna, J. F. T., Euceda-Padilla, E. A., Ortega-López, J., Chávez-Munguía, B., Lagunes-Guillén, A., Velázquez-Valassi, B., Jasso-Villazul, L., & Arroyo, R. (2020). The effect of iron on *Trichomonas vaginalis* TvCP2, a cysteine proteinase found in vaginal secretions of trichomoniasis patients. *Parasitology.* 147(7):760-74 <https://doi.org/10.1017/S0031182020000438>

Sajid, M., McKerrow, J. H. (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol.* 120(1):1-21. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(01\)00438-8](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(01)00438-8)

Sánchez, M., Galy, B., Schwanhaeusser, B., Blake, J., Bahr-Ivacevic, T., Benes, V., Selbach, M., Muckenthaler, M. U., Hentze, M. W. (2011). Iron regulatory protein-1 and -2: transcriptome-wide definition of binding mRNAs and shaping of the cellular proteome by iron regulatory proteins. *Blood.* 118(22):168-79. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-343541>

Sánchez-Rodríguez, D. B., Ortega-López, J., Cárdenas-Guerra, R. E., Reséndiz-Cardiel, G., Chávez-Munguía, B., Lagunes-Guillen, A., & Arroyo, R. (2018). Characterization of a novel endogenous cysteine proteinase inhibitor, trichocystatin-3 (TC-3), localized on the surface of *Trichomonas vaginalis*. *Int J Biochem Cell Biol.* 102:87-100. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.07.005>

Shi, Y. (2012). Alternative polyadenylation: new insights from global analyses. *RNA.* 18(12):2105-2117. <https://doi.org/10.1261/rna.035899.112>

Smith, A., Johnson, P. (2011). Gene expression in the unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Res Microbiol.* 162(6): 646-54. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.04.007>

Smith, A. J., Chudnovsky, L., Simoes-Barbosa, A., Delgadillo-Correa, M. G., Jonsson, Z. O., Wohlschlegel, J. A., & Johnson, P. J. (2011). Novel Core Promoter Elements and a Cognate Transcription Factor in the Divergent Unicellular Eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Mol Cell Biol.* <https://doi.org/10.1128/mcb.00745-10>

Sommer, U., Costello, C. E., Hayes, G. R., Beach, D. H., Gilbert, D. O. Lucas, J. J., Singh, B. N. (2005). Identification of *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases that induce apoptosis in human vaginal epithelial cells, *J Biol Chem.* 280(25); 23853e23860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501752200>

Solano-González, E., Burrola-Barraza, E., León-Sicairos, C., Ávila-González, L., Gutiérrez-Escolano, L., Ortega-López, J., Arroyo, R. (2007). The trichomonad cysteine proteinase TvCP4 transcript contains an iron-responsive element. *FEBS Lett.* 581(16): 2912-28. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.056>

Soto-Castro, L., Plata-Guzmán, L. Y., Figueroa-Angulo, E. E., Calla-Choque, J. S., Reyes-López, M., De La Garza, M., León-Sicairos, N., Garzón-Tiznado, J. A., Arroyo, R., & León-Sicairos, C. (2017). Iron Responsive-Like elements in the parasite *entamoeba histolytica*. *Microbiology*. 163(9):1329-42. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000431>

Steinbüchel, A., Müller, M. (1986). Anaerobic pyruvate metabolism of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *Mol Biochem Parasitol*. 20(1):57-65. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(86\)90142-8](https://doi.org/10.1016/0166-6851(86)90142-8)

Sutcliffe, S., Giovanucci, E., Alderete, J. F., Chang, T. H., Gaydos, C. A. et.al. (2006) Plasma antibodies against *Trichomonas vaginalis* and subsequent risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 15(5):939-45. <https://doi.org/10.1158/1055-9955.EPI-05-0781>

Takagaki, Y., Manley, J.L. (1998). Levels of polyadenylation factor CstF-64 control IgM heavy chain mRNA accumulation and other events associated with B cell differentiation. *Mol Cell*. 2(6):761-71. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80291-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80291-9)

Takagaki, Y., Seipelt, R.L., Peterson, M.L., et al. (1996). The polyadenylation factor CstF-64 regulates alternative processing of IgM heavy chain pre-mRNA during B cell differentiation. *Cell*. 87(5):941-52. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)82000-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)82000-0)

Tian, B., Manley, J.L. (2013). Alternative cleavage and polyadenylation: the long and short of it. *Trends Biochem Sci*. 38(6):312-20. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.03.005>

- Torres-Romero, J. C., & Arroyo, R.** (2009). Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: Evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE/IRP-like system. *Infect Genet Evol.* 9(6):1065-74. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.003>
- Tsai, C. D., Liu, H. W., & Tai, J. H.** (2002). Characterization of an iron-responsive promoter in the protozoan pathogen *Trichomonas vaginalis*. *J Biol Chem.* 277(7):5153-62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110234200>
- Turner, R. E., Pattison, A. D., & Beilharz, T. H.** (2018). Alternative polyadenylation in the regulation and dysregulation of gene expression. *Semin Cell Dev Biol.* 75:61–69. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.08.056>
- Wahle, E., Keller, W.** (1996). The biochemistry of polyadenylation. *Trend Biochem Sci.* 21(7): 247-50. PMID: 8755245
- Wang, J., Pantopoulos, K.** (2011). Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem. J.* 434(3): 365-81. <https://doi.org/10.1042/BJ20101825>
- Wilkinson, N., & Pantopoulos, K.** (2014). The IRP/IRE system in vivo: Insights from mouse models. *Front Pharmacol.* 5:176. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00176>
- World Health Organization** (2012). A baseline report on global sexually transmitted infection surveillance.
- Yang, Y., Li, W., Hoque, M., Hou, L., Shen, S., Tian, B., & Dynlacht, B. D.** (2016). PAF Complex Plays Novel Subunit-Specific Roles in Alternative Cleavage and Polyadenylation. *PLoS Genet.* 12(1):e1005794. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005794>

Yao, C., Choi, E.A., Weng, L., et al. (2013). Overlapping and distinct functions of CstF64 and CstF64tau in mammalian mRNA 3' processing. *RNA*. 19(12):1781-90.

<https://doi.org/10.1261/rna.042317.113>

Yoon, K., Ryu, J. S., Min, D. Y. (1991). Cytotoxicity of lymphokine activated peritoneal macrophages against *Trichomonas vaginalis*. *Kisaengchunghak Chapchi*

29(4):381-8. <https://doi.org/kjp.1991.29.4.381>

Yu, L., Volkert, M.R. (2013). UV damage regulates alternative polyadenylation of the RPB2 gene in yeast. *Nucleic Acids Res.* 41(5):3104-3114.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkt020>

Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridation prediction. *Nucleic Acids Res.* 31(13):3406-15. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>

Tabla 3. Componentes de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis* identificados en el genoma

No.	Nombre	Gen	Descripción	Tamaño (pb)	Orientación
1	CPSF160	TVAG_077030	Proteína hipotética	3910	5'-3'
2	CPSF160	TVAG_532720	Proteína similar a neurobeachina, putativa	6516	3'-5'
3	CPSF100	TVAG_380050	Kinectina, putativa	7500	5'-3'
4	CPSF73	TVAG_437970	Factor de poliadenilación C-terminal del procesamiento 3'- del pre-mRNA, endonucleasa	2040	3'-5'
5	CPSF73	TVAG_183200	Factor específico de corte y poliadenilación	1767	5'-3'
6	CPSF73	TVAG_363680	Factor terminal 2 C de corte y poliadenilación	2103	5'-3'
7	CPSF30	TVAG_047060	Factor específico de corte y poliadenilación	501	5'-3'
8	CPSF30	TVAG_094550	Factor específico de corte y poliadenilación	501	5'-3'
9	PAPa	TVAG_391250	Dominio central de poli (A) polimerasa	1404	3'-5'
10	PAPa	TVAG_388620	Poli (A) polimerasa	1485	5'-3'
11	PAPa	TVAG_127020	Poli (A) polimerasa, putativa	1670	3'-5'
12	PAPg	TVAG_187910	tRNA-nuceotidil transferasa	1365	3'-5'
13	FIP1	TVAG_463950	FIP1	576	5'-3'
14	CstF77	TVAG_343030	Subunidad del factor estimulante de corte 77 kDa	1857	3'-5'
15	CstF64	TVAG_028060	Subunidad del factor estimulante de corte 64 kDa	1731	3'-5'
16	CstF50	TVAG_493960	Proteína con repetidos WD, putativa	1329	3'-5'
17	CstF50	TVAG_374220	Proteína con repetidos WD, putativa	1290	5'-3'
18	CstF50	TVAG_105750	Proteína con repetidos WD, putativa	1167	3'-5'
19	Clp1	TVAG_162880	Proteína Clp1 del complejo de corte II de pre-mRNA	1188	5'-3'
20	Clp1	TVAG_317830	Proteína hipotética	1197	5'-3'
21	Clp1	TVAG_248940	Factor ia de la subunidad Clp1 de corte y poliadenilación, putativa	1344	3'-5'
22	Pcf11	TVAG_198600	Subunidad catalítica alfa DNA polimerasa, putativa	3658	5'-3'
23	Pfs2	TVAG_121040	Proteína con repetidos WD, putativa	1497	5'-3'
24	Pfs2	TVAG_002920	Proteína con repetidos WD, putativa	1401	3'-5'
25	Pfs2	TVAG_105750	Proteína con repetidos WD, putativa	1167	3'-5'
26	Mpe1	TVAG_196880	BAS1, putativa	659	5'-3'
27	Mpe1	TVAG_265310	Proteína hipotética	1608	5'-3'
28	PC4/Sub11	TVAG_255210	Coactivador transcripcional kelp de la RNA polimerasa II, putativa	338	5'-3'
29	PC4/Sub11	TVAG_403840	Proteína hipotética	5493	5'-3'
30	Ssu72	TVAG_229140	Proteína spac3g9.04, putativa	615	3'-5'
31	CFIm25	TVAG_475950	Factor de corte im de pre-mRNA, subunidad de 25 kDa, putativa	576	3'-5'

Tabla 4. Componentes de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis* identificados a nivel de transcrito

No.	Nombre	Gen	Descripción	Tamaño (pb)	ESTs
1	CPSF160	TVAG_077030	Proteína hipotética	3910	1
2	CPSF160	TVAG_532720	Proteína similar a neurobeachina, putativa	6516	0 ^a
3	CPSF100	TVAG_380050	Kinectina, putativa	7500	2
4	CPSF73	TVAG_437970	Factor de poliadenilación C-terminal del procesamiento 3´- del pre-mRNA, endonucleasa	2040	5
5	PAPa	TVAG_388620	Poli (A) polimerasa	1485	1
6	PAPa	TVAG_127020	Poli (A) polimerasa, putativa	1670	2
7	CstF77	TVAG_343030	Subunidad del factor estimulante de corte 77 kDa	1857	1
8	CstF64	TVAG_028060	Subunidad del factor estimulante de corte 64 kDa	1731	4
9	CstF50	TVAG_493960	Proteína con repetidos WD, putativa	1329	5
10	Clp1	TVAG_162880	Proteína Clp1 del complejo de corte II de pre-mRNA	1188	1
11	Clp1	TVAG_317830	Proteína hipotética	1197	3
12	Pcf11	TVAG_198600	Subunidad catalítica alfa DNA polimerasa, putativa	3658	4
13	Pfs2	TVAG_121040	Proteína con repetidos WD, putativa	1497	5
14	Pfs2	TVAG_002920	Proteína con repetidos WD, putativa	1401	1
15	PC4/Sub11	TVAG_255210	Coactivador transcripcional kelp de la RNA polimerasa II, putativa	338	3
16	PC4/Sub11	TVAG_403840	Proteína hipotética	5493	8
17	Ssu72	TVAG_229140	Proteína spac3g9.04, putativa	615	0 ^a
18	CFIm25	TVAG_475950	Factor de corte im de pre-mRNA, subunidad de 25 kDa, putativa	576	2

^aTranscritos identificados en el transcriptoma de bajo y alto hierro (Horváthova y col., 2007).

Tabla 5. Componentes de la maquinaria de poliadenilación de *T. vaginalis* identificados a nivel de proteína

No.	Nombre	Gen	Descripción	aas	MW (kDa)	pI	Cuantificación (pmol/mg) ^a	
							RH	AH
1	CPSF160	TVAG_077030	Proteína hipotética	1297	160	5.4	0.044	0.114
2	CPSF160	TVAG_532720	Proteína similar a neurobeachina, putativa	2172	160	5.2	0.080	0.211
3	CPSF73	TVAG_437970	Factor de poliadenilación C-terminal del procesamiento 3'-del pre-mRNA, endonucleasa	679	73	5.8	0.021	0.012
4	CPSF73	TVAG_363680	Factor terminal 2 C de corte y poliadenilación	700	73	5.2	0.017	0.148
5	CPSF30	TVAG_047060	Factor específico de corte y poliadenilación	166	30	7.4	0	0.038
6	PAPa	TVAG_388620	Poli (A) polimerasa	494	55	7.3	0.098	0.206
7	PAPa	TVAG_127020	Poli (A) polimerasa, putativa	508	56	8.3	0.135	0.109
8	PAPa	TVAG_187910	Poli (A) polimerasa, putativa	454	53	7.5	3.477	0.208
8	CstF77	TVAG_343030	Subunidad del factor estimulante de corte 77 kDa	614	77	6.0	0.052	0.471
9	CstF64	TVAG_028060	Subunidad del factor estimulante de corte 64 kDa	576	64	5.6	0.040	0.044
10	CstF50	TVAG_493960	Proteína con repetidos WD, putativa	433	50	5.5	0.433	0.470
11	CstF50	TVAG_374220	Proteína con repetidos WD, putativa	429	49	5.8	0.012	0.025
12	Clp1	TVAG_162880	Proteína Clp1 del complejo de corte II de pre-mRNA	395	40	5.2	0.259	0.511
13	Clp1	TVAG_317830	Proteína hipotética	398	41	6.8	0.207	1.043
14	Pfs2	TVAG_121040	Proteína con repetidos WD, putativa	498	52	5.5	0.062	0.032
15	Pfs2	TVAG_002920	Proteína con repetidos WD, putativa	466	50	6.9	0.303	0.167
16	PC4/Sub11	TVAG_255210	Coactivador transcripcional kelp de la RNA polimerasa II, putativa	96	11	5.0	1.251	4.586
17	Ssu72	TVAG_229140	Proteína spac3g9.04, putativa	204	25.3	5.3	0.113	0
18	CFIm25	TVAG_475950	Factor de corte im de pre-mRNA, subunidad de 25 kDa, putativa	191	25	6.0	0.150	0.341

^a Datos de cuantificación obtenidos de los datos de proteómica reportados en los estadios de trofozoito y pseudoquiste (estadios inducidos por alto hierro y restricción de hierro) (Dias-Lopes y col., 2018)

Tabla 6. Proteínas del extracto nuclear de parásitos cultivados en restricción de hierro identificadas por espectrometría de masas. a) Proteínas asignadas clasificadas con base en su función

PROTEÍNAS RIBOSOMALES					
Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_164550	A2E1Z6	Proteína ribosomal, putativa	370	40.3	9.98
TVAG_064640	A2DYM3	Proteína ribosomal L5	308	34.8	9.92
TVAG_131210	A2DBB7	Proteína ribosomal S4, 40S	255	28.6	9.91
TVAG_106800	A2DIM3	Proteína ribosomal S3, putativa	216	24.4	9.99
TVAG_140290	A2DNC1	Proteína ribosomal L27e, putativa	139	15.9	9.99
TVAG_054130	A2EMI2	Proteína ribosomal L7-2, putativa	239	26.9	9.80
TVAG_155060	A2DIZ2	Proteína ribosomal L12, 60S	160	17.2	9.74
TVAG_005910	A2E6Z8	Proteína ribosomal L8, putativa	251	26.9	10.49
TVAG_347250	A2FSH1	Proteína ribosomal L18a, 60S	176	19.8	9.83
TVAG_348090	A2DSV0	Proteína ribosomal S3Ae, putativa	247	28.1	9.45
TVAG_246200	A2E4S6	Proteína ribosomal S5-B, 40S	193	21.6	9.14
TVAG_437020	A2DFF0	Proteína ribosomal, putativa	209	23.7	10.24
TVAG_020040	A2D919	Proteína ribosomal S16, putativa	140	15.6	9.91
TVAG_313290	A2G5E4	Proteína ribosomal L32, putativa	132	15.3	10.81
TVAG_231250	A2F2S5	Proteína ribosomal L21e, putativa	159	17.9	11.02
TVAG_198680	A2DDQ3	Proteína ribosomal S7, 40S	167	18.6	9.55
TVAG_066030	A2E1L5	Proteína ribosomal, S8, 40S	197	22.1	10.33
TVAG_054500	A2DDT1	Proteína ribosomal L6, putativa	197	22.9	8.18
TVAG_470330	A2G442	Proteína ribosomal L32, putativa	133	15.3	10.68
TVAG_117480	Q76KS8	Proteína ribosomal S14	159	16.6	10.30
TVAG_306190	A2DNB0	Proteína ribosomal SA, 40S	256	28.5	5.17
TVAG_119330	A2D780	Proteína ribosomal L21e, putativa	159	17.9	11.34
TVAG_020480	A2DTR8	Proteína ribosomal S13p/S18e, putativa	155	17.5	11.28
TVAG_482430	A2EBQ2	Proteína ribosomal L18, 60S, putativa	186	21.1	10.45
TVAG_143030	A2G5X6	Proteína ribosomal S7, 40S	168	18.7	9.55
TVAG_071920	A2D895	Proteína ribosomal S23, 40S	144	15.6	11.22
TVAG_199240	A2DDV9	Proteína ribosomal S19e, putativa	148	16.5	10.14
TVAG_199100	A2DDU5	Proteína ribosomal S7, 40S	186	20.8	9.52
TVAG_074480	A2DCH7	Proteína ribosomal L10a	215	24.3	10.13
TVAG_423320	A2DTH0	Proteína ribosomal L13e, putativa	189	21.8	10.59

TVAG_148950	A2ECR7	Proteína ribosomal L15	204	24.3	11.24
TVAG_067370	A2DSF3	Proteína ribosomal L35a, putativa	102	11.6	10.20
TVAG_094720	A2FWA1	Proteína ribosomal L34e, putativa	116	13.3	10.58
TVAG_417810	A2EDA1	Proteína ribosomal L34e, putativa	116	13.3	10.58
TVAG_199270	A2DDW2	Proteína ribosomal L7Ae, putativa	244	27.5	9.52
TVAG_083260	A2DM53	Proteína ribosomal L22, putativa	164	18.5	9.92
TVAG_263760	A2EP03	Proteína ribosomal L18a, 60S	176	19.8	9.83
TVAG_033590	A2DEJ9	Proteína ribosomal S6, 40S	216	24.5	10.37
TVAG_192910	A2DH05	Proteína ribosomal L30, 60S	112	12.2	9.07
TVAG_426320	A2DYP9	Proteína ribosomal L18, putativa	186	21.2	10.30
TVAG_159370	A2F592	Proteína ribosomal L30p/L7e, putativa	239	26.8	9.64
TVAG_006170	A2D8G1	Proteína ribosomal L19-3, putativa	178	21.0	11.74
TVAG_040820	A2DPS3	Proteína ribosomal S17-B, 40S, putativa	129	14.9	10.40
TVAG_110530	A2DGQ4	Proteína ribosomal S10p/S20e, putativa	122	13.8	9.58
TVAG_044560	A2E7L8	Proteína ribosomal L11, putativa	169	19.3	10.14
TVAG_272960	A2F0H5	Proteína ribosomal S24e, putativa	140	16.0	10.61
TVAG_013870	A2DDE2	Proteína ribosomal L29, putativa	124	14.3	10.39
TVAG_055940	A2DVD8	Proteína ribosomal S19, putativa	144	16.2	10.18
TVAG_006250	A2DLW4	Proteína ribosomal S15a	130	14.6	9.77
TVAG_101690	A2DJQ1	Proteína ribosomal L24e, putativa	113	13.2	10.89
TVAG_026460	A2DZ49	Proteína ribosomal L14, putativa	128	14.7	9.50
TVAG_066760	A2D9L2	Proteína ribosomal S13, 40S	151	17.0	10.40
TVAG_246730	A2DKL2	Proteína ribosomal L38e, putativa	74	8.5	9.70
TVAG_224750	A2DW98	Proteína ribosomal L23, putativa	140	15.6	10.21
TVAG_158830	A2E6R2	Proteína ribosomal L29, putativa	124	14.3	10.39
TVAG_262730	A2FS39	Proteína ribosomal L14, putativa	128	14.6	9.58
TVAG_038050	A2DCS2	Proteína ribosomal L24, putative	138	15.7	10.46
TVAG_020530	A2EXW7	Proteína ribosomal L36e, putativa	91	10.9	10.15
TVAG_015800	A2DP51	Proteína ribosomal L23, putativa	140	14.8	10.68
TVAG_353280	A2EN51	Proteína ribosomal S19e, putativa	148	16.4	10.10
TVAG_407240	A2F421	Proteína ribosomal, putativa	209	24.0	10.45
TVAG_076410	A2D9N8	Proteína ribosomal L31e, putativa	110	12.4	9.85
TVAG_120980	A2D7P3	Proteína ribosomal L7Ae, putativa	124	13.4	8.92
TVAG_298270	A2ET18	Proteína ribosomal L31e, putativa	110	12.4	9.80
TVAG_050420	A2D9N4	Proteína ribosomal L39, 60S	51	6.3	12.60
TVAG_264670	A2DAA0	Proteína ribosomal S30, 40S	62	6.9	11.66

TVAG_402510	A2DI07	Proteína ribosomal ácida, 60S	105	11.0	4.32
TVAG_040120	A2DST7	Proteína ribosomal S26, 40S	118	13.8	10.55
TVAG_498400	A2E828	Proteína que contiene el dominio Brix	275	31.9	8.69

METABÓLICAS					
Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
	Q27090	Proproteína de la subunidad B de la enzima málica hidrogenosomal	567	63.2	6.92
TVAG_267870	A2DLD6	Subunidad A de la malato deshidrogenasa	567	63.1	7.96
TVAG_412220	A2F1M8	Subunidad A de la malato deshidrogenasa	566	62.9	7.96
TVAG_183500	A2D987	Subunidad beta de la succinato-CoA ligasa, mitocondrial	409	43.8	7.78
TVAG_144730	A2FVK7	Subunidad beta de la succinato-CoA ligasa, mitocondrial	409	43.8	7.44
TVAG_165340	P53400	Subunidad alfa-2 de la succinato-CoA ligasa, mitocondrial	309	32.6	9.44
TVAG_254890	A2EXN1	Piruvato:ferredoxin oxidorreductasa E	1157	128.0	8.09
TVAG_146910	A2DHT2	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	361	39.2	7.84
TVAG_475220	A2EM29	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	361	39.2	8.03
TVAG_036010	Q6XKE2	Oxígeno reductasa hidrogenosomal	417	46.4	7.85
---	Q9GTP2	Hidrogenasa dependiente de hierro de 64 kDa, putativa, fragmento	589	64.8	7.71
TVAG_462920	A2DM03	Proteína de la familia de las fosfofructocinasas	324	24.5	8.16
TVAG_391760	A2DFT9	Proteína de la familia de las fosfofructocinasas	323	34.7	8.41
TVAG_182620	A2D900	Proteína TvhydB, putativa	470	50.8	8.97
TVAG_257780	A2F4F9	Proteína de ensamblaje hierro-hidrogenasa	517	58.6	8.69
TVAG_293770	A2FKA7	Proteína de la familia de las fosfofructocinasas	326	34.6	8.10
TVAG_464170	A2F592	Enolasa 4, putativa	493	53.3	6.73
TVAG_263740	A2EP01	Proteína de la familia de las enolasas	483	53.2	5.63
TVAG_094630	A2DBT5	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	712	81.2	8.05
TVAG_310050	A2EKS1	Proteína TvhydB, putativa	404	44.7	9.17
TVAG_358110	A2ELB9	Proteína de la familia de las enolasas	483	52.5	5.91
TVAG_329460	Q9NDF8	Enolasa 3, fragmento	331	35.9	5.87
TVAG_073860	A2EEC2	Piruvato fosfato dicinasa	917	101.0	6.11
TVAG_496160	A2FR66	Proteína de la familia de las fosfofructocinasas	324	35.2	7.18
TVAG_133030	Q5S7T0	NADH deshidrogenasa hidrogenosomal de 51 kDa	429	46.7	8.09
TVAG_304500	A2F2N5	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	316	34.8	5.33
TVAG_157940	A2FBC9	Proteína de la familia 4-alfa glucanotransferasa	932	109	6.13
TVAG_268050	A2DLF4	Fosfoglicerato cinasa	419	45.3	7.06
TVAG_265760	A2F2H3	Proteína de la familia de unión FAD/FMN, oxidorreductasa	356	39.7	8.68
TVAG_064490	A2EHC4	Rubreritrina	191	21.3	7.99

TRADUCCIÓN					
Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pl
--	O97108	Factor de elongación 1-alfa, fragmento	422	46.6	8.63
TVAG_380910	A2FUH8	Factor de inicio de la traducción eucariótico, putativo	410	46.0	6.32
TVAG_2830220	A2DEK5	Factor de inicio de la traducción eucariótico 5A	167	18.4	5.16
TVAG_239580	A2DGI5	Proteína que contiene dominio de unión a GTP/Factor de elongación Tu	684	76.4	5.55
TVAG_379780	A2E7K3	Proteína de la familia de la subunidad alfa del factor de inicio de la traducción eucariótico 2	306	34.1	4.96
TVAG_208470	A2F347	Proteína de la familia de la treonil-tRNA sintetasa	709	81.6	6.70
TVAG_435990	A2FB71	Subunidad beta del complejo de asociación a polipéptidos nacientes	138	15.1	8.05
TVAG_072140	A2D8B8	Subunidad beta del complejo de asociación a polipéptidos nacientes	137	14.9	8.05
TVAG_036210	A2DAU3	Proteína que contiene el dominio NAC	167	18.4	4.89
TVAG_020030	A2EPZ2	Factor eucariótico de liberación 1, putativo	438	49.5	5.57
TVAG_226360	A2ER70	Proteína de la familia IF2B/IF5	405	46.2	4.96

CITOESQUELETO Y ASOCIADAS					
Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pl
TVAG_337240	P90623	Actina	376	41.8	5.26
TVAG_512800	A2HNG1	Actina, fragmento	360	40.2	5.49
--	Q27120	Actina, fragmento	367	40.8	5.50
--	Q964E6	Cadena alfa de tubulina, fragmento	430	47.7	5.01
TVAG_008680	A2DC16	Cadena beta de tubulina	447	49.9	4.92
TVAG_190450	A2DKH3	Alfa actinina, putativa	931	106.2	5.02
TVAG_312170	A2ED60	Cadena ligera de la dineína	90	10.4	7.37
TVAG_120180	A2D7G4	Proteína que contiene dominio de plectina/S10	141	16.2	9.67
TVAG_497260	A2EGW8	Cadena pesada de la dineína	4493	512.3	5.63
TVAG_015940	A2DP64	RIB72	182	20.8	7.24
TVAG_006480	A2E755	Cadena pesada de la dineína	4660	529.9	6.04
TVAG_354020	A2FH22	Proteína de la familia de actina	390	44.1	5.83
TVAG_239310	A2DGG1	Actinina, putativa	1129	127.8	5.00

TVAG_440130	A2FDL6	Cadena pesada de la dineína	4506	514.9	5.92
TVAG_087140	A2EN28	Subunidad de 34 kDa del complejo Arp2/3	307	34.7	8.98
TVAG_212110	A2EIG7	Proteína de la familia Tctex-1	109	12.4	6.52
TVAG_181970	A2F6X9	Proteína de la familia Tctex-1	108	12.1	5.76

SEÑALIZACIÓN

Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_407250	A2F422	Proteína asociada a la adenilil ciclasa	427	46.2	6.90
TVAG_151920	A2ELV7	Subunidad beta de la proteína de unión de nucleótido guanina	335	37.1	6.68
TVAG_059360	A2ERL1	Proteína de la familia de repetidos similares a Armadillo/Beta catenina	505	54.9	7.06
TVAG_274750	A2EB65	Subunidad alfa de la proteína G, putativa	363	40.3	5.26
TVAG_169060	A2EWS4	Homólogo de Cdc42, putativa	188	21.0	6.39
TVAG_462940	Q4KXQ3	Isoforma A de la proteína 14-3-3	237	27.1	5.19
TVAG_185080	A2D8F3	Proteína nuclear de unión a GTP	215	24.4	7.49
TVAG_159730	Q4G2D2	Proteína de unión a GTP pequeña, putativa	203	22.4	5.71
TVAG_461080	A2DY82	Proteína nucleolar 1 de unión a GTP	596	67.8	9.01
TVAG_125340	A2F9K9	Proteína que contiene dominios de unión a nucleótidos cíclicos	369	41.6	8.65
TVAG_454380	A2EU51	14-3-3	238	27.3	4.86
TVAG_315190	A2FDI8	Proteína cinasa de la familia CAMK	407	45.4	8.56
TVAG_429360	A2F954	Subunidad beta de la proteína de unión de nucleótido guanina	333	36.8	6.98
TVAG_405380	A2FYY9	Proteína de la familia de las enzimas de unión a AMP	652	71.8	6.49
TVAG_298130	A2ET06	Proteína de la familia mano EF	783	89.1	6.93
TVAG_037530	A2FCW0	Proteína de la familia mano EF	785	89.1	6.70
TVAG_408160	A2FX13	Proteína de unión a GTP pequeña, putativa	191	21.4	4.96
TVAG_572140	A2GGN6	Proteína de resistencia a multidroga, putativa	189	21.1	5.02
TVAG_454380	A2FN11	Proteína que contiene el dominio TUDOR	828	93.9	6.99

PROCESAMIENTO DE RNA

Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_158990	A2E6S8	Proteína de unión a RNA, putativa (posible proteína de unión a poli (A))	189	21.1	10.30
TVAG_371220	A2FYE4	Proteína de unión a poli (A), putativa	477	53.9	8.25
TVAG_371980	A2E0W9	Proteína que contiene dominio de unión a SnoRNA	569	63.6	6.95
TVAG_459140	A2E6B9	Proteína que contiene dominio de unión a SnoRNA	481	53.7	6.55
TVAG_282140	A2E9S9	Fibrilarina, putativa	318	34.0	9.89
TVAG_380100	A2DXE8	Fibrilarina, putativa	308	33.4	9.61
TVAG_407130	A2F410	Proteína similar a la pseudouridina sintasa	391	43.6	9.17

TVAG_236960	A2DCP6	Posible regulador de transcritos sin sentido, putativo	619	69.1	6.87
TVAG_227750	A2ERS7	Proteína de la familia res, enzima de restricción tipo III, RNA helicasa	1961	222.9	7.44

UNIÓN A DNA

Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_402580	A2DI13	Proteína que contiene el dominio alfa ribonucleótido reductasa	614	68.6	6.83
TVAG_038880	A2E5K0	DNA Topoisomerasa 2	1458	166.9	6.39
TVAG_209190	A2DVG1	Proteína helicasa de la familia DEAD/DEAH	478	53.2	5.74
TVAG_193230	A2DH37	Proteína helicasa de la familia DEAD/DEAH	541	60.0	7.34
TVAG_173590	A2EVI2	Proteína helicasa de la familia DEAD/DEAH	598	65.3	9.04
TVAG_235060	A2DPM5	Proteína cinasa atípica de la familia PIKK	2171	246.9	6.51

HISTONAS Y PROTEÍNAS ASOCIADAS

Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_026390	A2DJ26	Histona H2B	129	14.1	9.85
TVAG_014920	Q27875	Histona H4	101	11.4	11.33
TVAG_014910	A2DGG3	Histona H3-1	138	15.5	11.25
TVAG_021440	A2DHC5	Histona H2A	139	15.2	10.36
TVAG_087830	A2G7I3	Histona H3-1	138	15.5	11.25
TVAG_002360	A2G7D4	Proteína de la familia linker de histonas H1 y H5	302	35.4	9.73

PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS

Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
--	P90622	Chaperonina 60, fragmento	544	57.8	6.37
TVAG_151220	A2EQB9	Proteína de choque térmico 70 citoplásmica	659	71.3	5.40
TVAG_066690	A2DS85	Subunidad delta 1 de la proteína del complejo T	536	57.8	6.11
TVAG_153560	A2EPR1	Proteína de choque térmico, putativa	720	83.6	5.02
--	Q94834	HSP70 mitocondrial	609	66.8	7.42
--	O76307	Proteína de choque térmico 70 de retículo endoplásmico, fragmento	619	68.3	5.17
TVAG_305730	A2DN65	Proteína que contiene dominio DnaJ	416	46.7	7.39
TVAG_303600	A2DR42	Subunidad zeta de chaperonina CCTzeta	528	57.9	6.49
TVAG_381290	A2FKC5	Proteína de la familia HSP20/alfa cristalina	113	12.3	6.09
--	Q9GU10	Subunidad alfa-2 de chaperonina CCTalpha, fragmento	433	46.6	8.57
--	Q9GU07	Subunidad eta de chaperonina CCTeta	558	60.1	5.53

DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS					
Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_266380	A2EPF2	Proteína de la familia repetidos ciclosoma/proteasoma	850	94.4	5.49
TVAG_388670	A2DYJ9	Proteína que contiene dominio PCI	435	48.9	5.03
TVAG_115420	A2F7I0	Complejo endopeptidasa de proteosoma	391	43.9	7.62
TVAG_076170	A2D9L4	Proteína que contiene dominio PCI	389	43.9	5.76
TVAG_231160	A2F2R6	Proteína de la familia repetidos ciclosoma/proteasoma	854	95.3	5.19
TVAG_438030	A2FCG4	Proteína que contiene dominio PCI	415	48.5	6.57
TVAG_074870	A2E404	Proteasoma, putativa	468	52.8	5.31
TVAG_193070	A2DH21	Proteína que contiene dominio PCI	369	42.9	5.91

TRANSPORTE					
Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_072120	A2D8B6	Proteína que contiene el dominio C2	290	33.3	6.43
TVAG_051820	A2FII9	Proteína acarreadora mitocondrial	401	44.6	9.66
TVAG_36627	A2DHS1	Coatómero subunidad beta	900	100.7	6.39
TVAG_373190	A2DZI2	Proteína de la familia adaptina, región N-terminal	808	90.1	5.22
TVAG_044240	A2E0I2	Subunidad alfa del complejo AP-2	1006	111.6	5.40
TVAG_421580	A2FR45	Adaptina Mu, putativa	426	48.9	6.37
TVAG_532880	A2GL34	Proteína que contiene dominio VPS/Clatrina	838	94.9	5.20
--	Q9NI37	Proteína hidrogenosomal de membrana 31	316	34.6	9.88
TVAG_472690	A2FU96	Subunidad beta del complejo AP	724	80.7	4.92
TVAG_103850	A2FJW4	Proteína de la familia adaptina, región N-terminal	844	96.4	5.20
TVAG_270990	A2EA68	Proteína con repetidos WD, putativa	1157	128.7	5.78
TVAG_547230	A2GKQ5	Proteína de la familia adaptina, región N-terminal	849	93.8	5.85
TVAG_436840	A2DFD2	Proteína de la familia dinamina región central	597	66.1	6.28
TVAG_333150	A2EHB1	Proteína de la familia de la subunidad media del complejo adaptador	436	48.7	5.12
TVAG_009720	A2ET48	Subunidad gamma del complejo AP-1	778	85.6	6.30
TVAG_065750	A2ELX9	Proteína de la superfamilia del facilitador mayor	486	53.7	5.80
TVAG_476310	A2DA54	Proteína de la familia de la subunidad media del complejo adaptador	407	45.5	5.74
TVAG_083310	A2DM58	Proteína de la familia adaptina, región N-terminal	690	76.2	4.88
TVAG_430250	A2E351	Subunidad beta del complejo AP	715	80.5	5.41
TVAG_344080	A2E7M9	Subunidad gamma del complejo AP-1	739	81.4	6.39
TVAG_037710	A2FCX8	Proteína de la familia copina	547	60.2	7.31
TVAG_039020	A2E5L3	Subunidad SRP72 de la partícula de reconocimiento de señales	590	66.3	7.71
TVAG_076100	A2D9K7	Proteína de poro nuclear	759	84.8	5.03

TVAG_250050	A2DCK8	Proteína de poro nuclear	770	86.0	5.83
TVAG_038030	A2DXW1	Coatómero subunidad beta	857	97.7	5.12

ADHESINAS

Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
--	Q27102	Adhesina AP65-1	567	63.2	7.53
--	Q27102	Adhesina AP65-3	567	63.1	7.96

ATPasas

Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_318870	A2EP65	Factor asociado a espermatogénesis, putativo	796	87.2	5.26
TVAG_006020	A2E6R2	Subunidad A ATPasa protón tipo V	347	40.0	5.03
TVAG_016670	A2ER05	ATPasa 1 tipo Obg	392	44.1	6.80
TVAG_453110	A2ES57	Adenositriofosfatasa, putativa	496	55.6	6.11
TVAG_038640	A2DY20	Proteína de familia ATPasa tipo V, subunidad D	246	27.9	8.03

