



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL (CINVESTAV-IPN)**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE
INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**“Participación de la proteína multifuncional AP120/PFO en la interacción
Trichomonas vaginalis-células HeLa en altas concentraciones de hierro”**

Tesis que presenta:

MQC. GABRIELA MARÍA CÁLIX RODRÍGUEZ

Para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN
INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

Directora de tesis:

DRA. ROSSANA ARROYO VERÁSTEGUI

CIUDAD DE MÉXICO

SEPTIEMBRE, 2020

ASESORES DE TESIS:

Dra. Patricia Talamás Rohana

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV-IPN

Dr. Jaime Ortega López

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN

Este trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio No. 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 parcialmente financiado por el Cinvestav donativo SEP-Cinvestav 074 (R.A.V.) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Becaria de CONACyT No. 938061

Con todo mi cariño y amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por creer en mí, ser mi inspiración y por ayudarme a llegar donde he llegado. Mi logro es para ustedes. ¡Gracias por su apoyo incondicional!

AGRADECIMIENTOS:

A **Dios** todopoderoso por bendecirme y cuidar de mi en cada paso de mi vida.

A la **Dra. Rossana Arroyo Verástegui** por aceptarme en su grupo de trabajo, por guiarme en esta investigación, por su apoyo incondicional y por ser un ejemplo para seguir.

Al **Dr. Jaime Ortega** y a la **Dra. Patricia Talamás** por sus observaciones y consejos para mejorar este trabajo.

Al Laboratorio 11 por aceptarme y brindarme su apoyo. A la **Q.F.B Leticia Ávila Gonzáles** por su paciencia, ayuda y asesoramiento durante mi estadía de investigación.

A mis compañeros de laboratorio: **Luis Rivera**, por tener la paciencia de aclarar todas y cada una de mis dudas, por sus consejos académicos y de la vida.

A **Sarahí Rodríguez**, por apoyarme y trabajar a mi lado en esos experimentos que duraban hasta altas horas de la noche, pero que siempre salían bien.

A **Sebastián Benito**, por sus consejos y por las risas que siempre estuvieron presentes.

A **Esly Euceda** por su apoyo desde el inicio de esta travesía, por sus consejos y por su ayuda en mis experimentos, en mis problemas y porque siempre conté con tu compañía. Por esas tardes de risas dentro y fuera del laboratorio, no pude haber pedido un lugar de trabajo mejor que el laboratorio 11.

A mis padres, **Erika** y **Martín**. No hay palabras suficientes para agradecerles por todo su amor, por sus consejos y regaños, por ser los mejores maestros, por cuidar cada uno de mis pasos y por guiarme por el camino del bien. Sin ustedes no sería lo que soy, ni estaría donde estoy. Por confiar y creer en mí, éste logro es por y para ustedes. A mis hermanos, **Axel**, **Ale** y **Génesis** por ser mis primeros y mejores

amigos en la vida, por mostrarme lo maravillosa que es la vida si la compartimos con los que amamos.

A las personas que Dios puso en mi camino para brindarme su apoyo, su amistad y para hacer de mi estancia en este bello país un tiempo único e increíble, **Alejandro, Esly, Luis, Sebastián, Ángel, Sarahí, Nadia, Carla y Ángeles**. Los malos tiempos son los que nos descubren a los buenos amigos... ¡Gracias por su amistad!

Índice

Índice de figuras	10
Glosario de abreviaturas	13
ABSTRACT	16
RESUMEN	17
INTRODUCCIÓN	18
Tricomoniasis	18
Epidemiología	18
Sintomatología	19
Diagnóstico	19
Tratamiento	20
<i>Trichomonas vaginalis</i>	20
Reproducción y ciclo de vida	22
Mecanismos de evasión del sistema inmune	23
Metabolismo	24
Factores ambientales y <i>T. vaginalis</i>	25
Proteínas “moonlighting”	26
ANTECEDENTES	28
JUSTIFICACIÓN	37
HIPÓTESIS	38
OBJETIVOS	39
General	39
Específicos:	39
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	40

Objetivo 1. Demostrar la presencia de la AP120/PFO de <i>T. vaginalis</i> en los productos de secreción <i>in vitro</i> del parásito en diferentes concentraciones de hierro.....	40
Objetivo 1.1. Aislar vesículas extracelulares (VEs) de los productos de secreción <i>in vitro</i> de <i>T. vaginalis</i> en altas concentraciones de hierro.....	41
Objetivo 2. Estudiar la participación de la AP120/PFO de <i>T. vaginalis</i> en la interacción de parásitos en altas concentraciones de hierro con monocapas de células HeLa	42
MATERIALES Y MÉTODOS	43
Cultivo de parásitos.....	43
Cultivo de células HeLa	43
Extracción de proteínas totales por precipitación con TCA al 10%.....	43
Electroforesis (SDS-PAGE) y electrotransferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa (NC)	44
Ensayo de Western Blot (WB).....	44
Ensayo de secreción.....	45
Fluorescencia de parásitos después de la secreción <i>in vitro</i> por tinción con DAPI.	45
Obtención de vesículas extracelulares.....	46
Fluorescencia de las vesículas extracelulares de <i>T. vaginalis</i>	46
Seguimiento de PFO durante la interacción de tricomonas vivas en altas concentraciones de hierro con monocapas de células HeLa vivas (IFI permeabilizadas).....	47
Seguimiento de PFO durante la interacción de tricomonas vivas en altas concentraciones de hierro con monocapas de células HeLa vivas (IFI no permeabilizadas).....	48
RESULTADOS.....	49

1. Presencia de la AP120/PFO en secreciones <i>in vitro</i> del parásito en diferentes concentraciones de hierro	49
1.1. Vesículas extracelulares (VEs) de los productos de secreción <i>in vitro</i> de <i>T. vaginalis</i> en altas concentraciones de hierro.....	56
2. Participación de la AP120/PFO de <i>T. vaginalis</i> en la interacción de parásitos en altas concentraciones de hierro con monocapas de células HeLa.....	61
DISCUSIÓN	87
CONCLUSIONES.....	96
PERSPECTIVAS.....	97
BIBLIOGRAFÍA	98
APÉNDICE	105

Índice de figuras

Figura 1. Morfología de <i>Trichomonas vaginalis</i>	21
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Trichomonas vaginalis</i>	22
Figura 3. Esquema de la vía metabólica de la PFO en los hidrogenosomas de <i>Trichomonas vaginalis</i>	25
Figura 4. Análisis de la proteína AP120 de <i>T. vaginalis</i>	28
Figura 5. Efecto del hierro en la transcripción de genes pfo de <i>T. vaginalis</i>	29
Figura 6. Caracterización de la PFO de <i>T. vaginalis</i>	31
Figura 7. Localización de la PFO en hidrogenosomas, vacuolas, en citoplasma y en la superficie de <i>T. vaginalis</i>	32
Figura 8. Vías propuestas para la relocalización de la PFO.	33
Figura 9. Relocalización de AP120/PFO a la superficie de los parásitos en ausencia y presencia del inhibidor de autofagia wortmannina en condición de alto hierro (AH).	34
Figura 10. Localización de la AP120/PFO en membrana en una cinética de tiempo corto en presencia de AH.....	35
Figura 11. Presencia de anticuerpos anti-AP120/PFO en sueros (Panel A) y de la AP120/PFO de <i>T. vaginalis</i> en secreciones vaginales (Panel B) de pacientes positivos a Tricomoniasis.	35

Figura 12. Secreción <i>in vitro</i> de la AP120/PFO de <i>T. vaginalis</i> en diferentes concentraciones de hierro	51
Figura 13. Viabilidad celular de los parásitos en diferentes concentraciones de hierro antes y después del ensayo de secreción <i>in vitro</i>	54
Figura 14. Efecto del hierro en la secreción <i>in vitro</i> de la AP120/PFO de <i>T. vaginalis</i>	55
Figura 15. Ensayo de secreción <i>in vitro</i> de parásitos en AH.	57
Figura 16. Vesículas extracelulares (VEs) aisladas de los productos de secreción <i>in vitro</i> de <i>T. vaginalis</i> en altas concentraciones de hierro	59
Figura 17. Vesículas secretadas por <i>T. vaginalis</i> en diferentes condiciones.	60
Figura 18. Adhesión de Tv a la superficie de las células HeLa resultado de la interacción Tv-células HeLa en altas concentraciones de hierro.....	65
Figura 19. Formación de “blebbing” en células HeLa provocado por la interacción Tv-células HeLa en altas concentraciones de hierro	67
Figura 20. Liberación de VEs por las células HeLa producto de la interacción Tv-células HeLa en altas concentraciones de hierro	69
Figura 21. Localización de la AP120/PFO de <i>T. vaginalis</i> en células HeLa después de su interacción por microscopía confocal.....	72

Figura 22. Efectos causados por la interacción Tv-células HeLa sobre las células HeLa Detectados por microscopía confocal	73
Figura 23. Adhesión de Tv a la superficie de las células HeLa resultado de la interacción permeabilizada de Tv-células HeLa en altas concentraciones de hierro.	76
Figura 24. Localización de la AP120/PFO de <i>T. vaginalis</i> en células HeLa después de la interacción permeabilizada de Tv-células HeLa	78
Figura 25. Reconocimiento de filamentos de tubulina en células HeLa durante la interacción permeabilizada de Tv-células HeLa mediante epifluorescencia	80
Figura 26. Detección de la AP120/PFO de <i>T. vaginalis</i> en el interior de las células HeLa después de la interacción permeabilizada de Tv-células HeLa por microscopía confocal.....	82
Figura 27. Reconocimiento de filamentos de tubulina en células HeLa mediante microscopia confocal de la interacción permeabilizada de Tv-células HeLa	83
Figura 28. Alineamiento entre la secuencia de PFO de <i>T. vaginalis</i> con genoma en <i>Homo sapiens</i>	86
Figura 29. Modelo propuesto de la participación de la proteína AP120/PFO en la interacción <i>Trichomonas vaginalis</i> -células HeLa en altas concentraciones de Fe ²⁺	94

Glosario de abreviaturas

Ac	Anticuerpo
AH	Alto hierro
AP	Adhesina (proteína de adhesión)
AS	Antes de secreción (proteínas totales)
ATP	Trifosfato de adenosina
BM	Amortiguador de muestra
BSA	Albúmina de suero bovino
CBB	Azul Brillante de Coomassie
CDC	Center of Disease Control
CNCD	Centro Nacional de Clínicas de Displasias del Hospital General de México
CPs	Cisteína proteasas
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DIL	Colorante catiónico-lipofílico absorbente
DMEM	Medio de cultivo "Eagle" modificado por Dulbecco
DS	Después de secreción (proteínas totales)
FDA	Administración de Alimentos y Drogas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Fn	Fibronectina
HeLa	Línea celular de cáncer cervical humano (Henrieta Lacks)
h	horas
IFI	Inmunofluorescencia indirecta

ITS	Infecciones de transmisión sexual
kDa	Kilodaltones
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MTZ	Metronidazol
mM	Milimolar
nM	Nanómetro
NC	Nitrocelulosa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Amortiguador de fosfato salino
PFO	Piruvato ferredoxín óxido-reductasa
PI	Preimmune
PS	Proteínas de secreción
PT	Proteínas totales
RH	Restricción de hierro
SBA	Suero Bovino Adulto
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
SNR	Suero normal de conejo
TA	Temperatura ambiente
TCA	Ácido tricloroacético
TvCP4	Cisteína proteasa 4 de <i>Trichomonas vaginalis</i>
TvTIM	Triosafofato isomerasa de <i>T. vaginalis</i>
TYM	Triptona-Extracto de levadura-maltosa
VEC	Células epiteliales vaginales

VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VEs	Vesículas extracelulares
WB	Western blot
α-EhHKr	Anticuerpo contra la hexoquinasa recombinante de <i>Entamoeba histolytica</i>
α-TvCP4r	Anticuerpo contra la proteína recombinante TvCP4
α-PFO50r	Anticuerpo contra la proteína recombinante PFO50r
μM	Micromolar
μm	Micrómetro
μl	Microlitros

ABSTRACT

Trichomonas vaginalis is an amitochondriate protist parasite that contains hydrogenosomes instead. Oxidation of pyruvate to acetyl coenzyme A catalyzed by the metabolic enzyme pyruvate ferredoxin-oxide reductase (PFO) occurs in this organelle. This protein in the presence of high iron concentrations (HI) is relocated to the parasite membrane, acquiring an alternative non-enzymatic function as an adhesin (AP120). Thus, PFO is characterized by its double functionality as a "moonlighting or multifunctional protein" (AP120 / PFO). In a short kinetics of trichomonads exposure to HI, the amount of PFO increases in the cytoplasm in the first minutes, after 20 min mobilizes to the membrane and after 60 min the protein label disappears from cytoplasm and parasite membrane. Where does the protein go? Studies carried out in our laboratory demonstrated the presence of this protein in vaginal secretions of trichomoniasis patients, showing its expression and secretion during infection. In addition, in *in vitro* ligand-receptor and inhibition assays using extracts of HI-grown parasites with fixed HeLa cells and antibodies anti-PFO and anti-AP120 showed that *T. vaginalis* AP120 / PFO binds to the cell surface and functions as an adhesin. Therefore, our aim was to demonstrate whether parasites grown under HI condition secrete the multifunctional protein AP120 / PFO and if, during the interaction between trichomonas and monolayers of HeLa cells, AP120 / PFO binds to the surface of host cells. The results of the *in vitro* secretion and WB assays showed that AP120 / PFO is secreted under HI condition. Furthermore, indirect immunofluorescence assays and confocal microscopy of the host cell-parasite interaction under HI condition showed that the AP120 / PFO protein binds to the surface of HeLa cells during the interaction, confirming the results of the *in vitro* ligand-receptor assay and suggesting that this type of interaction occurs during infection.

RESUMEN

Trichomonas vaginalis es un protozooario parásito amitocondriado que en su lugar contiene hidrogenosomas. En este organelo ocurre la oxidación del piruvato a acetil coenzima A catalizada por la enzima metabólica piruvato ferredoxín-óxido reductasa (PFO). Esta proteína en presencia de altas concentraciones de hierro (AH) se relocaliza a la membrana del parásito, adquiriendo una función alternativa no enzimática como adhesina (AP120), caracterizándose por esta doble funcionalidad como una “proteína multifuncional o moonlighting protein” (AP120/PFO). En una cinética corta de exposición de tricomonas a AH, en los primeros minutos la PFO se incrementa en citoplasma, a los 20 min se moviliza a la membrana y después de 60 min la marca de la proteína desaparece del citoplasma y de la membrana del parásito. ¿A dónde se va la proteína? Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron la presencia de dicha proteína en secreciones vaginales de pacientes positivas a la tricomoniasis mostrando su expresión y secreción durante la infección. Además, mediante ensayos de ligando receptor *in vitro* utilizando extractos de parásitos en presencia de AH con células HeLa fijadas y ensayos de inhibición con anticuerpos anti-PFO o anti-AP120 se demostró que la AP120/PFO de *T. vaginalis* se une a la superficie de las células y funciona como adhesina. Por lo que nuestro objetivo fue demostrar si parásitos cultivados en AH secretan a la proteína multifuncional AP120/PFO y si durante la interacción entre tricomonas y monocapas de células HeLa vivas, la AP120/PFO se une a la superficie de las células hospederas. Los resultados de los ensayos de secreción *in vitro* y WB muestran que la AP120/PFO se secreta en presencia de AH. Además, ensayos de inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal de la interacción célula-parásito en AH muestran que la proteína AP120/PFO se une a la superficie de las células HeLa durante la interacción, confirmando los resultados del ensayo de ligando-receptor *in vitro* y sugiriendo que este tipo de interacción ocurre durante la infección.