PROTEASAS

Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_212800	A2E2S0	Clan MG, familia M24, aminopeptidasa tipo P, metalopeptidasa	967	109.1	5.40
TVAG_159580	A2F5B3	Clan MP, familia M67, metalopeptidasa tipo Poh-1	300	33.5	6.70

SISTEMA ANTIOXIDANTE

Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
--	Q8IEV2	Tioredoxin peroxidasa	196	21.9	6.79
TVAG_055200	A2ETI8	Tiol peroxidasa	169	18.1	8.78
TVAG_455310	A2GAU8	Triparedoxin peroxidasa	196	21.9	6.54

OTRAS

Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_261950	A2DUA7	Proteína de la familia de lectina con repetidos QXW	131	15.0	6.35
--	Q95WG9	Proteína tipo IscS/NifS	411	44.8	8.21
TVAG_366360	A2DHT0	Proteína de la familia de lectina con repetidos QXW	246	28.4	8.35
--	Q8WR12	Proteína de cluster híbrido	514	56.8	8.00
TVAG_136660	A2DJE8	Nucleósido difosfatasa cinasa	389	44.3	5.07
TVAG_048780	A2FJD9	Proteína de la familia de lectina con repetidos QXW	237	27.5	9.19
TVAG_440180	A2FDM1	Subunidad A del complejo ribonucleoproteico H/ACA	177	18.1	10.37

TVAG_030160	A2FVE3	Proteína MGC78960, putativa	605	65.6	6.93
TVAG_468280	A2E0R7	Proteína de la familia lectina con repetidos QXW	229	26.4	9.11
TVAG_067760	A2EMG0	Proteína que contiene dominio MIF4G	724	83.5	5.34
TVAG_300550	A2EP35	Proteína rica en prolina	367	41.7	8.40
TVAG_492260	A2G584	Proteína MGC84469	595	68.1	6.16
TVAG_377950	A2DAY6	Proteína que contiene bromodominio	322	36.9	7.14
TVAG_123500	A2FCS6	Proteína cinasa de la familia STE	461	50.7	7.47

Tabla 7. Proteínas del extracto nuclear de parásitos crecidos en alto hierro identificadas por espectrometría de masas. b) Proteínas asignadas clasificadas con base a su función

PROTEÍNAS RIBOSOMALES					
Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_164550	A2E1Z6	Proteína ribosomal, putativa	370	40.3	9.98
TVAG_131210	A2DBB7	Proteína ribosomal S4, 40S	255	28.6	9.91
TVAG_106800	A2DIM3	Proteína ribosomal S3, putativa	216	24.4	9.99
TVAG_140290	A2DNC1	Proteína ribosomal L27e, putativa	139	15.9	9.99
TVAG_054130	A2EMI2	Proteína ribosomal L7-2, putativa	239	26.9	9.80
TVAG_155060	A2DIZ2	Proteína ribosomal L12, 60S	160	17.2	9.74
TVAG_005910	A2E6Z8	Proteína ribosomal L8, putativa	251	26.9	10.49
TVAG_347250	A2FSH1	Proteína ribosomal L18a, 60S	176	19.8	9.83
TVAG_348090	A2DSV0	Proteína ribosomal S3Ae, putativa	247	28.1	9.45
TVAG_437020	A2DFF0	Proteína ribosomal, putativa	209	23.7	10.24
TVAG_020040	A2D919	Proteína ribosomal S16, putativa	140	15.6	9.91
TVAG_231250	A2F2S5	Proteína ribosomal L21e, putativa	159	17.9	11.02
TVAG_198680	A2DDQ3	Proteína ribosomal S7, 40S	167	18.6	9.55
TVAG_054500	A2DDT1	Proteína ribosomal L6, putativa	197	22.9	8.18
TVAG_470330	A2G442	Proteína ribosomal L32, putativa	133	15.3	10.68
TVAG_306190	A2DNB0	Proteína ribosomal SA, 40S	256	28.5	5.17
TVAG_119330	A2D780	Proteína ribosomal L21e, putativa	159	17.9	11.34
TVAG_020480	A2DTR8	Proteína ribosomal S13p/S18e, putativa	155	17.5	11.28
TVAG_143030	A2G5X6	Proteína ribosomal S7, 40S	168	18.7	9.55
TVAG_071920	A2D895	Proteína ribosomal S23, 40S	144	15.6	11.22
TVAG_074480	A2DCH7	Proteína ribosomal L10a	215	24.3	10.13
TVAG_148950	A2ECR7	Proteína ribosomal L15	204	24.3	11.24
TVAG_067370	A2DSF3	Proteína ribosomal L35a, putativa	102	11.6	10.20
TVAG_417810	A2EDA1	Proteína ribosomal L34e, putativa	116	13.3	10.58
TVAG_199270	A2DDW2	Proteína ribosomal L7Ae, putativa	244	27.5	9.52
TVAG_083260	A2DM53	Proteína ribosomal L22, putativa	164	18.5	9.92
TVAG_263760	A2EP03	Proteína ribosomal L18a, 60S	176	19.8	9.83
TVAG_033590	A2DEJ9	Proteína ribosomal S6, 40S	216	24.5	10.37
TVAG_192910	A2DH05	Proteína ribosomal L30, 60S	112	12.2	9.07
TVAG_426320	A2DYP9	Proteína ribosomal L18, putativa	186	21.2	10.30

TVAG_159370	A2F592	Proteína ribosomal L30p/L7e, putativa	239	26.8	9.64
TVAG_006170	A2D8G1	Proteína ribosomal L19-3, putativa	178	21.0	11.74
TVAG_040820	A2DPS3	Proteína ribosomal S17-B, 40S, putativa	129	14.9	10.40
TVAG_044560	A2E7L8	Proteína ribosomal L11, putativa	169	19.3	10.14
TVAG_272960	A2F0H5	Proteína ribosomal S24e, putativa	140	16.0	10.61
TVAG_013870	A2DDE2	Proteína ribosomal L29, putativa	124	14.3	10.39
TVAG_055940	A2DVD8	Proteína ribosomal S19, putativa	144	16.2	10.18
TVAG_101690	A2DJQ1	Proteína ribosomal L24e, putativa	113	13.2	10.89
TVAG_026460	A2DZ49	Proteína ribosomal L14, putativa	128	14.7	9.50
TVAG_246730	A2DKL2	Proteína ribosomal L38e, putativa	74	8.5	9.70
TVAG_158830	A2E6R2	Proteína ribosomal L29, putativa	124	14.3	10.39
TVAG_262730	A2FS39	Proteína ribosomal L14, putativa	128	14.6	9.58
TVAG_038050	A2DCS2	Proteína ribosomal L24, putative	138	15.7	10.46
TVAG_020530	A2EXW7	Proteína ribosomal L36e, putativa	91	10.9	10.15
TVAG_015800	A2DP51	Proteína ribosomal L23, putativa	140	14.8	10.68
TVAG_353280	A2EN51	Proteína ribosomal S19e, putativa	148	16.4	10.10
TVAG_076410	A2D9N8	Proteína ribosomal L31e, putativa	110	12.4	9.85
TVAG_050420	A2D9N4	Proteína ribosomal L39, 60S	51	6.3	12.60
TVAG_466650	A2FL91	Proteína ribosomal L5	308	34.8	9.92
TVAG_015780	A2DB09	Proteína ribosomal L12, 60S	160	17.2	9.74
TVAG_112230	A2G4E1	Proteína ribosomal L13e, putativa	189	21.8	10.65
TVAG_190280	A2DKF7	Proteína ribosomal L13e, putativa	189	21.9	10.59
TVAG_182520	A2D8Z0	Proteína ribosomal L13, putativa	189	21.7	10.52
TVAG_265930	A2F2J0	Proteína ribosomal L32, putativa	132	15.2	10.78
TVAG_121100	A2D7Q5	Proteína ribosomal L18, 60S	186	21.1	10.46
TVAG_464120	A2E264	Proteína ribosomal S14, putativa	162	17.0	10.20
TVAG_185880	A2D9N1	Proteína ribosomal L35Ae, putativa	102	11.7	10.20
TVAG_163900	A2DG67	Proteína ribosomal L6, 60S	151	16.1	9.39
TVAG_344700	A2FVM1	Proteína ácida ribosomal P0, 60S	317	34.3	6.65
TVAG_207570	A2F2M0	Proteína ribosomal S19e, putativa	148	16.5	10.18
TVAG_199380	A2DDX3	Proteína ribosomal L13e, putativa	189	21.8	10.49
TVAG_006250	A2DLW4	Proteína ribosomal S15a	130	14.6	9.77
TVAG_066760	A2D9L2	Proteína ribosomal S13, 40S, putativa	151	17.0	10.40
TVAG_164700	A2E211	Proteína ribosomal S15a, putativa	130	14.6	9.92
TVAG_093600	A2DBI3	Proteína ribosomal L23, putativa	140	15.5	10.29
TVAG_319220	A2FUM8	Proteína ribosomal S24e, putative	140	16.0	10.61

TVAG_216440	A2ENX8	Proteína ribosomal L24e, putativa	178	21.2	9.67
TVAG_467320	A2FQD8	Proteína que contiene dominio Brix	286	33.2	6.87
TVAG_163180	A2DFZ5	Proteína ribosomal S5, putativa	193	21.7	9.14
TVAG_099510	A2FXW1	Proteína ribosomal L6, putativa	151	16.0	9.57

METABÓLICAS					
Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
--	Q27090	Proteína de la subunidad B de la enzima málica hidrogenosomal	567	63.2	6.92
TVAG_412220	A2F1M8	Subunidad A de la malato deshidrogenasa	566	62.9	7.96
TVAG_146910	A2DHT2	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	361	39.2	7.84
TVAG_475220	A2EM29	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	361	39.2	8.03
TVAG_036010	Q6XKE2	Oxígeno reductasa hidrogenosomal	417	46.4	7.85
---	Q9GTP2	Hidrogenasa dependiente de hierro de 64 kDa, putativa, fragmento	589	64.8	7.71
TVAG_462920	A2DM03	Proteína de la familia de las fosfofructocinasas	324	24.5	8.16
TVAG_391760	A2DFT9	Proteína de la familia de las fosfofructocinasas	323	34.7	8.41
TVAG_257780	A2F4F9	Proteína de ensamblaje hierro-hidrogenasa	517	58.6	8.69
TVAG_293770	A2FKA7	Proteína de la familia de las fosfofructocinasas	326	34.6	8.10
TVAG_263740	A2EP01	Proteína de la familia de las enolasas	483	53.2	5.63
TVAG_310050	A2EKS1	Proteína TvhydB, putativa	404	44.7	9.17
TVAG_496160	A2FR66	Proteína de la familia de las fosfofructocinasas	324	35.2	7.18
TVAG_268050	A2DLF4	Fosfoglicerato cinasa	419	45.3	7.06
--	Q5S7T0	Cadena de hidrogenasa, putativa	429	16.7	8.09
--	O15567	Succinato-CoA ligasa, subunidad beta, fragmento	405	43.4	8.03
TVAG_464170	A2E269	Enolasa 4, putativa	493	53.3	6.73
TVAG_144730	A2FVK7	Subunidad beta de la succinato-CoA ligasa, mitocondrial	409	43.8	7.44
--	Q6LC42	Subunidad beta de la succinato-CoA ligasa, fragmento	403	43.4	7.01
TVAG_329460	A2EBB4	Enolasa 2, putativa	472	51.2	6.02
---	Q4KY23	Piruvato:ferredoxin oxidorreductasa tipo A	1157	127.8	7.97
--	Q5EFD8	Enolasa 3, putativa	472	51.3	6.19
TVAG_230580	A2EDY6	Piruvato:ferredoxin oxidorreductasa BI	1157	127.9	7.97
TVAG_073860	A2EEC2	Piruvato fosfato dicinasa	917	101.0	6.11
TVAG_157940	A2FBC9	Proteína de la familia 4-alfa glucanotransferasa	932	109.0	6.13
TVAG_383940	A2F093	Fosfoglicerato cinasa	419	45.3	7.28
TVAG_242960	A2F855	Piruvato:ferredoxin oxidorreductasa BII	1157	128.0	7.93
TVAG_154680	A2F259	Proteína de la familia 4-alfa glucanotransferasa	930	108.7	6.02

TVAG_222040	A2E3F9	Proteína de la familia 4-alfa glucanotransferasa	930	108.6	6.30
TVAG_043060	A2F6S0	Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa	328	36.2	6.20
TVAG_300000	A2FAF3	Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa, putativa	328	36.2	6.47
TVAG_437410	A2DFI7	Piruvato fosfato dicinasa	917	101.0	6.06
---	O15568	Subunidad alfa de la succinato-CoA ligasa, mitocondrial	309	32.4	9.44
TVAG_228780	A2DJ40	Alcohol deshidrogenasa	365	39.1	6.61
--	Q2PCA5	Flavoproteína tipo A, fragmento	852	92.7	6.21
TVAG_253650	A2DMN2	Malato deshidrogenasa	332	35.7	6.86
TVAG_348330	A2DSX4	Alfa-1,4-glucan fosforilasa	944	106.8	5.96
TVAG_361130	A2FNF0	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	350	38.4	5.72
---	P53400	Subunidad alfa-2 de la succinato-CoA ligasa, mitocondrial	309	32.6	9.44
TVAG_310250	A2EKU1	Fosfoenolpiruvato carboxicinasa, putativa	600	67.0	7.12
TVAG_214830	A2DK87	Proteína de la familia uridina cinasa/fosforibulocinasa	520	59.5	5.94
TVAG_204360	A2FJ30	Malato deshidrogenasa, putativa	322	35.7	6.46
TVAG_171090	A2FIP8	L-lactato deshidrogenasa	334	37.0	6.42
TVAG_139300	A2E4A4	Fosfoenolpiruvato carboxicinasa	599	67.0	6.49
TVAG_258220	A2E926	Proteína de la familia glicosiltransferasa, grupo 1	1572	177.5	5.94
TVAG_226870	A2FCD1	Proteína de la familia 4-alfa-glucanotransferasa	1035	121.2	5.57
TVAG_113710	A2DNM4	Fosfoglicerato mutasa	251	28.3	8.32
TVAG_493290	A2F2D7	Proteína de la familia piridoxal cinasa	290	32.8	6.11
TVAG_241160	A2F6B9	Enzima málica	398	42.5	7.33
TVAG_491670	A2EAJ8	Enzima málica	398	42.4	6.80
TVAG_328940	A2EW36	Proteína de la familia alcohol deshidrogenasa, contenedora de hierro	395	44.1	6.70
TVAG_061930	A2E7V8	Glucosa-6-fosfato isomerasa	542	61.1	6.35
--	Q27096	TvhydB	449	49.2	8.95
---	Q5FZZ8	Triacilglicerol lipasa	298	32.9	5.43
TVAG_272880	A2F0G8	Proteína de la familia de oxidorreductasa que unen FAD/FMN	380	42.1	8.47
TVAG_268020	A2DLF1	Aspartato aminotransferasa	398	443.7	7.52
TVAG_205910	A2FW50	Proteína de la familia dominio I alfa/beta/alfa de fosfoglucomutasa/fosfomanomutasa	586	65.6	6.61
TVAG_183300	A2D968	Proteína de la familia aminotransferasa clase V	371	41.9	7.58
TVAG_276310	A2ECR2	Enzima IIB 1,4.alfa-glucano, putativa	671	78.1	6.14
TVAg_206500	AE1N5	Proteína de clúster híbrido	542	59.9	8.31
TVAG_381690	A2FZ56	AT5g28840/F7P1_20, putativo	357	40.7	6.46
TVAG_117360	A2E3S6	Proteína de la familia hidrolasa tipo haloácido deshalogenasa	223	25.0	5.33
TVAG_415140	A2FAJ7	Proteína que contiene el dominio catalítico de la glutamina sintetasa	698	78.4	6.67

--	O15565	Metionina gamma liasa	398	43.1	6.52
TVAG_123810	A2EMX3	Proteína de la familia de enzimas de unión a AMP	648	71.4	7.53
--	Q5S7S9	Subunidad de 24 kDa de la NADH deshidrogenasa hidrogenosomal	201	21.9	8.76
TVAG_047210	A2FHI8	Deshidrogenasa específica 2-hidroxiácido isómero-D	322	35.7	8.16
TVAG_183850	A2D9C2	Proteína de la familia amidinotransferasa	415	46.0	6.40
TVAG_409990	A2E8G9	Proteína de unión a oxisterol	394	45.5	7.31
TVAG_114530	A2FAS2	UDP-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	470	51.8	6.02
TVAG_430670	A2E392	Proteína de la familia adenosina deaminasa	732	81.9	6.51
TVAG_145700	A2EFT9	S-adenosilmetionina sintetasa	384	42.1	6.87
TVAG_391870	A2DFV0	Proteína de la familia de cisteina sintetasa	299	32.8	8.16
TVAG_362020	A2FRC0	Proteína de la familia treonina deshidratasa	418	45.2	6.67
TVAG_419720	A2EUI6	Proteína de la familia aminotransferasa, clases I y II	414	46.3	7.42
TVAG_388630	A2DYJ6	Proteína que contiene el dominio radical SAM	386	43.9	7.83
TVAG_336310	A2FIM6	Proteína que contiene el dominio radical SAM	377	43.1	5.27

TRADUCCIÓN					
Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_380910	A2FUH8	Factor de inicio de la traducción eucariótico, putativo	410	46.0	6.32
TVAG_208470	A2F347	Proteína de la familia de la treonil-tRNA sintetasa	709	81.6	6.70
TVAG_226360	A2ER70	Proteína de la familia IF2B/IF5	405	46.2	4.96
TVAG_067400	A2DSF6	Factor de elongación alfa-1	437	48.3	8.63
--	A2FCD6	Factor de inicio de la traducción eucariótico 6	246	26.6	4.67
TVAG_118970	A2D744	Proteína de la familia de la subunidad 2 del factor de iniciación	314	35.5	6.95
TVAG_342610	A2EJM3	Proteína de la familia histidil-tRNA sintetasa	797	87.8	6.09
TVAG_324610	A2G8P4	Proteína que contiene el dominio de unión a anticodón DALR	689	77.1	6.33
TVAG_024690	A2FF46	Proteína de la familia isoleucil-tRNA sintetasa	1069	122.7	6.52
--	Q5QGR5	Prolil-tRNA sintetasa, fragmento	506	57.6	7.34
TVAG_276400	A2ECS1	Proteína de la familia cisteinil-tRNA sintetasa	660	75.7	6.83
TVAG_334040	A2EIB0	Proteína de la familia leucil-tRNA sintetasa	1040	118.8	6.23
TVAG_152430	A2F719	Lisina-tRNA ligasa	605	69.1	5.87
TVAG_328570	A2F4T2	Proteína que contiene dominio de unión a tRNA	383	42.0	7.24
---	Q5QGR0	Alanil-tRNA sintetasa, fragmento	1003	112.9	6.51

CITOESQUELETO Y ASOCIADAS					
Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_337240	P90623	Actina	376	41.8	5.26
TVAG_512800	A2HNG1	Actina, fragmento	360	40.2	5.49
--	Q964E6	Cadena alfa de tubulina, fragmento	430	47.7	5.01
TVAG_008680	A2DC16	Cadena beta de tubulina	447	49.9	4.92
TVAG_190450	A2DKH3	Alfa actinina, putativa	931	106.2	5.02
TVAG_120180	A2D7G4	Proteína que contiene dominio de plectina/S10	141	16.2	9.67
TVAG_354020	A2FH22	Proteína de la familia de actina	390	44.1	5.83
TVAG_087140	A2EN28	Subunidad de 34 kDa del complejo Arp2/3	307	34.7	8.98
---	X5FVA1	Alfa actinina-3	1129	127.7	4.97
TVAG_156680	A2FRU0	Actinina, putativa	609	69.0	5.00
TVAG_222320	A2G0N8	Coronina	436	48.4	5.81
TVAG_124870	A2EIJ3	Coronina	436	48.1	6.46
TVAG_371880	A2E0V9	Proteína tipo actina 3	420	46.6	6.47
---	E5FCB3	Factor de despolimerización de actina, putativo, fragmento	126	14.5	5.24
TVAG_459130	A2E6B8	Profilina	122	13.2	8.27
TVAG_123140	A2FH85	Proteína de la familia de dominio central de dinamina	597	67.5	6.09
TVAG_150940	A2FM06	Proteína tipo tropomiosina de unión a actina/cofilina	141	15.8	5.86
TVAG_470160	A2FE23	Subunidad 4 del complejo de proteínas relacionadas a actina 2/3	169	19.6	9.38
TVAG_208990	A2DVE1	Profilina	122	13.2	8.25
TVAG_470230	A2FE30	Subunidad alfa de la proteína capping de F-actina	261	29.1	5.58
TVAG_298300	A2ET21	Proteína de la familia de dominio central de dinamina	594	67.3	6.21
TVAG_351310	A2DZL5	Fimbrina, putativa	610	67.8	5.35
TVAG_100620	A2ENN9	Profilina	122	13.1	7.83
TVAG_439840	A2DFD2	Proteína de la familia de dominio central de dinamina	597	66.1	6.28
TVAG_327050	A2FTQ7	Proteína con repetidos de ankirina	720	80.9	6.20
TVAG_333620	A2F8R8	Proteína con repetidos WD, putativa	592	64.5	6.74

SEÑALIZACIÓN					
Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_407250	A2F422	Proteína asociada a la adenilil ciclasa	427	46.2	6.90
TVAG_169060	A2EWS4	Homólogo de Cdc42, putativa	188	21.0	6.39
TVAG_462940	Q4KXQ3	Isoforma A de la proteína 14-3-3	237	27.1	5.19
TVAG_185080	A2D8F3	Proteína nuclear de unión a GTP	215	24.4	7.49
TVAG_159730	Q4G2D2	Proteína de unión a GTP pequeña, putativa	203	22.4	5.71
TVAG_461080	A2DY82	Proteína nucleolar 1 de unión a GTP	596	67.8	9.01
TVAG_315190	A2FDI8	Proteína cinasa de la familia CAMK	407	45.4	8.56
TVAG_429360	A2F954	Subunidad beta de la proteína de unión de nucleótido guanina	333	36.8	6.98
TVAG_405380	A2FYY9	Proteína de la familia de las enzimas de unión a AMP	652	71.8	6.49
TVAG_408160	A2FX13	Proteína de unión a GTP pequeña, putativa	191	21.4	4.96
---	KADH	Adenilato cinasa	229	25.5	8.91
TVAG_099490	A2FXV9	Proteína de la familia ROK	307	33.0	7.15
TVAG_351500	Q4G2A2	Proteína RYL1 de unión a GTP tipo Ras	209	23.8	8.46
TVAG_340550	A2EKG8	Proteína de la familia de enzimas de unión a AMP	652	71.8	6.67
TVAG_069460	A2ELA0	Proteína de la familia de enzimas de unión a AMP	633	70.2	6.79
TVAG_072700	A2FYU1	Adenilato cinasa, putativa	217	24.0	7.44
TVAG_253760	A2DMP3	Proteína de la familia Armadillo/ repetidos tipo beta catenina	776	86.6	5.35
TVAG_022370	A2GDD4	Proteína que contiene dominio RhoGAP	576	65.8	4.94
TVAG_179660	A2F448	Proteína de la familia adenilato cinasa	191	21.2	8.02
TVAG_035370	A2DAL1	Proteína de la familia Ras	202	23.0	6.29
TVAG_331490	Q4G2C6	Proteína de la familia Ras	206	22.8	8.41
TVAG_251260	A2FUZ1	14-3-3	238	27.2	4.84
TVAG_462480	A2DLV9	Rac1, putativa	200	22.6	5.00
TVAG_158470	A2FN11	Proteína que contiene dominio Tudor	828	93.9	6.99
TVAG_312450	A2EHQ0	Proteína tipo SRP54, putativa	553	59.6	7.75
TVAG_008850	A2FGT0	Proteína que contiene dominio PX	135	15.5	5.20
TVAG_495400	A2DVI3	Proteína nucleolar de unión a GTP 2	504	57.5	8.51
TVAG_205390	A2FFR8	Proteína pequeña de unión a GTP, putativa	434	48.2	9.28
TVAG_133120	A2EDI9	Subunidad 3 de la GTPasa del factor de liberación eucariótico	555	61.7	7.46

PROCESAMIENTO DE RNA					
Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_459140	A2E6B9	Proteína que contiene dominio de unión a SnoRNA	481	53.7	6.55
TVAG_282140	A2E9S9	Fibrilarina, putativa	318	34.0	9.89
TVAG_330710	A2F4N7	Posible regulador de transcritos sin sentido	814	91.7	8.53
TVAG_453810	A2DPV7	Proteína que contiene dominio Piwi	809	91.6	9.01
TVAG_179860	A2F468	RNA helicasa p47 dependiente de ATP	420	47.5	6.23

UNIÓN A DNA					
Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_402580	A2DI13	Proteína que contiene el dominio alfa ribonucleótido reductasa	614	68.6	6.83
TVAG_038880	A2E5K0	DNA Topoisomerasa 2	1458	166.9	6.39
TVAG_209190	A2DVG1	Proteína helicasa de la familia DEAD/DEAH	478	53.2	5.74
TVAG_060470	A2ECH6	Proteína que contiene el dominio N-terminal de la familia SNF2	1354	157.8	5.16

HISTONAS Y PROTEÍNAS ASOCIADAS					
Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_021440	A2DHC5	Histona H2A	139	15.2	10.36
TVAG_100580	A2ENN5	Histona H4	101	11.4	11.3

PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS					
Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
--	P90622	Chaperonina 60, fragmento	544	57.8	6.37
TVAG_066690	A2DS85	Subunidad delta 1 de la proteína del complejo T	536	57.8	6.11
TVAG_153560	A2EPR1	Proteína de choque térmico, putativa	720	83.6	5.02
--	Q94834	HSP70 mitocondrial	609	66.8	7.42
--	O76307	Proteína de choque térmico 70 de retículo endoplásmico, fragmento	619	68.3	5.17
TVAG_303600	A2DR42	Subunidad zeta de chaperonina CCTzeta	528	57.9	6.49
--	Q9GU07	Subunidad eta de chaperonina CCTeta	558	60.1	5.53
TVAG_163000	A2DFX7	Proteína de choque térmico citosólica, putativa	657	71.1	5.45
---	Q5KTX1	HSP90 tipo citosólico (fragmento)	353	41.5	5.10
TVAG_137880	A2EC21	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa	172	18.6	8.24
TVAG_466660	A2FL92	Proteína de la familia chaperonina TCP1/cpn60	537	58.7	5.91
TVAG_381470	A2FKE2	Proteína DnaK	573	63.6	5.58
--	Q9GU09	Subunidad gamma chaperonina CCTgamma, fragmento	462	50.4	5.58

TVAG_277390	A2FTU8	Peptidil prolil cis-trans isomerasa	203	23.0	6.77
TVAG_433130	A2DIV4	Proteína de choque térmico 70 kDa, mitocondrial, putativa	622	67.7	6.70
TVAG_177930	A2DIE5	Chaperonina, putativa	527	56.8	5.86
TVAG_464010	A2E253	Proteína de la familia calreticulina	557	63.3	4.92

DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS					
Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_388670	A2DYJ9	Proteína que contiene dominio PCI	435	48.9	5.03
TVAG_115420	A2F7I0	Complejo endopeptidasa de proteosoma	391	43.9	7.62
TVAG_076170	A2D9L4	Proteína que contiene dominio PCI	389	43.9	5.76
TVAG_074870	A2E404	Proteosoma, putativa	468	52.8	5.31
--	Q27100	Ubiquitina, fragmento	116	13.1	5.90
TVAG_035330	A2DAK7	Complejo endopeptidasa de proteosoma, putativo	422	47.2	5.34
--	Q9GU11	Subunidad alfa 1 de chaperonina CCTalfa	516	55.2	7.78
TVAG_128250	A2EBI6	Complejo endopeptidasa proteosoma	423	47.3	5.77
TVAG_286380	A2EPF2	Proteína de la familia de repetidos ciclosoma/proteosoma			
TVAG_371680	A2E0T9	Proteína que contiene el dominio PCI	378	43.2	6.10
TVAG_455710	A2G060	Proteína de la familia ThiF	286	31.8	6.05

TRANSPORTE					
Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_072120	A2D8B6	Proteína que contiene el dominio C2	290	33.3	6.43
TVAG_051820	A2FII9	Proteína acarreadora mitocondrial	401	44.6	9.66
TVAG_366270	A2DHS1	Coatómero subunidad beta	900	100.7	6.39
TVAG_373190	A2DZI2	Proteína de la familia adaptina, región N-terminal	808	90.1	5.22
TVAG_044240	A2E0I2	Subunidad alfa del complejo AP-2	1006	111.6	5.40
TVAG_421580	A2FR45	Adaptina Mu, putativa	426	48.9	6.37
TVAG_532880	A2GL34	Proteína que contiene dominio VPS/Clatrina	838	94.9	5.20
--	Q9NI37	Proteína hidrogenosomal de membrana 31	316	34.6	9.88
TVAG_472690	A2FU96	Subunidad beta del complejo AP	724	80.7	4.92
TVAG_547230	A2GKQ5	Proteína de la familia adaptina, región N-terminal	849	93.8	5.85
TVAG_436840	A2DFD2	Proteína de la familia dinamina región central	597	66.1	6.28
TVAG_333150	A2EHB1	Proteína de la familia de la subunidad media del complejo adaptador	436	48.7	5.12
TVAG_009720	A2ET48	Subunidad gamma del complejo AP-1	778	85.6	6.30
TVAG_369020	A2EV07	Proteína que contiene dominio VPS y clatrina	614	68.4	5.10
TVAG_169740	Q4G2C9	Proteína relativa a Ras, Rab11C, putativa	211	23.1	5.73
--	Q4G290	Proteína de unión a GTP YPTM2, putativa	202	22.3	7.21
TVAG_222450	A2F5C1	Proteína de unión a GTP pequeña, putativa	199	21.8	5.16
TVAG_070500	Q4G298	GTPasa pequeña Rab10	196	22.1	8.40
TVAG_349870	Q4G289	Proteína pequeña de unión a GTP	197	21.3	5.08
TVAG_211200	Q4G2B3	Proteína pequeña de unión a GTP	195	21.2	5.67
TVAG_282070	A2E9S2	Proteína pequeña de unión a GTP	196	21.9	5.26
TVAG_357210	A2FWD3	Proteína pequeña de unión a GTP	181	20.2	5.94
TVAG_257310	A2ELG5	Proteína pequeña de unión a GTP	200	21.3	6.16
TVAG_126970	A2G9W5	Inhibidor de la disociación de Rab GDP	439	49.0	5.85
TVAG_064150	A2EIX2	Factor de ribosilación de ADP, putativo	181	20.8	5.83
TVAG_120630	A2D7K8	Proteína similar al factor de ribosilación de ADP 3, putativo	177	19.9	5.22
TVAG_590550	A2HNP3	Proteína de membrana hidrogenosomal Hmp35	316	34.7	8.56
TVAG_398430	A2FSV1	Proteína que contiene dominio C2	287	33.1	8.48
TVAG_439460	A2FAG5	Proteína de la familia adaptina región N-terminal	829	92.2	5.48
TVAG_216890	A2FE95	Proteína asociada al sorteo de proteínas vacuolares 35	789	90.3	5.29

ADHESINAS					
Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
--	Q27093	Adhesina AP65-1	567	63.2	7.53

ATPasas					
Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_318870	A2EP65	Factor asociado a espermatogénesis, putativo	796	87.2	5.26
TVAG_006020	A2E6R2	Subunidad A ATPasa protón tipo V	347	40.0	5.03
TVAG_016670	A2ER05	ATPasa 1 tipo Obg	392	44.1	6.80
TVAG_453110	A2ES57	Adenositrifosfatasa, putativa	496	55.6	6.11
TVAG_038640	A2DY20	Proteína de familia ATPasa tipo V, subunidad D	246	27.9	8.03
TVAG_185830	A2D8M7	ATPasa de la familia AAA	446	49.2	8.37
TVAG_476020	A2DA25	ATPasa de la familia AAA	738	82.9	5.92
TVAG_388330	A2DYG8	ATPasa transportadora de calcio	981	108.2	5.90

PROTEASAS					
Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_212500	A2E2P0	Proteasa dependiente de Zn y ATP, putativa	494	55.5	6.71

SISTEMA ANTIOXIDANTE					
Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
--	Q8IEV2	Tioredoxin peroxidasa	196	21.9	6.79
TVAG_055200	A2ETI8	Tiol peroxidasa	169	18.1	8.78
TVAG_455310	A2GAU8	Triparedoxin peroxidasa	196	21.9	6.54
TVAG_039980	A2EQX2	Superóxido dismutasa	194	22.2	7.30

OTRAS					
Gen	No. Acceso	Descripción	aa	MW (kDa)	pI
--	Q95WG9	Proteína tipo IscS/NifS	411	44.8	8.21
TVAG_469020	A2FD73	Proteína que contiene el dominio asociado a la síntesis de biotina y tiamina	446	50.2	8.09
TVAG_047250	A2FJH2	Serina/treonina proteína cinasa no específica	452	50.5	5.82
TVAG_316050	A2FAW3	Serina/treonina proteína cinasa no específica	440	50.7	6.96

TVAG_261950	A2DUA7	Proteína de a familia lectina con repetidos QWX	131	15.0	6.35
--	A9NIQ2	Proteína tipo SCC3 A	903	101.8	5.47
TVAG_268810	A2FIW7	Proteína cinasa de la familia STE			
TVAG_445420	A2E4K8	Serina/treonina protein fosfatasa	303	34.7	5.31
TVAG_306660	A2DNF6	Proteína HCaRG	182	20.2	4.79
TVAG_420420	A2ED65	Proteína de la familia DJ-1	187	19.2	7.37
TVAG_078350	A2FYA1	Proteína que contiene dominio BTB/POZ	510	59.6	6.18

Tabla 8. Proteínas del extracto nuclear de parásitos crecidos en restricción de hierro identificadas por espectrometría de masas. b) Proteínas no caracterizadas clasificadas con base a la posible función de los dominios encontrados

RIBOSOMALES					
Gen	No. Acceso	Dominio	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_198100	A2DDJ7	Proteína ribosomal S2, 40S	268	29.6	9.96
TVAG_010560	A2DNY3	Proteína ribosomal 30S/40S	185	21.8	10.23
TVAG_110890	A2DGT9	Proteína ribosomal L13a, 60S	200	22.4	10.05
TVAG_070530	A2D7V7	Proteína ribosomal L13	200	22.4	10.08
TVAG_121550	A2DHU7	Proteína ribosomal L27a	151	17.0	10.18
TVAG_192480	A2DGW2	Proteína ribosomal L35a	102	11.6	10.20
TVAG_113950	A2DHU8	Proteína ribosomal S11, 40S	155	18.0	10.58
TVAG_111510	A2DYS0	Proteína ribosomal S25, 40S	115	12.6	9.79
TVAG_050990	A2DQN8	Proteína ribosomal S28, 40S	68	7.6	10.20
TVAG_388910	A2DYM3	Proteína ribosomal L3, 60S	415	46.8	10.20
TVAG_199230	A2DDV8	Proteína ribosomal L27a, 60S	162	18.2	10.29
TVAG_459170	A2E6C2	Proteína ribosomal L6	151	16.2	9.57
TVAG_083700	A2DEM7	Proteína ribosomal L37a, 60S	92	10.0	10.43
TVAG_226630	A2ER97	Proteína ribosomal S25, 40S	115	12.6	9.79
TVAG_377870	A2DAX8	Proteína ribosomal eS6, 40S	304	36.2	9.60

METABÓLICAS					
Gen	No. Acceso	Dominio	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_395550	A2F1E4	Acetil CoA hidrolasa	523	57.2	8.79
TVAG_164890	A2FS74	Acetil CoA hidrolasa	523	57.3	8.62
TVAG_377380	A2GD34	Región de hélice beta mano derecha, dominio tipo pectina-liasa	920	99.0	5.16
TVAG_225930	A2DNX2	Dominio medio y N-terminal Fucl/AraA	383	41.9	8.47
TVAG_081640	A2E6V6	Tioesterasa/tiolester deshidratasa isomerasa	130	14.0	9.19

TRADUCCIÓN					
Gen	No. Acceso	Dominio	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_276410	A2ECS2	Factor de elongación y traducción	841	93.3	6.55
TVAG_333940	A2EIA0	Factor eucariótico de inicio de la traducción 3	608	68.2	6.57
TVAG_267950	A2DLE4	Lisil-tRNA sintetasa	537	60.9	6.38

TVAG_184380	A2E9X4	Subunidad 8 de factor de inicio de la traducción eucariótico 3	773	90.0	4.97
-------------	--------	--	-----	------	------

CITOESQUELETO					
Gen	No. Acceso	Dominio	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_136170	A2DJ99	Proteína cinasa asociada a Rho	906	103.1	5.39
TVAG_166580	A2DE65	Proteína de membrana asociada a apoptosis (polimerización de actina)	1088	124.5	8.18
TVAG_461810	A2FI55	Proteína cinasa asociada a Rho	863	98.1	5.48
TVAG_300850	A2FKL6	Dominio I/LWEQ de unión a actina	1821	202.4	5.16
TVAG_466640	A2FL90	Dominio I/LWEQ de unión a actina	1659	182.6	6.27
TVAG_465850	A2EX66	Proteína cinasa asociada a Rho	874	99.2	5.49
TVAG_117060	A2E3P6	Proteína cinasa asociada a Rho	878	100.4	5.25
TVAG_026760	A2DZ79	Dominio tipo caltractina	717	79.0	5.80

SEÑALIZACIÓN					
Gen	No. Acceso	Dominio	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_120360	A2D711	Deoxiguanosina cinasa	209	23.2	6.05
TVAG_262370	A2DUE9	Nucleósido trifosfato hidrolasa que contiene el dominio P-loop	198	22.8	5.35
TVAG_249850	A2DCI8	Nucleósido trifosfato hidrolasa, inhibidor de RNAsa L	599	66.8	8.90
TVAG_251250	A2FUZ0	Dominio tipo BAR/IMD	248	28.6	8.38
TVAG_436540	A2DFA2	Dominio de repetidos tipo Armadillo	482	54.1	9.14
TVAG_385550	A2FU08	Dominio de serina/treonina fosfatasa	1014	117.0	8.35
TVAG_365950	A2DHN9	Dominio de repetidos tipo Armadillo	512	58.9	6.64
TVAG_377800	A2DAX1	Dominio de repetidos tipo Armadillo	236	27.2	7.96
TVAG_437150	A2DFG1	Nucleósido trifosfato hidrolasas que contiene el dominio P-loop	558	63.2	6.47
TVAG_211910	A2EIE7	Dominio de activación de GTPasa	660	75.5	8.63
TVAG_208590	A2F359	Dominio con repetidos tipo WD40	1185	132.4	5.11
TVAG_254480	A2DMW5	Dominio tipo RNI de serina/treonina cinasas	780	89.0	5.48
TVAG_383970	A2F096	Dominio con repetidos tipo WD40	757	83.2	6.90
TVAG_409860	A2F8E6	Nucleósido trifosfato hidrolasa que contiene el dominio P-loop	734	81.3	6.11
TVAG_353990	A2FH19	Nucleósido trifosfato hidrolasa que contiene el dominio P-loop	209	23.3	6.57
TVAG_163680	A2DG45	Dominio de repetidos tipo Armadillo	817	93.1	6.21
TVAG_443950	A2E2D7	Domino BTB/POZ	483	57.2	7.02
TVAG_382870	A2FJL5	Dominio de repetidos tipo Armadillo	489	55.7	6.48

PROCESAMIENTO DEL RNA					
Gen	No. Acceso	Dominio	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_043470	A2EV87	Dominio SUP-12 de unión a RNAs poliadenilados	202	23.2	10.27
TVAG_210380	A2DVU5	Dominio de reconocimiento de RNA	190	21.1	11.21
TVAG_256150	A2FYA9	Dominio tipo PIN	759	86.0	5.77
TVAG_083540	A2DM81	Complejo de silenciamiento de RNA, dominio de nucleasa tipo TUDOR-SN	849	94.6	5.88
TVAG_045340	A2FHH0	Proteína de unión a RNA	184	20.5	10.15
TVAG_470410	A2EM86	Dominio tipo PIN	763	86.1	5.97
TVAG_003950	A2E5A9	HAPB4 (involucrado en la regulacion de la estabilidad de los mRNA)	269	30.7	9.33

UNIÓN A DNA					
Gen	No. Acceso	Dominio	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_539120	A2HX16	Dominio Rad50 de reparación de ruptura de DNA de doble cadena	295	32.1	4.55
TVAG_474360	A2ESX2	Proteína centrosomal de 135 kDa	1042	119.0	5.17
TVAG_339450	A2F901	Dominio Rad50 de reparacion de DNA	977	110.9	5.25
TVAG_012080	A2G3G0	Proteína centrosomal de 152 kDa	1037	117.8	5.78
TVAG_291910	A2DQX1	Motivo UvrB/UvrC de reparación de DNA	327	37.7	9.32
TVAG_157160	A2E9I8	Dominio Rad50 de reparación de DNA de doble cadena	1035	118.0	5.94
TVAG_197420	A2EPL2	Dominio Rad50 de reparacion de DNA de doble cadena	1033	117.9	5.39
TVAG_270500	A2FG00	Dominio TLK de proteína cinasas	689	78.7	6.95
TVAG_325000	A2F135	Dominio Rad50 de reparacion de DNA de doble cadena	1011	117.1	5.77
TVAG_416640	A2EQQ6	Proteína 1 de mantenimiento estructural de cromosomas	1104	127.4	5.16
TVAG_226850	A2FCC9	DNA polimerasa phi	835	94.7	8.09

DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS					
Gen	No. Acceso	Dominio	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_477530	A2F9G0	Subunidad regulatoria 26S de proteasoma	388	43.4	9.10
TVAG_433230	A2DIW4	Subunidad regulatoria 26S de proteasoma	382	43.0	6.87
TVAG_475770	A2DA01	Dominio tipo Cullina	673	76.4	5.68
TVAG_171960	A2DEU7	Subunidad regulatoria no ATPasa del proteosoma 26S	258	29.2	6.43

ATPasas					
Gen	No. Acceso	Dominio	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_420260	A2ED49	Dominio catalítico de la ATPasa/Protón tipo V	610	67.9	5.26
TVAG_262750	A2FS41	Dominio de la subunidad H de ATPasa tipo V	433	48.9	6.61

TRANSPORTE					
Gen	No. Acceso	Dominio	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_100720	A2ENP	Factor 2 de transporte nuclear	183	21.6	8.63
TVAG_206430	A2E1M8	Dominio USO1 de transporte intracelular de proteínas	1235	140.8	5.38

SIN DOMINIO					
Gen	No. Acceso	Dominio	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_455090	A2FMX1	---	218	22.6	9.61
TVAG_291380	A2DQR9	---	1151	131.4	6.76
TVAG_216170	A2ENV1	---	324	36.0	9.67
TVAG_098000	A2E2D0	---	1315	148.6	5.52
TVAG_013410	A2DD97	---	2667	308.1	6.01
TVAG_431560	A2G666	---	1601	183.2	5.91
TVAG_395240	A2F1B3	---	550	61.9	6.28
TVAG_227780	A2ERT0	---	841	94.0	6.57
TVAG_306370	A2DNC7	---	961	108.3	6.70
TVAG_109650	A2EAF4	---	465	53.3	5.63
TVAG_344270	A2E7P8	---	199	23.0	9.26
TVAG_433060	A2DIU7	---	923	106.9	5.47
TVAG_567390	A2GDJ6	---	257	30.2	7.34
TVAG_266360	A2DQI9	---	473	54.9	4.98
TVAG_458790	A2E684	---	191	22.1	8.22
TVAG_333110	A2EHA7	---	516	59.7	9.44
TVAG_110760	A2DGS6	---	609	68.2	6.34
TVAG_347810	A2DSS2	---	377	43.7	9.61
TVAG_479840	A2F8G1	---	1098	126.7	5.35

Tabla 9. Proteínas del extracto nuclear de parásitos crecidos en alto hierro identificadas por espectrometría de masas. b) Proteínas no caracterizadas clasificadas con base a la posible función de los dominios encontrados

RIBOSOMALES					
Gen	No. Acceso	Dominio	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_198100	A2DDJ7	Proteína ribosomal S2, 40S	268	29.6	9.96
TVAG_010560	A2DNY3	Proteína ribosomal 30S/40S	185	21.8	10.23
TVAG_110890	A2DGT9	Proteína ribosomal L13a, 60S	200	22.4	10.05
TVAG_070530	A2D7V7	Proteína ribosomal L13	200	22.4	10.08
TVAG_121550	A2DHU7	Proteína ribosomal L27a	151	17.0	10.18
TVAG_192480	A2DGW2	Proteína ribosomal L35a	102	11.6	10.20
TVAG_113950	A2DHU8	Proteína ribosomal S11, 40S	155	18.0	10.58
TVAG_111510	A2DYS0	Proteína ribosomal S25, 40S	115	12.6	9.79
TVAG_050990	A2DQN8	Proteína ribosomal S28, 40S	68	7.6	10.20
TVAG_071700	A2D873	Proteína ribosomal L3, 50S	415	46.8	10.20
TVAG_119970	A2D7E3	Proteína ribosomal L6, 60S	151	16.3	9.36

METABÓLICAS					
Gen	No. Acceso	Dominio	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_395550	A2F1E4	Acetil CoA hidrolasa	523	57.2	8.79
TVAG_164890	A2FS74	Acetil CoA hidrolasa	523	57.3	8.62
TVAG_377380	A2GD34	Región de hélice beta mano derecha, dominio tipo pectina-liasa	920	99.0	5.16
TVAG_038850	A2E5J8	Dominio ciclasa de terpenoides/ preniltransferasa	886	98.4	5.17
TVAG_150430	A2DRU5	Dominio de glucanotransferasa	1149	130.8	5.88
TVAG_255980	A2DYZ5	Dominio tipo hidrogenasa exclusiva de hierro	413	46.5	6.13
TVAG_340510	A2EKG5	Dominio de ligasa aspartato-amonio	318	36.8	5.62
TVAG_026290	A2DZ32	Dominio de unión a oxisterol	383	43.6	5.94
TVAG_397250	A2DXB2	Glucocinasa	372	41.8	7.75
TVAG_092750	A2FTT2	Glucocinasa	375	41.5	6.68

TRADUCCIÓN					
Gen	No. Acceso	Dominio	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_276410	A2ECS2	Factor de elongación y traducción	841	93.3	6.55
TVAG_333940	A2EIA0	Factor eucariótico de inicio de la traducción 3	608	68.2	6.57
TVAG_267950	A2DLE4	Lisil-tRNA sintetasa	537	60.9	6.38

TVAG_266630	A2DQL6	Metionil-tRNA-sintetasa	710	81.1	5.71
TVAG_417700	A2ED92	Activador traduccional gcn1	2281	254.5	5.92

CITOESQUELETO

Gen	No. Acceso	Dominio	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_136170	A2DJ99	Proteína cinasa asociada a Rho	906	103.1	5.39
TVAG_166580	A2DE65	Proteína de membrana asociada a apoptosis (polimerización de actina)	1088	124.5	8.18
TVAG_461810	A2FI55	Proteína cinasa asociada a Rho	863	98.1	5.48
TVAG_300850	A2FKL6	Dominio I/LWEQ de unión a actina	1821	202.4	5.16
TVAG_466640	A2FL90	Dominio I/LWEQ de unión a actina	1659	182.6	6.27
TVAG_180570	A2EE85	Dominio central FERM	5481	613.2	6.06
TVAG_466780	A2FLA4	Proteína de membrana asociada a apoptosis	1101	125.7	8.50
TVAG_254350	A2DMV2	Dominio homólogo a calponina	196	22.2	8.84
TVAG_035180	A2DAJ2	Dominio con homología a ARP2/3	373	41.7	8.44
TVAG_437390	A2DFI5	Segundo dominio FERM	1751	199.7	5.54
TVAG_243360	A2FI19	Dominio relacionado a dineína tipo AAA	4106	467.5	5.06
TVAG_311270	A2FX53	Dominio de asociación a Kinesina	698	79.4	7.33

SEÑALIZACIÓN

Gen	No. Acceso	Dominio	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_120360	A2D711	Deoxiguanosina cinasa	209	23.2	6.05
TVAG_262370	A2DUE9	Nucleósido trifosfato hidrolasa que contiene el dominio P-loop	198	22.8	5.35
TVAG_249850	A2DCI8	Nucleósido trifosfato hidrolasa, inhibidor de RNAsa L	599	66.8	8.90
TVAG_251250	A2FUZ0	Dominio tipo BAR/IMD	248	28.6	8.38
TVAG_436540	A2DFA2	Dominio de repetidos tipo Armadillo	482	54.1	9.14
TVAG_385550	A2FU08	Dominio de serina/treonina fosfatasa	1014	117.0	8.35
TVAG_063450	A2EU15	Dominio de la familia factor X frágil citoplásmico	1214	137.6	5.52
TVAG_394400	A2DWF6	Dominio de repetidos tipo WD40	347	38.8	4.98
TVAG_110010	A2DGK2	Dominio tipo BAR/IMD	250	28.2	7.12
TVAG_172200	A2DEX1	Dominio de repetidos tipo Armadillo	1191	133.8	5.01
TVAG_329880	A2FQT4	Nucleósido trifosfato hidrolasa que contiene el dominio P-loop	2386	277.0	6.55
TVAG_204060	A2FXT6	Dominio circular con repetidos tipo Ankirina	313	35.4	6.86
TVAG_040860	A2EWP8	Dominio de repetidos tipo Armadillo	494	55.0	7.46
TVAG_410690	A2FU58	Dominio de repetidos tipo Armadillo	494	54.7	8.05
TVAG_215070	A2F637	Dominio de repetidos tipo Armadillo	438	49.4	4.91
TVAG_057830	A2FLD2	Dominio de repetidos tipo WD40	1164	125.3	6.71

TVAG_387670	A2E0Z4	Dominio de activación de GTPasa	610	69.8	5.63
TVAG_154760	A2F267	Dominio BP28CT, dominio de repetidos tipo Armadillo	1705	192.4	5.58

PROCESAMIENTO DEL RNA

Gen	No. Acceso	Dominio	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_043470	A2EV87	Dominio SUP-12 de unión a RNAs poliadenilados	202	23.2	10.27
TVAG_210380	A2DVU5	Dominio de reconocimiento de RNA	190	21.1	11.21
TVAG_256150	A2FYA9	Dominio tipo PIN	759	86.0	5.77
TVAG_083540	A2DM81	Complejo de silenciamiento de RNA, dominio de nucleasa tipo TUDOR-SN	849	94.6	5.88

UNIÓN A DNA

Gen	No. Acceso	Dominio	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_539120	A2HXI6	Dominio Rad50 de reparación de ruptura de DNA de doble cadena	295	32.1	4.55

DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS

Gen	No. Acceso	Dominio	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_477530	A2F9G0	Subunidad regulatoria 26S de proteasoma	388	43.4	9.10
TVAG_433230	A2DIW4	Subunidad regulatoria 26S de proteasoma	382	43.0	6.87
TVAG_083710	A2DM96	Dominio HECT, ubiquitin transferasa	351	40.1	5.90
TVAG_455110	A2FMX3	Dominio tipo Cullina	831	95.7	8.22

TRANSPORTE

Gen	No. Acceso	Dominio	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_100720	A2ENP	Factor 2 de transporte nuclear	183	21.6	8.63
TVAG_206430	A2E1M8	Dominio USO1 de transporte intracelular de proteínas	1235	140.8	5.38
TVAG_008790	A2F7V1	Dominio tipo Tim44, Dominio tipo NTF-2 de transporte nuclear	326	36.5	9.03
TVAG_063710	A2EU41	Dominio 2 de la proteína de sorteo vacuolar 39	868	99.2	5.24

ATPasas

Gen	No. Acceso	Dominio	aa	MW (kDa)	pI
TVAG_420260	A2ED49	Dominio catalítico de la ATPasa/Protón tipo V	610	67.9	5.26
TVAG_262750	A2FS41	Dominio de la subunidad H de ATPasa tipo V	433	48.9	6.61
TVAG_438870	A2FZ87	Subunidad E/31 ATP sintasa, dominio tipo E ATPasa tipo V	203	23.2	5.43

SIN DOMINIO/OTROS					
Gen	No. Acceso	Dominio	aa	MW (kDa)	<i>pI</i>
TVAG_455090	A2FMX1	---	218	22.6	9.61
TVAG_291380	A2DQR9	---	1151	131.4	6.76
TVAG_216170	A2ENV1	---	324	36.0	9.67
TVAG_098000	A2E2D0	---	1315	148.6	5.52
TVAG_013410	A2DD97	---	2667	308.1	6.01
TVAG_431560	A2G666	---	1601	183.2	5.91
TVAG_031860	A2EUI5	---	322	35.8	9.72
TVAG_038420	A2DXZ9	---	1687	191.3	7.40
TVAG_196620	A2FCY2	Dominio START (dominio de unión a lípidos)	212	24.0	6.81
TVAG_576970	A2GNU7	Dominio START (dominio de unión a lípidos)	213	24.3	6.04
TVAG_440200	A2FDM3	---	2440	25.9	9.82
TVAG_383370	A2FSG7	---	281	32.0	5.60
TVAG_369200	A2FGE6	---	393	44.0	4.82
TVAG_208760	A2DVB8	---	659	75.3	6.28
TVAG_167810	A2FLB9	---	403	45.1	7.30
TVAG_102740	A2ECY0	---	419	47.9	6.55

SOLUCIONES

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

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

Solución de Ácido sulfosalicílico 50 mM (Sigma)

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

Solución de Sulfato Ferroso Amoniacal 25 mM (Sigma)

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

Amortiguador Salino de Fosfatos (PBS)

NaCl.....8 gr

KCl.....0.2 gr

Na₂HPO₄.....8.52 gr

K₂HPO₄.....0.27 gr

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

Amortiguador de corrida 10x

Trisma Base.....30.2 gr

Glicina.....144 gr

SDS.....10 gr

Aforar a 1 L con agua destilada. El pH final queda en 8.3 cuando se hace 1x
(no se debe de ajustar).

Amortiguador de transferencia

Trisma Base.....4.84 gr

Glicina.....22.52 gr

H₂O destilada.....1600 ml

Metanol.....400 ml

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

Tris-HCl/SDS pH 6.8

Trisma Base.....6.055 gr

SDS.....0.4 gr

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

Tris-HCl/SDS pH 8.8

Trisma Base.....18.165 gr

SDS.....0.4 gr

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

Acrilamida 30%

Acrilamida.....29.2 gr

Bisacrilamida.....0.8 gr

Disolver en 40 ml de agua destilada y una vez disuelto aforar a 100 ml.

Almacenar a 4°C protegido de la luz.

Amortiguador TBE 10x

Trisma Base.....108 gr

Ácido Bórico.....27.5 gr

EDTA.....9.3 gr

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

Amortiguador de carga 6x para DNA/RNA

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

Azul de bromo fenol: xilene-xianol.....100 µl

Formamida.....400 µl

Volumen final.....500 µl

Guardar a 4°C hasta su uso.

Paraformaldehído 2%

Pesar 2 gr de paraformaldehído y disolver en 100 ml de PBS pH 7. Se disuelve calentando a una temperatura constante de 55°C.

Agua DEPC

Para 1 L, agregar 1 ml de DEPC (Sigma) en 1000 ml de agua destilada. Dejar en agitación toda la noche y posteriormente esterilizar en autoclave.

Amortiguador de lisis (Extracción de DNA genómico)

SDS (Sigma).....0.2%
NaCl.....100 nM
EDTA.....100 nM, pH 8
Tris-HCl.....100 nM, pH 8

Almacenar a TA.

Bromuro de etidio

Bromuro de etidio (Sigma).....0.5 mg
Agua destilada.....1 ml

Almacenar cubierto de la luz y manejar con precaución debido a que es cancerígeno.

Solución decolorante fuerte para geles de poliacrilamida

Metanol.....500 ml

Ácido acético glacial....125 ml

Agua destilada.....625 ml

SDS-Amortiguador 2x

Trisma Base.....1.52 gr

SDS.....2.0 gr

Disolver en 50 ml de agua destilada y ajustar el pH A 6.8. Posteriormente adicionar:

Glicerol.....20 ml

Agua destilada.....Aforar a 100 ml

Sacarosa al 10% en PBS pH 8

Sacarosa (Sigma).....10 gr

PBS pH 8..... cbp100 ml

Rojo de fenol (0.1 gr)

Persulfato de amonio al 10%

Disolver 10 mg en 1 ml de agua destilada. Almacenar en alícuotas de 250 μ l hasta 2 semanas a -20°C.

Solución stock de Azul brillante de Coomassie 0.2%

Metanol.....500 ml

Ácido acético glacial.....100 ml

Agua destilada.....400 ml

Azul de Coomassie R 250.....2.00 gr

Tapar perfectamente el matraz y agitar toda la noche. Filtrar con papel "Whatman"

No. 1 y proteger de la luz. Almacenar a TA.

Amortiguador de muestra 1x

SDS-Amortiguador 2x.....400 μ l

β -mercaptoetanol 5%.....50 μ l

Azul de Bromofenol

(Stock 10 mg/ml).....50 μ l

PBS-Tritón X-100 al 0.2%

Añadir 0.2 ml de Tritón X-100 a 100 ml de PBS pH 7. Agitar y posteriormente filtrar por 0.22 μ m. Almacenar a 4°C hasta su uso.

PBS-Glicina 0.5 M

Pesar 1.87 gr de glicina y disolver en 25 ml de PBS pH 7, luego aforar a 50 ml con más PBS. Almacenar a 4°C hasta su uso.

PBS-Albúmina 1%

Pesar 0.5 gr de albúmina y disolver en 50 ml de PBS pH 7. Almacenar a 4°C hasta su uso.

Medio TYM

Bacto Triptona.....	30 gr
Extracto de levadura.....	15 gr
Maltosa.....	7.5 gr
Cisteína.....	1.5 gr
Ácido ascórbico.....	0.3 gr
K ₂ HPO ₄	1.2 gr
KH ₂ PO ₄	1.2 gr

Disolver todo en 1 L de agua bidestilada, ajustar el pH a 6.2 con HCl, aforar a 1.5 L y esterilizar envasado en frascos de 100 ml o tubos de 6 ml por autoclave a 15 psi/15 min.

Medio y Agar LB

Bacto Triptona.....	10 gr
Extracto de levadura.....	5 gr
NaCl.....	5 gr

Para preparar agar, añadir 15 gr de agar bacteriológico por cada 1 L de medio preparado.

Disolver todo en 800 ml de agua destilada y una vez disuelto aforar a 1 L. Esterilizar en frascos de 500 ml a 15 psi/15 min.

Research Article

*These authors contributed equally to this work.

Cite this article: Miranda-Ozuna JF T, Rivera-Rivas LA, Cárdenas-Guerra RE, Hernández-García MS, Rodríguez-Cruz S, González-Robles A, Chavez-Munguía B, Arroyo R (2019). Glucose-restriction increases *Trichomonas vaginalis* cellular damage towards HeLa cells and proteolytic activity of cysteine proteinases (CPs), such as TvCP2. *Parasitology* **146**, 1156–1166. <https://doi.org/10.1017/S0031182019000209>

Received: 15 August 2018
Revised: 5 February 2019
Accepted: 7 February 2019
First published online: 12 March 2019

Key words:

Apoptosis induction; cellular damage; cysteine proteinases; cytotoxicity; glucose regulation; *Trichomonas vaginalis*

Author for correspondence:

Rossana Arroyo, E-mail: rarroyo@cinvestav.mx

Glucose-restriction increases *Trichomonas vaginalis* cellular damage towards HeLa cells and proteolytic activity of cysteine proteinases (CPs), such as TvCP2

Jesús F. T. Miranda-Ozuna*, Luis Alberto Rivera-Rivas*, Rosa Elena Cárdenas-Guerra, Mar Sarai Hernández-García, Sarahí Rodríguez-Cruz, Arturo González-Robles, Bibiana Chavez-Munguía and Rossana Arroyo

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Av. IPN # 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Delg. Gustavo A. Madero, CP 07360, Mexico City, Mexico

Abstract

Trichomonas vaginalis induces cellular damage to the host cells (cytotoxicity) through the proteolytic activity of multiple proteinases of the cysteine type (CPs). Some CPs are modulated by environmental factors such as iron, zinc, polyamines, etc. Thus, the goal of this study was to assess the effect of glucose on *T. vaginalis* cytotoxicity, proteolytic activity and the particular role of TvCP2 (TVAG_057000) during cellular damage. Cytotoxicity assays showed that glucose-restriction (GR) promotes the highest HeLa cell monolayers destruction (~95%) by trichomonads compared to those grown under high glucose (~44%) condition. Zymography and Western blot using different primary antibodies showed that GR increased the proteolytic activity, amount and secretion of certain CPs, including TvCP2. We further characterized the effect of glucose on TvCP2. TvCP2 increases in GR, localized in vesicles close to the plasma membrane and on the surface of *T. vaginalis*. Furthermore, pretreatment of GR-trichomonads with an anti-TvCP2r polyclonal antibody specifically reduced the levels of cytotoxicity and apoptosis induction to HeLa cells in a concentration-dependent manner. In conclusion, our data show that GR, as a nutritional stress condition, promotes trichomonal cytotoxicity to the host cells, increases trichomonad proteolytic activity and amount of CPs, such as TvCP2 involved in cellular damage.

Introduction

Trichomonas vaginalis is the causative agent of human trichomoniasis, the most common non-viral sexually transmitted infection worldwide, affecting ~276.4 million people annually (Poole and McClelland, 2013). This flagellated protist is responsible for severe health complication, such as chronic inflammation (vaginitis, urethritis and prostatitis), infertility, increasing the risk of prostate and cervical cancer, and facilitating the infection and transmission of the human immunodeficiency virus (HIV) (Petrin *et al.*, 1998).

The cellular and molecular mechanisms of *T. vaginalis* pathogenesis have not been clearly elucidated due to the multifactorial nature of its virulence mechanisms described up to date. Particularly, multiple molecules have been identified in the cellular damage caused by *T. vaginalis*, such as porins (Fiori *et al.*, 1993), phospholipases (Lubick and Burgess, 2004) and proteinases localized on the parasite surface or secreted into the extracellular medium, depending on the environmental conditions (Figueroa-Angulo *et al.*, 2012). *Trichomonas vaginalis* has multiple proteinases, mainly of the cysteine type (CPs), differentially modulated by iron, playing crucial roles in the virulence of *T. vaginalis*, in cytoadherence (TvLEGU-1) (Arroyo and Alderete, 1989; Rendón-Gandarilla *et al.*, 2013), cytotoxicity (TvCP39 and TvCP65) (Alvarez-Sánchez *et al.*, 2000; Ramón-Luing *et al.*, 2011), haemolysis (TvCP4) (Cárdenas-Guerra *et al.*, 2013), apoptosis induction (TvCP2, TvCP3, TvCP4 and TvCPT) (Sommer *et al.*, 2005), among others. Additionally, trichomonad CPs are found in the vaginal secretions of patients with trichomoniasis, some of which are immunogenic (Hernández *et al.*, 2014; Arroyo *et al.*, 2015). During vaginal infection, trichomonads are constantly exposed to stress conditions throughout the menstrual cycle, competition for nutrients with the vaginal microflora, and host immune response, among others. However, *T. vaginalis* adapts and responds to environmental changes, differentially modulating the expression of multiple genes, including those encoding virulence factors, to maintain a chronic infection (Figueroa-Angulo *et al.*, 2012). Glucose is the primary carbon source for *T. vaginalis* under both anaerobic and aerobic conditions. Thus, the energy generation through glycolysis is vital to the maintenance of a trichomonal chronic infection. The major source of glucose in the vaginal fluid is from the glycogen derived from vaginal epithelial cells through the action of α -glucosidase and β -amylase (Stafkova *et al.*, 2018). We recently reported that *T. vaginalis* is exposed to different glucose levels (0.3–36.65 mM) during vaginal infection of women with trichomoniasis. We also reported that

glucose promotes trichomonad growth and increases the adherence levels of parasites to laminin and fibronectin (Miranda-Ozuna *et al.*, 2016). *Trichomonas vaginalis* also activates survival mechanism, such as metabolic reprogramming, enhancing antioxidant ability and autophagy, as a response to nutritional stress by glucose restriction (Huang *et al.*, 2014, 2017). These data suggest that glucose is also an essential nutrient for *T. vaginalis*; however, its effects on trichomonal pathogenesis have not been explored yet.

Here, we assessed the effect of nutritional stress by glucose-restriction (GR) on the trichomonal cytotoxicity and apoptosis induction of HeLa cells and proteolytic activity involved in cellular damage. GR condition increases the cytotoxicity levels of *T. vaginalis* and the proteolytic activity released by *T. vaginalis* during host–parasite interaction with HeLa cell monolayers. Furthermore, TvCP2 plays a key role in cytotoxicity and apoptosis induction to HeLa cells under GR conditions.

Materials and methods

Parasites and HeLa cell cultures

Trichomonas vaginalis parasites from the fresh clinical isolate CNC188 (Alvarez-Sánchez *et al.*, 2000) were cultured for 1 week by daily passages in trypticase-yeast extract (TY) medium supplemented with 25 mM glucose (MERCK) [standard glucose concentration in the regular medium TYG; normal glucose (NG)] and 10% heat-inactivated bovine serum (HIBS) after incubating at 37 °C for 20 h. For growing parasites in different glucose concentrations, TY-HIBS medium was either supplemented with 50 mM glucose (high glucose; HG) or not supplemented with extra glucose (GR), containing ≤ 1 mM glucose derived from medium components (Miranda-Ozuna *et al.*, 2016). HeLa cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% HIBS for 48 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere to obtain confluent HeLa cell monolayers (Alvarez-Sánchez *et al.*, 2007).

Preparation of protein extracts and gel electrophoresis separation by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Total protein extracts (TPE) were obtained from parasites (2×10^7) grown under both glucose (HG and GR) conditions by 10% trichloroacetic acid (TCA) precipitation at 4 °C overnight (ON) and analysed by SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gels. Similarly, protease-resistant extracts (PRE) were obtained from parasites (2×10^7) grown under both glucose conditions without protease inhibitors, which leaves the proteolytic activity intact for detection. Briefly, parasites suspended in PBS pH 8 were lysed with 0.5% sodium deoxycholate (DOC) for 20 min at 4 °C, centrifuged at $16\,000 \times g$ for 30 min at 4 °C, and analysed by SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gels. The proteolytic activity from PRE or DMEM-TYG medium (20 μ L) obtained after 60 min parasite–HeLa cell interaction was analysed by substrate SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gels co-polymerized with 0.2% gelatin (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Proteinases were renatured with 2.5% Triton X-100 and activated with 100 mM sodium acetate buffer, pH 4.5, containing 0.1% β -mercaptoethanol for 12 h or 18 h at 37 °C, respectively, as described by Cárdenas-Guerra *et al.* (2013). Gels were Coomassie brilliant blue (CBB) stained to show the proteolytic activity as white bands against a blue background.

Western blot (WB) assays

For WB assays, TPE or PRE from parasites (2×10^7) grown under HG or GR conditions were separated by SDS-PAGE, blotted onto

nitrocellulose (NC) membranes (0.2 μ m pore size; Bio-Rad), blocked with 10% nonfat dried milk in PBS-Tween 20 [PBS pH 7 with 0.1% Tween 20 (PBS-T20)], and incubated with different primary antibodies (all diluted in PBS-T20): anti-TvCP2r (1:2000 dilution), anti-TvCP3r (1:2000 dilution), anti-TvCP4r (1:1000 dilution), anti-TvCP12r (1:2000 dilution), anti-TvCP39r (1:1000 dilution), anti-TvLEGU-1r (1:500 dilution), anti-Tv-CatDr (1:200 dilution) and anti-TC-2r (1:200 dilution) for 18 h at 4 °C. After incubation for 1 h at 37 °C with a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (1:3000 dilution in PBS-T20 with 5% nonfat dried milk; Bio-Rad), the reactive bands were developed using a chemiluminescence system (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Thermo Scientific-Pierce). Images were captured with a ChemiDoc XRS System (Bio-Rad) and analysed using the Quantity One software (Bio-Rad). Alpha-enolase protein (TvENO) detected with an anti-TvENOr antibody (1:2000 dilution in PBS-T20) was used as a loading or secretion control, since it is not affected by glucose. Triosephosphate isomerase (TvTIM), detected with an anti-TvTIMr antibody (1:1000 dilution in PBS-T20) was used as a control protein upregulated by glucose (Miranda-Ozuna *et al.*, 2016). These experiments were performed at least two independent times with similar results.

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity assays were performed by a colorimetric method as described by Alvarez-Sánchez *et al.* (2000) with some modifications. Briefly, parasites grown under HG or GR conditions were suspended in DMEM:TY interaction medium [2:1 (vol/vol)] without HIBS, supplemented with 50 mM glucose (HG) or without glucose (GR), according to the parasite glucose growth condition. Parasites (2×10^5 well⁻¹) were added to confluent HeLa cell monolayers on 96-well microtiter plates ($\sim 4 \times 10^4$ cells well⁻¹) at a 5:1 ratio (parasite: HeLa cell) and incubated for 15, 30 and 60 min at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere, washed 5 \times with PBS at RT, and HeLa cell monolayer destruction was assessed using light microscopy and spectrophotometric quantification at 570 nm. The interaction medium after 60 min host–parasite interaction was recovered, centrifuged and the supernatant was analysed by zymography for the presence of trichomonad secreted proteinases. Control parasites in the interaction medium without serum and with or without glucose (TYG:DMEM or TY:DMEM) were monitored for cell viability at the same incubation time of the assay by the trypan blue exclusion method. Parasite viability was maintained between 99 and 98% throughout the assay (up to 60 min) under both interaction media.

For cytotoxicity inhibition experiments, parasites grown under GR conditions were pre-incubated with increasing concentrations (0, 25, 50, 100 and 200 μ g mL⁻¹) of an anti-TvCP2r immunoglobulin G (IgGs) (purified by the caprylic acid method, as previously reported; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018) for 30 min at 37 °C, before interaction with confluent HeLa cell monolayers on 96-well microtiter plates for 30 min at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. The same concentrations of preimmune (PI) rabbit serum IgGs were used as a negative control. Untreated parasites were taken as 100% cytotoxicity. The experiment was performed in triplicate at least three independent times, with similar results.

Apoptosis assays

Apoptosis assays (Annexin V-FITC and DNA fragmentation assay) were performed using the same protocol described above for cytotoxicity inhibition experiments. After incubation of *T. vaginalis* with confluent HeLa cell monolayers on 96-well microtiter plates for 30 min at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere and washed 5 times with PBS at room temperature (RT), remnant

HeLa cell monolayers were labeled for 15 min using the Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) Fluorescence Microscopy Kit (BD Pharmingen), following the manufacturer's recommendations. The FITC fluorescent signal from apoptotic HeLa cells was analysed by epifluorescence microscopy (Nikon, Japan) (Sommer *et al.*, 2005) and quantitated by a spectrofluorometric analysis (SpectraMax Gemini EM spectrofluorometer).

For DNA fragmentation assay, after incubation of *T. vaginalis* with confluent HeLa cell monolayers on 6-well microtiter plates (at a 4:1 ratio) for 30 min at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere, the supernatant was recovered and centrifuged. The cells attached in the plate and in the pellet were lysed with the lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 0.2% Triton X-100). DNA was pretreated with RNase A (50 µg mL⁻¹) and proteinase K (1 mg mL⁻¹), recovered by phenol-chloroform extraction and precipitated with ethanol and 3 M sodium acetate. Normal-grown parasites and HeLa cells treated with 5% H₂O₂ for 30 and 60 min at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere were used as positive controls. The DNA was analysed by electrophoresis in 2% agarose gels (Abcam Protocols, 2018).

In vitro secretion assays

The *in vitro* secretion assays were performed as described by Cárdenas-Guerra *et al.* (2013) with few modifications. Parasites grown under HG or GR condition were harvested, washed three times with PBS pH 7 and suspended (1 × 10⁶ parasites mL⁻¹) in PBS supplemented with 50 mM glucose or without glucose, according to the parasite growth condition (HG or GR, respectively). The parasites were incubated at 37 °C for 60 min, parasite viability was measured by the trypan blue exclusion method, and the supernatant containing secretion products (SP) was clarified by centrifugation at 900 × *g* and filtered through a 0.22 µm NC membrane. The proteins were precipitated with 10% TCA at 4 °C ON, separated by SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gels, blotted onto NC membrane, and analysed by WB assay to confirm the presence of TvCP2 in the SP. To identify TvCP2 by mass spectrometry (MS) in the *in vitro* SP, the protein band of interest was manually excised from the CBB-stained gel and a matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-time of flight (TOF) MALDI-TOF/TOF MS analysis was performed at the Protein Core Facility, (CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato).

Immunolocalization of TvCP2 by indirect immunofluorescence assays (IFA)

To determine the localization of TvCP2 under different glucose conditions, IFA and confocal microscopy analyses were performed using parasites grown under HG and GR conditions and an anti-TvCP2r antibody. For TvCP2 localization, parasites were fixed with 4% formaldehyde in PBS for 20 min at RT on coverslips, washed two times with 20 mM NH₄Cl in PBS (NH₄Cl-PBS), two times with 0.2% bovine serum albumin (BSA) in PBS (PBS-BSA) and two times with PBS before permeabilization with 0.02% Triton X-100 in PBS for 5 min at RT. Parasites were then incubated with an anti-TvCP2r antibody or PI serum (both at a 1:100 dilution) for 1 h at RT, washed five times with PBS, and incubated with a FITC-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:100 dilution) (Thermo Scientific-Pierce) for 1 h at RT. For nuclei staining, the coverslips were mounted with Vectashield- 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) mounting solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and the parasites were analysed by confocal microscopy using a Zeiss microscope and ZEN 2012 software (Carl Zeiss, Germany). For lysosome staining, live parasites (1 × 10⁶ parasites mL⁻¹) grown under both glucose conditions (HG and GR) were incubated with 2 µM

Lysotracker Red DND-99 (Invitrogen) following the manufacturer's instructions for 30 min at 37 °C with gentle shaking. Parasites were then washed, fixed and processed as described for IFA with the anti-TvCP2r antibody.