INTRODUCCIÓN

Tricomoniasis

La tricomoniasis es una infección de transmisión sexual (ITS) no mortal que ocurre en el tracto urogenital femenino y masculino y los humanos son el único huésped natural del parásito (Menezes et al., 2016). Su importancia para la salud pública se ve subrayada por el hecho de que la infección por *T. vaginalis* es prevalente en mujeres en edad reproductiva y se asocia con resultados reproductivos adversos graves (Mielczarek & Blaszkowska, 2016). En la mayoría de los casos puede ser asintomática (85%) aunque algunas personas pueden presentar síntomas. Entre las complicaciones se encuentra vaginitis, parto prematuro, uretritis, prostatitis, infertilidad, incremento en el riesgo de cáncer de cérvix y de próstata y es un factor de riesgo para la infección y transmisión del VIH (Poole & McClelland, 2013).

Epidemiología

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que anualmente se infectan ~276.4 millones de personas; la mitad corresponde a los hombres, los cuales actúan como portadores de la enfermedad (Poole & McClelland, 2013; WHO, 2016). La prevalencia en mujeres es de 5.3% y en hombres de 0.6% (Rowley et al., 2019). La incidencia de la tasa de tricomoniasis depende de muchos factores, como la edad, la actividad sexual, el número de parejas sexuales, la presencia de otras ITS, las costumbres sexuales, la fase del ciclo menstrual, las técnicas de examen diagnóstico, la recolección de muestras y la experiencia del laboratorio. La recopilación de datos epidemiológicos significativos sobre la infección por *T. vaginalis* se ve obstaculizada por el hecho de que la tricomoniasis actualmente no es una infección reportable dentro de la vigilancia epidemiológica, en países desarrollados o en desarrollo (Poole & McClelland, 2013). Junto con la enfermedad de Chagas, cisticercosis, toxocariasis y toxoplasmosis, la tricomoniasis pertenece al grupo de infecciones parasitarias desatendidas (NPI's por sus siglas en inglés), que se ha dirigido por la CDC ("Center

of Disease Control”) como prioridad para la acción de salud pública (Mielczarek & Blaszkowska, 2016).

Sintomatología

Las mujeres con infección por *T. vaginalis* pueden llegar a desarrollar algunos síntomas después de 6 meses post infección (Edwards *et al.*, 2016; Petrin *et al.*, 1998). Entre los síntomas más comunes se encuentran picazón y dolor durante el coito, secreción espumosa de color verde con mal olor, vaginitis, que puede variar de leve a grave. En muy raros casos (2% de casos) se observa “colpitis macularis” o “cérnix de fresa” que consiste en lesiones puntiformes hemorrágicas en la mucosa vaginal y cervical. También se encuentra asociada con cervicitis, uretritis, enfermedad pélvica inflamatoria, cáncer cervical e infertilidad. En las mujeres embarazadas con infección por *T. vaginalis* se puede presentar una ruptura prematura de las membranas ocasionando parto prematuro y bajo peso de los recién nacidos (Guenthner *et al.*, 2005; Edwards *et al.*, 2016; Petrin *et al.*, 1998).

En hombres la infección por *T. vaginalis* es generalmente asintomática, comportándose como reservorio y trasmisor de la enfermedad (Petrin *et al.*, 1998). Sin embargo, algunos pacientes pueden presentar síntomas como prostatitis, epididimitis e infertilidad. Además, la tricomoniasis también es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de próstata (Sutcliffe *et al.*, 2006).

Diagnóstico

El diagnóstico de la tricomoniasis debe ser tanto laboratorial como diagnóstico clínico, ya que solo con la sintomatología se podría generar confusión con otras ITS. El método más utilizado para el diagnóstico de la tricomoniasis es el examen microscópico directo en fresco, a partir de muestras obtenidas de secreciones vaginales o cervicales en el caso de la mujer o descarga uretral en los hombres en donde se detectan los microorganismos móviles. Sin embargo, la sensibilidad de esta técnica de visualización microscópica es variable, con sensibilidades del 38% al 82% entre las mujeres sintomáticas. La prueba diagnóstica tradicional de laboratorio ha sido el cultivo de tricomonas con un medio Diamond modificado. Sin

embargo, presenta muchas desventajas. Por lo que el método de cultivo fue mejorado a un cultivo en caldo (InPouch), presentando mayor sensibilidad. En la actualidad existen otros métodos de diagnóstico basado en la detección de antígenos o métodos moleculares más sensibles como PCR (Bouchemal *et al.*, 2017; Van Der Pol B., 2016; Menezes *et al.*, 2016).

Tratamiento

La familia de fármacos de nitroimidazol, representada principalmente por metronidazol (MTZ) y tinidazol, se ha utilizado como agentes antitricomonales durante más de 30 años, siendo MTZ el tratamiento de elección. Estos medicamentos son los únicos autorizados por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) (Menezes *et al.*, 2016; Meites *et al.*, 2015). El régimen posológico recomendado es una única dosis de 2 g de MTZ por vía oral. En caso de que el tratamiento no sea efectivo, los clínicos habitualmente recomiendan repetir el mismo esquema. Sin embargo, si no se logra la eliminación del parásito, algunos médicos prescriben tinidazol o bien alargan la duración del tratamiento (Ibáñez & Gómez, 2017).

Trichomonas vaginalis

Trichomonas vaginalis es un protozoo flagelado del orden Trichomonadida que infecta el tracto urogenital del humano. En cultivo axénico, la forma del protozoo tiende a ser más uniforme, es decir, en forma de pera u ovoide con flagelos en el extremo anterior (Midlej y Benchimol, 2010), pero el parásito adquiere una forma más ameboide cuando se une a las células epiteliales vaginales (Arroyo *et al.*, 1993; Petrin *et al.*, 1998) (Figura 1), mide entre 7 a 30 μm de largo y entre 4 a 14 μm de diámetro. El movimiento vibratorio y direccional característico de *T. vaginalis* se debe a la presencia de cinco flagelos, uno de los cuales es recurrente y constituyente fundamental de un organelo motor complejo: la membrana ondulante. El axostilo constituye el eje de la célula sobresaliendo en la parte posterior del protozoo y se une a la pelta, estructura citoesquelética con forma de medialuna que rodea el área de donde emergen los flagelos anteriores. El núcleo se encuentra en

la porción anterior del parásito, y, como en otros eucariotas, está rodeado por una envoltura nuclear con poros (Ibáñez & Gómez, 2017; Petrin *et al.*, 1998). El genoma de *T. vaginalis* es uno de los de mayor tamaño secuenciado en un organismo vivo, incluido el hombre. *T. vaginalis* tiene un genoma de ~160 Mbp, organizado en seis cromosomas, en el cual al menos el 65% de dicho genoma es repetitivo (Carlton *et al.*, 2007). El citoplasma presenta numerosas vacuolas y vesículas relacionadas con procesos de endocitosis, digestión y transporte, así como ribosomas e hidrogenosomas (Ibáñez & Gómez, 2017). También posee aparato de Golgi bien definido (Benchimol *et al.*, 2001).

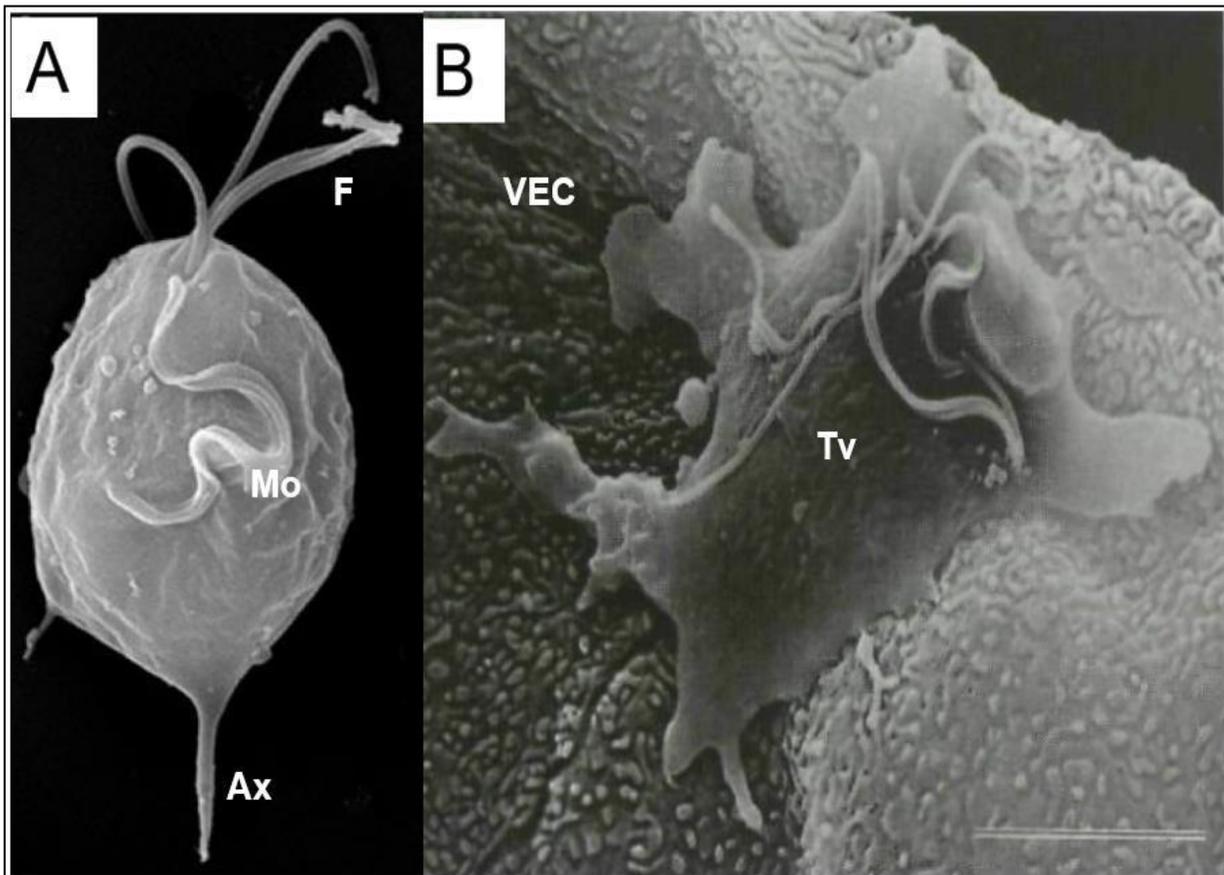


Figura 1. Morfología de *Trichomonas vaginalis*.

A) Parásito piriforme, donde se observan los flagelos (F), la membrana ondulante (Mo) y el axostilo (Ax) (Middlej y Benchimol, 2010). B) Parásito ameboide (Tv) al contacto con células epiteliales vaginales (VEC) (Arroyo *et al.*, 1993)

Reproducción y ciclo de vida

El trofozoíto es la forma usual e infectante del parásito. No se han descrito formas quísticas; sin embargo, en situaciones desfavorables, *T. vaginalis* puede interiorizar sus flagelos y adoptar una configuración de pseudoquiste. El único hospedero natural de este microorganismo es el hombre, infectando principalmente el epitelio escamoso del tracto urogenital. *T. vaginalis* se reproduce por fisión binaria y se transmite de manera directa de persona a persona a través del contacto sexual (Figura 2).

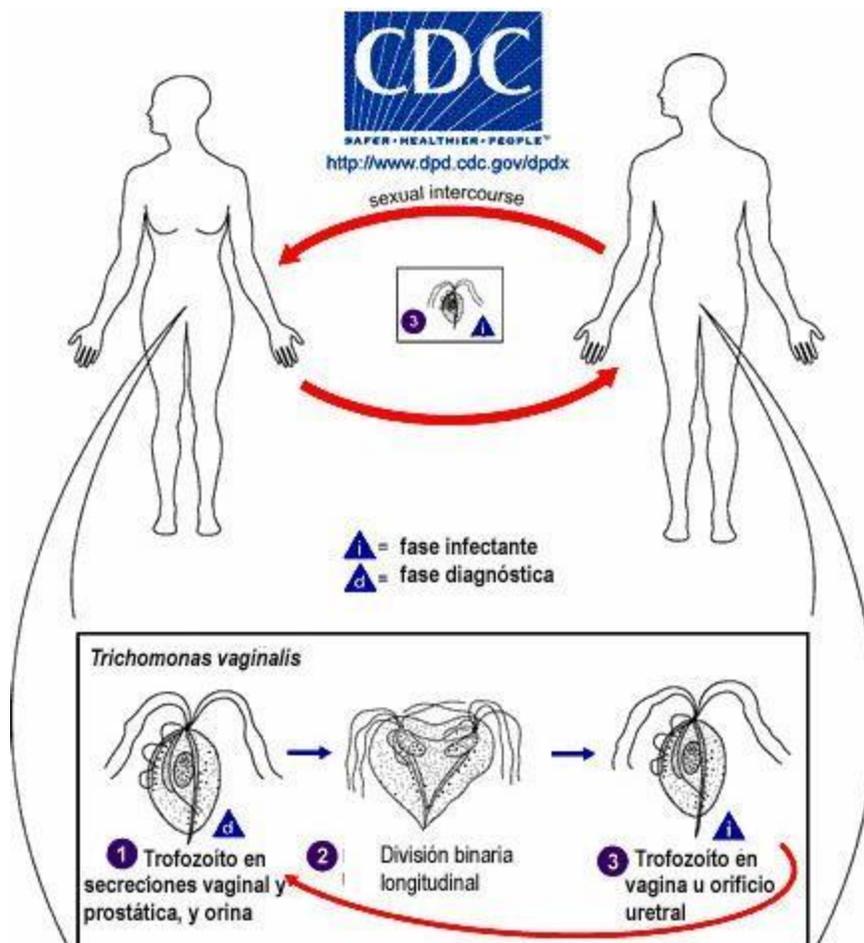


Figura 2. Ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis*.

(<https://www.cdc.gov/dpdx>)

Mecanismos de evasión del sistema inmune

T. vaginalis ha desarrollado numerosos mecanismos implicados en la supervivencia y colonización del tracto urogenital y en la evasión de la respuesta inmunitaria del huésped, entre ellas se encuentran: recubrirse con proteínas del huésped, secreción de sustancias tóxicas como las cisteín proteasas (CP), fagocitosis, el mimetismo molecular, degradación de inmunoglobulinas, entre otros.

Recubrimiento con proteínas del huésped: el recubrimiento de la superficie del parásito con moléculas del huésped como la fibronectina (Fn), laminina o proteínas séricas, puede representar un mecanismo por el cual los factores inmunes en la vagina son efectivamente neutralizados, permitiendo la supervivencia en un ambiente hostil temprano en la infección o durante la menstruación cuando abundan otros factores inmunes específicos e inespecíficos (Peterson & Alderete, 1982; Crouch *et al.*, 2001).

Secreción de CP: son factores líticos esenciales en los procesos de adherencia y colonización del tracto urogenital, aunque también intervienen en otros procesos relacionados con la evasión inmunitaria en donde participan en la degradación de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas IgA, IgM e IgG humanas, así como por medio de la lisis del factor C3b o del inhibidor de proteasas secretado por los leucocitos (Ibáñez & Gómez, 2017).

Fagocitosis: Mediante ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* han demostrado la capacidad de *T. vaginalis* de fagocitar diferentes tipos de células como células del microbiota vaginal, levaduras e incluso células del sistema inmunitario (Ibáñez & Gómez, 2017; Rendón-Maldonado *et al.*, 1998) y espermatozoides (Benchimol *et al.*, 2008).

Mimetismo molecular: la expresión de enzimas metabólicas con funciones alternativas en la superficie celular, las cuales al existir como moléculas similares a las del huésped puede conferir una estrategia de evasión inmune e, igualmente importante, pueden imitar o subvertir una función equivalente a la del huésped (Alderete *et al.*, 2001).