Immunogold labelling and transmission electron microscopy (TEM)

Parasites grown under HG and GR conditions were fixed with 4% formaldehyde-0.2% glutaraldehyde in serum-free DMEM, dehydrated in ethanol, embedded in LR White resin (London Resin Co. Ltd., Berkshire, UK) and polymerized under UV light at 4 °C for 18 h. Ultrathin sections were mounted on mesh nickel grids, incubated with an anti-TvCP2r primary antibody (1:30 dilution), for 18 h, washed, incubated with a 15 nm gold particle-conjugated goat anti-rabbit IgGs secondary antibody (Ted Pella, Inc., Redding, CA, USA) for 1 h at RT, and contrasted with uranyl acetate and lead citrate. As a negative control, the secondary antibody alone was used. Ultrathin sections were analysed by TEM in a JEM-1011 transmission electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

Scanning electron microscopy (SEM)

After parasite-HeLa cell interaction in TY:DMEM interaction medium without serum for 45 min at 37 °C, samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer for 30 min at 37 °C, washed with PBS and milli-Q water, dehydrated in ethanol, critical point-dried with CO₂ in a Sandri-780 dryer (Tousimis®) and coated with gold using a JFC-1100 ionizer (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). The samples were analysed with a JEOL-JSM 7100 F scanning electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

Statistical analysis

Statistically significant differences between means were determined by analysis of variance (ANOVA) using GraphPad Prism 5.0. The data were analysed by one-way ANOVA using the Tukey method comparing all pairs of columns (*P* < 0.05) for Figs 1, 2 and 5. The scores showing statistical significance are indicated in the figures with an asterisk. The corresponding *P* values are indicated in the figure legends.

Results

Effect of glucose on the cytotoxicity levels and the amount and proteolytic activity of *T. vaginalis* proteinases

To assess the effect of glucose on the cytotoxicity of *T. vaginalis*, parasites grown under both (GR and HG) glucose conditions were incubated with confluent HeLa cell monolayers and the levels of cellular destruction were determined by a colorimetric method. Interestingly, the optical microscopy (Fig. 1A) and spectrophotometric analyses (Fig. 1B) showed that parasites under GR conditions exhibited the highest levels of monolayers destruction (~95%) compared to parasites under HG conditions (~44%) after 60 min interaction. These differences were significant.

In addition to contact-dependent cytotoxicity, *T. vaginalis* secretes molecules with a proteolytic activity that could contribute to cellular damage. To confirm this, we performed zymograms of the PRE and supernatants obtained after 60 min of HeLa-Tv interaction under both (GR and HG) glucose conditions (Fig. 1C). Our results showed the presence of four main bands (~90-, ~66-, ~34- and ~25-kDa) with proteolytic activity released after host-parasite interaction under both glucose conditions (Fig. 1C, lanes 3 and 4). However, under GR condition the proteolytic activity bands were more intense, especially the ~66 kDa

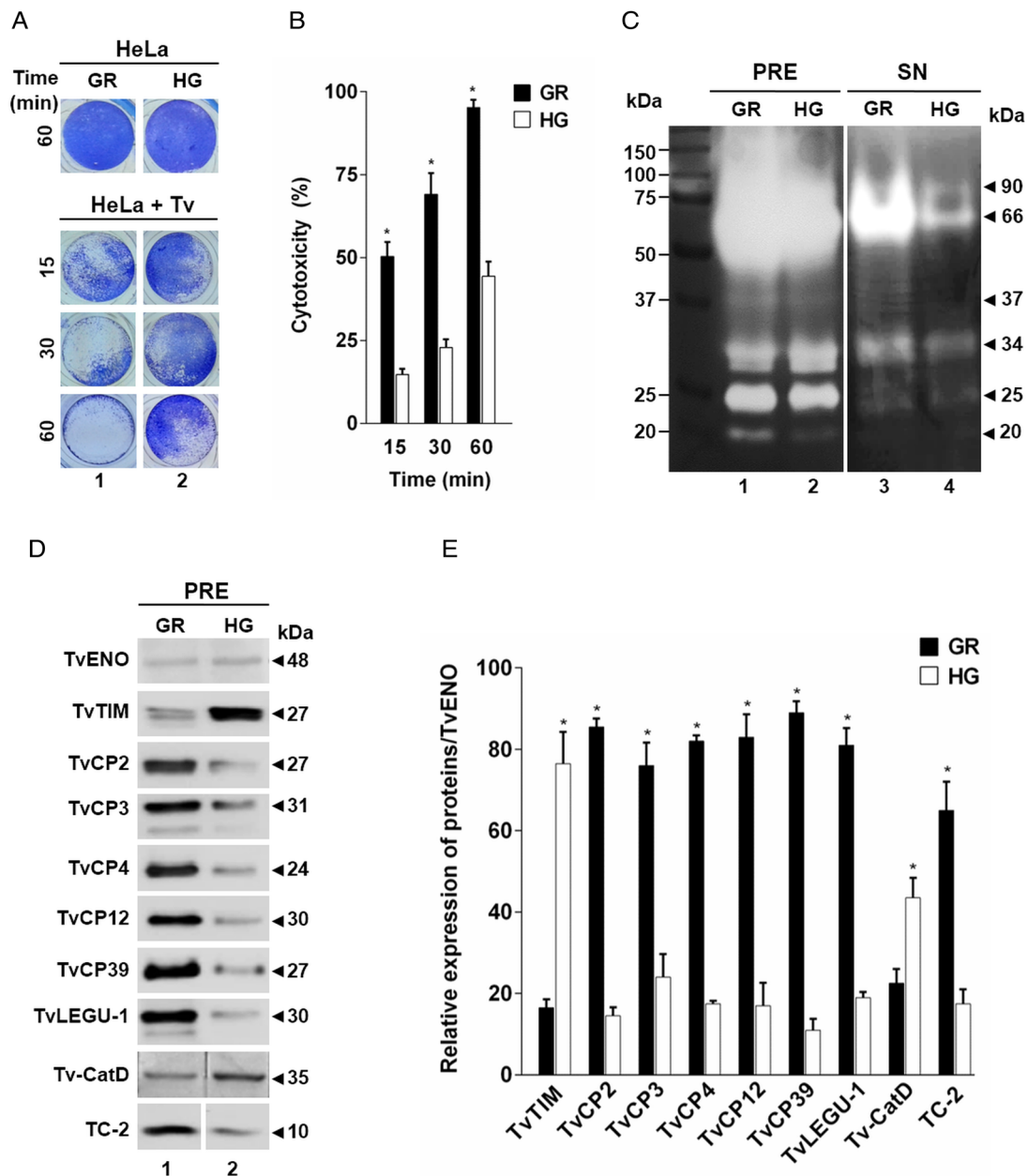


Fig. 1. Effect of glucose on the cytotoxicity levels, proteolytic activity and amount of different proteins of *Trichomonas vaginalis*. (A) Cytotoxicity assays to show HeLa cell monolayers integrity by staining with crystal violet dye, after 15, 30 and 60 min interaction with *T. vaginalis* under glucose-restricted (GR) (Lane 1) or high glucose (HG) (lane 2) conditions. HeLa cell monolayers incubated 60 min under both GR and HG conditions, but without *T. vaginalis* were used as 100% monolayer integrity controls. (B) Percentage of cytotoxicity levels on HeLa cells induced by *T. vaginalis* at different times (15, 30 and 60 min), under GR (black bars) or HG (white bars) conditions determined by spectrophotometric analysis of the eluted dye from HeLa cell monolayers. (C) Zymogram of proteinase-resistant extracts (PRE) (lanes 1 and 2) or supernatants (SN) (lanes 3 and 4) obtained after interaction of HeLa cell monolayers with parasites grown under GR (lanes 1 and 3) or HG (lanes 2 and 4) conditions for 60 min at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere. (D) WB assays of proteinase-resistant extracts (PRE, 35 µg per lane) from parasites grown under GR (lane 1) or HG (lane 2), transferred onto NC membrane and incubated with different primary antibodies against recombinant proteinases of *T. vaginalis* (TvCP2, TvCP3, TvCP4, TvCP12, TvCP39, TvLEGU-1 and Tv-CatD). An anti-trichocystatin 2 (TC-2r) antibody recognizes a 10-kDa band of an endogenous inhibitor of CPs, TC-2. An anti-enolase (TvENOR) antibody that recognizes a 48-kDa band was used as a control protein (TvENO) not affected by glucose. An anti-triosephosphate isomerase (TvTIMr) antibody that recognizes a 27-kDa band was used as a control protein (TvTIM) for a positive glucose modulation. (E) Densitometric analysis of the bands detected by WB (D) using the Quantity One software (Bio-Rad). The bar graphs show the relative amounts of TvTIM, TvCP2, TvCP3, TvCP4, TvCP12, TvCP39, TvLEGU-1, Tv-CatD and TC-2 proteins normalized to the level of the TvENO protein. For B and E, the error bars indicate the standard deviation (SD) of three and two independent experiments, respectively. The asterisk (*) shows significant differences ($P < 0.05$) as determined by ANOVA. Arrowheads show the proteolytic activity bands in the zymogram (C) and the molecular weight of protein bands detected by WB in kDa (D).

band, than under HG condition. Zymograms from PRE (Fig. 1C, lanes 1 and 2) under both glucose conditions (GR and HG) were used as controls of the effect of glucose on the total trichomonad proteolytic activity. These results showed that certain CPs are released by *T. vaginalis* during HeLa–Tv interaction mainly under GR conditions.

To determine the effect of glucose on the amount of proteins related to trichomonad virulence, particularly with cellular

damage, PRE from parasites grown under both (GR and HG) glucose conditions were analysed by WB assays using different anti-proteinases antibodies (Fig. 1D). Our results showed an increase in the amount of proteinases TvCP2, TvCP3, TvCP4, TvCP12, TvCP39, TvLEGU-1 and the endogenous inhibitor of CPs, trichocystatin-2 (TC-2), under GR condition (Fig. 1D, lane 1) compared to the reduced amount of Tv-CatD and TvTIM under the same GR condition, because these are two glucose

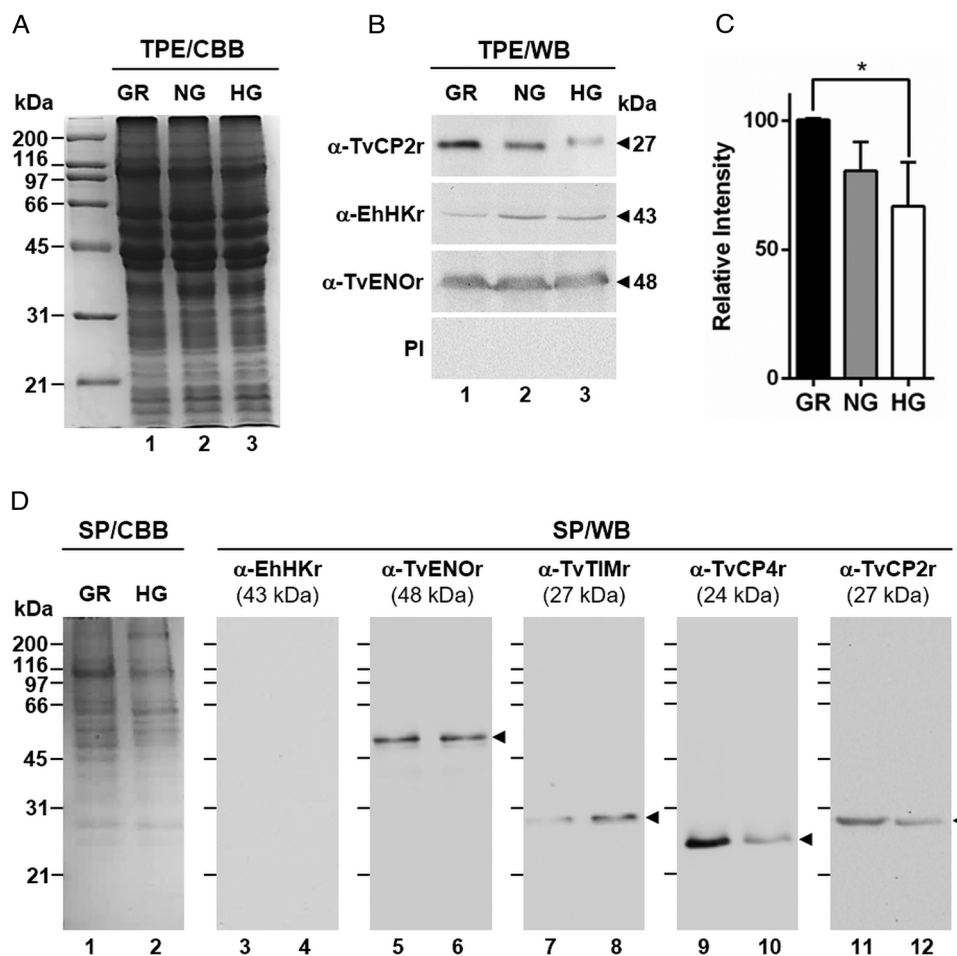


Fig. 2. Glucose-restricted (GR) condition up-regulates the amount and *in vitro* secretion of TvCP2 by *Trichomonas vaginalis*. (A) SDS-PAGE and Coomassie brilliant blue (CBB) staining of 12% polyacrylamide gels were performed to assess the total protein extracts (TPE) from parasites grown under GR (lane 1), NG (lane 2) and HG (lane 3) conditions. (B) For WB assays, duplicated gels from the panel (A) transferred onto NC membranes were incubated with different primary antibodies, including an anti-TvCP2r antibody (α -TvCP2r; 1:2000 dilution) that recognized a 27-kDa band corresponding to the native TvCP2 protein. An anti-hexokinase antibody (α -EhHKr; 1:1000 dilution) that recognized a 43-kDa band was used as a control protein (TvHK) for glucose-induced modulation. An anti-enolase (α -TvENOr) antibody that recognized a 48-kDa band was used as a control protein (TvENO) not affected by glucose. A preimmune rabbit serum (PI) (1:1000 dilution) was used as a negative control. (C) Densitometric analysis of the bands detected by WB (B) using the Quantity One software (Bio-Rad). The bar graphs show the relative amount of TvCP2 protein, under the three glucose conditions (GR, NG and HG), normalized to the level of the TvENO protein, which was used as a loading control. The error bars indicate standard deviations (SDs) of three independent experiments. The asterisk (*) show significant differences ($P < 0.05$), as determined by ANOVA. (D) SDS-PAGE and CBB staining of 12% polyacrylamide gels of proteins present in secretion products (SP) of *T. vaginalis*, obtained in GR (lane 1) and HG (lane 2), concentrated with 10% TCA precipitation and transferred onto NC membranes for WB assays. The α -EhHKr antibody (1:1000 dilution) was used as a control of a protein (TvHK) that is not secreted under both glucose conditions (GR and HG) (lanes 3 and 4). The α -TvENOr antibody was used as a control of a secreted protein (TvENO) that is not affected by glucose condition (lanes 5 and 6). The α -TvTIMr antibody was used as a control of a secreted protein (TvTIM) induced by glucose (lanes 7 and 8). The α -TvCP4r antibody was used as a control of a secreted protein (TvCP4) downregulated by glucose (lanes 9 and 10). The α -TvCP2r antibody was used to follow the secretion of TvCP2. Arrowheads show the expected protein bands detected by WB.

upregulated proteins, used as positive controls of the HG effect (Fig. 1D, lane 2). These differences corroborated by densitometric analysis (Fig. 1E) of the bands detected by WB normalized against the TvENO band, used as a loading control, were significant ($P < 0.05$) for all the proteins studied.

GR induces expression and secretion of TvCP2 in *T. vaginalis*.

The cysteine proteinase TvCP2 was previously identified as part of a 30 kDa band (CP30) with proteolytic activity found in *in vitro* SP of *T. vaginalis* composed of four CPs (CP2, CP3, CP4 and CPT), negatively regulated by iron and involved in cytotoxicity and apoptosis induction to vaginal epithelial cells (Sommer et al., 2005; Kummer et al., 2008). In addition, we recently reported that TvCP2 is one of the trichocystatin-3 (TC-3; an endogenous CP inhibitor) targeted CPs (Sánchez-Rodríguez et al., 2018). Together, these data suggest that TvCP2 could be involved in cytotoxicity. However, TvCP2 has not been characterized yet as an individual CP. Thus, we followed TvCP2 in further

experiments to investigate the effect of glucose in this particular CP and its possible role in cytotoxicity.

By WB using PRE from parasites grown under GR and HG conditions and an anti-TvCP2r antibody, we found that the amount of TvCP2 is reduced by glucose (Fig. 1D). To confirm the glucose negative effect, TPE from parasite grown under GR (≤ 1 mM), NG (25 mM) and HG (50 mM) conditions were analysed by SDS-PAGE (Fig. 2A) and WB assays using an anti-TvCP2r antibody (Fig. 2B). Our results show the highest amount of the 27-kDa TvCP2 band in parasite proteins from GR condition (Fig. 2B, lane 1) compared with those from NG and HG conditions (Fig. 2B, lanes 2 and 3). These differences corroborated by densitometric analysis of the WB TvCP2 bands normalized against the TvENO band (Fig. 2C) were significant ($P < 0.05$). WB with an anti-EhHKr antibody, using the same TPE extracts, was performed as a control of a protein positively regulated by glucose, showing an opposite effect to TvCP2 (Fig. 2B). PI rabbit serum was used as a negative control for WB (Fig. 2B). Thus, these data show that the amount of TvCP2 is reduced by glucose.

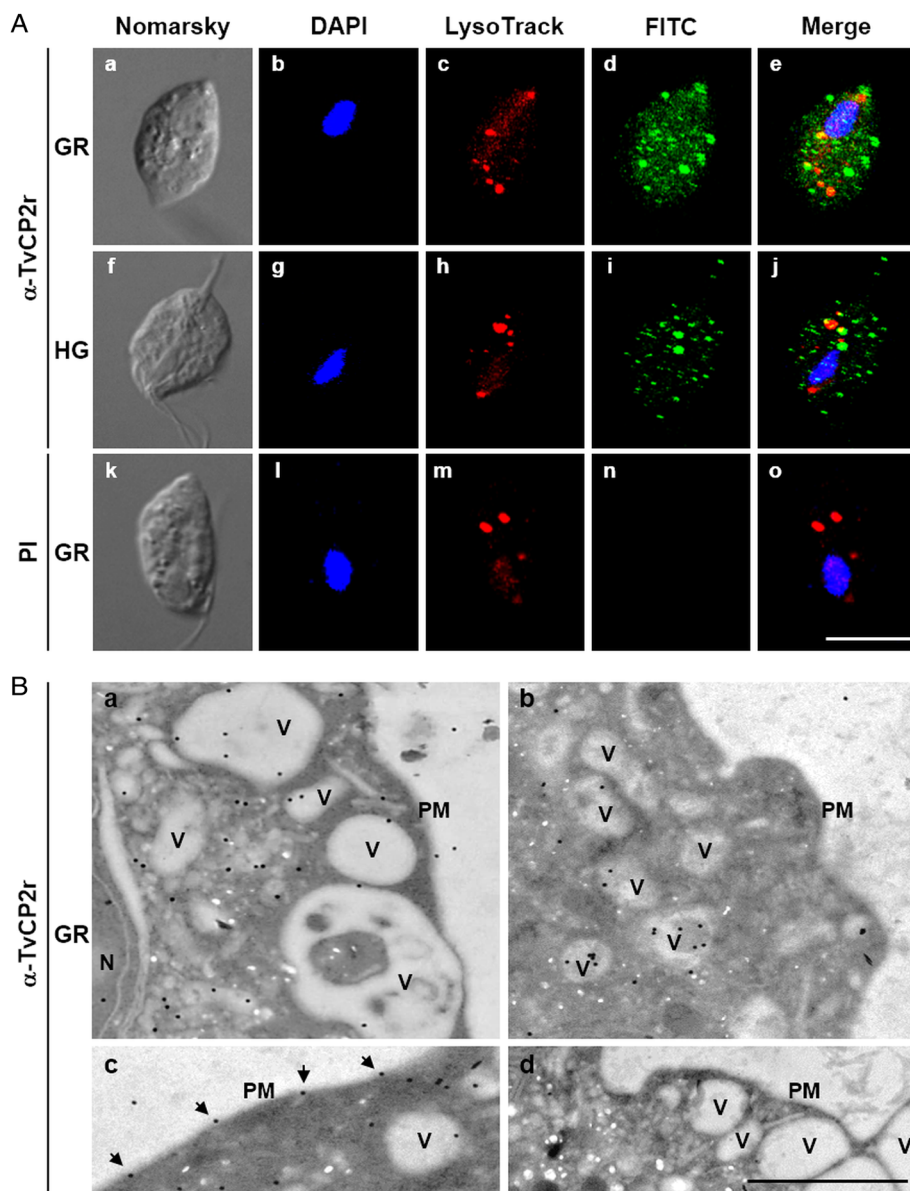


Fig. 3. The TvCP2 proteinase is localized in cytoplasmic vesicles and on the surface of *Trichomonas vaginalis*. (A) Nomarsky microscopy and indirect immunofluorescence to detect the cytoplasmic, lysosomal and vesicle localization of TvCP2 in permeabilized parasites grown under GR (a–e) and HG (f–j) conditions. Before fixation, live parasites were incubated for 30 min at 37 °C with LysoTracker red to stain lysosomes. Parasites were then fixed, blocked and incubated with a primary anti-TvCP2r antibody (1:100 dilution) followed by a FITC-conjugated secondary antibody (1:100 dilution). As a negative control, permeabilized parasites grown under GR condition incubated with preimmune (PI) rabbit serum (1:100 dilution) followed by a FITC-conjugated secondary antibody (1:100 dilution) were used. The confocal microscopy (Zeiss) images show nuclei labelled with DAPI (in blue), lysosomes (acid vesicles) stained with LysoTracker (in red) and TvCP2 labelled with FITC (in green). The merged images show the low levels of co-localization between TvCP2 and parasite lysosomes (in yellow). Bar size: 10 μ m. These experiments were performed two independent times, with similar results. (B) Possible vesicle trafficking routes to the plasma membrane of TvCP2. TEM analysis of immunogold labelling of ultrathin sections of parasites grown under GR (panels a, c and d) and HG (panel b) conditions using a primary α -TvCP2r antibody at 1:30 dilution and a secondary antibody conjugated to 15 nm gold particles. The TEM images show parasites in GR conditions directly incubated with a secondary antibody conjugated to gold particles as a negative control (panel d). In general, TvCP2 gold labelling free in the cytoplasm, in cytoplasmic vesicles (V), vesicles close to the plasma membrane (PM) and on the parasite surface (arrows). N, nucleus. Bar: 1 μ m.

To determine whether glucose affects the secretion of TvCP2, we performed an *in vitro* secretion and WB assays (60 min at 37 °C) using parasites grown under GR and HG glucose conditions and an anti-TvCP2r antibody. Parasites showed 95–97% viability at the end of the secretion assay. Figure 2D shows that TvCP2 is secreted under both glucose conditions (Fig. 2D, lanes 11 and 12). The TvCP2 band was more intense in the SP of parasites in the GR (Fig. 2D, lane 11) than in the HG conditions; whereas the control TvENO band showed similar intensity in both glucose condition, suggesting that secretion of TvENO is not affected by glucose levels (Fig. 2D, lanes 5 and 6). In contrast, the TvTIM band showed greater intensity in the HG (Fig. 2D, lanes 8) than in the GR conditions; whereas the TvCP4 band showed greater intensity in the GR (Fig. 2D, lane 9) than in the HG conditions. Both proteins were used as positive controls of secreted proteins under both glucose conditions. As a negative control of secretion, the TvHK was not detected by the specific antibody, as expected (Fig. 2D, lanes 3 and 4). The CBB-stained control gel showed the protein profile of SP of parasites in the GR and HG conditions (Fig. 2D, lanes 1 and 2). The presence of TvCP2 in the *in vitro* secretion products detected by the anti-TvCP2r antibody (Fig. 2D) was confirmed by MS analysis. Five peptides with identical masses to TvCP2 (TVAG_057000)

were identified by MALDI-TOF/TOF MS analysis that represents 22% TvCP2 sequence coverage (Supplementary Fig. S1). Thus, these data show that TvCP2 is part of the released products of live trichomonads promoted by glucose restriction condition.

TvCP2 is localized in the cytoplasm, vesicles and on the surface of *T. vaginalis*

To assess the cellular localization of TvCP2 in trichomonads grown under different glucose conditions, we performed IFA on formaldehyde-fixed and permeabilized parasites using an anti-TvCP2r antibody. By confocal microscopy, higher fluorescence signal (in green) on cytoplasm (free and in vesicles) and close to the surface of parasites grown under GR (Fig. 3A, panels a–e) than under HG conditions (Fig. 3A, panels f–j) was observed, which was further confirmed by immunogold localization TEM images (Fig. 3B). As a negative control, in parasites incubated with PI serum (Fig. 3A, panels k–o) no green fluorescent was observed, as expected.

To explore whether TvCP2 may have a typical lysosomal localization, similar to other cathepsin-L CPs, we performed co-localization assays using the anti-TvCP2r antibody and LysoTracker-red DND-99 as a lysosomal marker. Figure 3A shows (in the merged

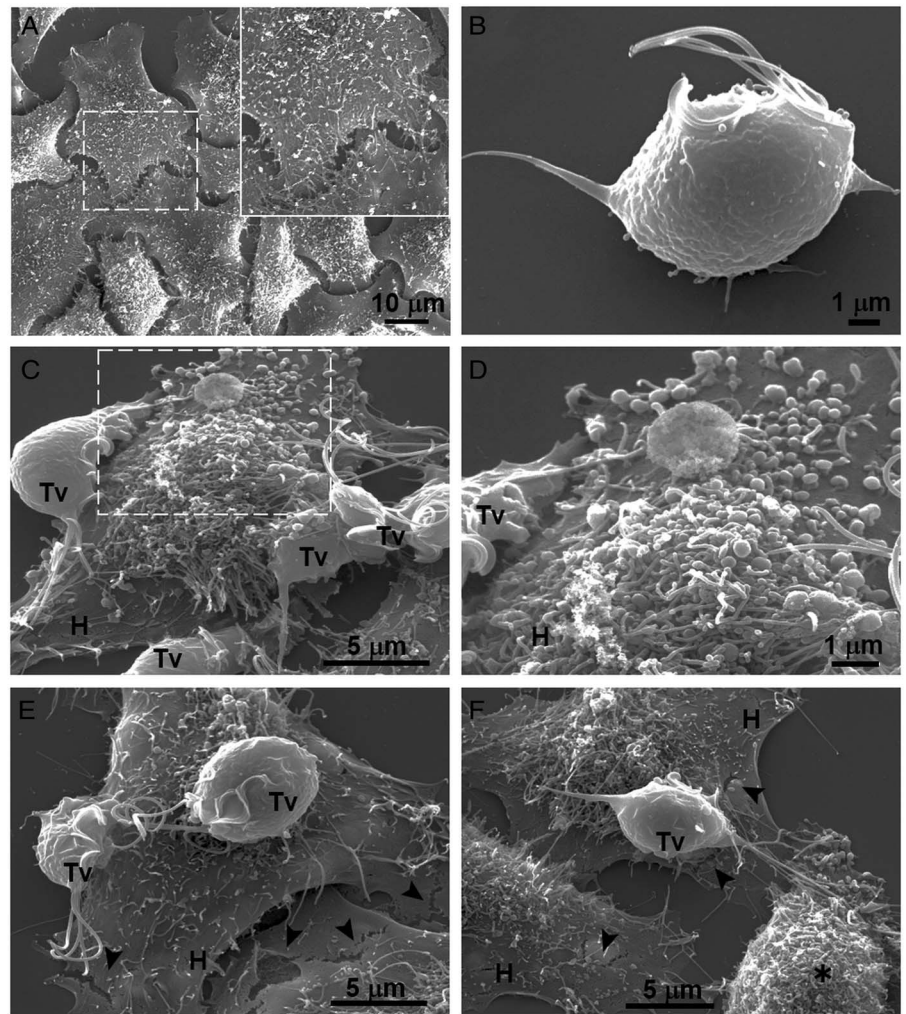


Fig. 4. SEM observation of a HeLa cells monolayer interaction with *Trichomonas vaginalis* grown in GR condition. (A) Control HeLa cells monolayer with a zoom of their surface (white frame). (B) Control *T. vaginalis* (Tv), keeps an ovoid shape with free flagella. (C) Interaction of HeLa cells (H) monolayer and *T. vaginalis*, the blebbing cells and stress fibres are observed during the interaction. (D) Higher magnification of the blebbing cell during the interaction (framed area in C). (E) Disruption on the HeLa cell surface during the interaction (black arrowhead). (F) A parasite over a HeLa cell (H) while flagella interact with another HeLa cell that is rounded (asterisk), disruption on HeLa cell surface (arrowheads).

images) very low levels of TvCP2/lysosomal co-localization in parasites under both glucose conditions (Fig. 3A, panels e and j; in yellow) with a Pearson's correlation coefficient of 0.43 for GR and 0.27 for HG conditions. These data suggest that TvCP2 is not a lysosomal CP. Thus, the TvCP2-positive vesicles (in green) could correspond to secretory vesicles (Fig. 3A), mainly under GR conditions.

TEM and immunogold localization assays of parasites grown under both glucose conditions confirmed the subcellular localization of TvCP2. Parasites under GR condition showed localization in the cytoplasm (62%), inside vesicles with different sizes (30%), or on the plasma membrane (6%) (Fig. 3B, panels a and c). Similarly, in trichomonads under HG condition, TvCP2 showed cytoplasmic localization (33%), inside vesicles (54%), or on the plasma membrane (4%) (Fig. 3B, panel b). Interestingly, in parasites under GR condition, TvCP2 was also localized in electron-lucent vesicles close to the plasma membrane (Fig. 3B, panel a) that could correspond to putative secretory vesicles. Moreover, the detection of the gold label on the parasite membrane confirms the surface localization of TvCP2 mainly under GR condition (Fig. 3B, panel c, black arrowheads). The secondary antibody used as a negative control did not show any gold labelling, as expected (Fig. 3B, panel d).

TvCP2 plays a key role in the trichomonal cytotoxicity through apoptosis induction in HeLa cells.

Our results showed that GR increases the cytotoxicity levels of *T. vaginalis* to HeLa cell monolayers (Fig. 1). In addition, GR increases the amount and promotes surface localization and

secretion of TvCP2 (Figs 2 and 3), suggesting a possible role of TvCP2 in the trichomonal cytotoxicity modulated by glucose starvation. To explore this hypothesis, we assessed the protective effect of an anti-TvCP2r antibody against trichomonal cytotoxicity. We first check by SEM the type of cellular damage inflicted by *T. vaginalis* grown under GR conditions to HeLa cell monolayers during the parasite:host interaction (Fig. 4). Figure 4A shows the morphology of control HeLa cells monolayer and the integrity of the HeLa cells surface with microvilli (zoomed image). The morphology of a control parasite grown in the GR condition is also shown (Fig. 4B). Figure 4C–F show the HeLa cells drastic morphological changes due to the interaction with *T. vaginalis*. Parasites firmly adhered to cells conserved the ovoid shape (Tv), whereas the cells in contact with parasites presented blebs and long stress fibres, both markers of cell stress and apoptosis induction (Fig. 4C and D). Besides, HeLa cells with or without direct contact with parasites also presented rupture of the cell membrane (Fig. 4E and F, black arrowhead). Rounded HeLa cells in contact with parasite flagella were also observed as another type of damage inflicted by trichomonads (Fig. 4F, asterisk). These results show that the interaction between HeLa cells and GR-parasites induced severe cellular damage that could be related to apoptosis induction.

Thus, to evaluate the participation of TvCP2 in this type of cellular damage, live parasites grown under GR condition were pre-incubated with increased concentrations of the anti-TvCP2r IgGs ($0\text{--}200\ \mu\text{g mL}^{-1}$) before interaction with HeLa cell monolayers expecting some degree of protection. Figure 5A shows up to ~60% reduction in trichomonal cytotoxicity using 100 and

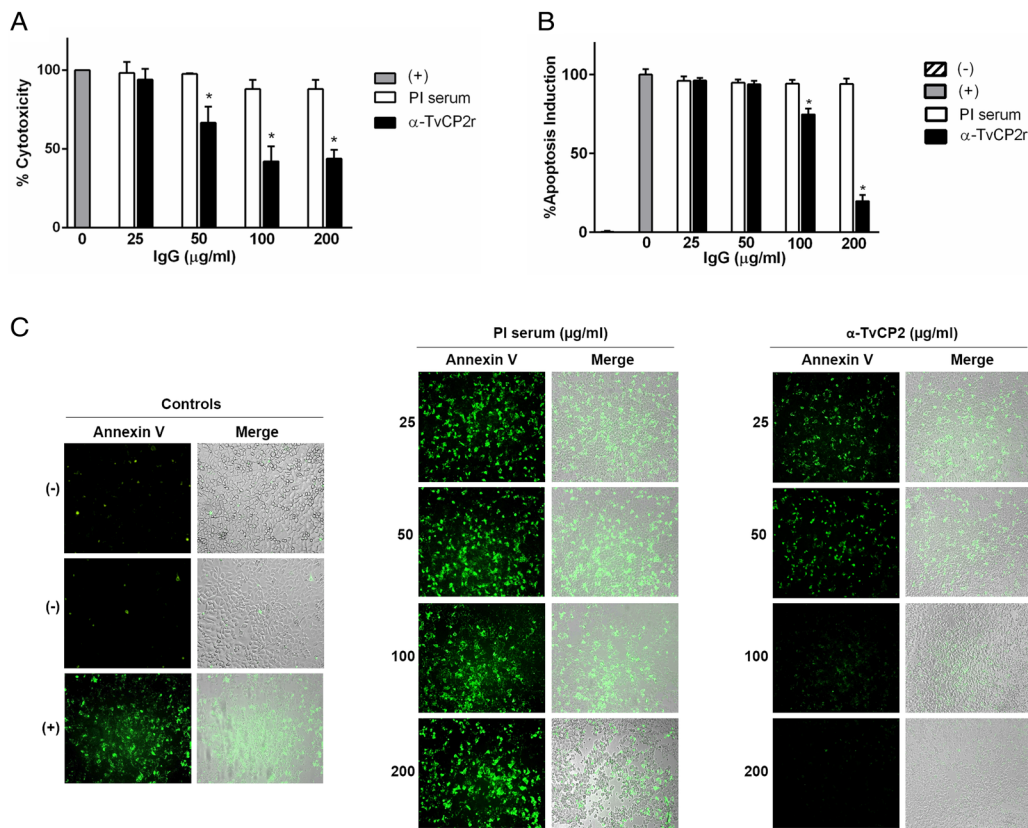


Fig. 5. TvCP2 participates in the cellular damage towards HeLa cells due to apoptosis induction. (A) Cytotoxicity inhibition assay performed with 2×10^5 live parasites grown under GR condition and preincubated with increasing concentrations (0 – $200 \mu\text{g mL}^{-1}$) of anti-TvCP2r or PI serum purified IgGs followed by incubation with HeLa cell monolayers (4×10^4 cells well $^{-1}$) at 5:1 ratio. HeLa cell monolayers without parasites were used as a negative control. HeLa cell monolayers with parasites grown under GR without antibody treatment were used as a positive control (+) and considered as 100% cytotoxicity levels. (B) Apoptosis inhibition assay was performed similarly to the cytotoxicity inhibition assay. After incubation with live parasites, cell monolayers were incubated with FITC-conjugated Annexin V. Annexin V fluorescence signal (in green) was quantified using a SpectraMax Gemini EM spectrofluorometer. Each point in the bar is the mean of the percentage of cell monolayer destruction or apoptosis induction of representative experiments with triplicate samples. The error bars indicate standard deviations (SDs) of three independent experiments. The Annexin V fluorescence signal of HeLa cell monolayers without parasites but incubated in the interaction media (DMEM:TY) (mock) were used as a negative control (-). HeLa cell monolayers incubated with parasites grown under GR without antibody treatment were used as a positive control (+) and considered as 100% apoptosis induction. The asterisk (*) shows significant differences ($P < 0.05$), as determined by ANOVA. (C) Annexin-V fluorescence signal was also observed by epifluorescence microscopy (Nikon). In addition to the other assay controls described in (B), HeLa cell monolayers before the host-parasite interaction were used as an extra negative control (-). The green label indicates apoptotic cells accompanied by cellular damage.

$200 \mu\text{g mL}^{-1}$ anti-TvCP2r IgGs compared with the same concentrations of PI serum IgGs used as a negative control, which showed great monolayer destruction (Fig. 5A).