Metabolismo

T. vaginalis es un organismo eucariota primitivo. Aunque es similar en muchos aspectos a otros eucariotas, difiere en su metabolismo energético y muestra notable similitud con bacterias anaerobias (Petrin *et al.*, 1998). Son protozoos microaerófilos, carentes de mitocondrias y peroxisomas. Los orgánulos implicados en el metabolismo energético son los hidrogenosomas. Este organelo contiene enzimas que participan en el metabolismo del piruvato durante la glicólisis; además es el sitio de síntesis de ATP (Müller, 1995) y de producción de hidrógeno molecular. Los hidratos de carbono son la principal fuente de ATP del tricomonádido (Ibáñez & Gómez, 2017). El metabolismo de los carbohidratos ocurre en dos compartimentos: en el citoplasma y en los hidrogenosomas. En el citoplasma, la glucosa se convierte en fosfoenolpiruvato y posteriormente en piruvato a través de una vía clásica de Embden-Meyerhoff-Parnas. Algunos intermediarios de esta ruta metabólica, como el piruvato o el malato, continúan su catabolismo en los hidrogenosomas (Ibáñez & Gómez, 2017; Petrin *et al.*, 1998). El piruvato sufre una descarboxilación oxidativa por acción de la piruvato: ferredoxina oxidoreductasa (PFO)

La PFO es una enzima hidrogenosomal presente en *T. vaginalis* y en otros protozoarios amitocondriados como *Giardia intestinalis* (Ellis *et al.*, 1993) y *Entamoeba histolytica* (Rodríguez *et al.*, 1996) que se encuentra formada por dos subunidades homólogas de aproximadamente 120-130 kDa. Sin embargo, es una enzima ausente en humanos. La PFO se encarga de descarboxilar oxidativamente el piruvato que se suministra desde el citosol o través de la enzima málica hidrogenosomal, en acetil-CoA; el cual se convierte en acetato por acción de la acetato succinato-CoA transferasa en una reacción dependiente de succinato. El succinil CoA resultante sirve como sustrato para la síntesis de ATP por la succinato de la tioquinasa, mientras que los electrones liberados del piruvato se transportan a través de la ferredoxina a hidrogenasa obteniéndose hidrógeno molecular como producto final en la cadena transportadora de electrones dentro del hidrogenosoma (Figura 3) (Beltrán *et al.*, 2013; Ibáñez & Gómez, 2017).

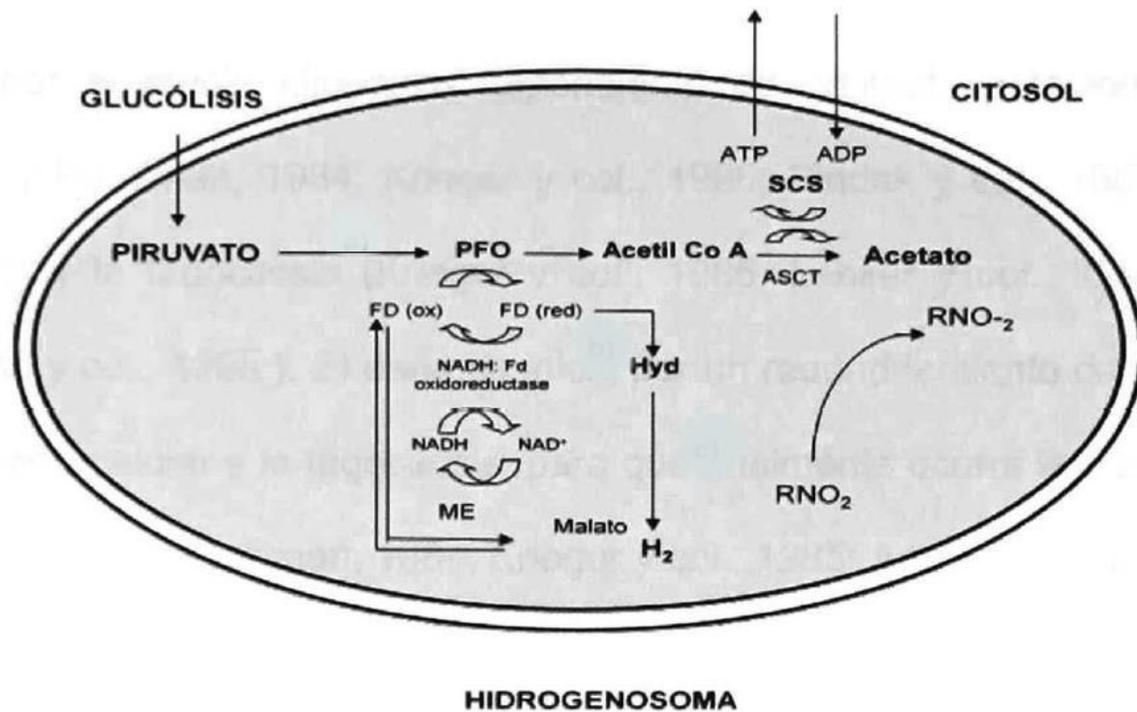


Figura 3. Esquema de la vía metabólica de la PFO en los hidrogenosomas de *Trichomonas vaginalis*.

Esquema tomado y modificado de Meza-Cervantez, tesis de doctorado, 2011;
Land *et al.*, 2004.

Factores ambientales y *T. vaginalis*

Trichomonas vaginalis se encuentra expuesto a diversos estímulos ambientales presentes en el tracto urogenital tanto del hombre como de la mujer, como pH, temperatura, cambios en las concentraciones hormonales durante el ciclo menstrual, concentraciones de hierro, glucosa, poliaminas, zinc, etc. En este sentido, el parásito ha tenido que ser capaz de desarrollar mecanismos de adaptación al hospedero para colonizar y mantener la infección en este ambiente tan hostil (Ibáñez & Gómez, 2017).

El hierro es uno de los factores que más se han estudiado en la patogenia de *T. vaginalis*. Este parásito requiere altas concentraciones de hierro (250-300 μM)

para su crecimiento y metabolismo. Los niveles altos de hierro condicionan procesos metabólicos asociados al hidrogenosoma, regulando el potencial de membrana del orgánulo, así como la expresión de enzimas hidrogenosomales entre las que se encuentran las AP (Adhesinas) (Ibáñez & Gómez, 2017).

El hierro modula los niveles de varias propiedades de virulencia en *T. vaginalis* (Figuroa-Angulo et al., 2015). Una de estas propiedades es la adherencia a las células epiteliales de la vagina (VECs) mediada por la regulación positiva del hierro a la síntesis de cinco adhesinas (AP65, AP51, AP33, AP23 y AP120) que al aumentar su expresión se incrementan los niveles de adherencia de los parásitos (Arroyo & Alderete, 1992; García et al., 2003; García & Alderete, 2007; Lehker et al., 1991; Moreno-Brito et al., 2005).

Estas AP destacan por su diversidad funcional y el mimetismo molecular que presentan, co-localizándose en el hidrogenosoma donde desarrollan diversos papeles enzimáticos o pudiéndose expresar en la superficie del parásito donde intervienen en el proceso de interacción con el hospedero (Ibáñez & Gómez, 2017). La AP65 presenta identidad con la enzima málica descarboxilante dependiente del NAD hidrogenosomal, las AP51 y AP33 a las subunidades β y α de la enzima succinil CoA sintetasa, respectivamente, y la AP120 con la piruvato ferredoxín óxido reductasa (PFO) (Alderete et al., 1995; Arroyo & Alderete, 1992; Engbring & Alderete, 1998; Moreno-Brito et al., 2005). Por dicha diversidad funcional estas proteínas son denominadas como “moonlighting proteins” o proteínas multifuncionales.

Proteínas “moonlighting”

“Moonlighting protein” se refiere a una sola cadena de aminoácidos que presenta dos o más localizaciones y funciones bioquímicas o biofísicas distintas y fisiológicamente relevantes (Jeffery, 2019) y que no se debe a fusión de genes, variantes de proteínas por el mecanismo de “splicing alternativo” o efectos pleiotrópicos (Jeffery, 2016). La primera función descrita para una proteína recibe el nombre de función canónica y la segunda función es la “moonlighting”.

Los primeros ejemplos fueron descritos por Piatigorsky & Wistow, 1989 cuando reportaron que ciertas proteínas estructurales del cristalino del ojo eran enzimas bien conocidas (Huberts & van der Klei, 2010). Las funciones de las “moonlighting proteins” pueden variar como consecuencia de cambios en su localización celular, tipo celular, estado oligomérico, o la concentración celular del ligando, sustrato, cofactor o producto, y en muchos casos, una proteína puede tener una combinación de estas condiciones para cambiar funciones (Jeffery, 1999).

ANTECEDENTES

Moreno-Brito et al., 2005, identificaron y caracterizaron una nueva adhesina de 120 kDa (AP120) expresada en la superficie de parásitos cultivados en altas concentraciones de hierro y que presenta afinidad por las superficie de las células HeLa (Figura 4 panel B). Además, mediante un análisis por electroforesis bidimensional (2-D) se demostró que la proteína AP120 estaba constituida por tres manchas de las cuales únicamente la primera era reconocida por al anticuerpo anti-AP120 en condiciones de alto hierro. Se le realizó mapeo tríptico y se analizó por espectrometría de masas encontrando que la proteína AP120 presenta homología con la enzima piruvato ferredoxín óxido reductasa (PFO) de *T. vaginalis* (Figura 4 panel C).

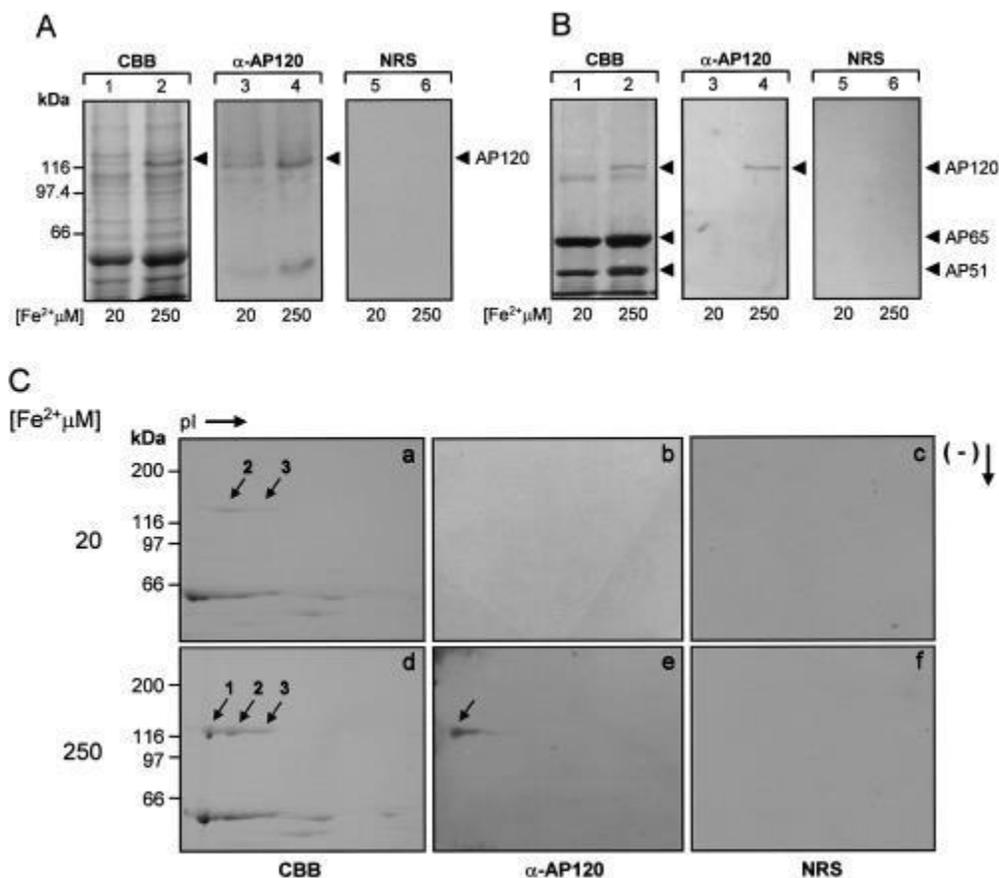


Figura 4. Análisis de la proteína AP120 de *T. vaginalis*.

(Moreno-Brito *et al.*, 2005)

Por medio de análisis *in silico* de la base de datos de la secuencia del genoma de *T. vaginalis* (TrichDB) se demostró que existen 6 genes homólogos a PFO (*pfo a-pfo-f*). Mediante ensayos de RT-PCR semicuantitativa (Figura 5), usando RNA de parásitos crecidos en diferentes concentraciones de hierro (0, 20 y 250 μM) se demostró que de todos los genes *pfo* solo el gen *pfo a* se expresó en 250 μM de hierro, mientras que el gen *pfo b* se expresó de manera constitutiva en todas las condiciones de hierro probadas, aunque se observó un incremento en alto hierro, lo que no sucedió con los otros genes *pfo c-f* (Meza-Cervantez, tesis de licenciatura, 2005; Meza-Cervantez *et al.*, 2011).

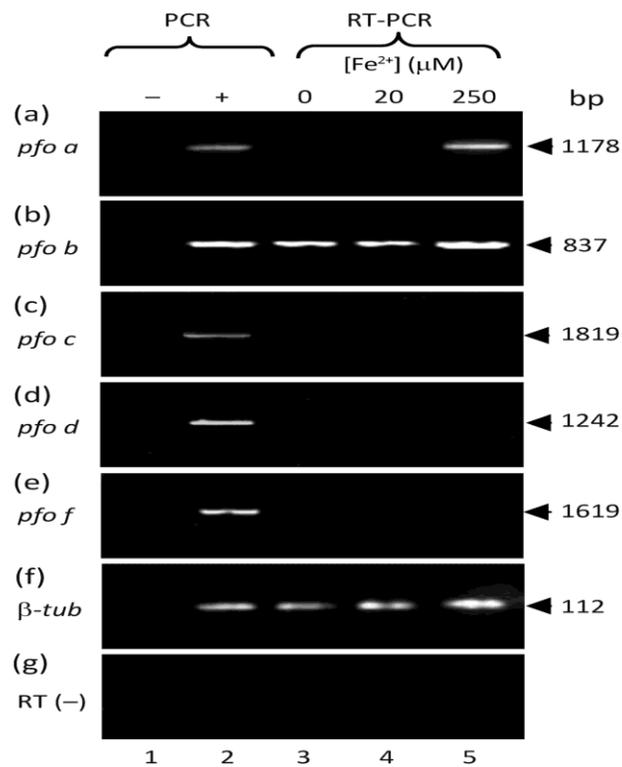


Figura 5. Efecto del hierro en la transcripción de genes *pfo* de *T. vaginalis*.

(Meza-Cervantez *et al.*, 2011).

A su vez, se demostró que la adhesina AP120 estaba codificada por uno de los genes de la PFO, el gen *pfo a* (Moreno-Brito *et al.*, 2005) que solo se transcribe en altas concentraciones de hierro (Meza-Cervantez, tesis de maestría, 2007). Esto llevó a sugerir que la PFO A pudiera ser una proteína multifuncional (“moonlighting protein”), una enzima metabólica asociada a la superficie que participa tanto en los procesos metabólicos en el hidrogenosoma como en los procesos de adhesión en la superficie del parásito.

Por lo anterior fue necesario demostrar que la PFO era otra enzima asociada a la superficie de tricomonas con una función no enzimática y que participa en la adhesión como la AP120, cuando se relocaliza del hidrogenosoma a la membrana en condiciones de alto hierro durante el crecimiento del parásito.

Mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y marcaje de superficie con biotina, se demostró la doble localización de la PFO tanto en la superficie como en los hidrogenosomas de tricomonas (Figura 6A) (Moreno-Brito *et al.*, 2005; Meza-Cervantez *et al.*, 2011). Sin embargo, solo la PFO hidrogenosomal tiene actividad enzimática (Figura 6B). Además, mediante ensayos *in vitro* de unión celular (ensayos de ligando-adhesina) en donde se realizó la interacción de células HeLa con extractos de parásitos cultivados en diferentes concentraciones de hierro (AH) se comprobó que la AP120/PFO de *T. vaginalis* se une a la superficie de las células HeLa en AH, determinando la participación de esta proteína en las interacciones (Figura 6C). Con estos ensayos de ligando-adhesina e inhibición de la adhesión (Figura 6D) se describió la participación de esta proteína en la citoadherencia de *T. vaginalis*, lo que confirmó su doble funcionalidad (Meza-Cervantez, tesis de doctorado, 2011; Meza-Cervantez *et al.*, 2011), concluyendo que la AP120/PFO es un ejemplo de proteínas cuya función depende de su localización modulada por las concentraciones de hierro hoy denominadas “moonlighting proteins”: a) en el hidrogenosoma como enzima metabólica y b) en la membrana plasmática como adhesina en altas concentraciones de hierro.

Una vez comprobada su doble funcionalidad, la siguiente pregunta que surgió fue ¿cuál es el mecanismo que utiliza dicha proteína para relocalizarse a la

membrana? Los resultados de inmunolocalización con partículas de oro y microscopía electrónica de transmisión mostraron la localización de la PFO en hidrogenosomas, vacuolas, citosol y superficie de *T. vaginalis* (Figura 7) (Meza-Cervantez, tesis de doctorado, 2011), sugiriendo que la relocalización pudiera llevarse a cabo a través de dos vías: a) la vía autofágica y b) la vía de secreción convencional (Figura 8).

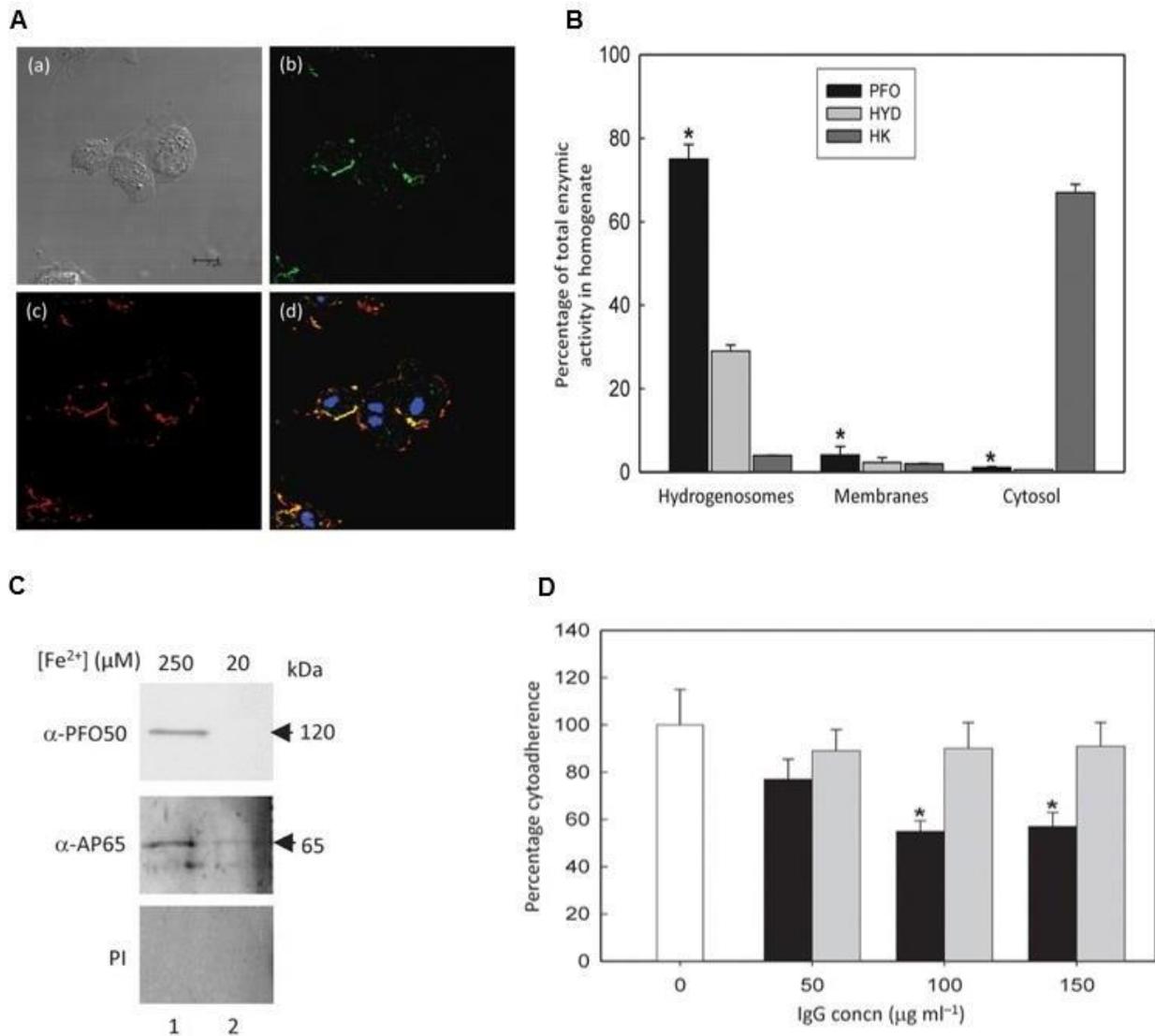


Figura 6. Caracterización de la PFO de *T. vaginalis*.

A) IFI localización de la PFO en superficie del parásito. B) Actividad enzimática de la PFO mediante fraccionamiento celular. C) Ensayo ligando-adhesina. D) Inhibición de la de adhesión de la PFO (Tomado y modificado de Meza-Cervantez *et al.*, 2011).

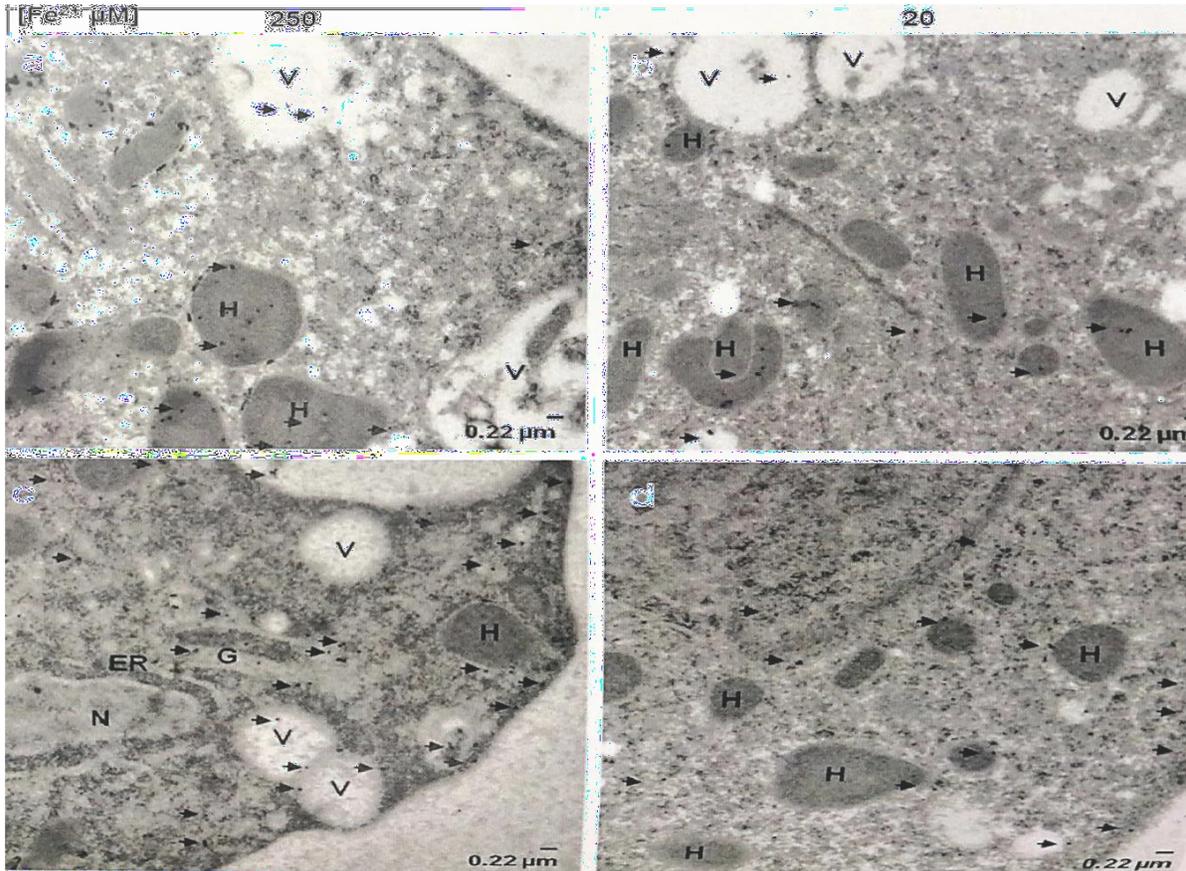
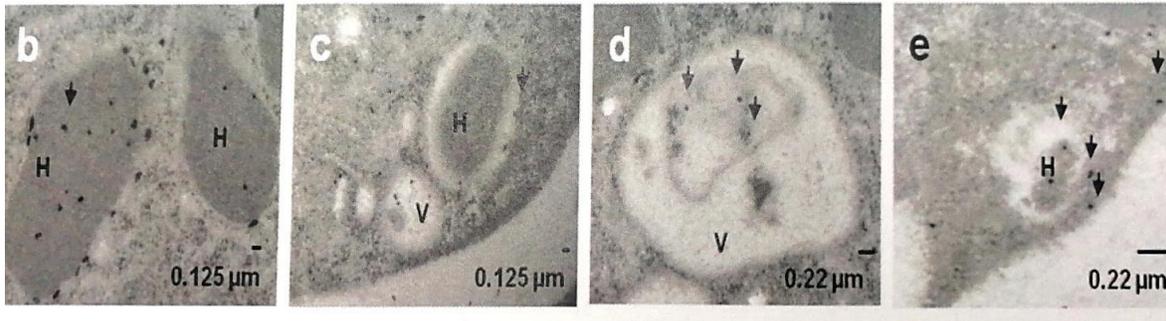


Figura 7. Localización de la PFO en hidrogenosomas, vacuolas, en citoplasma y en la superficie de *T. vaginalis*.

(Meza-Cervantez, tesis de doctorado, 2011).

A. Autofagia de hidrogenosomas



B. Vía de secreción vacuolar

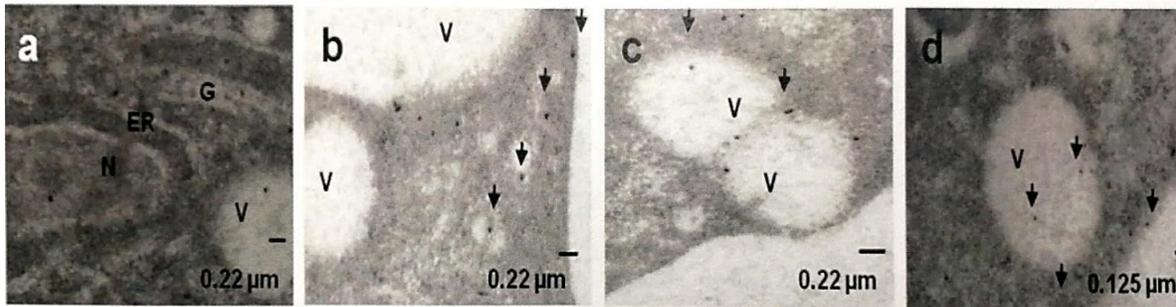


Figura 8. Vías propuestas para la relocalización de la PFO.

A. Autofagia de hidrogenosomas; B. Vía de secreción vacuolar. (Meza-Cervantez, tesis de doctorado, 2011).

Hernández-García demostró que la relocalización de la PFO a la membrana ocurre solo en altas concentraciones de hierro a través de la autofagia de los hidrogenosomas, comprobándolo mediante el uso de wortmannina, un inhibidor de autofagia (Figura 9) y con marcadores de autofagia como la TvAtg8. (Hernández-García, tesis de maestría, 2012; Tesis de doctorado 2019).

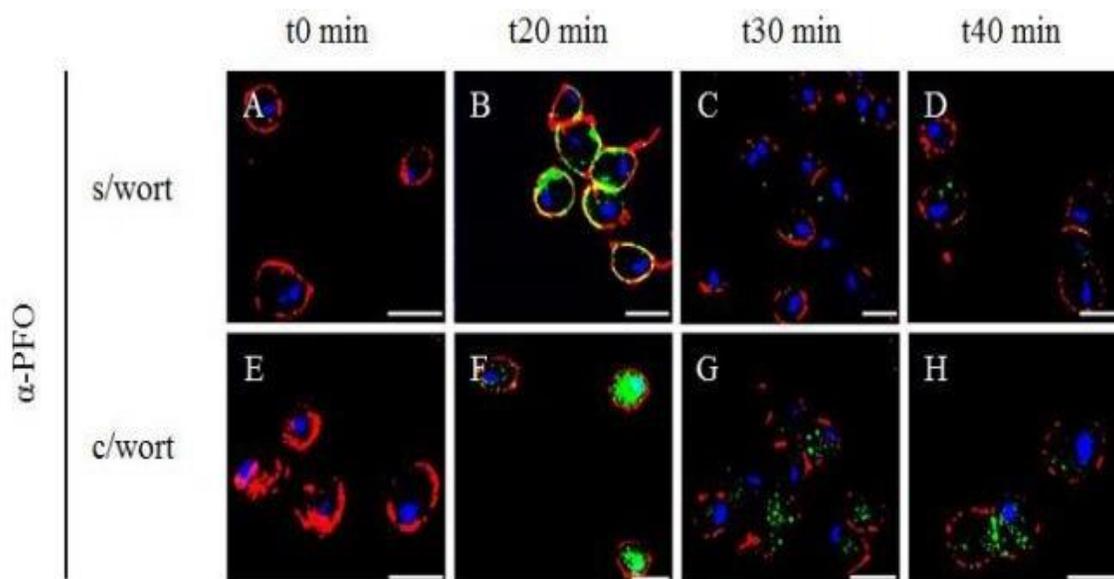


Figura 9. Relocalización de AP120/PFO a la superficie de los parásitos en ausencia y presencia del inhibidor de autofagia wortmannina en condición de AH.

(Hernández-García, tesis de doctorado 2019).

Mediante una cinética de tiempos cortos de parásitos en AH y observados por Inmunofluorescencia indirecta (IFI), se mostró que la relocalización de la AP120/PFO desde los hidrogenosomas hasta la superficie de *T. vaginalis* ocurría en los primeros 20 min (Figura 10). En cambio, a los 30 y 40 min ya no se observó a la proteína ni en la superficie ni en el interior de los parásitos, surgiendo las siguientes preguntas: 1) ¿Qué pasó con la proteína? ¿Se degradó? ¿O se secretó?

Mediante ensayos de Western blot (WB) y ELISA con proteínas recombinantes (PFO50r) se demostró la presencia de anticuerpos anti-AP120/PFO en sueros de pacientes positivos a *T. vaginalis* (Figura 11A). También se detectó a la AP120/PFO en secreciones vaginales de pacientes con tricomonas por ensayos de WB con anticuerpos anti-PFO50r (Figura 11B), lo que demuestra que esta proteína se expresa durante la infección (Meza-Cervantes, tesis de doctorado, 2011; Moreno-Brito *et al.*, 2005).

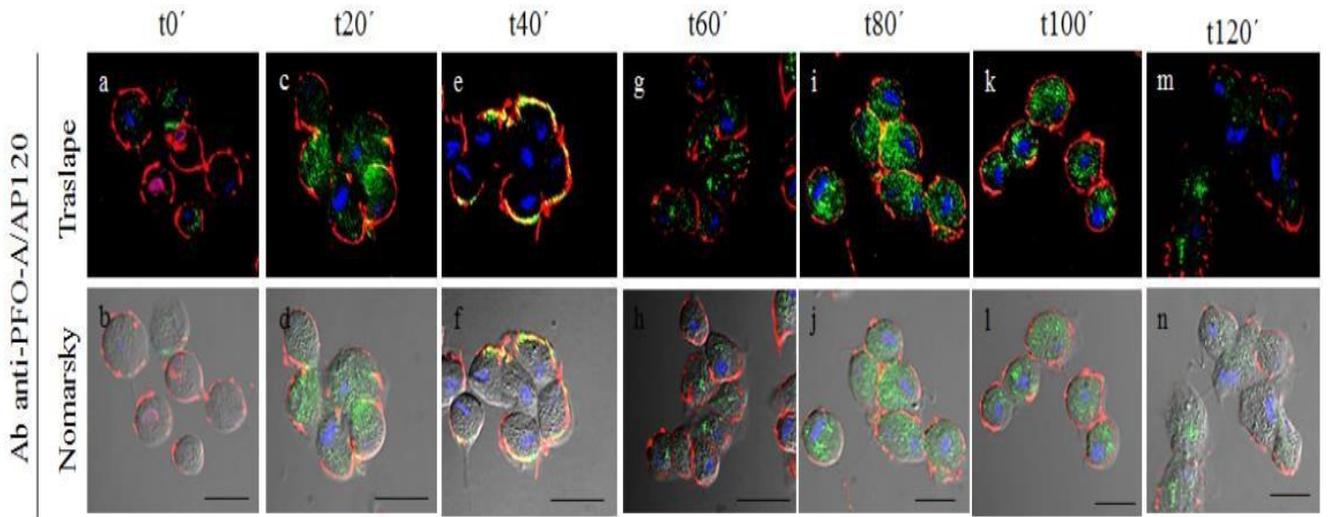


Figura 10. Localización de la AP120/PFO en membrana en una cinética de tiempo corto en presencia de alto hierro.

(Hernández-García, tesis de doctorado 2019).

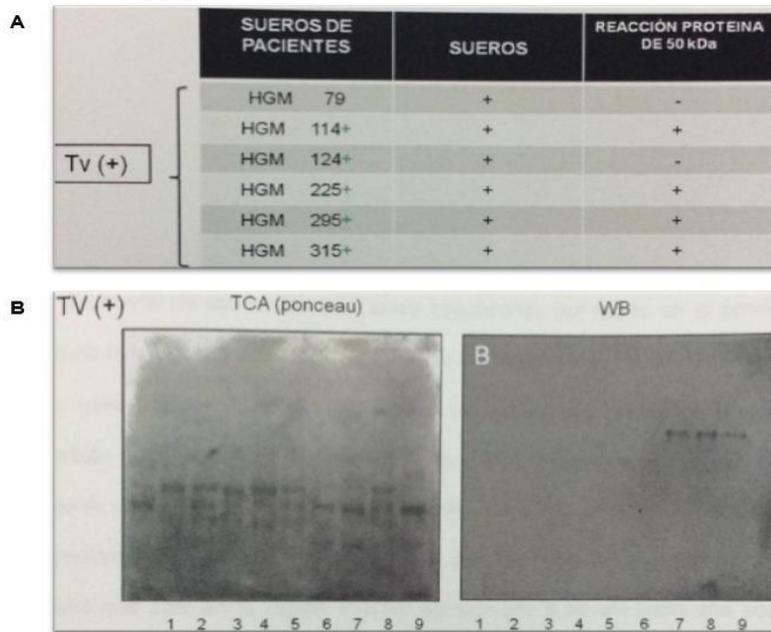


Figura 11. Presencia de anticuerpos anti-AP120/PFO en sueros (Panel A) y de la AP120/PFO de *T. vaginalis* en secreciones vaginales (Panel B) de pacientes positivos a Tricomoniasis.

(Meza-Cervantes, tesis de doctorado, 2011).

La relevancia del estudio de la AP120/PFO radica en que es una proteína única del parásito muy inmunogénica (Moreno-Brito *et al.*, 2005) e inducida por hierro; lo que la convierte en una molécula blanco contra el patógeno; mientras que las otras adhesinas son poco inmunogénicas debido a que comparten homología de secuencia con algunas enzimas metabólicas del hospedero (Meza-Cervantes, tesis de doctorado, 2011).

Con todos los datos anteriores nos surgió el interés de estudiar la participación de la proteína multifuncional AP120/PFO de *T. vaginalis* en la interacción de parásitos con monocapas de células HeLa en condiciones de alto hierro y determinar si la AP120/PFO se secreta al medio extracelular cuando desaparece de la membrana del parásito en altas concentraciones de hierro.

JUSTIFICACIÓN

La proteína multifuncional AP120/PFO de *T. vaginalis* es una proteína metabólica que se encuentra normalmente en los hidrogenosomas del parásito (PFO) y que en condiciones de AH incrementa su cantidad y se relocaliza a la membrana plasmática para cumplir una función alternativa no enzimática como adhesina (AP120). Sin embargo, después de cierto tiempo la proteína AP120/PFO desaparece de la membrana del parásito. ¿A dónde se va la AP120/PFO de *T. vaginalis*? ¿Se degrada? O ¿se secreta?

Estudios realizados en el laboratorio demuestran la presencia de anticuerpos anti-AP120/PFO en sueros y de la proteína AP120/PFO en secreciones vaginales de pacientes positivas a tricomoniasis, mostrando su expresión y posiblemente su secreción durante la infección. Además, mediante ensayos *in vitro* de ligando-receptor utilizando extractos del parásito y células HeLa fijadas, se demostró que la AP120/PFO de *T. vaginalis* se une a la superficie de las células hospederas, caracterizándola como adhesina por su participación en las interacciones célula-parásito.

Por lo anterior, es de interés estudiar si parásitos en AH secretan a la AP120/PFO o se degrada cuando desaparece de la membrana de *T. vaginalis* y determinar su participación en la interacción parásito-célula, utilizando monocapas de células HeLa.

HIPÓTESIS

La proteína multifuncional AP120/PFO de *Trichomonas vaginalis* en altas concentraciones de hierro se secreta al medio extracelular y participa en la interacción de parásitos-células HeLa, uniéndose a la superficie de las células hospederas.

OBJETIVOS

General

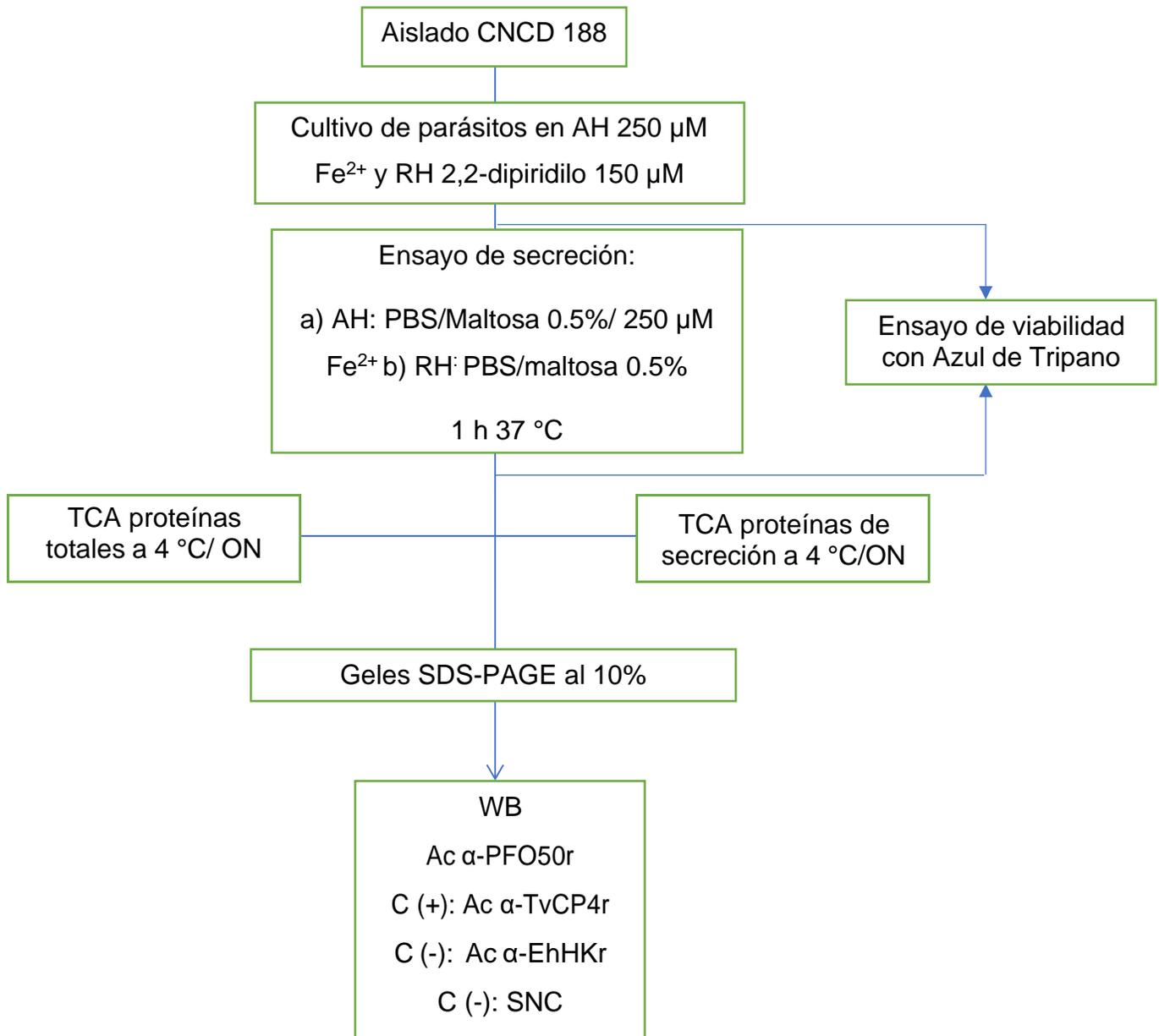
Demostrar la presencia de la proteína multifuncional AP120/PFO en los productos de secreción de *T. vaginalis* en altas concentraciones de hierro y evaluar su participación en la interacción parásito-célula.

Específicos:

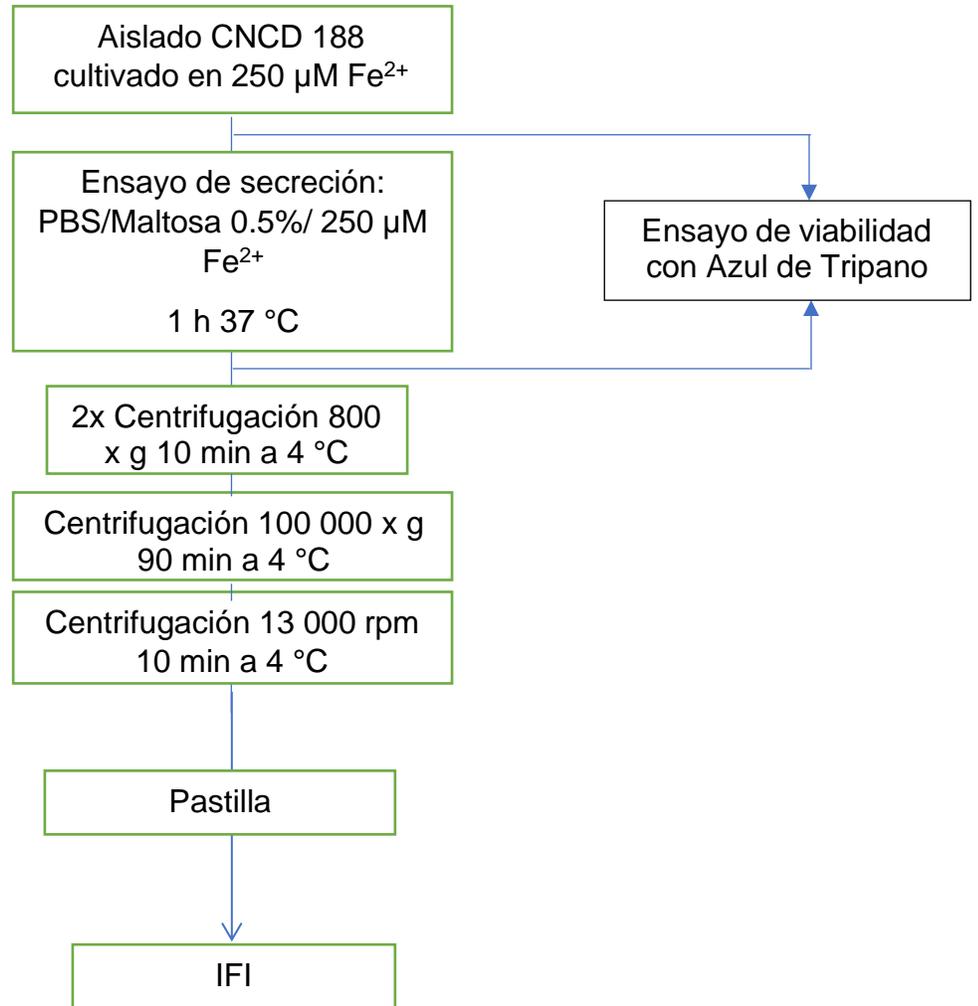
1. Demostrar la presencia de la AP120/PFO de *T. vaginalis* en los productos de secreción *in vitro* del parásito en diferentes concentraciones de hierro.
2. Estudiar la participación de la AP120/PFO de *T. vaginalis* en la interacción de parásitos en altas concentraciones de hierro con monocapas de células HeLa.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