We further hypothesized that cellular damage that leads to cell death of HeLa cell monolayers by live trichomonads is due to apoptosis induction, and TvCP2 is one of the molecules participating in this process. To test this hypothesis, we performed an apoptosis inhibition assay by the Annexin V-FITC method in the presence of increasing concentrations of purified anti-TvCP2r or PI serum IgGs. Figure 5B and C show the apoptosis induction to HeLa cell monolayers by parasites grown under GR condition as a strong Annexin V green label and wide destruction of HeLa cell monolayers, which was taken as 100% apoptosis induction. The damage of HeLa cell monolayer and Annexin V label was reduced in a concentration-dependent manner up to ~80% by the anti-TvCP2r IgGs, but not by the PI serum IgGs used as a negative control (Fig. 5B and C). These differences were significant (Fig. 5B).

We further analysed the HeLa cells damage caused by *T. vaginalis* through the DNA degradation assays by agarose gel electrophoresis. Figure 6A shows high molecular size bands indicative of the integrity of HeLa cells and trichomonads genomic DNA before the host-parasite interaction used as controls. As a positive control of DNA degradation for both type of cells, we induced apoptosis by treatment with 5% H_2O_2 for 30 and 60 min at 37 °C

(Singh *et al.*, 2007) and observed the fragmentation/degradation of both genomic DNAs. As expected, in HeLa cells after H_2O_2 treatment a DNA laddering with multiple bands was observed; whereas in trichomonads, the H_2O_2 treatment induced DNA degradation observed as a smear (Fig. 6A, lanes 5–6). Analysis of the genomic DNA after the parasite–host cell interaction showed a massive degradation and the absence of the high molecular size DNA band (Fig. 6B, lane 3) compared with the control DNA bands (Fig. 6B, lanes 1–2). However, a certain degree of protection of the genomic DNA band was observed after the interaction of anti-TvCP2r IgG-pretreated parasites with HeLa cell monolayers (Fig. 6B, lane 4) compared with the interactions with PI serum IgGs-pretreated parasites (Fig. 6B, lane 5) used as a control.

These data confirmed the participation of TvCP2 in the trichomonal cytotoxicity due to apoptosis induction to HeLa cell monolayers, as previously suggested (Sommer *et al.*, 2005; Kummer *et al.*, 2008).

Discussion

Glucose is the primary carbon and energy source for *T. vaginalis*. We recently reported that *T. vaginalis* is exposed to different glucose levels (0.3 – 36.65 mM) during vaginal infection of women with trichomoniasis (Miranda-Ozuna *et al.*, 2016). Compared to the lowest value of glucose detected in vaginal secretion

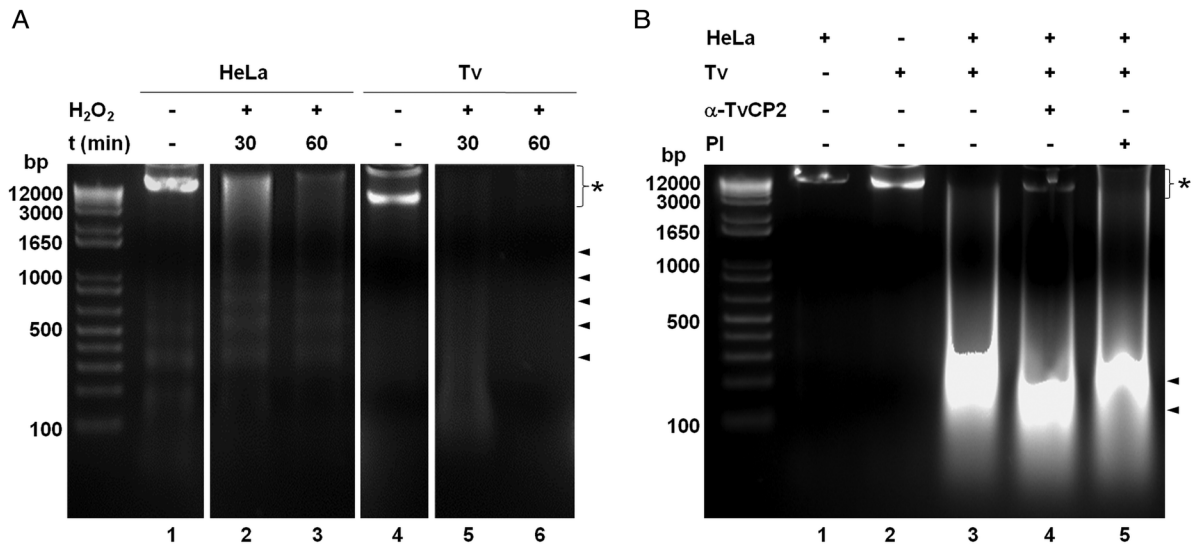


Fig. 6. *Trichomonas vaginalis* induces DNA damage to HeLa cells. (A) DNA degradation assay performed to assess the DNA damage due to *T. vaginalis* interaction. (A) Lane 1, HeLa cells genomic DNA. Lanes 2 and 3, positive controls of HeLa cell DNA damage induced by 5% H₂O₂ treatment for 30 and 60 min, respectively. Lane 4, *T. vaginalis* genomic DNA. Lanes 5 and 6, positive control of trichomonad DNA damage induced by 5% H₂O₂ treatment for 30 and 60 min, respectively. Arrowheads point to the DNA bands. Asterisk shows the large size genomic DNA band. (B) Inhibition of DNA degradation assay performed with live parasites (4×10^6) grown under GR condition and pre-incubated with 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of anti-TvCP2r or PI serum purified IgGs followed by incubation with HeLa cell monolayers (1×10^6 cells well⁻¹) for 30 min (lanes 4 and 5). Genomic DNA from HeLa cell monolayers without parasites and from parasites grown under GR condition were used as controls of intact DNA (lanes 1 and 2, respectively). Genomic DNA obtained from the interaction of HeLa cell monolayers with parasites grown under GR without antibody treatment was used as a positive control of DNA degradation (lane 3). DNA was analysed by electrophoresis in 2% agarose gels. Asterisk shows the presence of large size genomic DNA.

(0.3 mM) of patients with trichomoniasis, ≤ 1 mM glucose, used in *in vitro* assays as the GR condition, it is representative of the lowest glucose concentration detected during trichomonal infection.

In vitro studies showed that under metabolic stress by GR, *T. vaginalis* activates several adaptive mechanisms, such as metabolic reprogramming, enhancing antioxidant ability and autophagy as a cell survival strategy (Huang *et al.*, 2014, 2017). In this work, we focused on studying the effect of GR on the *T. vaginalis* cytotoxicity, as another cell survival strategy for the acquisition of glucose and nutrients from the host cell.

Here, we report that glucose negatively regulates trichomonal cytotoxicity. Particularly, we observe almost total destruction of HeLa cell monolayers by *T. vaginalis* under GR conditions, in a contact-dependent manner, suggesting that *T. vaginalis* activates its cytotoxicity mechanism in response to nutritional stress by glucose. A similar cytotoxic effect induced by GR conditions has been reported in other parasites as *Entamoeba histolytica*, supporting that glucose has an important role in parasites virulence modulation (Tovy *et al.*, 2011).

In addition to cell contact, the cytotoxicity of *T. vaginalis* also involves secreted molecules to the extracellular medium, such as porins, phospholipases and proteinases that contribute to cellular damage (Fiori *et al.*, 1993; Lubick and Burgess, 2004). Thus, in this work, we explored the effect of glucose on the activity of proteinases released during the interaction of *T. vaginalis* with HeLa cell monolayers. Zymograms show the presence of at least 4 bands with proteolytic activity in both glucose conditions (GR and HG) released during host–parasite interaction and cellular destruction. Interestingly, the highest proteolytic activity was observed in a 66-kDa band under GR conditions, suggesting that certain proteolytic activity could be linked with the high cytotoxicity levels of *T. vaginalis* under GR conditions. The CP-dependent cytotoxicity has been related to a 65-kDa (TvCP65) (Alvarez-Sánchez *et al.*, 2000) and a 39-kDa (TvCP39) (Hernández-Gutiérrez *et al.*, 2003, 2004; Ramón-Luing *et al.*, 2011) proteolytic activities modulated by environmental factors such as iron, zinc, polyamines and other unknown factors that participate in *T. vaginalis*

virulence (Figuroa-Angulo *et al.*, 2012), such as glucose as described in here.

Trichomonas vaginalis exhibits high levels of proteolytic activity, mediated mainly by CPs (Hernandez *et al.*, 2014; Arroyo *et al.*, 2015). Some CPs are differentially modulated by iron and play diverse biological roles in trichomonal pathogenesis. In this study, we found that glucose negatively regulates the expression of six CPs: TvCP2, TvCP3, TvCP4, TvCP12, TvCP39 and TvLEGU-1 at the protein level. Interestingly, some of these CPs have been localized on the cell surface of or secreted by *T. vaginalis*, participating in different steps of the host cellular damage, such as cytoadherence (TvLEGU-1) (Rendón-Gandarilla *et al.*, 2013), haemolysis (TvCP4) (Cárdenas-Guerra *et al.*, 2013), cytotoxicity (TvCP12 and TvCP39) (Hernández-Gutiérrez *et al.*, 2003, 2004) and apoptosis (the secreted CP30 complex: CP2, CP3, CP4 and CPT) (Kummer *et al.*, 2008; Sommer *et al.*, 2005). Our results suggest that some of the CPs negatively modulated by glucose could be responsible for the high cytotoxicity levels of *T. vaginalis* under GR conditions.

We also found that glucose also reduced the amount of one of the endogenous cystatin-like CP inhibitors, TC-2, previously identified in the active degradome of *T. vaginalis* to be associated with TvCP39 (Ramón-Luing *et al.*, 2011; Puente-Rivera *et al.*, 2014). Their principal function is cellular protection from an exacerbated proteolytic activity, suggesting that overexpression of TC-2 under GR condition could be related with the increase in the CPs amount, proteolytic activity and cytotoxic effect of *T. vaginalis* toward host cells. In addition to its association with TvCP39, it is possible that the TC-2 inhibitor binds to other CPs as a regulatory mechanism of the endogenous trichomonad CP proteolytic activity under GR conditions.

An opposite effect to the CPs expression was observed for the trichomonad aspartic proteinase Tv-CatD. We found that glucose positively regulates the expression of Tv-CatD at the protein level. The Tv-CatD was recently reported as a proteinase that degrades human haemoglobin (Mancilla-Olea *et al.*, 2018). *In vivo*, the erythrocytes are an important source of glucose and haemoglobin for

T. vaginalis. We hypothesize that glucose and haemoglobin levels are increased during menstrual flux, positively affecting the expression of Tv-CatD that could be involved in haemolysis.

In vitro studies show that *T. vaginalis* causes cell detachment followed by cellular destruction as a result of apoptosis induced by secreted CPs of the 30 kDa region (CP2, CP3, CP4 and CPT). Here, we reported that the amount of TvCP2, TvCP3 and TvCP4 increased under GR, a stress condition that promotes the destruction and death of the host cells in up to 30–60 min interaction. Thus, we selected to follow TvCP2 as one of the molecules responsive to glucose, to confirm the cytotoxicity and apoptosis induction under GR condition. First, we used TPE from parasites grown under different glucose condition (GR, NG and HG) to confirm that the amount of TvCP2 and its secretion increased by GR conditions. The negative effect of glucose in cellular damage described in here is similar to the negative influence of iron in cytotoxicity and apoptosis induction (Sommer *et al.*, 2005; Kummer *et al.*, 2008).

The highest proteolytic activity of *T. vaginalis* is in acid lysosomes. Therefore, it is expected that cathepsin L-like CPs are localized in this cellular compartment. We investigate the effect of glucose on the lysosomal localization of TvCP2. Our results show that TvCP2 does not have lysosomes as the main localization in trichomonads as other cathepsin-L CPs do. TvCP2 main localization was in different size vesicles close to the plasma membrane, suggesting that TvCP2 was in secretory vesicles. The vesicles localization of TvCP2 was confirmed by TEM microscopy that shows the highest gold particle labelled in parasites grown under GR compared to those under HG conditions. The localization of TvCP2 in secretory vesicles is supported by the *in vitro* secretion results and consistent with the presence of TvCP2 as part of the CP30 *in vitro* secreted proteolytic activity (Sommer *et al.*, 2005).

The parasite–HeLa cell interaction analysed by SEM showed that the apoptosis induction in HeLa cell by parasites in the GR condition is due to the detachment and rounding of HeLa cells and the presence of blebbing cells, a characteristic during the execution phase of apoptosis (Mills *et al.*, 1999; Charras, 2007). Moreover, we observed the presence of stress fibres and rupture of the cell membrane due to the mechanical stress and cytotoxic effect induced in a short period (30 min) compared with the effect induced by fresh Tv isolates (Midlej and Benchimol, 2010).

The results of cytotoxicity and apoptosis inhibition, using the anti-TvCP2r antibody, confirm that TvCP2 is used by trichomonads to induce cellular destruction, damage to DNA and cell death of the HeLa cell monolayers under GR condition. Our results show a 60 and 80% of cytotoxicity and apoptosis inhibition, respectively, and certain protection of the HeLa cells genomic DNA degradation by the anti-TvCP2r antibody, showing the participation of other trichomonad molecules that contribute to cellular damage, a multifactorial virulence mechanism. Further studies will be necessary to identify and characterize the mechanism of apoptosis induction by TvCP2.

Analysing the events that occur in the apoptosis cascade, we can note that the apoptosis process has 4 stages: (1) Induction, (2) Early stage, (3) Mid-stage, (4) Late stage. The induction stage is divided into 2 pathways such as the intrinsic pathway, mediated by mitochondria in response to internal stimuli such as DNA or plasma membrane damage and the extrinsic pathway, mediated by extracellular death receptors, for example, FasL to CD95 (Elmore, 2007). Our results suggest the activation of the apoptosis pathway during the trichomonads–HeLa cells interaction because we observed HeLa cell plasma membrane asymmetry (Annexin-V fluorescence signal) and DNA damage, and some inhibition of these processes when the parasites were preincubated with the anti-TvCP2r IgGs before the interaction with HeLa cells.


However, we could not analyse the deeper apoptosis pathway such as caspase-3 activation because our assay conditions do not allow analysis of longer interaction times as previously reported (Sommer *et al.*, 2005; Kummer *et al.*, 2008) due to the high cytotoxicity levels and proteolytic activity of the fresh trichomonad isolate used in this study, properties that were greatly enhanced by glucose restriction studied in here (Miranda-Ozuna *et al.*, 2016). These particular conditions drove the HeLa cells to rapid cell detachment, lost of the monolayer, cell rounding and blebbing and massive cellular destruction in less than 1 h that appears to be not enough time to detect caspase-3 activation as previously shown for SiHa cells after 4 h (Quan *et al.*, 2017). More experiments will be needed to elucidate the apoptosis process during the interaction between trichomonads and HeLa cells mediated by glucose. Nevertheless, the participation of other trichomonad molecules during the apoptosis cannot be discarded.

Same as glucose, iron also plays an important role in trichomonad cytotoxicity and apoptosis induction (Alvarez-Sánchez *et al.*, 2007; Kummer *et al.*, 2008). The parasite responds to iron fluctuations by changing the gene expression of CPs. For example, *tvcp4* and *tvcp12* mRNAs are upregulated and downregulated by iron, respectively, by a posttranscriptional regulatory mechanism mediated by RNA–protein interactions described for both mRNAs (Solano-Gonzalez *et al.*, 2007; Torres-Romero and Arroyo, 2009; Arroyo *et al.*, 2015; Figueroa-Angulo *et al.*, 2015). Based on that, we could hypothesize that a similar mechanism mediated by RNA–protein interactions could also participate in the glucose-related gene expression regulation of trichomonad CPs. However, an unknown mechanism cannot be discarded.

It is also clear from recent data (Huang *et al.*, 2014; Miranda-Ozuna *et al.*, 2016; Mancilla-Olea *et al.*, 2018; Stáfkova *et al.*, 2018) that glucose gene expression regulation is just starting to be unveiled as an attractive new field of research in *T. vaginalis*. No doubt that the new findings will shed some light in understanding the complex biology that *T. vaginalis* uses for survival during infection in the highly changing vaginal environment throughout the menstrual cycle.

In summary, our findings demonstrated that GR is another nutritional stress condition that promotes trichomonad cytotoxicity to the host cells, by increasing the amount and proteolytic activity of CPs such as TvCP2, which plays an important role in the apoptosis induction during cellular damage.

Supplementary materials. The supplementary material for this article can be found at <https://doi.org/10.1017/S0031182019000209>.

Author ORCIDs.  Rossana Arroyo, 0000-0002-8193-9700.

Acknowledgments. We would like to thank Carlos Vázquez-Calzada for his help with the confocal microscopy analysis at the Confocal microscopy facility of the DIPM-CINVESTAV-IPN. We also thank QFB Leticia Avila-González for her technical assistance in maintaining parasite cultures, Lizbeth I. Salazar-Villatoro and Anel Lagunes-Guillen for their help with the TEM and SEM sample processing, respectively, and Martha G. Aguilar-Romero for her secretarial assistance. We would also thank Alicia Chagolla for her support with the LC-MS/MS identification in the Proteomics facility at CINVESTAV-Irapuato, Mexico and Daniel Ortega-Arroyo for manuscript editing.

Financial support. This work was partially supported by CINVESTAV-IPN and by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Mexico (RA, grant numbers 162123 and 153093), CONACYT Mexico LARR received a Ph.D. scholarship number 338864 from CONACYT, MSHG received a Ph.D. scholarship number 375264 from CONACYT and SRC received a Ph.D. scholarship number 780847 from CONACYT.

Conflict of interest. None.

Ethical standards. Not applicable.

References

- Abcam Protocols (2018) <https://docs.abcam.com/pdf/protocols/apoptosis-dna-fragmentation-analysis-protocol.pdf>
- Alvarez-Sánchez ME, Avila-González L, Becerril-García C, Fattel-Facenda LV, Ortega-López J and Arroyo R (2000) A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microbial Pathogenesis* **28**, 193–202.
- Alvarez-Sánchez ME, Solano-González E, Yañez-Gómez C and Arroyo R (2007) Negative iron regulation of the CP65 cysteine proteinase cytotoxicity in *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and Infection* **9**, 1597–1605.
- Arroyo R and Alderete JF (1989) *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infection and Immunity* **57**, 2991–2997.
- Arroyo R, Cárdenas-Guerra RE, Figueroa-Angulo EE, Puente-Rivera J, Zamudio-Prieto O and Ortega-López J (2015) *Trichomonas vaginalis* cysteine proteinases: iron response in gene expression and proteolytic activity. *Biomedical Research International* **2015**, 946787.
- Cárdenas-Guerra RE, Arroyo R, Rosa de Andrade I, Benchimol M and Ortega-López J (2013) The iron-induced cysteine proteinase TvCP4 plays a key role in *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Microbes and Infection* **15**, 958–968.
- Charras GT (2007) A short history of blebbing. *Journal of Microscopy* **23**, 466–478.
- Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* **35**, 495–516.
- Figueroa-Angulo EE, Rendón-Gandarilla FJ, Puente-Rivera J, Calla-Choque JS, Cárdenas-Guerra RE, Ortega-López J, Quintas-Granados LI, Alvarez-Sánchez ME and Arroyo R (2012) The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and Infection* **14**, 1411–1427.
- Figueroa-Angulo EE, Calla-Choque JS, Mancilla-Olea MI and Arroyo R (2015) RNA-binding proteins in *Trichomonas vaginalis*: atypical multifunctional proteins involved in a posttranscriptional iron regulatory mechanism. In: “RNA-binding proteins – structure, function, networks and disease”. *Biomolecules* **5**, 3354–3395.
- Fiori PL, Rappelli P, Rocchigiani AM and Cappuccinelli P (1993) *Trichomonas vaginalis* haemolysis: evidence of functional pores formation on red cell membranes. *FEMS Microbiology Letters* **109**, 13–18.
- Hernández HM, Marcet R and Sarracent J (2014) Biological roles of cysteine proteinases in the pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parasite* **21**, 54.
- Hernandez-Gutierrez R, Ortega-López J and Arroyo R (2003) A 39-kDa cysteine proteinase CP39 from *Trichomonas vaginalis*, which is negatively affected by iron may be involved in trichomonal cytotoxicity. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **50**, 696–698.
- Hernández-Gutiérrez R, Avila-González L, Ortega-López J, Cruz-Talonia F, Gómez-Gutiérrez G and Arroyo R (2004) *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Experimental Parasitology* **107**, 125–135.
- Huang KY, Chen YY, Fang YK, Cheng WH, Cheng CC, Chen YC, Wu TE, Ku FM, Chen SC, Lin R and Tang P (2014) Adaptive responses to glucose restriction enhance cell survival, antioxidant capability, and autophagy of the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Biochimie and Biophysical Acta* **1840**, 53–64.
- Huang KY, Ong SC, Wu CC, Hsu CW, Lin HC, Fang YK, Cheng WH, Huang PJ, Chiu CH and Tang P (2017) Metabolic reprogramming of hydrogenosomal amino acids in *Trichomonas vaginalis* under glucose restriction. *Journal of Microbiology and Immunology Infections*. pii: S1684-1182(17)30241-4. doi: DOI.ORG/10.1016/J.JMII.2017.10.005.
- Kummer S, Hayes GR, Gilbert RO, Beach DH, Lucas JJ and Singh BN (2008) Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron. *Microbial Pathogenesis* **44**, 197–203.
- Lubick KJ and Burgess DE (2004) Purification and analysis of a phospholipase A2-like lytic factor of *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity* **72**, 1284–1290.
- Mancilla-Olea MI, Ortega-López J, Figueroa-Angulo EE, Avila-González L, Cárdenas-Guerra RE, Miranda-Ozuna JFT, González-Robles A, Hernández-García MS, Sánchez-Ayala L and Arroyo R (2018) *Trichomonas vaginalis* cathepsin D-like aspartic proteinase (Tv-CatD) is positively regulated by glucose and degrades human hemoglobin. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **97**, 1–15.
- Midlej V and Benchimol M (2010) *Trichomonas vaginalis* kills and eats—evidence for phagocytic activity as a cytopathic effect. *Parasitology* **137**, 65–76.
- Mills JC, Stone NL and Pittman RN (1999) Extranuclear apoptosis. *The role of the cytoplasm in the execution phase*. *Journal of Cell Biology* **146**, 703–708.
- Miranda-Ozuna JFT, Hernández-García MS, Briebe LG, Benítez-Cardoza CG, Ortega-López J, González-Robles A and 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. *Infection and Immunity* **84**, 2878–2894.
- Petrin D, Delgaty K, Bhatt R and Garber G (1998) Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews* **11**, 300–317.
- Poole DN and McClelland RS (2013) Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. *Sexually Transmitted Infections* **89**, 418–422.
- Puente-Rivera J, Ramón-Luing LA, Figueroa-Angulo EE, Ortega-López J and Arroyo R (2014) Trichocystatin-2 (TC-2): an endogenous inhibitor of cysteine proteinases in *Trichomonas vaginalis* is associated with TvCP39. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **54**, 255–265.
- Quan JH, Kang BH, Yang JB, Rhee YE, Noh HT, Choi IW, Cha GH, Yuk JM and Lee YH (2017) *Trichomonas vaginalis* induces SiHa cell apoptosis by NF- κ B inactivation via reactive oxygen species. *Biomed Research International* **2017**, 3904870.
- Ramón-Luing LD, Rendón-Gandarilla FJ, Puente-Rivera J, Ávila-González L and Arroyo R (2011) Identification and characterization of the immunogenic cytotoxic TvCP39 proteinase gene of *Trichomonas vaginalis*. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **43**, 1500–1511.
- Rendón-Gandarilla FJ, Ramón-Luing LA, Ortega-López J, Rosa de Andrade I, Benchimol M and Arroyo R (2013) The TvLEGU-1, a legumain-like cysteine proteinase, plays a key role in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Biomedical Research International* **2013**, 561979.
- Sánchez-Rodríguez DB, Ortega-López J, Cárdenas-Guerra RE, Reséndiz-Cardiel G, Chávez-Munguía B, Lagunes-Guillen A and Arroyo R (2018) Characterization of a novel endogenous cysteine proteinase inhibitor, trichocystatin-3 (TC-3), localized on the surface of *Trichomonas vaginalis*. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **102**, 87–100.
- Singh M, Sharma H and Singh N (2007) Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway. *Mitochondrion* **7**, 367–373.
- Solano-González E, Burrola-Barraza E, León-Sicairos CR, Avila-González L, Gutiérrez-Escolano L, Ortega-López J and Arroyo R (2007) The trichomonad cysteine proteinase TVCP4 transcript contains an iron-responsive element. *FEBS LETTERS* **581**, 2919–2928.
- Sommer U, Costello CE, Hayes GR, Beach DH, Gilbert RO, Lucas JJ and Singh BN (2005) Identification of *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases that induce apoptosis in human vaginal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 23853–23860.
- Stafkova J, Rada P, Meloni D, Zarsky V, Smutna T, Zimmann N, Haranta K, Pompach P, Hrdy L and Tachezy J (2018) Dynamic secretome of *Trichomonas vaginalis*: Case study of β -amylases. *Molecular Cellular Proteomics* **17**, 304–320.
- Torres-Romero JC and Arroyo R (2009) Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: Evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE/IRP-like system. *Infection, Genetics and Evolution* **9**, 1065–1074.
- Tovy A, Hertz R, Siman-Tov R, Syan S, Faust D, Guillen N and Ankri S (2011) Glucose starvation boosts *Entamoeba histolytica* virulence. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **5**, e1247.

Research Article

Cite this article: Rivera-Rivas LA *et al* (2020). The effect of iron on *Trichomonas vaginalis* TvCP2: a cysteine proteinase found in vaginal secretions of trichomoniasis patients. *Parasitology* **147**, 760–774. <https://doi.org/10.1017/S0031182020000438>

Received: 3 October 2019
Revised: 2 March 2020
Accepted: 4 March 2020
First published online: 16 March 2020


Key words:

Cathepsin L-like cysteine proteinases; cellular apoptosis induction; cytotoxicity; immunogenic proteinase; iron; trichocystatin-3 (TC-3); *Trichomonas vaginalis*; TvCP2; vaginal secretions

Author for correspondence:

Rossana Arroyo,
E-mail: rarroyo@cinvestav.mx

The effect of iron on *Trichomonas vaginalis* TvCP2: a cysteine proteinase found in vaginal secretions of trichomoniasis patients

Luis Alberto Rivera-Rivas¹, Sebastián Lorenzo-Benito¹,
Diana Belén Sánchez-Rodríguez¹, Jesús FT Miranda-Ozuna¹,
Esly Alejandra Euceda-Padilla¹, Jaime Ortega-López², Bibiana Chávez-Munguía¹,
Anel Lagunes-Guillén¹, Beatriz Velázquez-Valassi³, Lidia Jasso-Villazul⁴
and Rossana Arroyo¹ 

¹Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), CP 07360, Mexico City, Mexico; ²Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, CP 07360, Mexico City, Mexico; ³Departamento de Vigilancia Epidemiológica del Hospital General de México ‘Eduardo Liceaga’, CP 06720, Mexico City, Mexico and ⁴Unidad de Medicina Preventiva del Hospital General de México ‘Eduardo Liceaga’, CP 06720, Mexico City, Mexico

Abstract

Trichomonas vaginalis (Tv) induces host cell damage through cysteine proteinases (CPs) modulated by iron. An immunoproteomic analysis showed that trichomoniasis patient sera recognize various CPs, also some of them are present in vaginal washes (VWs). Thus, the goal of this work was to determine whether TvCP2 is expressed during infection and to assess the effect of iron on TvCP2 expression, localization and contribution to *in vitro* cellular damage. Western-blotting (WB) assays using TvCP2r and vaginitis patient serum samples showed that 6/9 Tv (+) but none of the Tv (–) patient sera recognized TvCP2r. WB using an anti-TvCP2r antibody and VWs from the same patients showed that in all of the Tv (+) but none of the Tv (–) VWs, the anti-TvCP2r antibody detected a 27 kDa protein band that corresponded to the mature TvCP2, which was confirmed by mass spectrometry analysis. Iron decreased the amount of TvCP2 mRNA and the protein localized on the parasite surface and cytoplasmic vesicles concomitant with the cytotoxic effect of TvCP2 on HeLa cells. Parasites pretreated with the anti-TvCP2r antibody also showed reduced levels of cytotoxicity and apoptosis induction in HeLa cell monolayers. In conclusion, these results show that TvCP2 is expressed during trichomonal infection and plays an important role in the *in vitro* HeLa cell cytotoxic damage under iron-restricted conditions.

Introduction

Trichomonas vaginalis (Tv) is the protozoan parasite responsible for human trichomoniasis, the most common, non-viral, sexually transmitted neglected disease worldwide (WHO, 2012). This infection is associated with serious health complications, such as pregnancy outcome, children with low birth weight, infertility, and cervical and prostate cancer (Lehker and Alderete, 2000).

During infection, trichomonads are exposed to constantly changing microenvironmental conditions throughout the menstrual cycle, such as nutrients scarcity and competition with the vaginal microbiota, hit by the host immune response and hormonal fluctuations, among others. However, *T. vaginalis* has mechanisms that allow the parasite to adapt and respond to environmental changes, such as iron concentration differentially modulating the gene expression of virulence factors, among other proteins, thus allowing the maintenance of a chronic infection (Figueroa-Angulo *et al.*, 2012).

Trichomonas vaginalis has high requirements of exogenous iron (up to 300 μ M), an essential micronutrient for its survival, multiplication and metabolism (Gorrell, 1985; Lehker and Alderete, 1992). Iron by known and unknown mechanisms also regulates the virulence factors of *T. vaginalis*. The absence of iron in the culture media reduces cell growth and induces morphological changes in *T. vaginalis* from amoeboid to rounded parasites and flagella internalization. Evidence of pseudocyst formation in *T. vaginalis* under nutritional stress conditions such as iron restriction has been reported (Dias-Lopes *et al.*, 2017). Thus, iron plays an important role in the physiology and morphology of *T. vaginalis*. Besides, morphological alterations are also accompanied by an extensive change in the protein profiles of parasite grown under different iron conditions and suggest that protein synthesis is differentially regulated by iron in trichomonads (Benchimol, 2004; De Jesus *et al.*, 2006, 2007).

The *T. vaginalis* genome has ~440 genes that encode proteinases; half of them are cysteine proteinases (CPs), and 48 correspond to cathepsin L-like CPs (Carlton *et al.*, 2007),

but less than half show proteolytic activity by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) zymography (Neale and Alderete, 1990; Ramón-Luing *et al.*, 2010; Cárdenas-Guerra *et al.*, 2013). The expression of some CP genes is differentially modulated by iron concentrations (Arroyo *et al.*, 2015). Moreover, CPs are considered to be virulence factors (Hernández *et al.*, 2014), participating in haemolysis (Dailey *et al.*, 1990; Fiori *et al.*, 1993, 1996, 1999; Lubick and Burgess, 2004; Cárdenas-Guerra *et al.*, 2013, 2015), complement resistance (Alderete *et al.*, 1995), cytoadherence (Arroyo and Alderete, 1989, 1995; Mendoza-López *et al.*, 2000; Rendón-Gandarilla *et al.*, 2013), cytotoxicity (Alvarez-Sánchez *et al.*, 2000, 2007; Ramón-Luing *et al.*, 2011; Carvajal-Gámez *et al.*, 2014; Arroyo *et al.*, 2015) and apoptosis induction in HeLa and human vaginal epithelial cells (Sommer *et al.*, 2005; Kummer *et al.*, 2008; Miranda-Ozuna *et al.*, 2019).

The *tvcp2* (TVAG_057000) gene (945-bp) was identified as one of the cDNA clones in an expression library together with three other genes that encode similar trichomonad cathepsin L-like CPs (Mallinson *et al.*, 1994), which were also found in *in vitro* secretion products (SPs) involved in the induction of apoptosis in vaginal epithelial cells (Sommer *et al.*, 2005). TvCP2 is downregulated by glucose and is involved in cellular damage (Miranda-Ozuna *et al.*, 2019). Moreover, several immunogenic proteinases from *T. vaginalis* (immunoproteome) were identified in an immunoproteomic analysis, combined with mass spectrometry (MS) and the use of patient sera in 2-DE-Western-blotting (2-DE-WB) assays (Ramón-Luing *et al.*, 2010). In this analysis, TvCP2 was one of the CPs recognized by patient sera. However, the presence of TvCP2 in vaginal secretions during infection and the effect of iron on the expression, localization and function of TvCP2 in the cytotoxic mechanisms of *T. vaginalis* and the putative association with cystatin-like endogenous CP inhibitors have not yet been determined.

In this work, we demonstrated the presence of TvCP2 in vaginal washes (VWs) of trichomoniasis patients and assessed the effect of iron in diminishing the expression of TvCP2, which is localized on the plasma membrane and in secretory vesicles, and could be targeted by TC-3, an endogenous CP inhibitor of *T. vaginalis*. TvCP2 is a key parasite CP involved in the cytotoxic cellular damage through apoptosis induction in HeLa cells under iron-restricted (IR) conditions.

Materials and methods

Cloning and expression of the TvCP2 recombinant protein

The complete *tvcp2* gene (945-bp) (TVAG_057000) was amplified by PCR using trichomonad genomic DNA as a template, a sense primer (5'-GCCGGTACCATGTTTGCTTTCTTGCTTTCTGGC-GCT-3'), and an antisense primer (5'-GGCGAATTCTTAGAG-AGCCTTTGGAAGGATAGTTCAG-3') (Supplementary Fig. S1A). The restriction sites used, *Kpn*I and *Eco*RI, respectively, are underlined in the primer sequences for directional cloning into the pCold I prokaryotic expression vector (Takara Bio Inc., Mountain View, CA, USA), as recommended by the manufacturer. Recombinant protein expression in the *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) was induced with 1 mM isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside for 16 h at 16 °C and analysed by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and WB assays using an anti-histidine6 tag monoclonal antibody (α -His6; Invitrogen-Gibco, Carlsbad, CA, USA). The recombinant TvCP2 protein (TvCP2r) was purified by affinity chromatography using Ni-Sepharose 6 Fast Flow columns (GE Healthcare-Amersham Biosciences, UK), as recommended by the manufacturer (Supplementary Fig. S2A).

Production of a polyclonal anti-TvCP2r antibody (anti-TvCP2r)

To produce an anti-TvCP2r polyclonal antibody, a 6-week-old male New Zealand rabbit was subcutaneously immunized twice with 200 μ g of purified TvCP2r protein mixed with the TiterMax Gold adjuvant (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) every 15 days. The anti-TvCP2r antibody was used in WB assays to detect native TvCP2 in VWs from patients with trichomoniasis and in Tv extracts, for indirect immunofluorescence, and for cytotoxicity and apoptosis-induction inhibition assays. A preimmune (PI) serum sample was obtained before animal immunization and was used as a negative control in all experiments using antibodies (Supplementary Fig. S2B and C). For inhibition assays, immunoglobulin G (IgG) fractions from anti-TvCP2r and PI sera were obtained using the caprylic acid method (Harlow and Lane, 1988). The use and handling of rabbits for antibody production were included in a protocol submitted and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at CINVESTAV (Protocol No. 0229-16).

Biological samples

To detect the presence of TvCP2 in VWs from patients with trichomoniasis, nine Tv (+) VWs and nine Tv (-) samples were obtained from patients attending the Hospital General de México (HGM), who had been diagnosed with vaginitis through clinical examination. Diagnosis for the presence or absence of Tv in these patients was confirmed by VW microscopic analysis and *in vitro* culture (Table 1). Moreover, to detect the presence of antibodies against TvCP2 in sera from patients with trichomoniasis, TvCP2r was used as an antigen in WB assays, and sera from Tv (+) and Tv (-) patients were used as primary antibodies (1:100 dilution) (Table 1). To obtain patient biological samples (VW and serum), each patient who participated in this study signed an informed consent form included in a protocol approved by the HGM scientific and ethical committees (Protocol No. DI/14/204/03/010).

Parasites and HeLa cell cultures

Parasites from the fresh clinical *T. vaginalis* isolates CNCD 147 (type 2) and CNCD 280 (type 1) were used in this study for all experiments or where indicated, respectively (Alvarez-Sánchez *et al.*, 2000; Conrad *et al.*, 2012; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018). Trichomonad cultures were maintained at 37°C for 1 week by daily passage in trypticase-yeast-extract-maltose (TYM) medium supplemented with 10% heat-inactivated bovine serum (HIBS) (Diamond, 1957). Organisms at the mid-logarithmic phase were used for all assays. The TYM medium used for regular parasite growth contained 20 μ M iron [normal iron (NI) condition]. For parasites grown under high-iron (HI) or IR condition (250 or 0 μ M iron, respectively), the culture medium was supplemented with 250 μ M ferrous ammonium sulphate or 150 μ M 2-2'-dipyridyl (an iron-chelating agent; Sigma-Aldrich, Co.), respectively (Gorrell, 1985; Alvarez-Sánchez *et al.*, 2007). To obtain confluent HeLa cell monolayers, cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Gibco Lab, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% HIBS at 37 °C for 48 h in a 5% CO₂ atmosphere (Alvarez-Sánchez *et al.*, 2000; Miranda-Ozuna *et al.*, 2019).