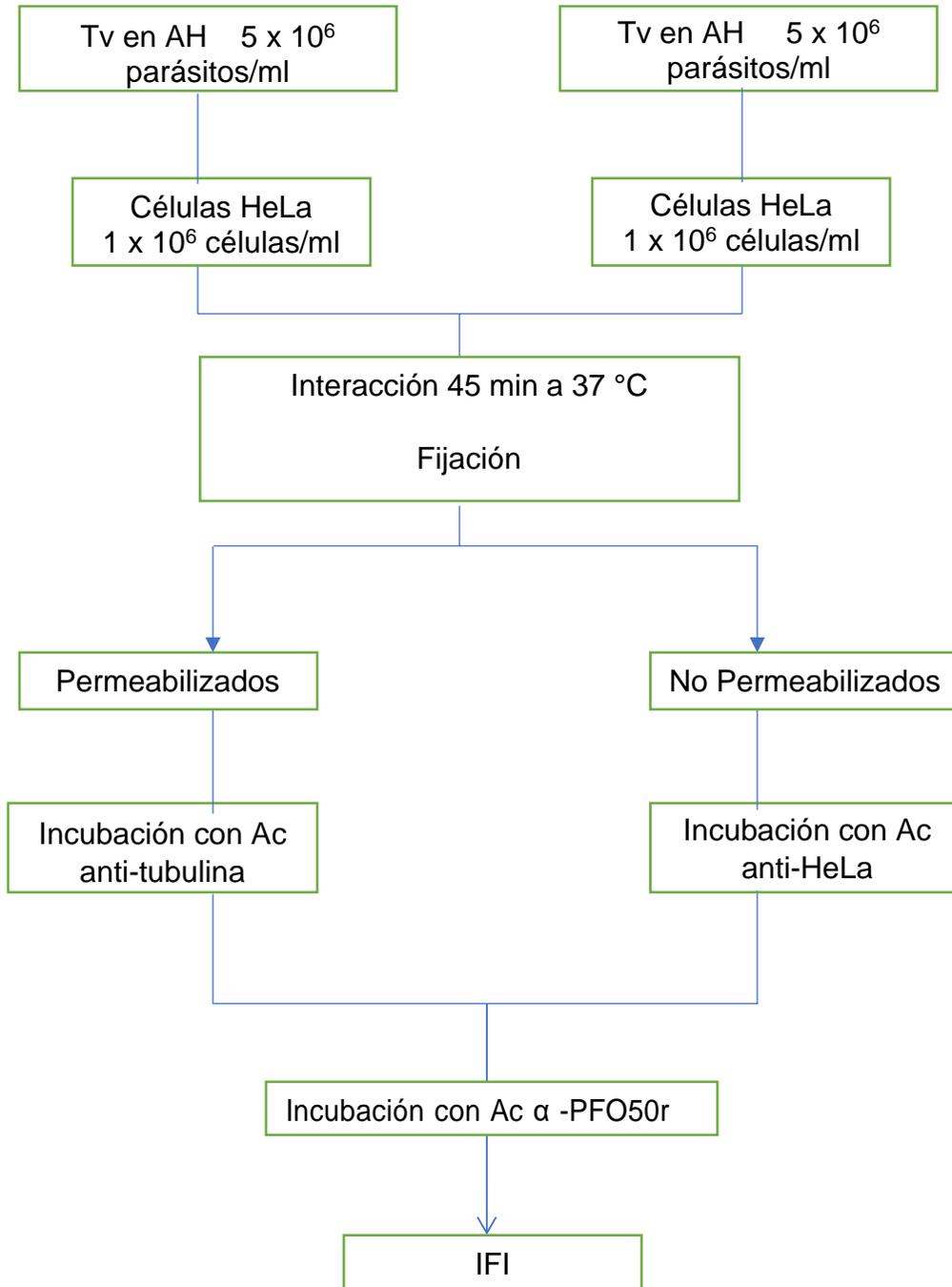
Objetivo 1. Demostrar la presencia de la AP120/PFO de *T. vaginalis* en los productos de secreción *in vitro* del parásito en diferentes concentraciones de hierro.



Objetivo 1.1. Aislar vesículas extracelulares (VEs) de los productos de secreción *in vitro* de *T. vaginalis* en altas concentraciones de hierro.



Objetivo 2. Estudiar la participación de la AP120/PFO de *T. vaginalis* en la interacción de parásitos en altas concentraciones de hierro con monocapas de células HeLa.



MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de parásitos

En este trabajo se utilizaron parásitos de *T. vaginalis* del aislado CNCD 188 (Centro Nacional de Clínicas de Displasias del Hospital General de México) de una semana de descongelación, se cultivaron por 24 h a 37°C en medio triptona-extracto de levadura-maltosa (TYM) con 10% de suero de bovino adulto (SBA) inactivado por calor, para obtenerlos en fase logarítmica (Diamond, 1957). Para obtener parásitos crecidos en altas concentraciones de hierro (AH), al medio de cultivo se le agregó una solución de sulfato ferroso amoniacal a una concentración final de 250 µM y a los parásitos en restricción de hierro (RH) se le agregó la solución 2,2 dipiridilo a 150 µM (agente quelante de hierro) 24 h antes de la inoculación de los parásitos.

Cultivo de células HeLa

Las células HeLa se cultivaron sobre laminillas de vidrio en medio de cultivo "Eagle" modificado por Dulbecco con suero bovino adulto (DMEM-SBA) al 10% con penicilina/estreptomina al 1% y se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5% por 24 h hasta obtener una monocapa confluyente.

Extracción de proteínas totales por precipitación con TCA al 10%

Para la extracción de proteínas totales se utilizaron 2×10^7 parásitos del aislado CNCD 188 en fase logarítmica previamente lavados con PBS pH 7 frío, se resuspendieron en 900 µl de PBS frío y 100 µl de TCA al 100%, se homogenizó bien y se incubó a 4 °C durante toda la noche. La muestra se microcentrifugó a 13 000 rpm durante 5 min a 4 °C para obtener las proteínas precipitadas; la pastilla se lavó 5 veces con PBS frío, se dejó secar y se resuspendió en amortiguador de muestra 1x con 5% de β-mercaptoetanol, se hirvió por 3 min y se microcentrifugó a 13 000 rpm durante 5 min a 4 °C para eliminar el material no solubilizado. Las proteínas

solubilizadas se separaron por electroforesis (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida al 10%.

Electroforesis (SDS-PAGE) y electrotransferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa (NC)

Las muestras de los extractos totales de proteínas obtenidas por precipitación por TCA al 10% se cargaron en geles de poliacrilamida al 10%, y se corrieron a 100 volts a temperatura ambiente (TA). El gel teñido con Azul de Coomassie al 2.5% se usó como control. Otro gel duplicado se utilizó para realizar la transferencia a una membrana de nitrocelulosa (NC; Bio-Rad) de 0.45 o 0.22 μm en sándwich de transferencia con el siguiente orden: lado oscuro de la unidad de transferencia, esponja, papel filtro Whatman 3 mm, gel de poliacrilamida, membrana de NC, papel filtro, esponja y lado transparente de la unidad de transferencia en cámara húmeda con amortiguador de transferencia, en frío y agitación constante por 30 min a 60 volts y después 1 h a 100 volts. Para verificar la transferencia la membrana se tiñó con Rojo de Ponceau, se capturó la imagen en el fotodocumentador y luego se realizó cinco lavados de 10 min cada uno con PBS pH 7. Las membranas de NC con las proteínas transferidas se bloquearon con leche descremada al 5% en PBS-Tween al 0.1% en agitación constante durante toda la noche a 4 °C.

Ensayo de Western Blot (WB)

Las membranas de NC se lavaron 5 veces con PBS-Tween al 0.1% por 10 min c/u, se incubaron con el anticuerpo primario (α -PFO50r) a una dilución 1:4 000 en leche al 5% por 24 h en agitación a 4 °C. Las membranas de NC se lavaron 5 veces con PBS-Tween al 0.1% cada 10 min en agitación constante y se incubaron posteriormente con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa en una dilución 1:3 000 en leche al 2.5% en PBS-Tween al 0.1% a temperatura ambiente, cubierto de la luz durante 2.5 h, se realizaron 3 lavados con

PBS-Tween al 0.1% y 2 lavados con PBS pH 7, de 10 min cada uno. Las membranas de NC se revelaron por el método de quimioluminiscencia utilizando el kit “SuperSignal West Pico Plus Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific-Pierce)” y las imágenes se capturaron en el fotodocumentador (ChemiDoc XRS, Bio-Rad) y se analizaron mediante el software “Quantity One”.

Ensayo de secreción

Para la detección de la proteína AP120/PFO en las secreciones de *T. vaginalis* en condiciones de AH y RH, se realizaron ensayos de secreción *in vitro*, con una densidad de 2×10^6 parásitos/ml del aislado CNCD 188. Parásitos en fase logarítmica, se despegaron con baño agua-hielo por 15 min, se centrifugaron a 1 800 rpm por 5 min a 4 °C para retirar el medio de cultivo y se lavaron 3 veces con PBS pH 7 frío. Luego los parásitos crecidos en AH se resuspendieron en una solución de PBS pH 7.0 suplementado con maltosa al 0.5% y sulfato ferroso amoniacal 250 μ M o en una solución de PBS suplementado con Maltosa al 0.5% y 2,2-dipiridilo 150 μ M para RH a una densidad de 2×10^6 parásitos/ml por 1 h a 37 °C. Los parásitos se centrifugaron a 1 800 rpm por 5 min a 4 °C; el sobrenadante se decantó a otro tubo nuevo y se microcentrifugó dos veces a 2 000 rpm por 10 min a 4 °C. El producto de secreción se precipitó con TCA al 10% durante toda la noche a 4 °C. La pastilla se lavó 3 veces con acetona fría a 13 000 rpm por 5 min a 4 °C, se dejó secando en campana y se resuspendió en 35 μ l de amortiguador de muestra 1x (BM 1x) con 5% de β -mercaptoetanol, se hirvió por 3 min y se microcentrifugó a 13 000 rpm durante 5 min a 4 °C. Las proteínas se analizaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de NC para ensayos de WB.

Fluorescencia de parásitos después de la secreción *in vitro* por tinción con DAPI.

Para los ensayos de fluorescencia se utilizaron parásitos cultivados en AH en una densidad de 2×10^6 parásitos/ml, se lavaron 3 veces con PBS pH 7 y se colocaron

sobre las laminillas por 1 h con PBS suplementado con maltosa 0.5% y 250 μM de hierro y se incubaron a 37 °C, se les retiró el sobrenadante (el cual se precipitó con TCA al 10%). Los parásitos en las laminillas se fijaron con formaldehído al 4% en PBS por 15 min a TA, se lavaron dos veces con NH_4Cl 20 mM en PBS, dos veces con PBS-BSA y dos veces con PBS pH 7. Los parásitos fijados y bloqueados se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2% en PBS durante 10 min a TA, se lavaron dos veces con PBS y dos veces con PBS-BSA al 0.2%. Los parásitos fijados y permeabilizados se montaron con 7 μl de Vectashield con DAPI para teñir los núcleos. Las laminillas se observaron por microscopía confocal.

Obtención de vesículas extracelulares

Para la obtención de vesículas extracelulares se siguió el protocolo descrito por Rodríguez-Cruz, tesis de maestría, 2018, el cual fue modificado del método estándar para la obtención de vesículas reportado por Raposo & Stoorvel, 2013. Para la secreción y captura de vesículas se utilizaron 3.60×10^8 parásitos, distribuidos en 6 tubos con 6.0×10^7 parásitos resuspendidos en 30 ml (densidad de 2×10^6 Tv/ml) de PBS pH 7 suplementado con maltosa al 0.5% y Fe^{2+} 250 μM por 1 h. El producto de secreción se centrifugó 2 veces a 800 x g por 10 min a 4 °C para retirar los parásitos y restos celulares presentes. El sobrenadante se ultracentrifugó a 100 000 x g por 75 min a 4 °C, se decantó y se recuperaron las pastillas de cada tubo en un tubo Eppendorf y se microcentrifugaron a 13 000 rpm durante 4 min a 4 °C. La pastilla de vesículas se utilizó para ensayos de fluorescencia.

Fluorescencia de las vesículas extracelulares de *T. vaginalis*

Las pastillas de las vesículas se fijaron con 1 ml de formaldehído al 4% sobre cubreobjetos, pretratados con una solución de poli-L-lisina, durante 20 min a 4 °C. Los cubreobjetos se lavaron 1 vez con NH_4Cl 20 mM en PBS pH 7, 1 vez con PBS-BSA al 0.2% y 1 vez con PBS pH 7, se incubaron con DIL (1:2 500) diluido en agua

miliQ filtrada por 1 h a temperatura ambiente y se lavó 5 veces con PBS pH 7. Las laminillas se montaron con 7 µl de solución Vectashield con DAPI, se sellaron con esmalte de uñas transparente y se observaron por microscopía confocal.

Seguimiento de PFO durante la interacción de tricomonas vivas en altas concentraciones de hierro con monocapas de células HeLa vivas (IFI permeabilizadas).

Las células HeLa se crecieron sobre laminillas de vidrio en placas de 6 pozos hasta llegar a confluencia, se lavaron 3x con PBS a 37 °C y se interaccionaron con parásitos en AH, lavados previamente 3x con PBS, en una relación 1:5 células: parásitos, por 45 min a 37 °C en CO₂ al 5% en medio de interacción DMEM: TYM en relación 2:1 sin suero, adicionado solución de sulfato ferroso amoniacal a una concentración final de 250 µM. Posteriormente, se les retiró el medio de interacción, se lavaron 3x con PBS pH 7 a 37 °C y se fijaron con paraformaldehído al 4% a 37 °C por 10 min en la incubadora; se lavaron 3x con PBS a TA y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 1% a temperatura ambiente por 20 min, se bloquearon con BSA al 3% en Tritón X-100 al 0.1% por 1 h, se incubaron con el anticuerpo primario ratón anti-tubulina de humano en dilución 1:500 (en BSA al 0.3% en Tritón X-100 al 0.1%) en cámara húmeda a 4 °C por 20 h. Posteriormente las monocapas y parásitos se lavaron 3x con Tritón X-100 al 1 % y se incubaron con el anticuerpo primario anti-PFO50r (dilución 1:100) en BSA al 0.3% por 1 h a TA, después se lavaron 3x con Tritón X-100 al 1% y se incubaron con los anticuerpos secundarios de cabra anti-conejo acoplado a FITC (Thermo Fisher) en dilución 1:100 y cabra anti-ratón acoplado a Alexa 594 (Thermo Fisher) en dilución 1:100 por 1 h a TA, se lavaron 3x con Tritón X-100 al 1%, 3x con Tritón X-100 al 0.1%, 3x con agua miliQ filtrada y se montaron con 10 µl de solución “Vectashield” con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) para teñir los núcleos. Las muestras se observaron por microscopía confocal en un microscopio Zeiss y se analizaron las imágenes con el software ZEN 3.1 (Carl Zeiss, Germany); también se observaron por microscopía de epifluorescencia.

Seguimiento de PFO durante la interacción de tricomonas vivas en altas concentraciones de hierro con monocapas de células HeLa vivas (IFI no permeabilizadas).

Para la realización de este ensayo partimos de la interacción entre células HeLa-parásitos como en el ensayo anterior, pasados los 45 min de interacción se retiró el medio de interacción y se lavaron 3x con PBS pH 7 a 37 °C, se fijaron con formaldehído al 4% en PBS por 15 min a TA, se lavaron 2x con NH₄Cl 20 mM en PBS, 3x con BSA al 0.2% en PBS (PBS-BSA) y 3x con PBS, se incubaron con el anticuerpo primario conejo anti-HeLa (dilución 1:100) en PBS-BSA por 1 h a TA en agitación, se lavaron 3x con PBS, 2x con PBS-BSA y se incubaron 1 h con el anticuerpo primario ratón anti-pepPFOAr (dilución 1:100) en agitación, se lavaron 5x con PBS-BSA y se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-ratón acoplado a FITC en dilución 1:100 y anti-conejo acoplado a Alexa 594 en dilución 1:100 por 1 h a TA en PBS-BSA y con agitación, se lavaron 5x con PBS y se montaron con 4 µl de Vectashield con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) para teñir núcleos. Las muestras se observaron por microscopía confocal en un microscopio Zeiss y se analizaron las imágenes con el software ZEN 3.1 (Carl Zeiss, Germany).

RESULTADOS

1. Presencia de la AP120/PFO en secreciones *in vitro* del parásito en diferentes concentraciones de hierro.

La AP120/PFO de *T. vaginalis* en condiciones normales es una enzima hidrogenosomal, pero en condiciones de alto hierro se relocaliza a la membrana plasmática del parásito cumpliendo una función diferente como adhesina a través de un proceso de secreción no convencional, la hidrogenofagia (Hernández-García, 2019 Tesis de Doctorado). La función de PFO como adhesina se siguió mediante una cinética de parásitos en AH por ensayos de IFI y se observó que a los 40 min la AP120/PFO se encontraba en la superficie de tricomonas; sin embargo, a los 60 min la proteína desaparecía de la membrana plasmática y del interior del parásito, preguntándonos ¿Adónde se va la AP120/PFO de *T. vaginalis* cuando desaparece de la membrana del parásito? ¿La AP120/PFO de *T. vaginalis* se degrada o se secreta activamente cuando desaparece de la membrana del parásito? En los antecedentes de este trabajo se describe la presencia de la proteína AP120/PFO de *T. vaginalis* en pacientes positivas a la infección causada por este parásito, mostrando que se expresa y posiblemente se secreta durante la infección.