RNA isolation and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

Total RNA was isolated from parasites (2×10^7) grown under different iron concentrations using TRIzol reagent (Invitrogen). The quality of RNA was determined using agarose gels (data not shown). Before cDNA synthesis, total RNA was first treated with

Table 1. Characteristics of biological samples from patients with vaginitis used in Western-blot assays shown in Fig. 1

Sample number ^a	Patient ID	VW microscopic analysis ^b					Serum ^c
		VEC ^d	WBC ^e	Bacteria	Tv ^f	Tv culture	
1	HGMM 718	+	+	+++	+	+	+
2	HGMM 513	+	++	+++	+	+	+
3	HGMM 664	++	+	+++	+	+	+
4	HGMM 492	+	+	+	+	+	+
5	HGMM 507	+	+	++	+	+	+
6	HGMM 588	+	+++	+	+	+	+
7	HGMM 490	+	++	++	+	+	+
8	HGMM 478	++	+	+++	+	+	+
9	HGMM 615	+	+	+	+	+	+
10	HGMM 578	+	+	+++	–	–	+
11	HGMM 479	+	++	+++	–	–	+
12	HGMM 261	++	+	+++	–	–	+
13	HGMM 431	+	+	+	–	NA	–
14	HGMM 367	+	+	++	–	NA	–
15	HGMM 457	+	+++	+	–	NA	–
16	HGMM 452	+	++	++	–	NA	–
17	HGMM 717	++	+	+++	–	NA	–
18	HGMM 587	+	+	+	–	NA	–

Samples of vaginal washes (VWs) and sera were obtained from enrolled people attending for an annual Pap smear examination at the 'Medicina Preventiva del Hospital General de México' (HGMM). People accepted to participate after signing the consent form approved in the Protocol No. DI/14/204/03/010 by the HGM ethical committee. The presence of Tv detected in the microscopic analysis was confirmed by *in vitro* culture of vaginal secretions. All patients were diagnosed with cervicovaginitis, but in none of them was the presence of yeast detected.

^aThe patient sample number from 1 to 9 of VWs and sera are from Tv (+) patients and from 10 to 18 are from Tv (–) patients. These samples were used in WBs shown in Fig. 1.

^bPatient VWs were TCA-precipitated for the WB assay presented in Fig. 1C using anti-TvCP2r serum as the primary antibody. The protein profile of each VW used in Fig. 1C was shown as Supplementary Fig. S4. Signs (+ or –) show the abundance of cellular components as follows: +, few; ++, moderate; +++ abundant; –, absent.

^cPatient serum at 1:100 dilution for the WB assay presented in Fig. 1B using TvCP2r as antigen; NA, no serum sample was obtained from these patients.

^dVEC, presence of vaginal epithelial cells.

^eWBC, presence of white blood cells.

^fTv, presence of moving parasites confirmed by *in vitro* culture of VW.

DNase I for 60 min at 37°C. To check for the absence of gDNA, DNase-treated RNA was used as a template for PCR reaction. PCR reaction without cDNA was also used as a negative control (Fig. 2A). To obtain cDNA, 10 µg total DNase-treated RNA was processed using a RevertAid first-strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific-Pierce, Rockford, IL, USA), following the manufacturer's instructions. For endpoint PCR amplification, 500 ng cDNA, *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) and specific primers for *tvcp2* (TVAG_057000) designed using the gene sequence reported in TrichDB were selected to amplify a 322-bp fragment. The *tvcp2* primers used were a sense primer (5'-GGGCTACG-ATGAGGTTAAGG-3') at position 623–643 nt and an antisense primer (5'-GGCGAATTCTTAGAGAGCCTTTGGAAGGATAG-TTCAG-3') at position 908–945 nt (Supplementary Fig. S1A). The amplification programme consisted of 20 cycles of denaturation at 95 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 35 s and extension at 72 °C for 80 s. The 112-bp fragment of the *T. vaginalis* β -tubulin mRNA (Madico *et al.*, 1998) was used as an internal control. The amplification programme consisted of 25 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 1 min and extension at 72 °C for 30 s. These experiments were performed three independent times with similar results.

Protein preparation and SDS-PAGE

Proteins [total protein extracts (TPEs) and protease-resistant extracts (PREs)] were obtained from 2×10^7 parasites cultured

under different iron concentrations. To obtain TPEs for WB, washed parasites were resuspended in PBS pH 7.0 for 10% trichloroacetic acid (TCA) precipitation at 4°C for 18 h. To obtain PREs for WB, washed parasites were lysed with 0.5% sodium deoxycholate in PBS pH 8.0, and in the absence of protease inhibitors to keep the proteolytic activity intact, as previously described (Miranda-Ozuna *et al.*, 2019). Then, PRE lysates were centrifuged at $13\,000 \times g$ for 30 min at 4°C and supernatants were analysed, without boiling, by SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gels. Proteins from VWs were obtained by 10% TCA precipitation using 100 µL of VW supernatant. TCA-protein pellets from TPEs and VWs were resuspended directly in SDS-PAGE sample buffer, boiled for 3 min and analysed through SDS-PAGE and WB assays using different primary antibodies.

In vitro secretion assays

The *in vitro* secretion assay was performed as previously described (Hernández-Gutiérrez *et al.*, 2004) with some modifications. Briefly, parasites grown under IR or HI conditions were harvested, washed three times with PBS, resuspended (2×10^6 parasites mL⁻¹) in PBS-0.5% maltose directly or supplemented with 250 µM ferrous ammonium sulphate, according to the parasite growth condition (IR or HI, respectively), incubated for 90 min at 37 °C, and parasite viability was assessed by the Trypan Blue exclusion method. To confirm the presence of TvCP2 in the SPs, the supernatant was clarified by centrifugation at $900 \times g$,

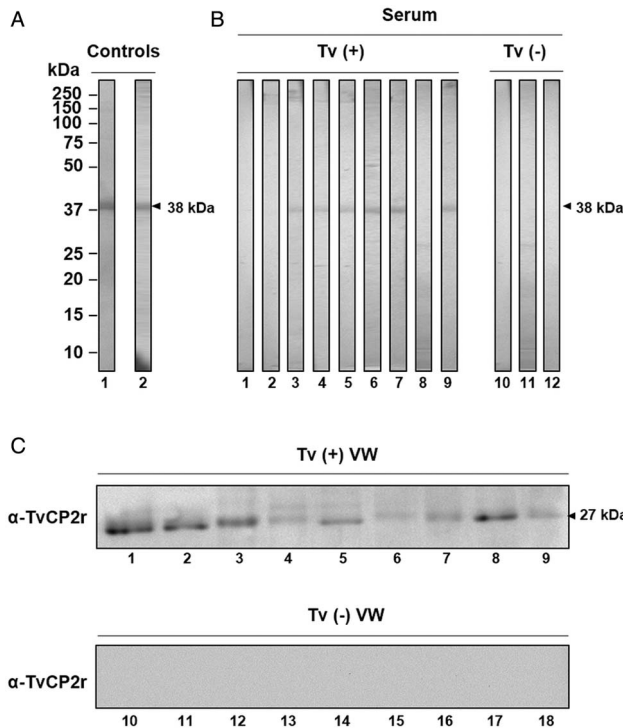


Fig. 1. Presence of TvCP2 during trichomonad infection. (A) Controls of WB assays using the recombinant TvCP2 protein (TvCP2r) transferred onto NC membrane stained with Ponceau Red (lane 1) and the recognition by the anti-TvCP2r antibody (1:8000 dilution; lane 2) used as a positive control. (B) WB assays using NC membrane containing TvCP2r as antigen incubated with different Tv (+) (lanes 1–9) and Tv (–) (lanes 10–12) patient sera (Table 1) at a 1:100 dilution. (C) WB assays performed using the anti-TvCP2r (1:2000 dilution) antibody in NC membranes containing duplicate samples of the proteins from nine Tv (+) (Supplementary Fig. S3, lanes 1–9) and nine Tv (–) vaginal washes (VWs) (Supplementary Fig. S3, lanes 10–18) previously separated by SDS-PAGE using 12% polyacrylamide gels and CBB-stained (Supplementary Fig. S3; Table 1). Sera and VWs used in Fig. 1B and C, lanes 1–12 are from the same patients in each case (Table 1).

filtered through a 0.22 μm membrane, and proteins were precipitated with 10% TCA at 4°C for 18 h prior to WB assays. These experiments were performed at least in three independent times.

Western blot

WB assays were performed using different sources of proteins (TvCP2r, *in vitro* SPs, TPEs or PREs from Tv or TCA-precipitated proteins from VWs) separated by SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gels, transferred onto nitrocellulose (NC) membranes (0.2 μm pore size; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), and blocked with 10% non-fat dried milk in PBS-0.1% Tween 20 (PBS-T20). The NC membranes were incubated for 1 h at 37°C with the following primary antibodies diluted in PBS-T20: anti-TvCP2r (1:2000 dilution); anti-TvCP4r (1:500 dilution; Cárdenas-Guerra *et al.*, 2013), TvCP4 is a CP that is secreted under HI conditions and was used as a positive control for SPs; anti-TvPFO (1:10 000 dilution; Meza-Cervantez *et al.*, 2011), this antibody was produced against a recombinant protein of the carboxy-terminal region of Tv pyruvate ferredoxin:oxidoreductase (PFO) A, which is induced under HI condition and was used as a positive control for iron induction; anti-EhHKr (1:500 dilution; Meza-Cervantez *et al.*, 2011), this antibody was produced against an *Entamoeba histolytica* hexokinase recombinant protein (EhHKr) that recognizes the TvHK, which was used as a negative control for SPs WB; anti-TvLEGU-1r (1:500 dilution; Rendón-Gandarilla *et al.*, 2013), TvLEGU-1 is a CP of the asparaginyl endopeptidase (legumain) subfamily that was used as a

loading control for PREs WB; anti-His6 (1:1000 dilution), PI serum (1:100 dilution) or Tv (+) and Tv (–) patient sera (dilution 1:100; Ramón-Luing *et al.*, 2010). After five washes with PBS-T20, NC membranes were incubated for 1 h at 37°C with a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit, anti-mouse or anti-human IgG secondary antibody (1:3000 dilution; Bio-Rad Laboratories). Then, the reactive bands were developed using a chemiluminescence system (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific-Pierce), images were captured in a ChemiDoc XRS System (Bio-Rad), and analysed using Quantity One software (Bio-Rad). Densitometry analysis was determined using the pixels of the TvCP2 protein bands detected by the anti-TvCP2r antibody in the IR conditions as a 100% intensity and used to calculate the relative intensity of the bands detected by the anti-TvCP2r antibody in the HI conditions for both types of protein extracts (TPEs and PREs) and the *in vitro* secretion assay. These experiments were performed at least in three independent times.

Protein identification by MS

Protein bands of interest detected in WB assays using *in vitro* trichomonad SPs and patient VWs were excised from Coomassie brilliant blue (CBB)-stained gels (Supplementary Fig. S4). The samples were analysed on a NanoAcquity nano-flow liquid chromatography (LC) system (Waters), coupled to a linear ion trap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) equipped with a nanoelectrospray ion source (LC-ESI-MS/MS). Proteins were identified from the tandem MS data using SEQUEST software with searches in the TrichDB database at the Proteomics Laboratory in CINVESTAV-Unidad Irapuato.

Indirect immunofluorescence assay (IFA) and lysotracker labelling assays

To determine the cellular localization of TvCP2 under different iron concentrations, IFA and confocal microscopy analyses were performed using parasites grown under IR and HI conditions and an anti-TvCP2r antibody. Parasites attached to coverslips were fixed with 4% formaldehyde in PBS for 30 min at room temperature (RT). Half of the coverslips with fixed parasites were permeabilized with 0.07% Triton X-100 for 5 min at RT, while the other half were not treated. All coverslips were then blocked with 0.5 M glycine for 1 h at 37°C and 1% fetal bovine serum for 15 min at 37°C. Parasites were incubated with the anti-TvCP2r antibody or PI serum as a negative control (1:100 dilution) for 18 h at 4°C, followed by incubation with a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated secondary anti-rabbit antibody (1:100 dilution) (Thermo Scientific-Pierce) for 1 h at RT. The parasites were stained with the membrane marker 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DIL-CM-38; Molecular Probes-Invitrogen) at 1:2000 dilution for 30 min at RT, washed with PBS, and mounted with Vectashield-DAPI (4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) mounting solution. For lysosomal co-localization assays, the acidic compartments of live parasites grown under both iron conditions (IR and HI) were incubated with 2 μM LysoTracker Red DND-99 (Invitrogen) following the manufacturer's instructions for 30 min at 37°C. Parasites were then washed, fixed and processed as previously described by Miranda-Ozuna *et al.* (2019) for IFA and incubated with an anti-TvCP2r antibody.

The TC-3 and TvCP2 co-localization assays were performed using the CNCD280 Tv isolate, as previously reported (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018). Briefly, parasites were incubated with both primary antibodies (mouse anti-TC-3r and rabbit anti-TvCP2r, both at 1:100 dilution) for 18 h at 4°C, washed

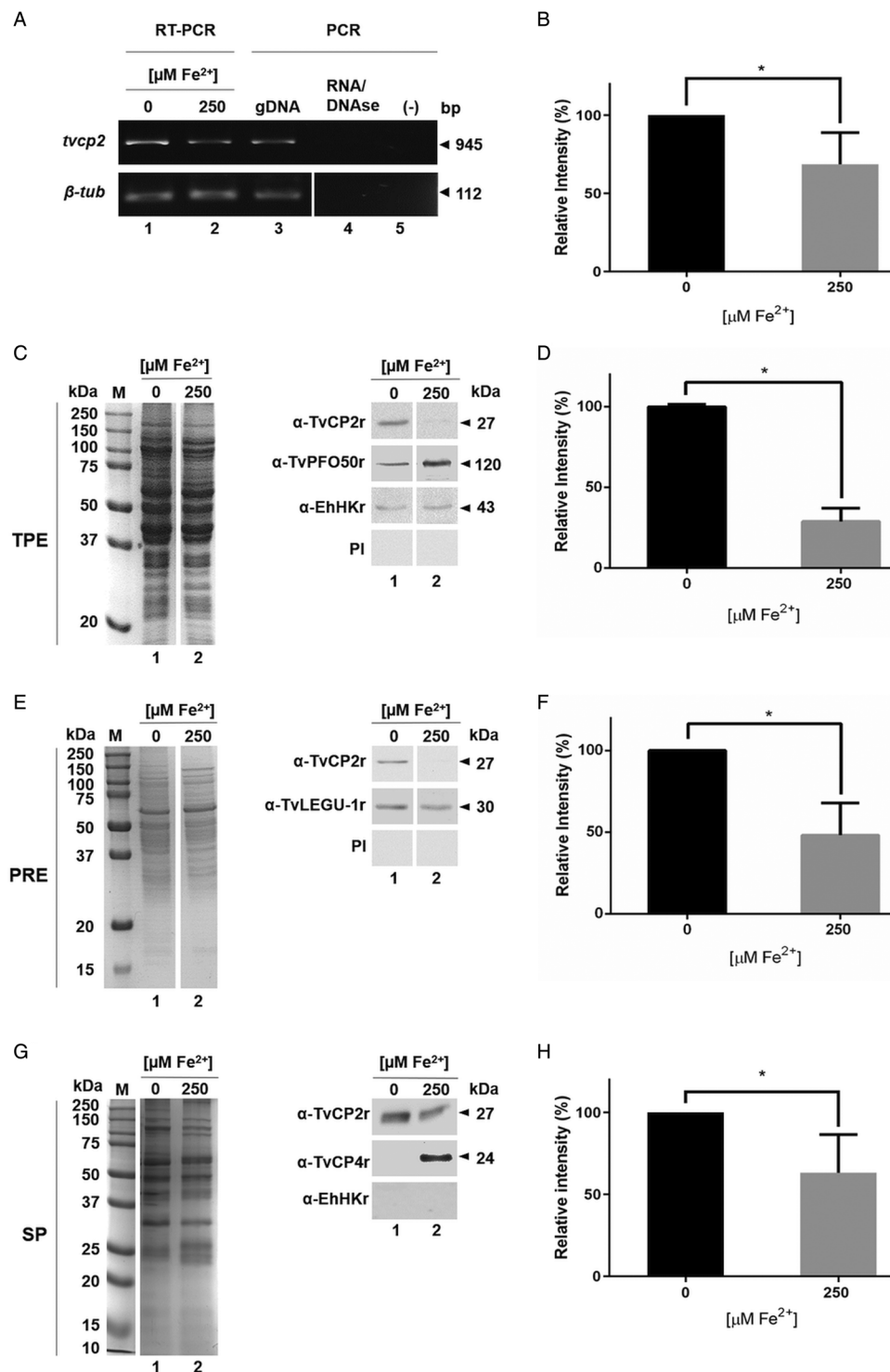


Fig. 2. Effect of iron on the expression of TvCP2 at the mRNA, protein and *in vitro* secretion. (A) Endpoint RT-PCR with specific primers for the *tvcp2* and β -*tubulin* genes using 500 ng of cDNA from parasites grown in IR (0 μM ; lane 1) and HI conditions (250 μM ; lane 2). As a positive control, 500 ng of gDNA was used (lane 3). To verify the lack of gDNA contamination, DNase-I-treated RNA was used as a template for the PCR (lane 4). As another negative control, a reaction without DNA was used (lane 5). β -*tubulin* mRNA under different iron concentrations was used as a loading control. Arrowheads show the length of each amplicon in base pairs (bp). (B) Densitometric analysis of the *tvcp2* bands detected in the ethidium bromide-stained agarose gel in (A) using Quantity One software (Bio-Rad) and compared with the β -*tubulin* bands used as a loading control. (C and E) Coomassie-Brilliant-Blue (CBB)-stained 12% SDS-PAGE gel for TPEs and PREs from parasites grown under IR (0 μM) and HI (250 μM) conditions (lanes 1 and 2), respectively. For WB assays, duplicate gels of (C) and (E) were transferred onto NC membranes and incubated with different antibodies: anti-TvCP2r polyclonal antibody (1:2000 dilution); anti-TvPFO50r antibody (1: 10 000 dilution) to detect an overexpressed PFO-A control protein under HI conditions; anti-EhHKr antibody (1:1000 dilution) as a loading control to detect TvHK; anti-TvLEGU-1r antibody (1:500 dilution) as a control for a proteinase expressed under both iron conditions used; and PI serum (1:1000 dilution) as a negative control. (D and F) Densitometric analysis of the TvCP2 protein bands detected by WB in (C) and (E) using Quantity One software (Bio-Rad) were compared with the protein bands detected by the anti-EhHKr antibody in (C) and by the anti-TvLEGU-1r antibody in (F) as loading controls, respectively. (G) CBB-stained protein profiles of the *in vitro* secreted products from parasites grown under IR (0 μM) and HI (250 μM) conditions. WB assay of duplicated samples transferred onto NC membranes using polyclonal antibodies specific for each protein (anti-TvCP2r, anti-TvCP4r and anti-EhHKr) to detect TvCP2; TvCP4 (secreted protein) and TvHK (non-secreted protein) were used as controls to determine the active secretion of TvCP2 from live parasites. (H) Densitometric analysis of the protein bands detected by WB in (G) for TvCP2 using Quantity One software (Bio-Rad). The band detected by amplification of *tvcp2* by RT-PCR and TvCP2 in WB assays with the anti-TvCP2r antibody in the IR-grown parasite TPE, PRE or SP (A, C, E and G) was set as 100% of relative intensity for the densitometry analysis (B, D, F and H). (*) indicate a significant difference with $P < 0.05$ values.

with PBS, incubated with FITC-conjugated and Alexa-Fluor-594-conjugated secondary antibodies, respectively (1:100 dilution; Thermo Scientific-Pierce) for 1 h at RT, mounted, and analysed by confocal microscopy using a Zeiss microscope and Zen 2012 software (Carl Zeiss, Germany). PI sera were used as negative controls. To quantify the degree of co-localization (putative molecular association) between two fluorochromes, the Pearson's correlation coefficient (r) was used. Values close to zero represent weak association while values between 0.5 and 1 represent biologically meaningful association (Adler and Parmryd, 2010).

Pull-down assay

A pull-down assay was performed according to the manufacturer's instructions (Pierce™ Pull-Down PolyHis Protein: Protein Interaction Kit) as recently reported (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018). Briefly, TC-3r and clarified protein extract (CPE) were used as bait and prey proteins, respectively. The CPE was obtained from parasites (2×10^7) of the CNCD 280 isolate grown under NI conditions. The CPE was incubated with TC-3r (150 μ g) previously immobilized on a cobalt resin column for 18 h at 4°C. After washing, fractions (CPE, washes and bound or prey proteins) were analysed by SDS-PAGE on a 13% polyacrylamide CBB-stained gel. Additionally, bound proteins were transferred onto NC membranes (Bio-Rad) for WB detection with the anti-TvCP2r antibody and with the anti-TvTIMr antibody and PI serum as negative controls (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018). Bovine serum albumin (BSA) and HSP70r were used as a negative control and unrelated protein, respectively, with a similar treatment as TC-3r.

Immunogold localization using transmission electron microscopy (TEM)

These assays were performed using the CNCD280 Tv isolate, as previously reported (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018), grown under NI conditions. Ultrathin (60 nm) sections were obtained and incubated for 18 h at RT with a mouse anti-TC-3r antibody (1:10 dilution) or with a rabbit anti-TvCP2r antibody (1:20 dilution) alone or together (for co-localization assays) with mouse anti-TC-3r as primary antibodies, and with gold-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG (1:60 dilution) (or together) as secondary antibodies (Ted Pella Inc. Redding, CA, USA) (using 20 or 30 and 15 nm gold particles, respectively). Then, the sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Secondary antibodies alone were used as negative controls for these assays. The sections were examined using a JEM-1011 transmission electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

Cytotoxicity, apoptosis induction and inhibition assays

Cytotoxicity assays were performed by a colorimetric method as previously described (Alvarez-Sánchez *et al.*, 2000; Miranda-Ozuna *et al.*, 2019) using confluent HeLa cell monolayers in 96-well microtiter plates and parasites grown under IR or HI conditions. For inhibition assays, parasites grown under IR conditions were incubated prior to the interaction assays for 30 min at 4°C in the presence of increasing IgG concentrations (0, 50, 100 and 300 μ g mL⁻¹) of anti-TvCP2r or PI serum (used as a negative control). The parasites were then washed and resuspended in interaction medium (DMEM: iron-chelated TYM at a 2:1 ratio and without serum). The untreated or IgG-pre-treated parasites (2×10^5 well⁻¹) were added to confluent HeLa cell monolayers (5×10^4 well⁻¹) at a 5:1 parasite-to-host cell ratio and incubated for 1 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. HeLa cell monolayer destruction was assessed using light microscopy and spectrophotometric

quantification at 570 nm. Untreated parasites were set as 100% cytotoxicity. Each experiment was performed in triplicate at least three independent times, with similar results.

Trichomonal apoptosis induction assays: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) DNA fragmentation and Annexin V-FITC were performed. A TUNEL assay after the cytotoxicity assay in the absence or presence of 300 μ g mL⁻¹ anti-TvCP2r IgG-treated parasites using the DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, Madison, WI, USA) was performed following the manufacturer's instructions. Briefly, after incubation of *T. vaginalis* with confluent HeLa cell monolayer for 30 min at 37°C, cells recovered from the supernatant and those remaining in the monolayer attached to the coverslips were fixed with 4% formaldehyde, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 5 min at RT, and incubated with the Terminal deoxynucleotidyl transferase and fluorescein-labelled nucleotide mix for 1 h at 37°C. Nuclei were stained with DAPI. HeLa cells and Tv incubated with H₂O₂ for 30 and 60 min at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere were used as positive controls. Green fluorescence incorporated in the nicked DNA was observed by confocal microscopy (Zeiss). Experiments were performed at least two independent times with similar results.

To confirm the role played by TvCP2 in apoptosis induction, other assays were also performed. For the DNA fragmentation assay, after incubation of *T. vaginalis* (with or without pre-treatment with anti-TvCP2r or PI IgGs) with confluent HeLa cell monolayers on six-well microtiter plates for 30 min at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, the supernatant was recovered and centrifuged. The cells attached to the plate and in the pellet were processed for DNA extraction as previously reported (Miranda-Ozuna *et al.*, 2019). As positive controls, parasites and HeLa cells treated with 5% H₂O₂ for 30 and 60 min at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere were used. The DNA was analysed by electrophoresis in 2% agarose gels. The experiments were performed at least two independent times with similar results.

For the annexin V-FITC staining method, after the incubation of *T. vaginalis* with confluent HeLa cell monolayers for 30 min at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, the cell monolayers were labelled with the Annexin V-FITC Fluorescence Microscopy Kit (BD Pharmingen) for 15 min at RT, following the manufacturer's recommendations. The FITC fluorescent signal from apoptotic HeLa cells was observed under an epifluorescence inverted microscope (Nikon, Japan) and quantified by a spectrofluorometric analysis (SpectraMax Gemini EM spectrofluorometer). The interaction of HeLa cell monolayers with parasites grown under IR conditions without antibody pre-treatment and their level of Annexin V label was set as 100% apoptosis.

Statistical analysis

Statistically significant differences between means were determined by analysis of variance (ANOVA) using GraphPad Prism 6. The scores showing statistical significance are indicated in the figures with asterisks. The corresponding *P* values are indicated in the figure legends.

Results

Expression of TvCP2r and anti-TvCP2r antibody production and validation

To demonstrate the expression of TvCP2 during trichomonal infection, we determined the immunogenicity of TvCP2 by detecting the reactivity of anti-TvCP2 antibodies in patient serum samples and the presence of the TvCP2 proteinase in vaginal secretions of patients with trichomoniasis using VWs

(Table 1). For this purpose, the recombinant TvCP2 protein and the previously generated polyclonal anti-TvCP2r antibodies (Miranda-Ozuna *et al.*, 2019) were used. The complete 945-bp open reading frame of the *tvcp2* gene (TVAG_057000) that encodes a 315-aa cathepsin L-like zymogen with a predicted molecular mass of ~35 kDa and *pI* 7.0 (Supplementary Fig. S1A) was cloned. The N-terminal region from aa residues 1–72 corresponds to the prepro-region that is removed by proteolytic processing during proteinase maturation leaving a 242-aa and 27 kDa mature proteinase (Supplementary Fig. S1B). The affinity-purified recombinant TvCP2 (TvCP2r) proteinase expressed as a 38 kDa protein band (Supplementary Fig. S2A) was used as an antigen in WB assays with vaginitis patient sera (Fig. 1).

The anti-TvCP2r antibody produced in rabbits was validated by WB assays using TvCP2r, TPEs and PREs obtained from normally grown parasites (Supplementary Fig. S2). The anti-TvCP2r antibody recognized a 38 kDa TvCP2r protein band (Supplementary Fig. S2C, lane 1) and a ~27 kDa protein band in the TCA-precipitated TPEs and the PREs from parasites grown in NI concentrations (Supplementary Fig. S2C, lanes 2 and 3). The ~27 kDa protein could correspond to the mature TvCP2 proteinase (Supplementary Fig. S1B). The PI serum showed no reactivity (Supplementary Fig. S2B). The anti-TvCP2r antibody tested by IFA using normally grown fixed and non-permeabilized parasites detected TvCP2 mainly in spots on some parts of the parasite surface (Supplementary Fig. S2D).

TvCP2 is present during trichomonal infection

To determine the immunogenicity of TvCP2 during infection, the presence of anti-TvCP2 antibodies in vaginitis patient sera (Table 1) using TvCP2r as an antigen was analysed in WB assays. Figure 1B shows the immunodetection of TvCP2r (38 kDa) in 6/9 tested Tv (+) patient sera, while no bands were detected when Tv (–) patient sera were tested. As a positive control, the rabbit anti-TvCP2r antibody was used (Fig. 1A).

The presence of TvCP2 during infection in Tv (+) and Tv (–) VWs with similar cytological composition, at least under the microscopic examination of each wet mount (Table 1) was also analysed in WB assays. Proteins from VWs of vaginitis patients were concentrated by TCA precipitation, electrophoresed (Supplementary Fig. S3), and transferred onto NC membranes to perform WB assays using the anti-TvCP2r antibody (Fig. 1C). Supplementary Figure S3 shows the CBB-stained protein profile of each VW sample used in the WB analysis. The immune detection of TvCP2 in the Tv (+) VWs showed a 27 kDa protein band in all VWs tested (Fig. 1C), which was confirmed by MS analysis, using two bands from the 27 kDa region of Tv (+) and two from the Tv (–) VWs profiles (Supplementary Fig. S3, segmented rectangles). Only on the Tv (+) VWs bands, four peptides were identified that corresponded to the TVAG_057000 gene product, giving a 17% sequence coverage (Supplementary Fig. S1C). As expected, the anti-TvCP2r antibody did not detect the presence of TvCP2 in Tv (–) VWs (Fig. 1C). Thus, these data demonstrate that TvCP2 is expressed during infection.

TvCP2 is downregulated by iron at the mRNA and protein levels

The presence of TvCP2 in VWs of Tv (+) patients prompted us to study the effect of iron on the *in vitro* TvCP2 expression. Thus, the iron effect at the transcript and protein levels and in the *in vitro* secretion and cellular localization of TvCP2 was determined. The role of TvCP2 in parasite cytotoxicity was also analysed. These results could help explain its presence and function during

infection when exposed to iron variations throughout the menstrual cycle.

To determine the effect of iron on the expression of *tvcp2*, we designed specific primers (Supplementary Fig. S1A) and performed an RT-PCR assay of the *tvcp2* gene using cDNA synthesized from DNase I-treated total RNA obtained from parasites grown under IR and HI conditions using trizol. RT-PCR results showed more *tvcp2* transcripts in the IR condition than in the HI condition (Fig. 2A), which was confirmed by a densitometry analysis (Fig. 2B). As a positive control, the *tvcp2* gene was amplified from genomic DNA, and β -tubulin mRNA was used as a loading control. DNase I-treated RNA as a template (no RT reaction) and a PCR reaction without DNA template were used as negative controls, which did not show any amplification (Fig. 2A, lanes 4 and 5).

To determine the effect of iron on TvCP2 protein expression, WB assays using TPEs from parasites grown in IR and HI conditions were performed. The anti-TvCP2r antibody recognized a 27 kDa protein band with greater intensity in parasites grown in IR conditions than in those grown under HI conditions (Fig. 2C and D). The anti-TvPFO50r antibody detected a 120 kDa PFO protein (used as a control for an iron-upregulated protein, PFO) (Meza-Cervantes *et al.*, 2011) with greater intensity in the HI condition than in the IR condition. The anti-EhHKr antibody [obtained against a recombinant hexokinase (EhHKr) from *E. histolytica* that recognizes Tv hexokinase (TvHK), which is a cytoplasmic protein that is not secreted *in vitro* and does not change under different iron conditions] detected a 43 kDa TvHK protein band with similar intensity in both iron conditions, which was used as a loading control. The PI serum used as a negative control showed no recognition, as expected (Fig. 2C and D). Also, WB assays using protein extracts prepared in the absence of protease inhibitors (PREs) from trichomonads grown under different iron conditions (Fig. 2E and F) were performed. The anti-TvCP2r antibody also detected a 27 kDa protein band with greater intensity in the IR condition than in the HI condition, compared with the recognition observed by the anti-TvLEGU-1r antibody (TvLEGU-1 is an asparaginyl endopeptidase that does not change under different iron conditions), a protein that was used as a loading control for PREs. The PI serum did not show any reactivity (Fig. 2E and F).

To corroborate that TvCP2 was present in Tv (+) vaginal secretions due to active secretion by live parasites under different iron concentrations, *in vitro* secretion assays under IR and HI conditions, WB assays using the anti-TvCP2r antibody and MS analysis to confirm the presence of TvCP2 were also performed. Parasite viability assessed during the *in vitro* secretion assay was 98 and 99% under IR and HI conditions, respectively. Figure 2G shows the presence of TvCP2 in the excretion products/SPs of live parasites, mainly under IR conditions, as supported by a densitometric analysis (Fig. 2H). Four peptides of the TVAG_057000 gene product were identified by MS, giving a 17% sequence coverage (Supplementary Fig. S1C). These data confirm the secretion of TvCP2 by metabolically active parasites mainly under IR conditions.

Localization of TvCP2

To determine whether iron modulates the subcellular localization of TvCP2, an IFA using the anti-TvCP2r antibody and fixed and non-permeabilized or permeabilized parasites grown under different iron conditions were performed and analysed by confocal microscopy. Figure 3 shows a higher TvCP2 fluorescence signal (in green) in IR than in HI parasites (Fig. 3A and B, panels d and i). TvCP2 was detected in spots on the surface of non-permeabilized parasite that co-localized (in yellow)

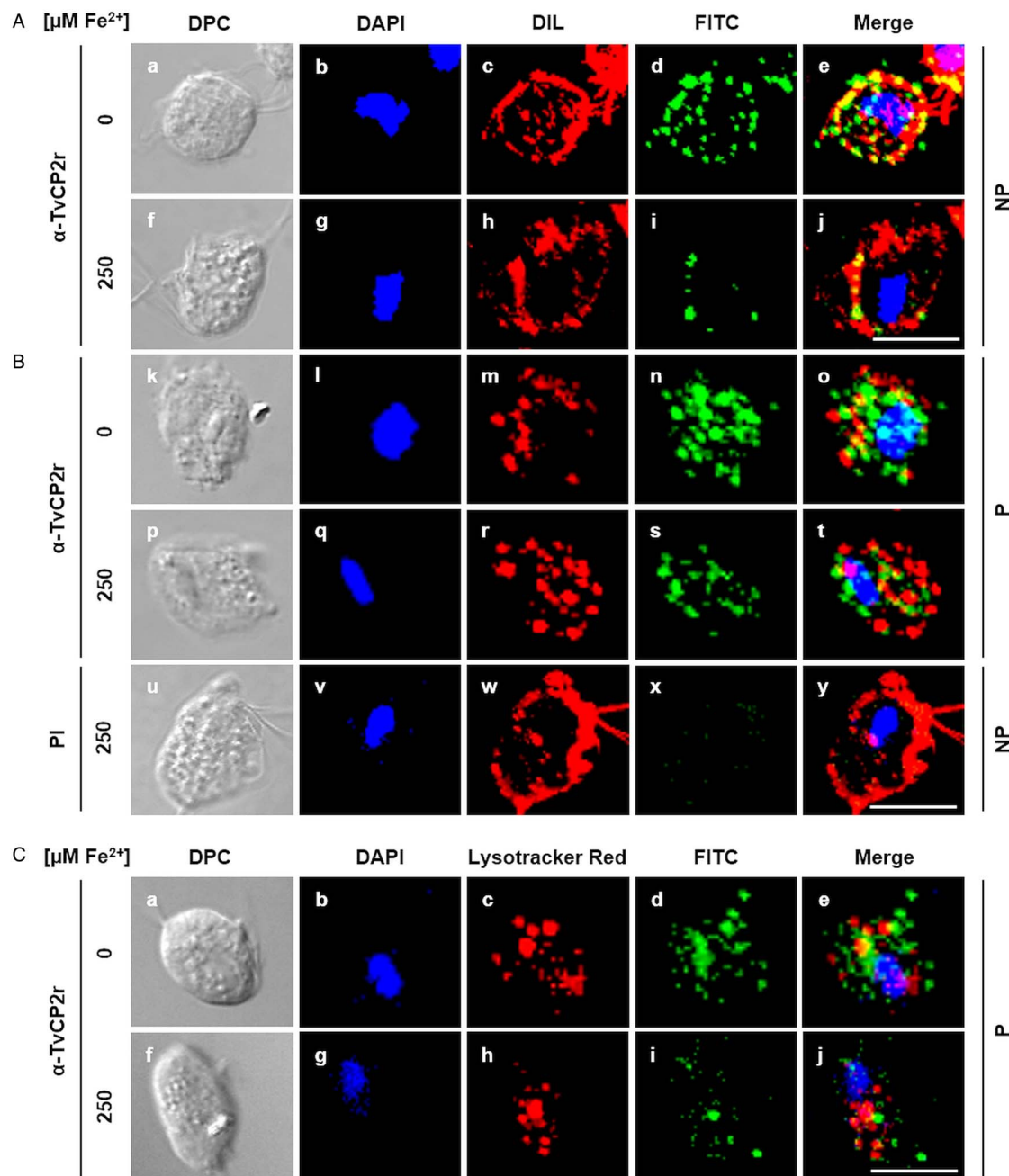


Fig. 3. TvCP2 is localized in spots on the parasite surface and in cytoplasmic vacuoles of *T. vaginalis* under different iron concentrations. (A and B) IFA of non-permeabilized (NP) and permeabilized (P) parasites, respectively, incubated with the anti-TvCP2r antibody followed by FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (in green). Differential phase contrast (DPC; a, f, k and p) images of parasites grown under IR (0 μ M) and HI (250 μ M) conditions; nuclei stained with DAPI (in blue; b, g, l and q); parasites labelled with DIL (in red; c, h, m and r) as a membrane marker; TvCP2 (labelled with FITC; in green; d, i, n and s) staining of parasites incubated with the anti-TvCP2r antibody (1:100 dilution) and a FITC-conjugated secondary antibody (1:100 dilution); merge of the co-localization of TvCP2 with membrane marker (in yellow; e, j, o and t). Pre-immune (PI) serum was used as a negative control representative of all experiments (panels u–y), using non-permeabilized parasites. The slides were observed at 63 \times magnification by confocal microscopy (Zeiss) 3D maximum projection. Scale bar = 10 μ m. (C) Localization of TvCP2 in lysosomes was performed using parasites incubated with LysoTracker (in red; c and h), fixed and permeabilized with Triton X-100 and incubated with the anti-TvCP2r antibody as in (B) (in green; d and i) (merge; e and j). The scant co-localization of TvCP2 with lysosomes (in yellow; e). Nuclei were stained with DAPI (in blue; b and g). The slides were observed at 63 \times magnification by confocal microscopy (Zeiss) 3D maximum projection. Differential phase contrast (DPC; a and f) images of parasites grown under IR and HI conditions. Scale bar = 10 μ m.

with the membrane marker DIL (in red) with a Pearson's correlation coefficient of $r = 0.76$ (Fig. 3A, panels e and j), supporting a surface localization of TvCP2. TvCP2 was also detected in cytoplasmic spots in permeabilized parasites that could correspond to lysosomes and/or secretory vesicles (Fig. 3B, panels n, o, s and t). The PI serum exhibited no reaction (Fig. 3B). To corroborate whether TvCP2 may also have a lysosomal localization in the parasite, an assay using live parasites incubated with LysoTracker Red before IFA with the anti-TvCP2r antibody

(in green) was performed. Figure 3C shows the presence of lysosomes (in red; panels c and h). However, the co-localization of both labels was observed only in few spots (in yellow; panel e), suggesting that TvCP2 may also be present in some lysosomes. Nevertheless, the co-localization analysis reported a Pearson's correlation coefficient of $r = 0.46$, suggesting a minor lysosomal localization of TvCP2 (Fig. 3C, panels e and j). Thus, some of the TvCP2 spots could correspond to secretory vacuoles.