Para responder estas preguntas se realizaron ensayos de secreción *in vitro* de parásitos viables en diferentes concentraciones de hierro, alto hierro (AH) y restricción de hierro (RH) y los productos de secreción se transfirieron a membranas de NC para realizarles Western blot con diferentes anticuerpos.

¿La AP120/PFO de *T. vaginalis* se degrada cuando desaparece de la membrana del parásito? Para esto, las proteínas totales (PT) de los parásitos en concentraciones de AH y RH se obtuvieron antes y después de la secreción, además del producto de secreción, se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de NC para incubarse con el anticuerpo anti-PFO50r por ensayos de WB.

En la figura 12 se muestra los resultados del ensayo de WB. En el panel A como control del ensayo se tiñó la membrana de NC con Rojo de Ponceau que permite observar los patrones de las proteínas totales (PT) y de las proteínas de secreción (PS) de los parásitos en las dos concentraciones de hierro. En el panel B se muestra el control negativo del ensayo, una membrana de NC incubada con suero preinmune, en la que no se observa ninguna reactividad. En el panel C se muestran los resultados de una membrana de NC incubada con el anticuerpo anti-PFO50r. En la membrana de NC se observa una banda de ~120 kDa que corresponde a la proteína AP120/PFO de *T. vaginalis* en las PT antes y después de secreción en ambas condiciones de hierro (AH y RH), así como también en las PS de los parásitos únicamente en la condición de AH.

Estos resultados nos muestran que la proteína AP120/PFO de *T. vaginalis* no se encuentra degradada, ya que se observa la banda de 120 kDa tanto en las PT antes y después de la secreción, así como en las PS de AH. Además, estos resultados también nos muestran que la proteína solo se secreta por parásitos en condiciones de AH.

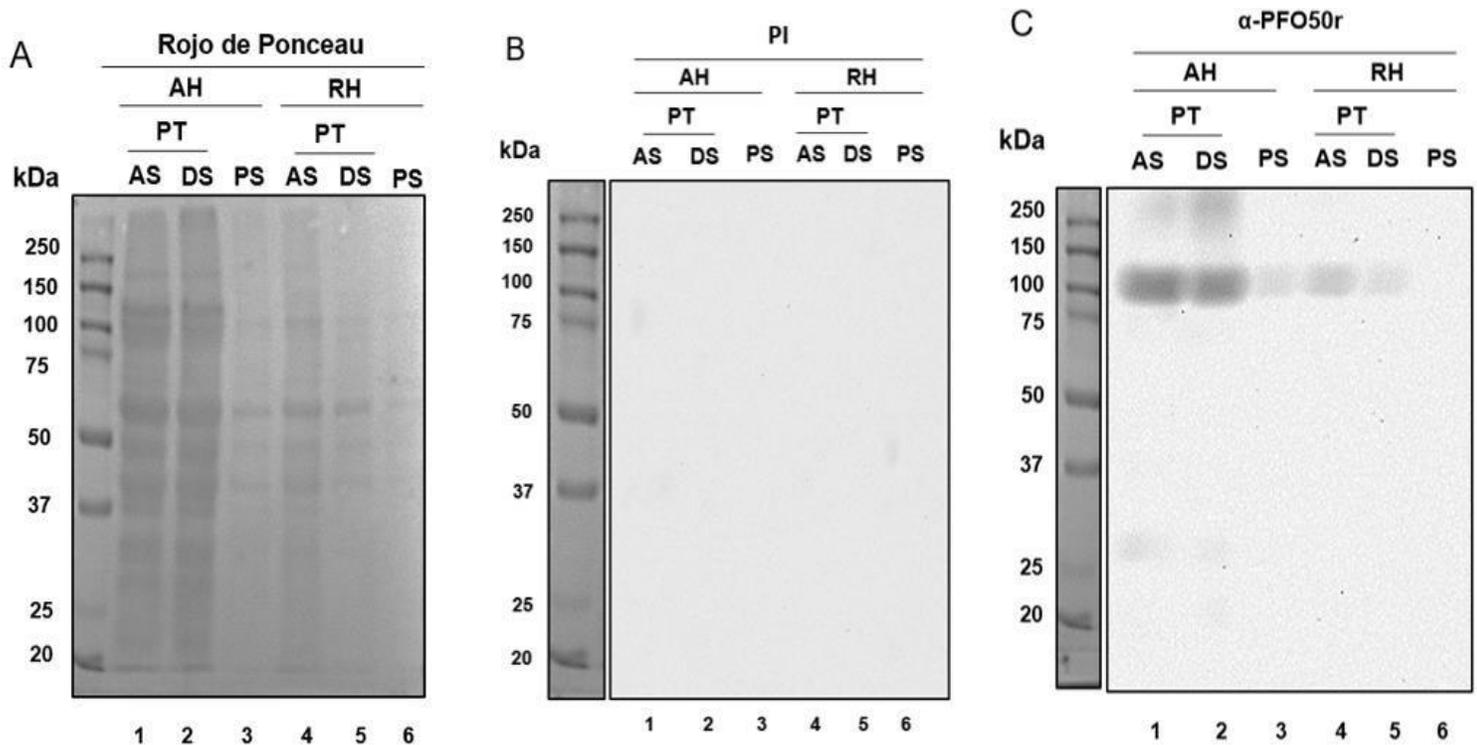


Figura 12. Secreción *in vitro* de la AP120/PFO de *T. vaginalis* en diferentes concentraciones de hierro. A) Membrana de NC teñida con Rojo de Ponceau como control positivo del ensayo con el perfil de proteínas totales y de proteínas de secreción de parásitos cultivados en AH (250 μ M) y RH (<1 μ M), analizados por SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10%, transferidos a membranas de NC. B) Membrana de NC incubada con suero preinmune (dilución 1:4 000) como control negativo del ensayo. C) Membrana de NC incubada con el anticuerpo anti-PFO50r (dilución 1:4 000) que reconoce una banda de 120 kDa correspondiente a la proteína AP120/PFO de *T. vaginalis*. Carril 1: proteínas totales antes de secretar (AS) en AH; Carril 2: proteínas totales después de secretar (DS) en AH; Carril 3: proteínas de secreción (PS) en AH; Carril 4: proteínas totales antes de secretar (AS) en RH; Carril 5: proteínas totales después de secretar (DS) en RH; Carril 6: proteínas de secreción (PS) en RH.

Con el ensayo anterior se demostró que la AP120/PFO de *T. vaginalis* no se degrada, pero también se demostró que se secreta en condiciones de AH. Sin embargo, para confirmar los resultados anteriores y demostrar que la AP120/PFO de *T. vaginalis* se secreta en esa condición se realizó el mismo procedimiento para el ensayo de secreción, con la diferencia que solo se tomaron las PT después de secretar. Antes y después del ensayo de secreción *in vitro* de los parásitos en diferentes concentraciones de hierro se midió la viabilidad celular con Azul de tripano en relación 1:1 y se observaron en la cámara de Neubauer. En la figura 13 se muestra la viabilidad celular de los parásitos antes (AS) y después (DS) de la secreción de dos ensayos individuales en los que la viabilidad fue mayor al 95% en todos los casos.

Como control del ensayo se muestra en la Figura 14 el patrón de proteínas en membranas de NC teñidas con Rojo de Ponceau. Las membranas de NC se incubaron de la siguiente forma: La membrana de la figura 14A se incubó con el anticuerpo anti-TvCP4, luego se le realizó stripping y se incubó con suero preinmune. La Figura 14D muestra la membrana de NC incubada con el anticuerpo anti-PFO50r, luego se le realizó stripping y se incubó con el anticuerpo anti-EhHKr.

En la Figura 14 se muestra los resultados del ensayo de secreción *in vitro* de los parásitos en ambas condiciones de hierro (AH y RH) en el cual las proteínas totales (PT) y proteínas de secreción (PS) de los parásitos se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de NC y se incubaron con distintos anticuerpos. En la figura 14B se observan las PT y PS de los parásitos en AH y RH incubadas con suero preinmune (PI) como control negativo del ensayo. En la figura 14C se muestra como control positivo de secreción del ensayo, una membrana de NC incubada con el anticuerpo anti-TvCP4r que reconoce una banda de 24 kDa de la proteasa TvCP4 madura tanto en PT (carriles 1-2) como en PS (carriles 3-4). En la Figura 14E se observa como control negativo de secreción una membrana de NC incubada con el anticuerpo anti-EhHKr que reconoce una banda de 40 kDa de la hexoquinasa de *T. vaginalis* solo en las PT (carriles 1-2), ausente en las PS (carriles 3-4); resultados esperados, dado que la TvHK es una proteína citoplásmica que no

se secreta. En la figura 14F se muestran los resultados de una membrana incubada con el anticuerpo anti-PFO50r, la proteína de interés. En la figura 14F se puede observar la presencia de una banda de ~120 kDa que corresponde a la AP120/PFO de *T. vaginalis* en las PT tanto de AH como de RH (carriles 1-2), aunque en mayor cantidad en AH. Sin embargo, en las PS se observa la banda únicamente en la condición de AH.

Los resultados anteriores confirman: primero, que la AP120/PFO de *T. vaginalis* no se degrada y segundo que se secreta en condiciones de AH. Los productos de secreción se obtuvieron después de 1 h de incubación a 37° C de los parásitos cultivados en las diferentes condiciones, por lo que podemos afirmar que después de los 60 min la desaparición de la marca de la proteína AP120/PFO de la membrana plasmática del parásito se debe a la secreción y no a la degradación de esta proteína en AH.

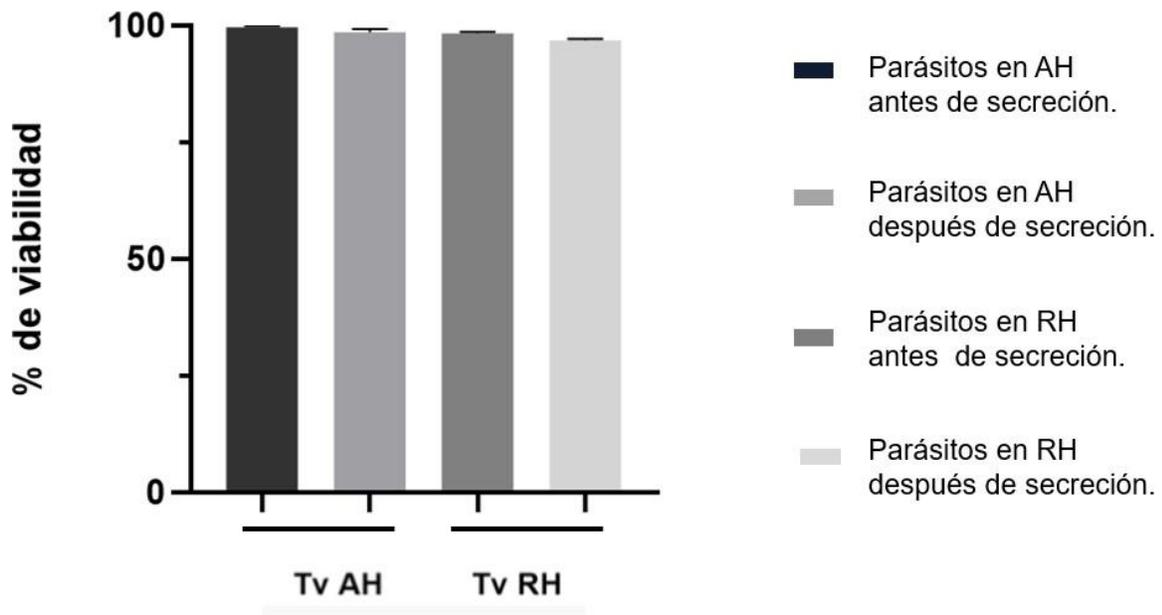


Figura 13. Viabilidad celular de los parásitos en diferentes concentraciones de hierro antes y después del ensayo de secreción *in vitro*. Ensayo de viabilidad celular con Azul de Tripano de parásitos cultivados en condiciones de AH y RH antes (AS) y después (DS) del ensayo de secreción *in vitro*. Los ensayos se realizaron por duplicado.

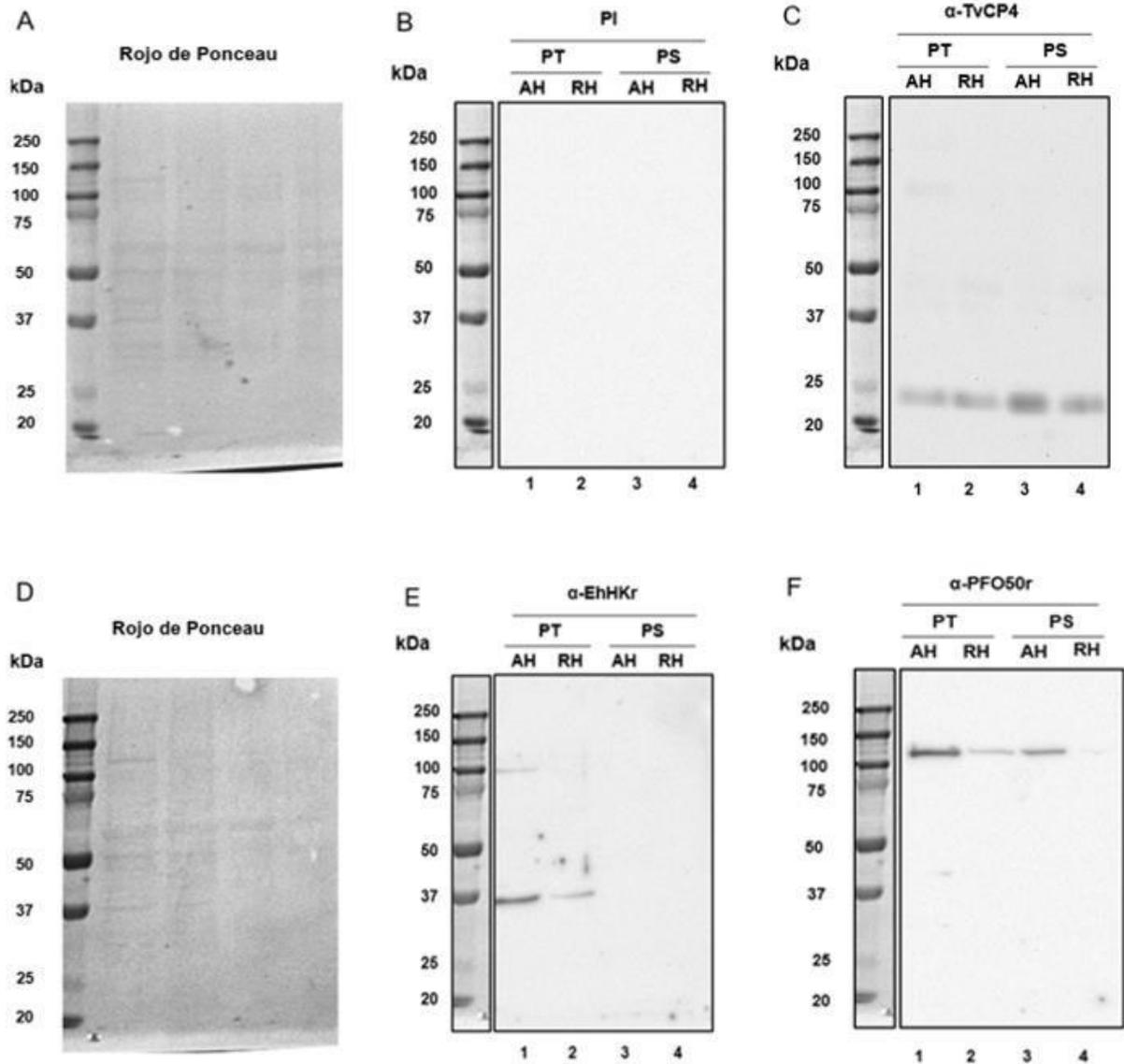


Figura 14. Efecto del hierro en la secreción *in vitro* de la AP120/PFO de *T. vaginalis*. Perfil de proteínas totales (PT, carriles 1 y 2) y de proteínas de secreción (PS, carriles 3 y 4) de parásitos cultivados en AH (250 μ M) y RH (<1 μ M), analizados por SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10%, transferidos a membranas de NC (A-D) e incubados con diferentes anticuerpos. B) Suero preinmune (dilución 1:4 000) como control negativo del ensayo. C) Anticuerpo anti-TvCP4r (dilución 1:1 000) que reconoce una banda de 24 kDa de la proteasa TvCP4 utilizado como control positivo de secreción. E) Anticuerpo anti-EhHKr (dilución 1:1 000) que reconoce una banda de ~40 kDa correspondiente a la hexoquinasa de *T. vaginalis* (TvHK) utilizado como control negativo de secreción. F) Anticuerpo anti-PFO50r (dilución 1:4 000) que reconoce una banda de 120 kDa correspondiente a la proteína AP120/PFO de *T. vaginalis*.