TvCP2 could be a protease targeted by TC-3

We recently determined that an endogenous CP inhibitor, trichocystatin 3 (TC-3), interacts with and inhibits the proteolytic activity of several trichomonad CPs, thereby reducing cellular damage (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018). We aimed to evaluate whether TvCP2 is another CP target for TC-3 using a similar approach. Thus, a pull-down assay was performed as reported by Sánchez-Rodríguez *et al.* (2018) using TC-3r as bait protein and trichomonad extract as a source of TvCP2. The TC-3r-bound proteins were eluted and analysed by SDS-PAGE and WB assays. An eluted 30 kDa very weak protein band was detected in CBB-stained gels. Besides, a prominent 14.2 kDa protein band that corresponds to TC-3r, used as an anchor, was also eluted (Fig. 4A, lane 2). Finally, to detect whether the TvCP2 protease was present in the eluted fraction, we performed a WB assay using the anti-TvCP2r antibody and an anti-TvTIMr antibody (Miranda-Ozuna *et al.*, 2016) and PI serum as negative controls. The eluted TC-3r pull-down and CPE showed the presence of the ~27 kDa TvCP2 band that corresponds to the molecular mass of the mature protease (Fig. 4B). As expected, neither the PI serum nor the anti-TvTIMr antibody used as negative controls showed any recognition in the eluted fraction from the TC-3 pull-down assay. Similarly, the anti-TvTIMr antibody detected a protein band only in the control CPE. The HSP70r and BSA proteins were used as control bait proteins (as an unrelated and negative control protein, respectively; Figure 4A). The HSP70r pull-down assay showed very weak protein bands at ~56–65 kDa in the CBB-stained gel (Fig. 4A). However, the WB did not show recognition by the anti-TvCP2r antibody (Fig. 4B). Similarly, the BSA pull-down assay did not show any band in the gel (Fig. 4A), and by WB, there was no recognition (Fig. 4B), showing that the TC-3r/TvCP2 interaction was specific. These data show that TvCP2 could be one of the CPs targeted by TC-3 in *T. vaginalis*.

Limited co-localization of TC-3 with TvCP2 in *T. vaginalis*

To verify whether the binding of the TC-3 inhibitor with TvCP2 identified by pull-down and WB assays occurs in the same cellular compartment of *T. vaginalis*, co-localization of IFA of TC-3 with TvCP2 were performed. First, we determined the localization of TvCP2 in non-permeabilized CNCD280 Tv isolate (a type 1 isolate). The TvCP2 protease (Fig. 4C, panel c; green label) was detected on the plasma membrane (Fig. 4C, panel b; red label) as prominent spots in non-permeabilized parasites (Fig. 4C, panel d; yellow label). The negative control did not show any green label, as expected (Fig. 4C, panels g and h). In permeabilized Tv, immunofluorescence showed a punctate pattern of TvCP2 distribution throughout the cell, compatible with vesicular localization (Fig. 4D, panel b; red label) consistent with ultrastructural data (Fig. 4E, panels b–e). The subcellular localization of TvCP2 in the whole parasite is shown as a specificity control (Fig. 4E, panel b). TvCP2 accumulates mainly in vesicles and close to the parasite surface. The negative control did not show any gold particles, as expected (Fig. 4E, panel a). Figure 4D immunofluorescence merge images revealed limited co-localization of TvCP2 (panel b, red label) and TC-3 (panel c, green label) at both in an area close to the nucleus and in some puncta (panel d, yellow label, white arrowheads). The organelles where TvCP2 and TC-3 may co-localize were subsequently identified by immune gold labelling as in vesicles and on the parasite surface by electron microscopy (TEM; Figure 4F), but the frequency of co-localization was minimal. For example, TvCP2 was frequently observed in TC-3-free vesicles and TC-3 in TvCP2-free vesicles (Fig. 4F, panel e). Although both molecules were also found in the organelle – Golgi complex – these were

not in close proximity (Fig. 4F, panel f), suggesting that these two molecules do not interact in the Golgi complex either; instead, both molecules may undergo glycosylation and follow the classical secretory pathway. Occasionally, the TvCP2 and TC-3 molecules were observed in close proximity (Fig. 4F, panels g–i) in some vesicles and on the parasite surface. The negative control did not show any gold particles (Fig. 4F, panels a–d). Thus, these data suggest that the TvCP2 protease has a limited interaction with TC-3 at these parasite compartments (vacuoles and parasite surface). Thus, our data could not confirm the co-localization of TvCP2 with TC-3 in the parasite. However, these results could also suggest the TvCP2 is not the main CP targeted by TC-3, but could also suggest that TvCP2 may be interacting with any of the two trichocystatin inhibitors of trichomonads, such as TC-1 or TC-2 (Carlton *et al.*, 2007).

TvCP2 plays a key role in trichomonal cytotoxicity and apoptosis induction in HeLa cell monolayers

To investigate the role of TvCP2 on trichomonal cytotoxicity under the influence of iron, the effect of iron on the levels of trichomonal cytotoxicity in HeLa cell monolayers was first examined. Parasites grown under IR conditions were more cytotoxic than those grown under HI conditions (Fig. 5A). To determine whether TvCP2 is involved in trichomonal cytotoxicity towards HeLa cell monolayers modulated by IR conditions, live IR parasites were pretreated with increasing concentrations (0–300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of purified anti-TvCP2r IgGs or with PI serum IgGs used as a negative control. The anti-TvCP2r antibody showed a protective effect on HeLa cell monolayers by reducing cytotoxicity levels by up to 40% (Fig. 5B). The PI serum-pretreated parasites destroyed the HeLa cell monolayers as the untreated parasites did. These data showed that the interaction of live parasites with the anti-TvCP2 antibody reduced the TvCP2-dependent trichomonal cytotoxicity under IR conditions.

To further confirm the role played by TvCP2 in the HeLa cell damage triggered by *T. vaginalis*, three different apoptosis inhibition assays were performed. Two of them, through DNA fragmentation assays assessed by a TUNEL assay and by DNA laddering observed by agarose gel electrophoresis using the highest concentration of anti-TvCP2 IgGs in the cytotoxicity inhibition assays (Fig. 5B). Figure 5C and D and Supplementary Fig. S5 (lanes 1 and 4) show the lack of TUNEL reaction (no green label) and the control of high molecular size bands, respectively, that correspond to HeLa cells and trichomonad genomic DNA, as indicative of DNA integrity before the host–parasite interaction. The induction of apoptosis (as a positive control of DNA degradation) was achieved by the treatment of both cell types with 5% H_2O_2 for 30 and 60 min at 37°C (Singh *et al.*, 2007) and the fragmentation/degradation of both genomic DNAs was observed. In HeLa cells and trichomonads after H_2O_2 treatment, DNA fragmentation was observed as a TUNEL-positive reaction (green label; Supplementary Fig. S4). These results were supported by the DNA degradation observed in the agarose gel as a reduction of the genomic DNA band and as smears mainly in the Tv gDNA (Supplementary Fig. S5, lanes 2, 3, 5, 6). Analysis of the genomic DNA after parasite–host cell interaction showed DNA fragmentation detected by a TUNEL positive reaction (green label; Fig. 5C and D) and DNA degradation detected by a reduction of the high molecular size DNA band and an enrichment of a lower size DNA band (Supplementary Fig. S5, lane 7) compared with the control DNAs (Supplementary Fig. S5, lanes 1 and 4). However, after the interaction of anti-TvCP2r IgG-pretreated parasites with HeLa cell monolayers, the lack of TUNEL reaction (no green label; Fig. 5C and D) and a certain degree of protection of the

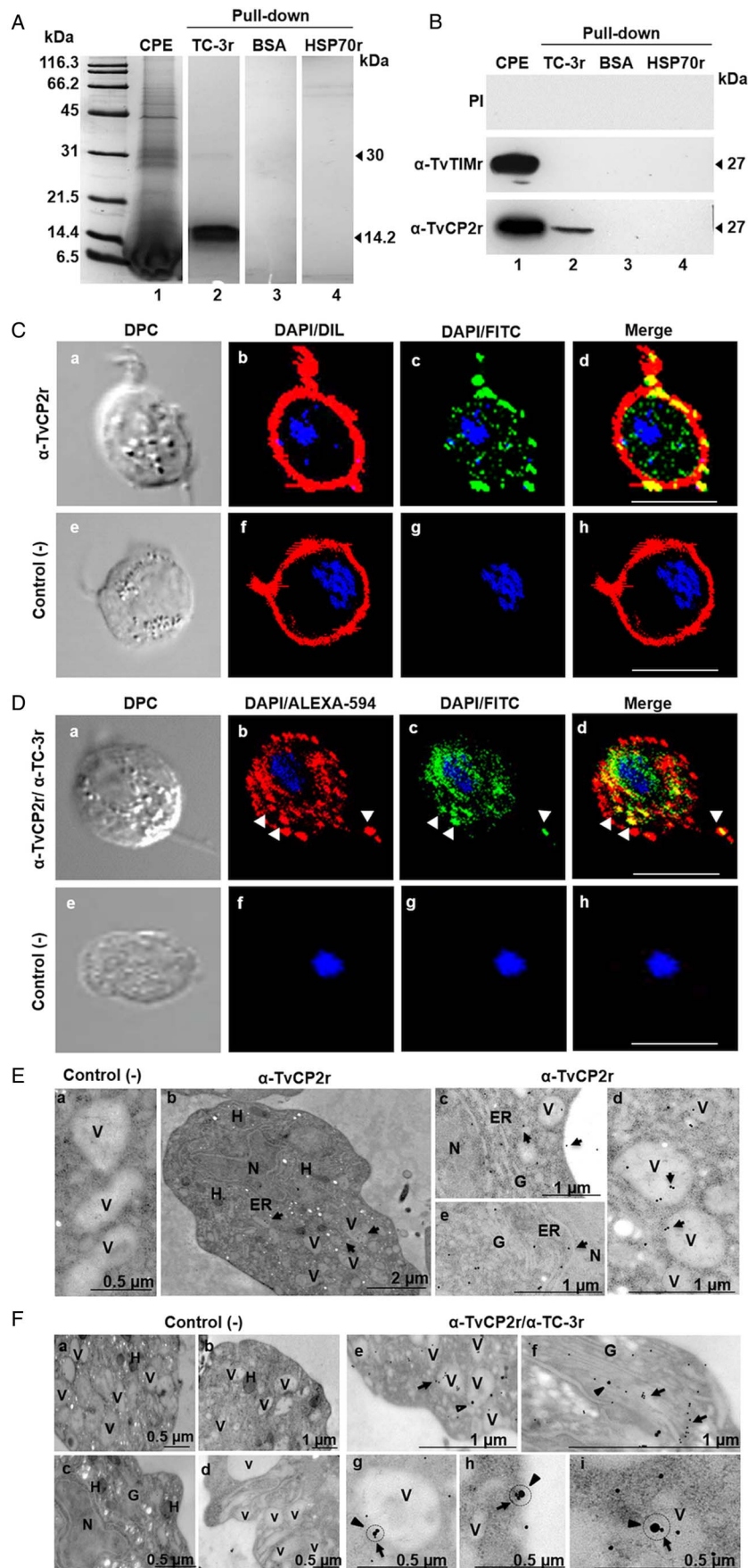


Fig. 4. TvCP2 could be targeted by TC-3r in *T. vaginalis*. (A) Pull-down assay with TC-3r; CBB-stained gel. Lane 1, a clarified protein extract (CPE) from the CNCD280 *Tv* isolate; lane 2, elution fraction using TC-3r as bait protein; lanes 3–4, elution fractions using BSA or HSP70r as control bait proteins, respectively. (B) Western-blot assay using duplicate samples from (A). Lane 1, CPE; lanes 2–4, elution fractions after a pull-down assay with TC-3r, BSA and HSP70r, respectively. For WB, the following antibodies were tested: PI serum, anti-TvTIMr and anti-TvCP2r. (C) Confocal microscopy analysis of TvCP2 localization using a rabbit anti-TvCP2r antibody, a preimmune serum used as a negative control, and a FITC-labelled secondary antibody (in green; panels c, d, g and h), DIL (panels b, d, f and h; in red) as a membrane marker, and DAPI (panels b–d; panels f–h; in blue) as a nucleus marker. Merged (panels d and h) and DPC (panels a and e). (D) Co-localization analysis by indirect immunofluorescence assays and confocal microscopy using rabbit anti-TvCP2r and mouse anti-TC-3r as primary antibodies. Alexa Fluor-594-labelled (in red, panels b, d, f and h) secondary antibody for TvCP2 and FITC-labelled secondary antibody for TC-3 (in green, panels c, g, d and h). Merged (panels d and h) and DPC (panels a and e). White arrowheads point to discrete areas of each label alone (panels b and c) and in co-localization (yellow label; panel d). The slides were observed at 63 \times magnification by confocal microscopy (Zeiss). Scale bar = 10 μ m. (E) TEM immunogold labelling with a rabbit anti-TvCP2r antibody and a 20 nm gold particle secondary antibody. Panel a, the secondary antibody alone was used as a negative control (-) for TEM immunolocalization assays. Panel b shows the subcellular localization of TvCP2 in the whole parasite, as a specificity control. (F) Co-localization by TEM with immunogold labelling for mouse anti-TC-3r (30 nm particle) and rabbit anti-TvCP2r (15 nm particle) as primary antibodies were analysed according to the method described by Pastorek *et al.* (2016). Panels a–d are images using both secondary antibodies alone as negative controls for TEM immunoco-localization assays. Panel e shows localization of TvCP2 in TC-3-free vacuoles and of TC-3 in TvCP2-free vacuoles. Panel f shows localization of both molecules in the Golgi complex, but not in close proximity. Panels g–i (black circle) show co-localization (close proximity) of TC-3 and TvCP2 labels on the vacuole membrane and on the plasma membrane. Subcellular compartments observed in panels E and F by TEM: N, nucleus; H, hydrogenosome; V, vacuoles; ER, endoplasmic reticulum, G, Golgi complex; black arrow in Fig. 4E, panel c indicates plasma membrane; black circles in Fig. 4F, panels g–i indicate co-localization between TC-3 and TvCP2. Black arrows in Fig. 4E, panels b–e and Fig. 4F, panels e–i indicate the compartments where the TvCP2 label is concentrated. Black arrowheads in Fig. 4F panels e–i indicate the compartments where the TC-3 label is observed.

genomic DNA integrity was observed (Supplementary Fig. S5, lane 9) compared with the interactions with PI serum IgG-pre-treated parasites (Fig. 5C and D; Supplementary Fig. S5, lane 8) used as a control.

Additionally, an apoptosis inhibition assay followed by the Annexin V-FITC method in the presence of the anti-TvCP2r or PI serum IgGs was performed. Apoptosis induction in HeLa cell monolayers by IR parasites (used as a positive control) showed a

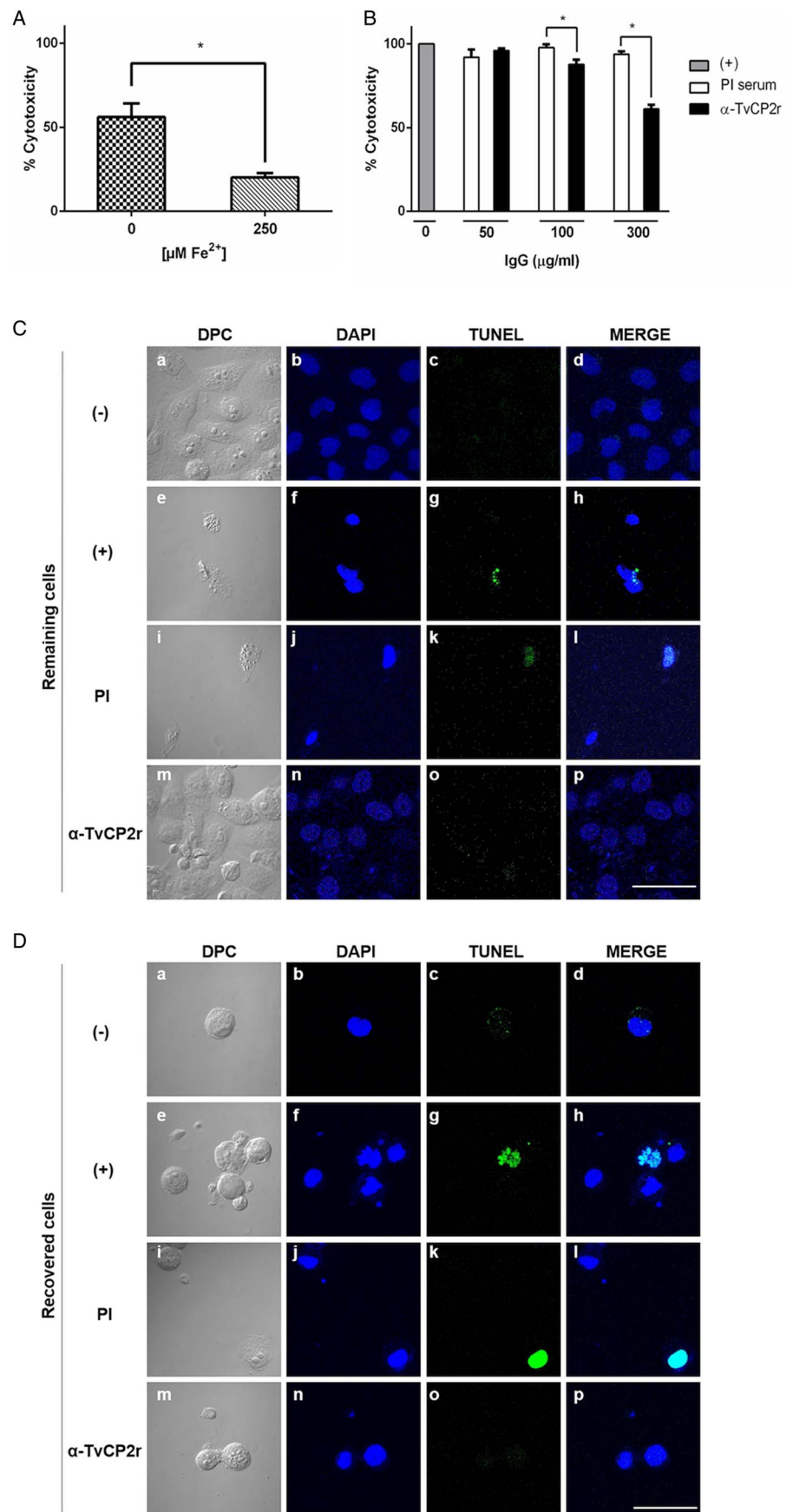


Fig. 5. TvCP2 participates in cellular damage to HeLa cells through apoptosis induction detected as DNA fragmentation by TUNEL assay. (A) Cytotoxicity assays were performed using 2×10^5 live parasites grown under IR (0 μM) and HI (250 μM) conditions. (B) Cytotoxicity inhibition assays were done using 2×10^5 live parasites grown under IR conditions and pretreated with increasing concentrations of purified IgGs of the anti-TvCP2r antibody or preimmune (PI) serum, followed by interaction with HeLa cell monolayers (3.5×10^4 well⁻¹). As a negative control (-), HeLa cell monolayers without parasites were used. As a positive control (+), HeLa cell monolayers with parasites grown under IR conditions without antibody pretreatment were used, and their level of destruction was set as 100% cytotoxicity. Each point in the bar represents the mean of the percentage of the destruction of the HeLa cell monolayer for representative experiments with triplicate samples (panel B). (C and D) TUNEL assay was performed after the interaction of HeLa cells with trichomonads as previously described in (B). Inhibition of apoptosis induction detected by TUNEL was performed with live parasites pretreated with 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of anti-TvCP2 purified IgGs. Parasites pretreated with the same amount of IgGs purified from preimmune (PI) serum were used as a negative control for the inhibition assays. HeLa cell monolayer without treatment was used as a negative control. HeLa cell monolayers incubated with live parasites were used as a positive control. After the interaction, the remaining cells attached to the coverslips (C) and released into the culture medium (D) were incubated with TdT transferase and the fluorescein-labelled nucleotide mix, as recommended by the manufacturer, and observed by confocal microscopy (Zeiss). (C and D) Differential Phase Contrast (DPC; panels a, e, i and m), DAPI (in blue, panels b, f, j and n), fluorescent TUNEL label (in green, panels c, g, k and o) and merge (panels d, h, l and p). These experiments were performed at least two independent times with similar results. The slides were observed at 63 \times magnification by confocal microscopy (Zeiss) 3D maximum projection. Scale bar = 20 μm .

strong Annexin V (in green) fluorescence intensity and extensive cytotoxic damage of HeLa cell monolayers compared to the lack of Annexin V fluorescent signal in the negative control of HeLa cell monolayers (Supplementary Fig. S6A). The cytotoxic damage

of the HeLa cell monolayer and the fluorescence intensity of Annexin V were reduced (up to $46.6 \pm 2.2\%$) by the anti-TvCP2r IgGs, but not by the PI serum IgG ($81 \pm 11.1\%$) (Supplementary Fig. S6B) and these differences were significant ($P < 0.05$).

Thus, all together these data support the participation of TvCP2 in trichomonal cytotoxicity due to apoptosis induction as a cell death mechanism in HeLa cell monolayers, as previously suggested (Sommer *et al.*, 2005; Kummer *et al.*, 2008) that occurred in parasite grown under different starvation conditions such as putrescine (Carvajal-Gómez *et al.*, 2014), zinc (Puente-Rivera *et al.*, 2017), glucose (Miranda-Ozuna *et al.*, 2019) and iron, as shown in this work.

Discussion

Iron is an essential nutrient for *T. vaginalis*. Similar to other amitochondriate protozoa, such as *E. histolytica* and *Giardia lamblia*, iron is necessary for high amounts (50–300 μM) for parasite metabolism, multiplication and survival that results in competition for iron between the pathogen and host during the infection (Lehker and Alderete, 1992; Ortíz-Estrada *et al.*, 2015). Like glucose, the scarcity of iron is a metabolic stress that induces the activation of survival mechanisms and acts as a regulator of virulence factors such as CPs and other metabolic enzymes (Figueroa-Angulo *et al.*, 2012; Arroyo *et al.*, 2015). Also, an iron-responsive promoter-dependent transcriptional iron regulatory mechanism and an iron-responsive element/iron regulatory protein-like (IRE/IRP-like) system that participate in a post-transcriptional mechanism mediated by iron have been identified in this parasite (Tsai *et al.*, 2002; Solano-González *et al.*, 2007; Torres-Romero and Arroyo, 2009; Figueroa-Angulo *et al.*, 2015), indicating that fluctuations in iron concentrations also play a crucial role in the regulation of gene expression in *T. vaginalis*, as previously shown at the transcriptomic level (Horváthová *et al.*, 2012).

Trichomonas vaginalis is a parasitic protozoan with a complex active degradome due to its high proteolytic activity that includes the activities of cathepsin-L-like and legumain-like CPs (Ramón-Luing *et al.*, 2010). Some of these CPs were identified as part of the trichomonad immunoproteome detected by trichomoniasis patient sera (TvCP2, TvCP4, TvCP39) (Ramón-Luing *et al.*, 2010), suggesting their presence and participation during infection in the host–parasite interaction (CP30 and TvCP39) (Sommer *et al.*, 2005; Kummer *et al.*, 2008; Ramón-Luing *et al.*, 2011). However, the role of some of these CPs, such as TvCP2, during infection has not been characterized.

Thus, the goals of this work were as follows: (1) to demonstrate that TvCP2 is immunogenic and that is present in vaginal secretions of patients with trichomoniasis, as a meaning of its expression during infection and (2) to assess the effect of iron on TvCP2 expression, localization and participation in trichomonal cytotoxicity. In this work, we demonstrated the presence of TvCP2 in vaginal secretions, confirmed its immunogenicity and suggested that TvCP2 could be a protease targeted by the TC-3 inhibitor, which could regulate its proteolytic activity at the post-translational level, as has been reported for TC-2 and TvCP39 (Puente-Rivera *et al.*, 2014). Further, the effect of iron on the expression and localization of TvCP2 and its role in cellular damage was determined.

Our results demonstrated that TvCP2 protein is expressed, processed to the mature form and triggers an immunological response in Tv-infected people, since anti-TvCP2 antibodies were found in sera from Tv (+) patients (Fig. 1B). These data are consistent with the Tv immunoproteome analysis (Ramón-Luing *et al.*, 2010), suggesting that TvCP2 could be a putative biomarker of trichomoniasis. TvCP2 is also released during trichomonal infection as the mature form, since a 27 kDa TvCP2 protein band was found in vaginal fluids from Tv (+) patients (Fig. 1C; Supplementary Fig. S1B). These results are consistent with previous reports that showed active *in vitro* and *in*

vivo secretion of CPs by the parasite and the presence of some trichomonad CPs of the 30 kDa region in vaginal secretions (Neale and Alderete, 1990; Mendoza-López *et al.*, 2000; Hernández-Gutiérrez *et al.*, 2003, 2004; Ramón-Luing *et al.*, 2011). Moreover, mature TvCP2 is released in SPs by metabolically active parasites under different iron conditions *in vitro* (Fig. 2G).

Our results also suggest a possible vesicular secretory pathway for the secretion of TvCP2 since TvCP2 shows cytoplasmic vacuolar localization that most of them do not correspond to lysosomes (Fig. 3). Thus, the punctate fluorescent staining could correspond to autophagy or secretion vesicles that follow a secretory pathway to reach the parasite membrane and subsequent secretion. However, the secretion pathway of TvCP2 is still unknown. Further studies are necessary to elucidate the TvCP2 secretory pathway. Thus, the presence of TvCP2 in Tv (+) VWs (Fig. 1) could be due to active secretion during infection that occurs under different iron conditions (Fig. 2), as well as under glucose starvation, as we recently described (Miranda-Ozuna *et al.*, 2019), suggesting that several host components could regulate trichomonad gene expression, in particular TvCP2 and other CPs, which may be closely regulated by fluctuations in iron and glucose concentrations during the menstrual cycle (Figueroa-Angulo *et al.*, 2012; Miranda-Ozuna *et al.*, 2019). These responses allow the parasite to adapt to the changing environment and survive during periods of nutrient scarcity in the host to maintain the infection (Torres-Romero and Arroyo, 2009). These results are consistent with previous reports on the analysis of the Tv immunoproteome, in which TvCP2 was one of the spots detected by Tv (+) patient sera (Ramón-Luing *et al.*, 2010), rendering it as a putative biomarker for immunodiagnosis.

Additionally, TvCP2 was downregulated by iron at the mRNA and protein levels, in its localization (Figs 2 and 3), and at the functional level. Furthermore, iron also played an important role in trichomonal cytotoxicity through apoptosis induction in HeLa cell monolayers under IR conditions (Fig. 5; Supplementary Figs S4–S6). These results are consistent with previous reports (Sommer *et al.*, 2005; Kummer *et al.*, 2008) and like the previously reported iron downregulation of TvCP12 and TvCP65 at the transcript and protein levels. These CPs also participate in cellular destruction (León-Sicairos *et al.*, 2004; Alvarez-Sánchez *et al.*, 2007; our unpublished results). However, it is interesting to notice that TvCP2 is one of the molecules downregulated by iron and, despite that, participates in cellular damage. These data are contrasting with those previously reported by Ryu *et al.* (2001), in which cytotoxicity increased under high iron conditions and during menstruation. However, it is important to notice that the parasite activates some CPs under nutrient starvation. The parasite became more aggressive under iron restriction to be able to acquire iron from epithelial cells. Indeed, our results showed that it is under IR microenvironmental conditions when TvCP2 participates in cellular damage mediated by apoptosis induction. These results are consistent with those previously reported by Kummer *et al.* (2008), in which TvCP2 is part of the CP30 *in vitro* secretory products from parasites under IR conditions.

Moreover, the *tvcp2* iron-mediated downregulation shown in our work (Fig. 2A) is consistent with the transcriptomic analysis reported in parasites under IR and HI conditions (Horváthová *et al.*, 2012). However, the mechanism underlying the iron-mediated downregulation of *tvcp2* gene expression remains unknown. Thus, it is important to elucidate how the iron regulatory mechanism occurs, which may help to understand the adaptation and pathogenicity of the parasite under nutrient starvation in the vaginal microenvironment during the menstrual cycle.

Interestingly, regulation of TvCP2-active cytotoxic activity may be carried out, in part by TC-3, a surface endogenous CP

inhibitor of TvCP2, which has been shown to inhibit several CPs (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018). Indeed, pull-down assays showed the interaction of TC-3r and TvCP2 (Fig. 4A and B) and co-localization assays by IFA and immunogold localization by TEM (Fig. 4D and F) showed the presence of limited co-localization events of TC-3r and TvCP2 in cytoplasm vacuoles, and on the parasite surface (Fig. 4F, panels g–i), which may also help to control the contribution of TvCP2 to cellular damage. Nevertheless, the co-localization detected between both molecules was limited and insufficient to support a putative interaction detected by using immunoco-localization assays, as described here (Fig. 4D and F). This could be because the parasite requires the protease in an active form and not tightly regulated in these cellular compartments. Moreover, TvCP2 could not be the main protease targeted by TC-3 inhibitor, or that TvCP2 protease is associated with another trichomonad CP inhibitor, as was previously reported for TvCP39 and TC-2 (Puente-Rivera *et al.*, 2014). Further studies will help to elucidate the nature of the molecular and biological interaction between these molecules of *T. vaginalis*. These data did show that TvCP2 localization was similar in the two types of Tv isolates used here (Conrad *et al.*, 2012).

Moreover, the participation of TC-3 in modulating the trichomonad cytotoxicity effect on HeLa cell monolayers (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018) shows that TC-3r exhibits inhibitory activity over certain cytotoxic CPs located on the parasite surface and plays a role in the post-translational regulation of this virulence property (Alvarez-Sánchez *et al.*, 2000, 2007; Hernández-Gutiérrez *et al.*, 2003, 2004; Ramón-Luing *et al.*, 2011; Arroyo *et al.*, 2015). Our results then support the participation of TvCP2 that together with TvCP39, TvCP12, TvCP65 and TvCP3 in trichomonad cytotoxicity, since the TC-3/CP interaction occurs on the parasite surface (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018), which is similar to the interaction of these cytotoxic CPs with TC-2r, another endogenous CP inhibitor of *T. vaginalis* (Puente-Rivera *et al.*, 2014).

The results obtained in this work regarding the cytotoxicity and apoptosis inhibition assays using the anti-TvCP2r antibody confirmed that TvCP2 is used by trichomonads to induce cellular destruction, damage to DNA and cell death of the HeLa cell monolayers also under iron starvation conditions (Fig. 5; Supplementary Figs S4–S6). However, Tv cellular damage under IR conditions is not as drastic as the monolayer destruction observed using parasites cultured under glucose-restricted conditions (Miranda-Ozuna *et al.*, 2019), suggesting that the effect of iron starvation differentially regulates the participation and the effect of the distinct trichomonad factors involved in the cytotoxic mechanisms, such as porins, phospholipase A, a cell detaching factor (Petrin *et al.*, 1998; Fiori *et al.*, 1999; Lubick and Burgess, 2004). Thus, further studies are necessary to elucidate the mechanisms of apoptosis induction by TvCP2 related to iron and glucose starvation.

In conclusion, in this study, we determined that iron downregulates TvCP2, a cysteine protease present in vaginal secretions from patients with active infection. This *T. vaginalis* protease plays a key role in trichomonad cytotoxicity by the induction of apoptosis in HeLa cell monolayers. Additionally, TvCP2 could also be post-translationally regulated by TC-3, a surface endogenous CP inhibitor in this protist parasite.

Supplementary material. The supplementary material for this article can be found at <https://doi.org/10.1017/S0031182020000438>.

Acknowledgements. We thank Leticia Avila-González for her technical support with parasite culture maintenance, Manuel Flores-Cano for their help in handling the rabbits and mice to produce the polyclonal antibodies used in this work, Claudia Ivonne Flores-Pucheta for purification of the recombinant TvCP2 protein for antibody production, Martha G. Aguilar-

Romero for her technical assistance and Guadalupe Ortega-Pierres for her critical comments to the manuscript. We would also thank Claudia Ángel-Ortiz, Diana Rodríguez-Clemente and Alma Pérez-Sevilla for their support in enrolling and obtaining the biological samples of patients with vaginitis attending the Unidad de Medicina Preventiva at the Hospital General de México 'Eduardo Liceaga'.

Financial support. This research was partially supported by CINVESTAV-IPN and by grants 162123 and 153093 (to R.A.) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), grant SEP-CINVESTAV 074 (to R.A.), and grant INFR-2016 269657 (to J.O.L.) from CONACYT, México. This work is one of the requirements to obtain a Ph.D. degree in Postgrado en Infectómica y Patogénesis Molecular (DIPM-CINVESTAV-IPN) for Luis Alberto Rivera Rivas who was supported by a Ph.D. scholarship (338864) from CONACYT. S.L.B. was supported by an M.Sc. scholarship (234121) from CONACYT. D.B.S.R. was supported by a Ph.D. scholarship (243457).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

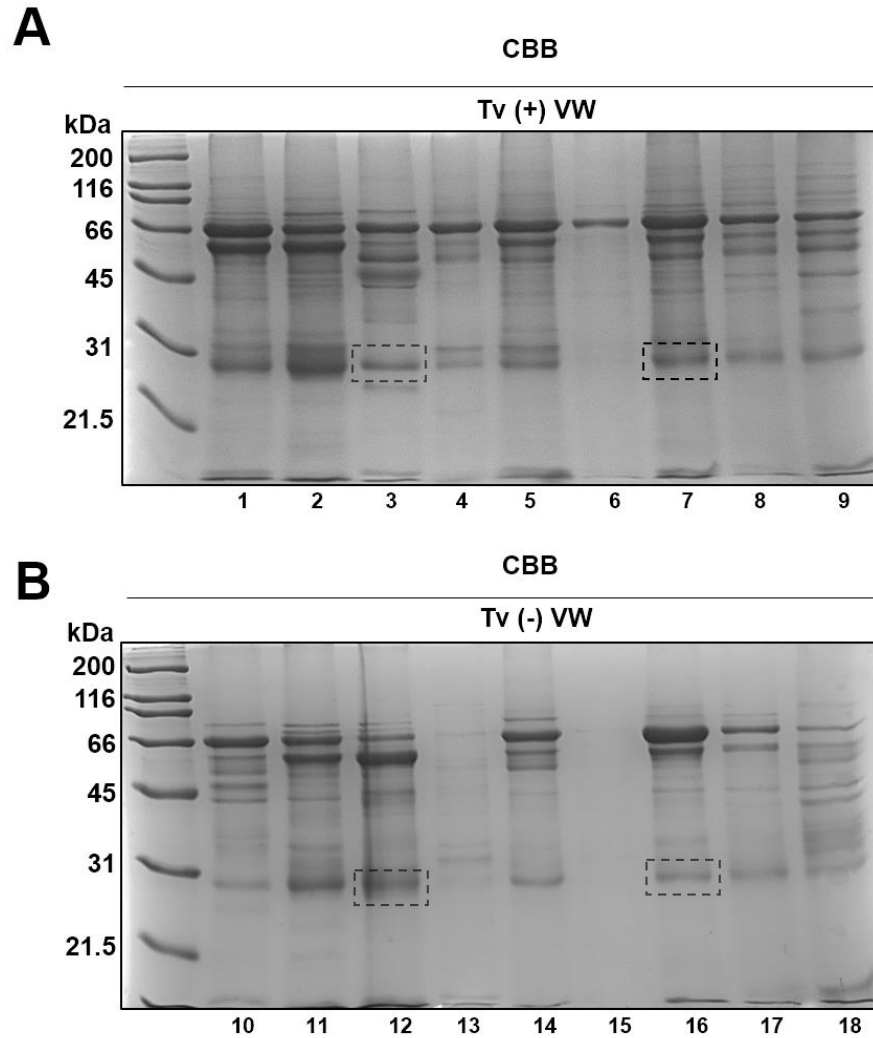
Ethical standards. Each patient who participated in this study signed an informed consent form included in a protocol approved by the HGM scientific and ethical committees (Protocol No. DI/14/204/03/010).

References

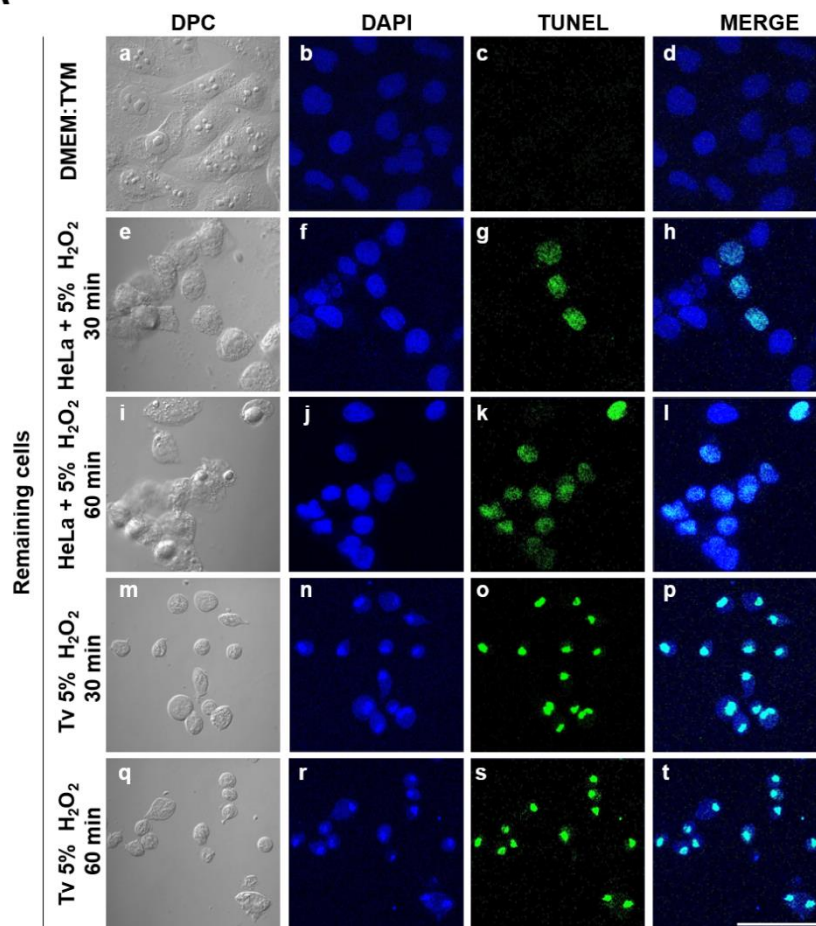
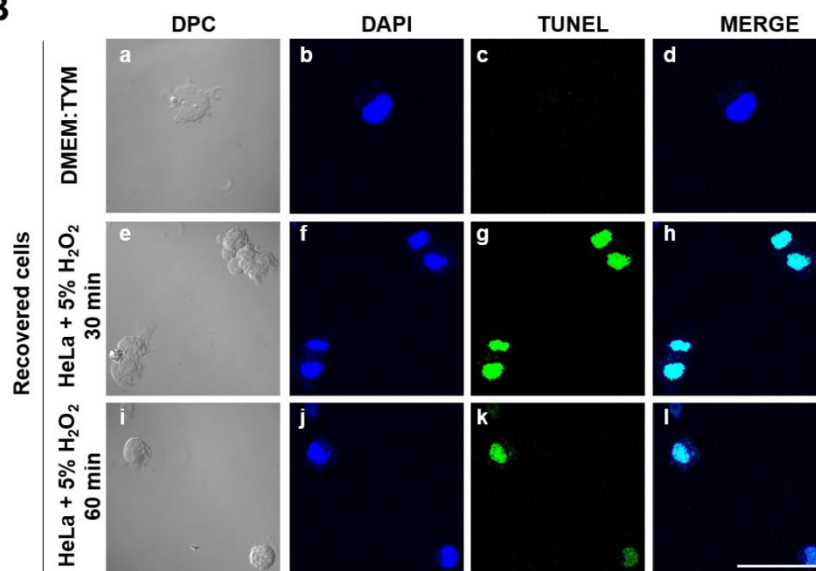
- Adler J and Parmryd I (2010) Quantifying colocalization by correlation: the Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient. *Cytometry Part A*, 77, 732–742. doi: 10.1002/cyto.a.20896.
- Alderete JF, Provenzano D and Lehker MW (1995) Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. *Microbial Pathogens* 19, 93–103.
- Alvarez-Sánchez ME, Ávila-González L, Becerril-García C, Fattel-Facenda IV, Ortega-López J and Arroyo R (2000) A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microbial Pathogens* 28, 193–202.
- Alvarez-Sánchez ME, Solano-González E, Yáñez-Gómez C and Arroyo R (2007) Negative iron regulation of the CP65 cysteine proteinase cytotoxicity in *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and Infection* 9, 1597–1605.
- Arroyo R and Alderete JF (1989) *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for adherence to epithelial cells. *Infection and Immunity* 57, 2991–2997.
- Arroyo R and Alderete JF (1995) Two *Trichomonas vaginalis* surface proteinases bind to host epithelial cells and are related to levels of cytoadherence and cytotoxicity. *Archives of Medical Research* 26, 279–285.
- Arroyo R, Cárdenas-Guerra RE, Figueroa-Angulo EE, Puente-Rivera J, Zamudio-Prieto O and Ortega-López J (2015) *Trichomonas vaginalis* cysteine proteinases: iron response in gene expression and proteolytic activity. *Biomed Research International* 2015, 946787. doi: 10.1155/2015/946787.
- Benchimol M (2004) Trichomonads under microscopy. *Microscopy and Microanalysis* 10, 528–550.
- Cárdenas-Guerra RE, Arroyo R, Rosa de Andrade I, Benchimol M and Ortega-López J (2013) The iron-induced cysteine proteinase TvCP4 plays a key role in *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Microbes and Infection* 15, 958–968.
- Cárdenas-Guerra RE, Ortega-López J, Flores-Pucheta CI, Benítez-Cardoza CG and Arroyo R (2015) The recombinant prepro region of TvCP4 is an inhibitor of cathepsin L-like cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis* that inhibits trichomonad haemolysis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 59, 73–83.
- Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, Wortman JR, Bidwell SL, Alsmark UC, Besteiro S, Sicheritz-Ponten T, Noel CJ, Dacks JB, Foster PG, Simillion C, Van de Peer Y, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Westrop GD, Müller S, Dessi D, Fiori PL, Ren Q, Paulsen I, Zhang H, Bastida-Corcuera FD, Simoes-Barbosa A, Brown MT, Hayes RD, Mukherjee M, Okumura CY, Schneider R, Smith AJ, Vanacova S, Villalvazo M, Haas BJ, Perlea M, Feldblyum TV, Utterback TR, Shu CL, Osoegawa K, de Jong PJ, Hrdy I, Horvathova L, Zubacova Z, Dolezal P, Malik SB, Logsdon JM Jr, Henze K, Gupta A, Wang CC, Dunne RL, Upcroft JA, Upcroft P, White O, Salzberg SL, Tang P, Chiu CH, Lee YS, Embley TM, Coombs GH, Mottram JC, Tachezy J, Fraser-Liggett CM and Johnson PJ (2007) Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science (New York, N.Y.)* 315, 207–212.

- Carvajal-Gómez BI, Quintas-Granados LI, Arroyo R, Vázquez-Carrillo LI, Ramón-Luing LL, Carrillo-Tapia E and Álvarez-Sánchez ME (2014) Putrescine-dependent re-localization of TvCP39, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity. *PLoS ONE* **9**, e107293.
- Conrad MD, Gorman AW, Schillinger JA, Fiori PL, Arroyo R, Malla N, Dubey ML, González J, Blank S, Secor WE and Carlton JM (2012) Extensive genetic diversity, unique population structure and evidence of genetic exchange in the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **6**, e1573.
- Dailey DC, Chang TH and Alderete JF (1990) Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Parasitology* **101**, 171–175.
- De Jesus JB, Ferreira MA, Cuervo P, Britto C, Silva-Filho FC and Meyer-Fernandes JR (2006) Iron modulates ecto-phosphohydrolase activities in pathogenic trichomonads. *Parasitology Internacional* **55**, 285–290.
- De Jesus JB, Cuervo P, Junqueira M, Britto C, Silva-Filho FC, Soares MJ, Cupolillo E, Fernandes O and Domont GB (2007) A further proteomic study on the effect of iron in the human pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Proteomics* **7**, 1961–1972.
- Diamond LS (1957) The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *Journal of Parasitology* **43**, 488–490.
- Dias-Lopes G, Saboia-Vahia L, Margotti ET, Fernandes NS, Castro CLF, Oliveira FO, Peixoto JF, Britto C, Silva-Filho FCE, Cuervo P and Jesus JB (2017) Morphologic study of the effect of iron on pseudocysts formation un *Trichomonas vaginalis* and its interaction with human epithelial cells. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **112**, 664–673.
- Figueroa-Angulo EE, Rendón-Gandarilla FJ, Puente-Rivera J, Calla-Choque JS, Cárdenas-Guerra RE, Ortega-López J, Quintas-Granados LI, Álvarez-Sánchez ME and Arroyo R (2012) The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and Infection* **14**, 1411–1427.
- Fiori PL, Rappelli P, Rocchigiani AM and Cappuccinelli P (1993) *Trichomonas vaginalis* haemolysis: evidence of functional pores formation on red cell membranes. *FEMS Microbiology* **109**, 13–18.
- Fiori PL, Rappelli P, Addis MF, Sechi A and Cappuccinelli P (1996) *Trichomonas vaginalis* haemolysis: pH regulates a contact-independent mechanism based on pore-forming proteins. *Microbial Pathogens* **20**, 109–118.
- Fiori PL, Rappelli P and Addis MF (1999) The flagellated parasite *Trichomonas vaginalis*: new insights into cytopathogenicity mechanisms. *Microbes and Infection* **1**, 149–156.
- Gorrell TE (1985) Effect of culture medium iron content on the biochemical composition and metabolism of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Bacteriology* **161**, 1228–1230.
- Harlow E and Lane D (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 298–300. ISBN 0-87969-314-2.
- Hernández-Gutiérrez R, Ortega-López J and Arroyo R (2003) A 39-kDa cysteine proteinase CP39 from *Trichomonas vaginalis*, which is negatively affected by iron may be involved in trichomonal cytotoxicity. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **50**(Suppl), 696–698.
- Hernández-Gutiérrez R, Avila González L, Ortega-López J, Cruz-Talonia F, Gómez-Gutiérrez G and Arroyo R (2004) *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Experimental Parasitology* **107**, 125–135.
- Hernández HM, Marcet R and Sarracent J (2014) Biological roles of cysteine proteinases in the pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parasite* **21**, 54.
- Horváthová L, Šafariková L, Basler M, Hrdy I, Campo NB, Shin JW, Huang KY, Huang PJ, Lin R, Tang P and Tachezy J (2012) Transcriptomic identification of iron-regulated and iron-independent gene copies within the heavily duplicated *Trichomonas vaginalis* genome. *Genome Biological Evolution* **4**, 1017–1029.
- Kummer S, Hayes GR, Gilbert RO, Beach DH, Lucas JJ and Singh BN (2008) Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron. *Microbial Pathogens* **44**, 197–203.
- Lehker MW and Alderete JF (1992) Iron regulates growth of *Trichomonas vaginalis* and the expression of immunogenic trichomonad proteins. *Molecular Microbiology* **6**, 123–132.
- Lehker MW and Alderete JF (2000) Biology of trichomonosis. *Current Opinion in Infectious Diseases* **13**, 7–45.
- León-Sicairos CR, León-Félix J and Arroyo R (2004) Tvcp12: a novel *Trichomonas vaginalis* cathepsin L-like cysteine proteinase encoding-gene. *Microbiology (Reading, England)* **150**, 1131–1138.
- Lubick KJ and Burgess DE (2004) Purification and analysis of a phospholipase A2-like lytic factor of *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity* **72**, 1284–1290.
- Madico G, Quinn TC, Rompalo A, McKee KT and Gaydós CA (1998) Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by using vaginal swab samples. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 3205–3210.
- Mallinson DJ, Lockwood BC, Coombs GH and North MJ (1994) Identification and molecular cloning of four cysteine proteinase genes from the pathogenic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Microbiology (Reading, England)* **140**, 2725–2735.
- Mendoza-López MR, Becerril-García C, Fattel-Facenda LV, Ávila-González L, et al. (2000) CP30, A cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Infection and Immunity* **68**, 4907–4912.
- Meza-Cervantez P, González-Robles A, Cárdenas-Guerra RE, Ortega-López J, Saavedra E, Pineda E and 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 (Reading, England)* **157**, 3469–3482.
- Miranda-Ozuna JFT, Hernández-García MS, Briebe LG, Benítez-Cardoza CG, Ortega-López J, González-Robles A and 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. *Infection and Immunity* **84**, 2878–2894.
- Miranda-Ozuna JFT, Rivera-Rivas LA, Cárdenas-Guerra RE, Hernández-García MS, Rodríguez-Cruz S, González-Robles A, Chávez-Munguía B and Arroyo R (2019) Glucose-restriction increases *Trichomonas vaginalis* cellular damage towards HeLa cells and proteolytic activity of cysteine proteinases (CPs), such as TvCP2. *Parasitology* **146**, 1156–1166.
- Neale KA and Alderete JF (1990) Analysis of the proteinases of representative *Trichomonas vaginalis* isolates. *Infection and Immunity* **58**, 157–162.
- Ortiz-Estrada G, Calderón-Salinas V, Shibayama-Salas M, León-Sicairos N and De la Garza M (2015) Binding and endocytosis of bovine hololactoferrin by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Biomedical Research International* **2015**, 375836.
- Pastorek L, Sobol M and Hozák P (2016) Colocalization coefficients evaluating the distribution of molecular targets in microscopy methods based on pointed patterns. *Histochemical Cell Biology* **146**, 391–406.
- Petrin D, Delgaty K, Bhatt R and Garber G (1998) Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews* **11**, 300–317.
- Puente-Rivera J, Ramón-Luing LA, Figueroa-Angulo EE, Ortega-López J and Arroyo R (2014) Trichocystatin-2 (TC-2): an endogenous inhibitor of cysteine proteinases in *Trichomonas vaginalis* is associated with TvCP39. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **54C**, 255–265.
- Puente-Rivera J, Villalpando JL, Villalobos-Osnaya A, Vázquez-Carrillo LI, León-Avila G, Ponce-Regalado MD, López-Camarillo C, Elizalde-Contreras JM, Ruiz-May E, Arroyo R and Alvarez-Sánchez ME (2017) The 50 kDa metalloproteinase TvMP50 is a zinc-mediated *Trichomonas vaginalis* virulence factor. *Molecular Biochemical Parasitology* **217**, 32–41.
- Ramón-Luing LA, Rendón-Gandarilla FJ, Puente-Rivera J, Ávila-González L and Arroyo R (2011) Identification and characterization of the immunogenic cytotoxic TvCP39 proteinase gene of *Trichomonas vaginalis*. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **43**, 1500–1511.
- Ramón-Luing LA, Rendón-Gandarilla FJ, Cárdenas-Guerra RE, Rodríguez-Cabrera N, Ortega-López J, et al. (2010) Immunoproteomics of the active degradome to identify biomarkers for *Trichomonas vaginalis*. *Proteomics* **10**, 435–444.
- Rendón-Gandarilla FJ, Ramón-Luing LA, Ortega-López J, Rosa de Andrade I, Benchimol M and Arroyo R (2013) The TvLEGU-1, a legumain-like cysteine proteinase, plays a key role in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Biomed Research International* **2013**, 561979. doi: 10.1155/2013/561979.
- Ryu JS, Choi HK, Min DY, Ha SE and Ahn MH (2001) Effect of iron on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Parasitology* **87**, 457–460.
- Sánchez-Rodríguez DB, Ortega-López J, Cárdenas-Guerra RE, Reséndiz-Cardiel G, Chávez-Munguía B, Lagunes-Guillén A and Arroyo R (2018) Characterization of a novel endogenous cysteine proteinase inhibitor trichocystatin-3 (TC-3), localized on the surface of *Trichomonas vaginalis*. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **102**, 87–100.
- Singh M, Sharma H and Singh N (2007) Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway. *Mitochondrion* **7**, 367–373.

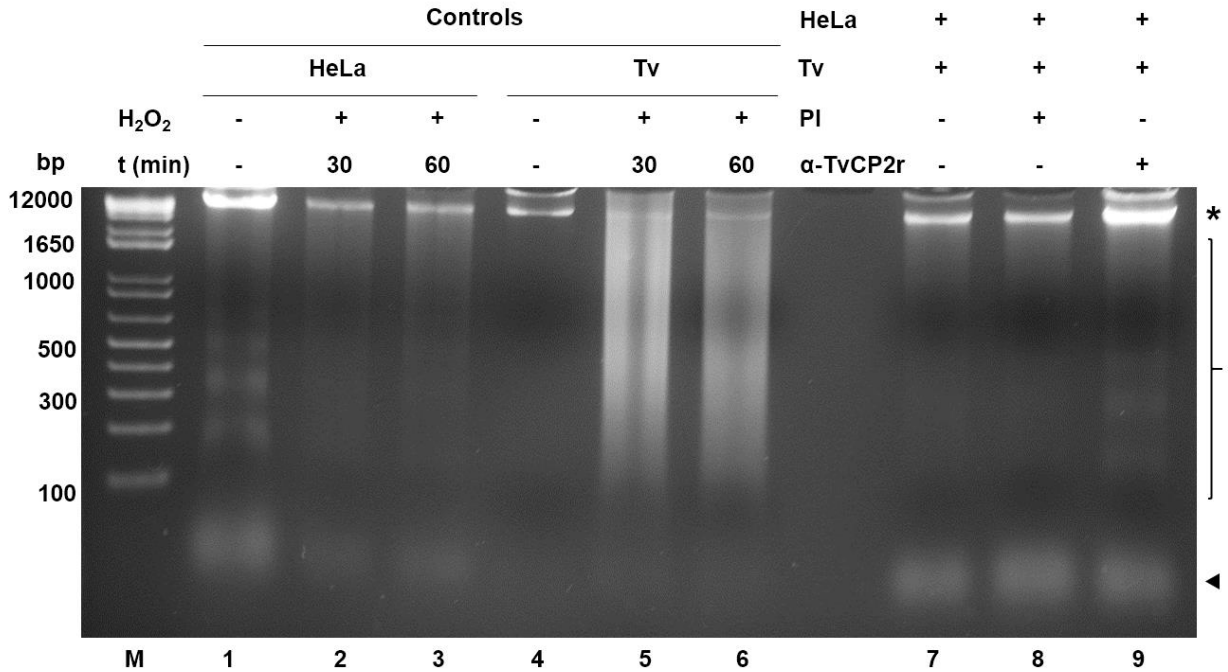
- Solano-González E, Burrola-Barraza E, León-Sicairos C, Ávila-González L, Gutiérrez-Escolano L, Ortega-López J and Arroyo R** (2007) The trichomonad cysteine proteinase TvCP4 transcript contains an iron-responsive element. *FEBS Letters* **581**, 2919–2928.
- Sommer U, Costello CE, Hayes GR, Beach DH, Gilbert DO, et al.** (2005) Identification of *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases that induce apoptosis in human vaginal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 2853–2860.
- Torres-Romero JC and Arroyo R** (2009) Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE/IRP-like system. *Infection Genetics and Evolution* **9**, 1065–1074.
- Tsai CD, Liu HS and Tai JH** (2002) Characterization of an iron-responsive promoter in the protozoan pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 5153–5162.
- World Health Organization** (2012) A baseline report on global sexually transmitted infection surveillance.



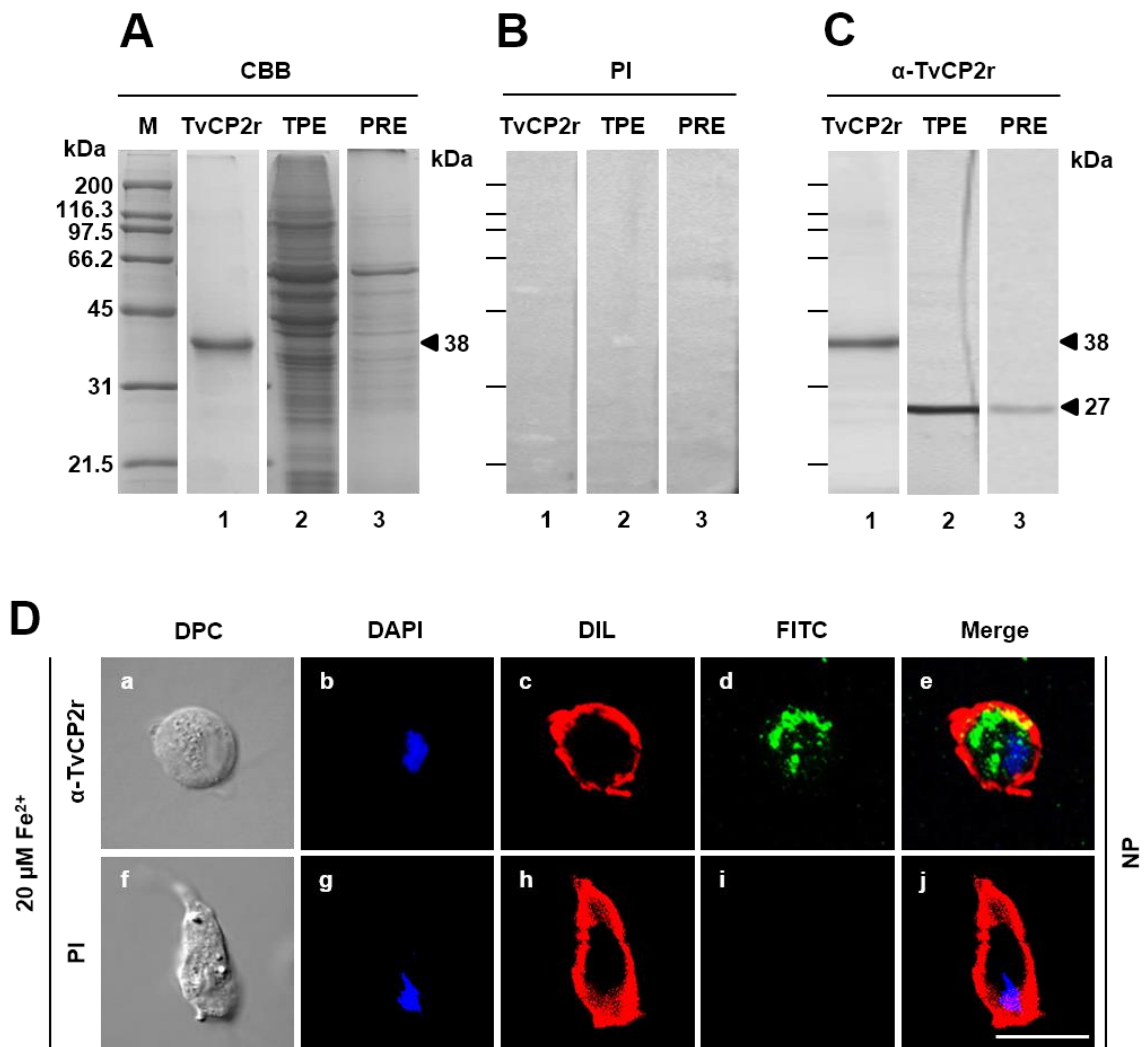
Supplementary Fig. S3. Protein patterns of the VWs from women with cervicovaginitis. SDS-PAGE 12% polyacrylamide CBB-stained gels of the proteins present in (A) nine Tv (+) (lanes 1-9) and (B) nine Tv (-) (lanes 10-18) vaginal washes (VWs; Table 1) used to detect the presence of the native TvCP2 protein during infection. Segmented rectangles indicate the protein bands that were excised from the CBB-gels and processed for MS/MS identification in Tv (+) and Tv (-) VW samples.

A**B**

Supplementary Fig. S4. Controls of induction of DNA fragmentation to HeLa cells and Tv. (A) TUNEL assay was performed after the incubation of HeLa cells and trichomonads with 5% H₂O₂ at 30 and 60 min at 37°C, as apoptosis inductor and positive control. After the incubation, the remaining cells attached to the coverslips (A) were incubated with TdT transferase and fluorescein-labelled nucleotide mix, as recommended by the manufacturer and observed by confocal microscopy (Zeiss, Germany). Differential Phase Contrast (DPC; panels a, e, i, m and q), DAPI (in blue, panels b, f, j, n and r) fluorescent TUNEL label (in green, panels c, g, k, o and s) and merge (panels d, h, l, p and t). HeLa cell monolayer incubated with the interaction medium was used as a negative control. (B) TUNEL assay was performed after the incubation of HeLa cells with 5% H₂O₂ at 30 and 60 min at 37°C, as apoptosis inductor and positive control. After the incubation, the cells released into the culture medium were incubated with TdT transferase and fluorescein-labelled nucleotide mix, as recommended by the manufacturer and observed by confocal microscopy (Zeiss, Germany). Differential Phase Contrast (DPC; panels a, e and i), DAPI (in blue, panels b, f and j), fluorescent TUNEL label (in green, panels c, g and k) and merge (panels d, h and l). HeLa cell monolayer incubated with the interaction medium was used as a negative control. These experiments were performed at least two independent times with similar results. The slides were observed at 63x magnification by confocal microscopy (Zeiss) 3D maximum projection. Scale bar = 20 µm.

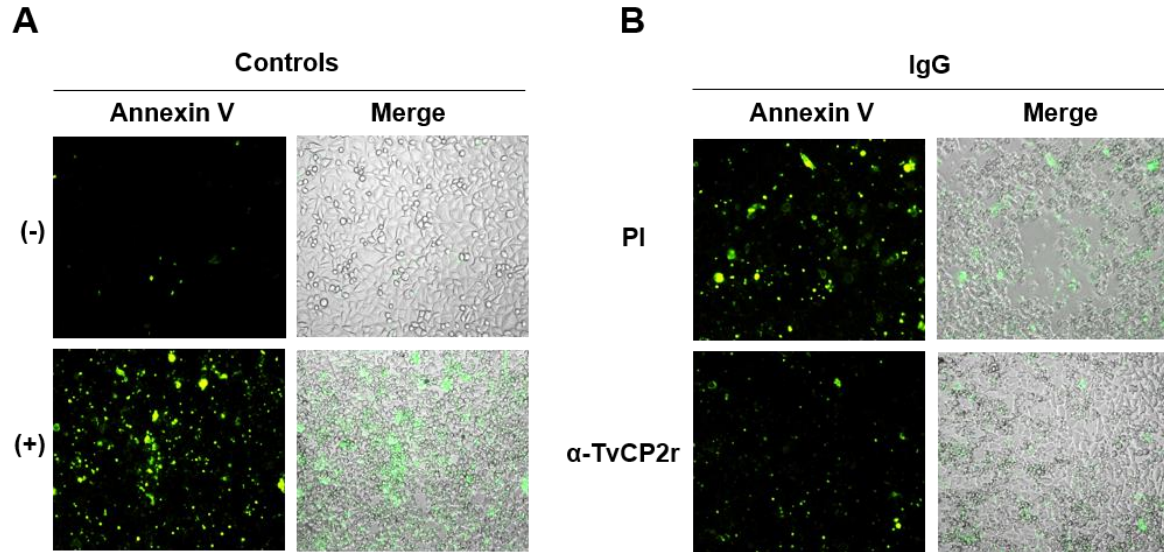


Supplementary Fig. S5. *Trichomonas vaginalis* induces DNA damage to HeLa cells. (A) A DNA degradation assay assessed DNA damage due to *T. vaginalis* interaction. Lane 1, HeLa cell genomic DNA used as a negative control. Lanes 2 and 3, positive controls of HeLa cell DNA damage induced by 5% H₂O₂ treatment for 30 and 60 min at 37°C, respectively. Lane 4, *T. vaginalis* genomic DNA used as a negative control. Lanes 5 and 6, positive control of trichomonad DNA damage induced by 5% H₂O₂ treatment for 30 and 60 min at 37°C, respectively. Inhibition of DNA degradation assay performed with live parasites (4×10^6) grown under IR conditions and pre-incubated with $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ anti-TvCP2r or PI serum purified IgGs followed by incubation with HeLa cell monolayers (1×10^6 cells well⁻¹) for 30 min at 37°C (lanes 8 and 9, respectively). Genomic DNA obtained following the interaction of HeLa cell monolayers with parasites grown under IR conditions without antibody treatment was used as a positive control of DNA damage (lane 7). DNA was analysed by electrophoresis in 2% agarose gels. The bracket indicates DNA degradation as a smear or DNA fragmentation as a laddering. The asterisk shows the presence of a large genomic DNA band. The arrowhead shows the presence of a low size band that may correspond to DNA degradation products.

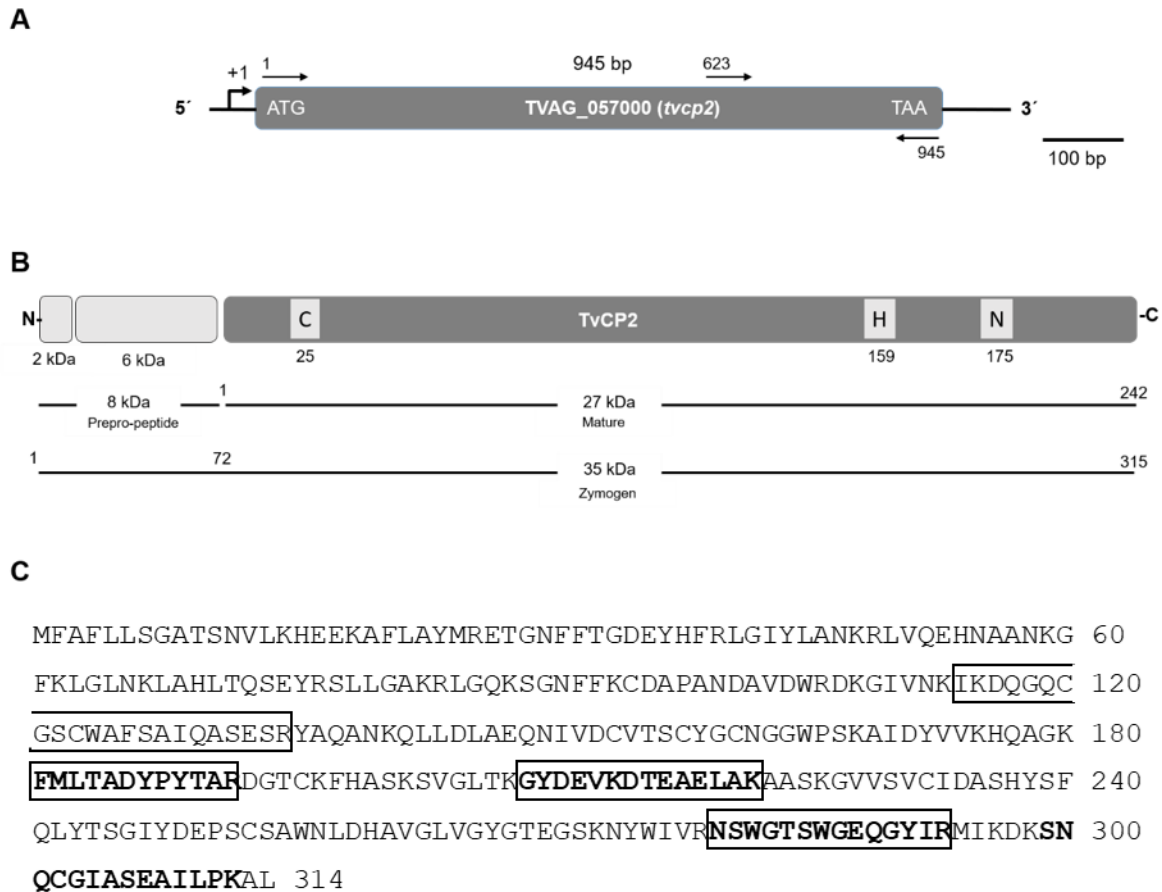


Supplementary Fig. S2. Production of recombinant TvCP2 protein (TvCP2r) and anti-TvCP2r antibody as biological tools to test samples from trichomoniasis patients and TvCP2 localization. (A) Cloning of *tvcp2*, expression of the recombinant TvCP2 protein, and anti-TvCP2r polyclonal antibody production. Coomassie Brilliant Blue-stained (CBB) SDS-PAGE on a 12% gel containing TvCP2r purified by nickel affinity chromatography (lane 1); total protein extract (TPE; lane 2), and protease-resistant extract (PRE; lane 3). M, broad range molecular weight markers (Bio-Rad)

(B) WB assay from a duplicate CBB gel incubated with PI serum at a 1:2000 dilution used as a negative control. (C) WB assay from a duplicate CBB gel using a polyclonal α -TvCP2r antibody at a 1:2000 dilution. Arrowheads show the molecular mass of recombinant (38-kDa) and mature (27-kDa) TvCP2 protein bands in kilodaltons (kDa). (D) IFA of non-permeabilized (NP) parasites incubated with the anti-TvCP2r antibody or preimmune (PI) serum followed by FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (in green). (a and f) Differential phase contrast (DPC) image of parasites grown under normal iron concentrations (NI; 20 μ M [Fe²⁺]); nuclei stained with DAPI (in blue; b and g); parasites labelled with DIL (in red; c and h) as a membrane marker; TvCP2 (labelled with FITC; in green; d) staining of parasites incubated with the anti-TvCP2r antibody (1:100 dilution; panel d), or with a PI serum (1:100 dilution; panel l) used as a negative control, and a FITC-conjugated secondary antibody (1:100 dilution); merge showing the co-localization of TvCP2 with the membrane marker (in yellow; e and j). The slides were observed at 63x magnification by confocal microscopy (Zeiss) 3D maximum projection. Scale bar = 10 μ m.



Supplementary Fig. S6. TvCP2 participates in cellular damage to HeLa cells through apoptosis induction. (A and B) Apoptosis inhibition assays were done using 2×10^5 live parasites grown under IR conditions and pretreated with $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ of purified IgGs of the anti-TvCP2r (α -TvCP2r) antibody or preimmune (PI) serum, followed by interaction with HeLa cell monolayers (3.5×10^4 well $^{-1}$) (B). (A) As a negative control (-), HeLa cell monolayers without parasites were used. As a positive control (+), HeLa cell monolayers with parasites grown under IR conditions without antibody pre-treatment were used. The cell monolayers were incubated with FITC-conjugated Annexin V after interaction with live parasites. (A and B) Annexin V fluorescence (in green, indicative of apoptotic cells) was observed by epifluorescence microscopy (Nikon). Fluorescence was also quantified using a SpectraMax Gemini EM spectrofluorometer. The interaction of HeLa cell monolayers with parasites grown under IR conditions without antibody pre-treatment and their level of Annexin V label was set as 100% apoptosis.



Supplementary Fig. S1. *In silico* analysis of the *tvcp2* gene and zymogen and identification of TvCP2 peptides by MS/MS. (A) Genomic organization of the *tvcp2* gene (TVAG_057000; contig DS113412) and putative transcription start site (+1 arrow) predicted from the *T. vaginalis* genomic sequence (Carlton et al., 2007; www.trichdb.org). Arrows indicated the position of primers used for cloning, RT-PCR and qRT-PCR assays). The bar represents 100 bp. (B) Schematic representation of the zymogen TvCP2 protein sequence. The predicted protein sequence is 315-aa. The catalytic triad is indicated in light gray boxes. A prepro-peptide of 72-aa (light gray boxes; 8-kDa molecular weight) and a mature proteinase sequence (dark gray box; 27-kDa molecular weight) are shown. (C) Amino acid sequence of the complete TvCP2 zymogen. Peptides identified by MS/MS from *in vitro* secretion assays (Black rectangle) and from patient vaginal secretions (bold letters).