1.1. Vesículas extracelulares (VEs) de los productos de secreción *in vitro* de *T. vaginalis* en altas concentraciones de hierro.

Con el ensayo anterior se confirmó la secreción de la proteína AP120/PFO de *T. vaginalis* en altas concentraciones de hierro presente en los productos de secreción del parásito. Con el objetivo de observar el producto secretado por los parásitos cuando se encuentran en condiciones de AH realizamos el ensayo de secreción *in vitro* en laminillas. Los parásitos se colocaron sobre las laminillas con medio de secreción durante 1 h, luego se fijaron y se tiñeron con DAPI presente en la resina Vectashield y se analizaron por microscopía confocal.

Al igual que en el ensayo anterior, a los parásitos se les realizó ensayo de viabilidad celular con Azul de Tripano. La Figura 15A muestra que la viabilidad celular de los parásitos fue mayor al 95% en ambas condiciones (antes y después de la secreción) por lo que se prosiguió con el ensayo. En la Figura 15B se muestra a los parásitos en AH después de la secreción *in vitro* fijados y no permeabilizados y sus productos de secreción después de 1 h. Los parásitos presentan estructuras tipo vesículas con morfología y tamaño homogéneos distribuidas por toda la laminilla, así como también en la superficie del parásito, tal y como se muestra en el panel d. Esto muestra que se trata de material secretado directamente por el parásito y depositado en las laminillas, lo que sugiere se traten de vesículas extracelulares (VEs) secretadas en AH.

Una vez observado el producto secretado por los parásitos en AH en forma vesiculada, se recuperó por medio de ultracentrifugación, proceso por el cual se obtienen las vesículas extracelulares contenidas en el producto de secreción. Las VEs obtenidas se tiñeron con DIL utilizado como marcador de membrana y con DAPI para marcaje de DNA y se analizaron por microscopia confocal. Antes y después del ensayo de secreción se les midió la viabilidad celular a los parásitos con Azul de tripano. Los resultados se muestran en la figura 15, en donde se observa que la viabilidad de los parásitos fue mayor al 95%.

En la Figura 16 se observa la presencia de las vesículas extracelulares de tamaño homogéneo secretadas por el parásito en AH, las cuales oscilan entre 2-3 μm de diámetro. Estos resultados concuerdan con la morfología observada en la secreción de parásitos en AH en laminilla. Sin embargo, el tratamiento con el DIL no logró teñir muy bien las vesículas. El que las vesículas presentaran un tamaño homogéneo nos llamó la atención ya que cuando el parásito se encuentra en diferentes condiciones de glucosa libera vesículas de tamaños muy heterogéneos, tal y como se muestra en la Figura 17. Los tamaños de las VEs en la condición de AG oscilan entre 0.5 a 5 μm de diámetro (Rodríguez Cruz, tesis de maestría, 2018). Estos resultados nos demuestran que el parásito secreta diferentes VEs dependiendo de la condición de cultivo en la que se encuentra.

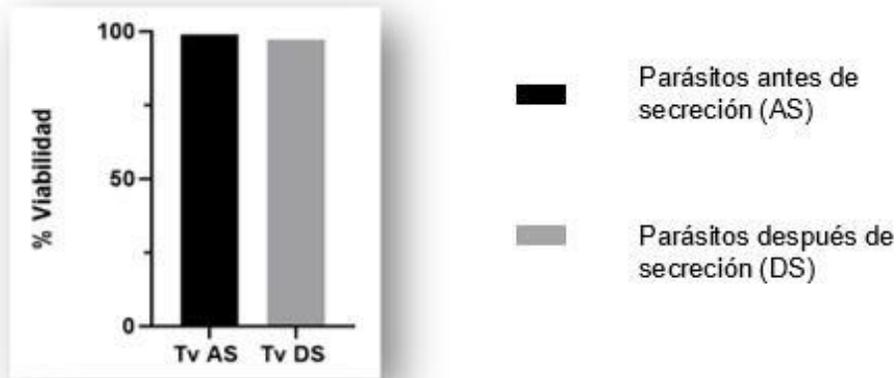
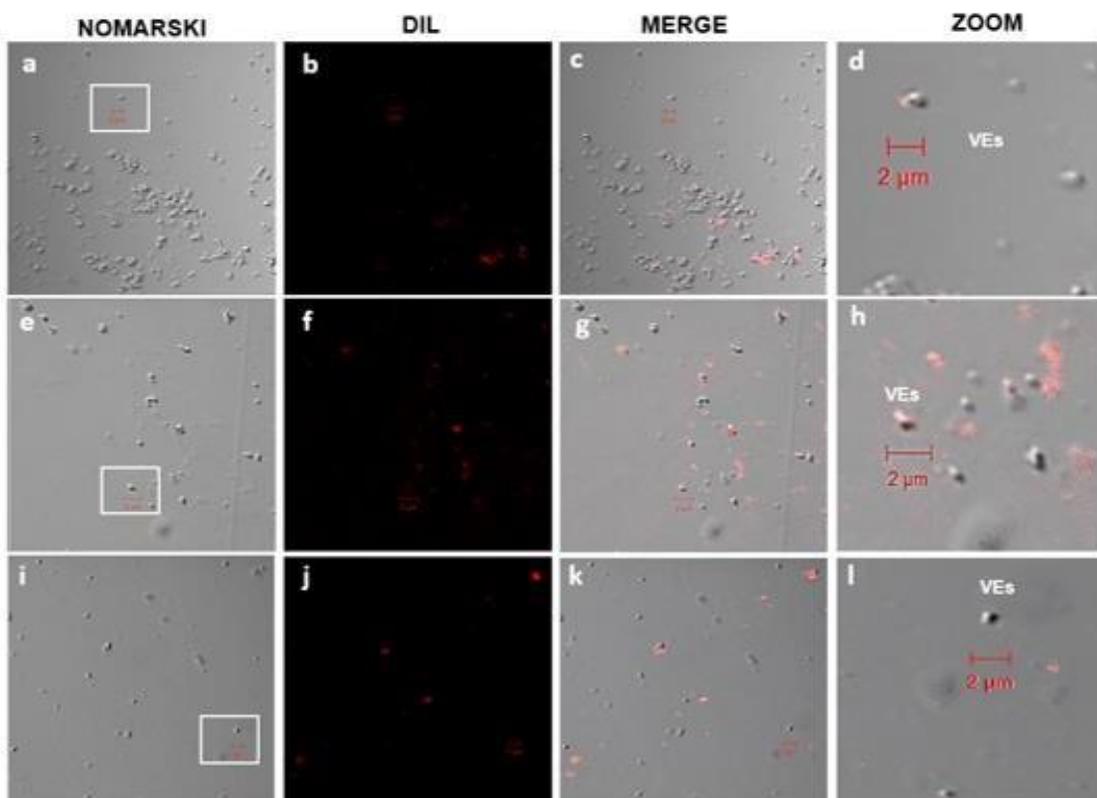
A**B**

Figura 16. Vesículas extracelulares (VEs) aisladas de los productos de secreción *in vitro* de *T. vaginalis* en altas concentraciones de hierro. A) Ensayo de viabilidad celular con Azul de Tripiano de parásitos cultivados en condiciones de AH y RH antes (AS) y después (DS) del ensayo de secreción *in vitro*. B) Vesículas extracelulares (VEs) aisladas de los productos de secreción *in vitro* de *T. vaginalis* en altas concentraciones de hierro obtenidas por ultracentrifugación.

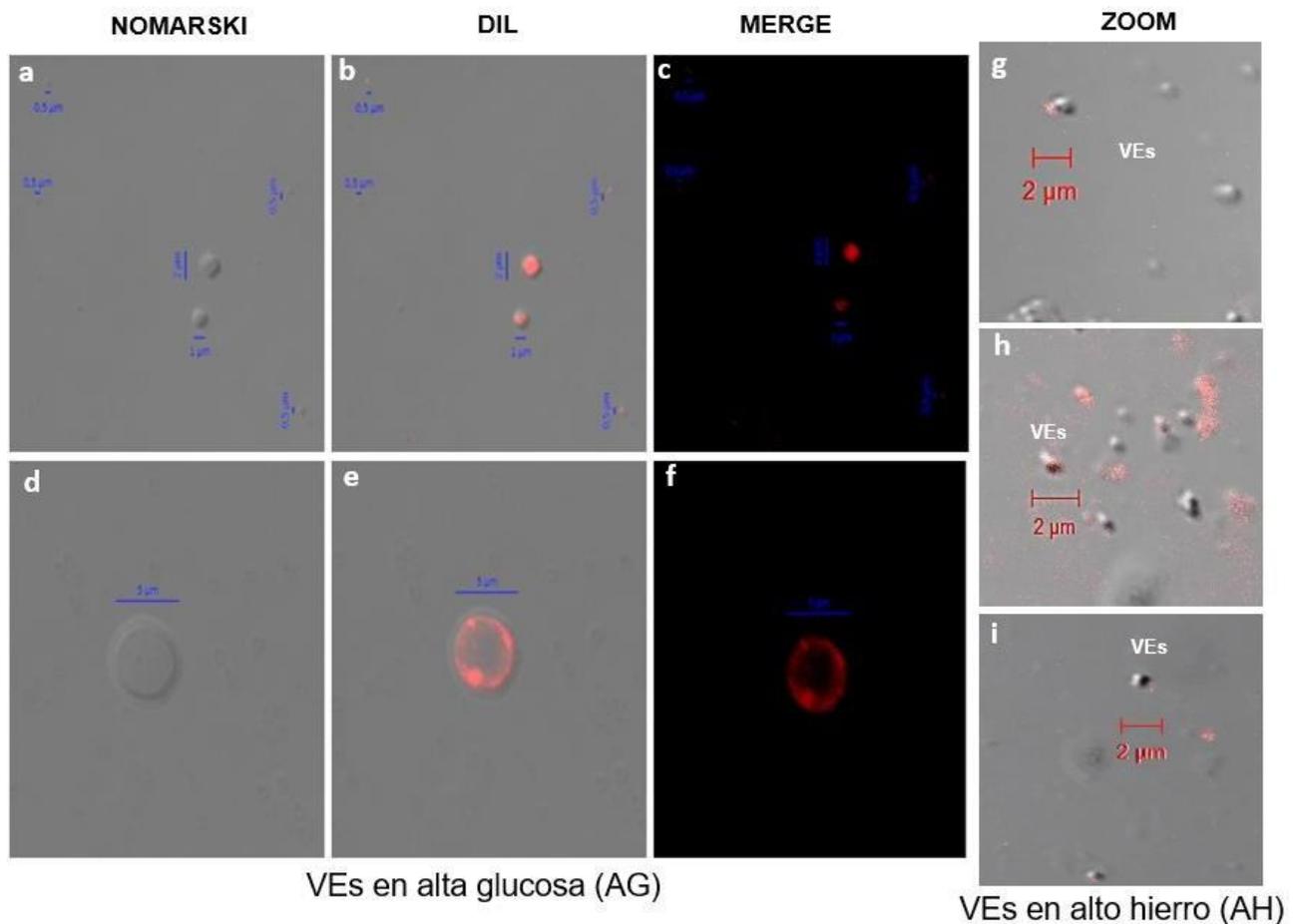


Figura 17. Vesículas secretadas por *T. vaginalis* en diferentes condiciones. Paneles a-f: Imágenes del ensayo de fluorescencia de VEs aisladas de parásitos en AG con diámetros entre 0.5-5 μm (Datos tomados de la tesis de Maestría de Rodríguez Cruz, 2018). Paneles g-i: Imágenes del ensayo de fluorescencia de VEs aisladas de parásitos en AH con diámetros entre 2-3 μm . Las vesículas se incubaron con DIL (en rojo) y con DAPI (en azul) para teñir material genómico que pudiera estar presente en las vesículas. Las vesículas se obtuvieron de parásitos en secreción *in vitro* 1 h a 37 °C y luego se analizaron por microscopía confocal.

2. Participación de la AP120/PFO de *T. vaginalis* en la interacción de parásitos en altas concentraciones de hierro con monocapas de células HeLa.

En los antecedentes de este trabajo se mencionó la capacidad que tiene la AP120/PFO de *T. vaginalis* de unirse a la superficie de células HeLa mediante ensayos *in vitro* de ligando-adhesina en los que se utilizaron extractos de parásitos en AH con células HeLa fijadas. Esto permitió caracterizar a la AP120/PFO de *T. vaginalis* como una adhesina. Dado que en estos ensayos se utilizaron extractos de parásitos y células HeLa fijadas, nos preguntamos si este fenómeno puede ser reproducible al utilizar un modelo más parecido a la realidad, utilizando parásitos completos y viables con monocapas de células HeLa viables y sin fijar. Para responder esta pregunta se realizaron ensayos de interacción de parásitos vivos en AH con monocapas de células HeLa a 37°C por 45 min y analizados por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos para detectar HeLa y Tv.

Para la interacción se realizaron dos metodologías diferentes. En la primera metodología después de la interacción de los parásitos cultivados en AH con monocapas de células HeLa, se fijaron, pero no se permeabilizaron antes de la IFI con los anticuerpos anti-HeLa para detectar proteínas de la membrana de HeLa y anti-PFO50r para detectar a la adhesina AP120/PFO, se analizaron por microscopía epifluorescencia y confocal. Esta metodología nos permitió responder la pregunta ¿La interacción parásitos-célula permite la unión de la AP120/PFO de *T. vaginalis* a la superficie de las células HeLa?

En las Figuras 18-20 se muestran los resultados del análisis por microscopía de epifluorescencia. En las imágenes se muestra el reconocimiento del anticuerpo anti-HeLa sobre la superficie de las células HeLa (mostrado en color rojo) y el reconocimiento de la proteína AP120/PFO de *T. vaginalis* (mostrado en color verde) sobre los parásitos. En la figura 18 se observan tres fenómenos principales: 1) la adhesión de los parásitos a las células HeLa, 2) la presencia de “blebbing” de diferentes tamaños en las células HeLa en respuesta a la interacción con Tv y 3) la

liberación de material en forma de vesículas extracelulares de las células HeLa y su depósito en los parásitos. El primer fenómeno de adhesión representado en la figura 18 con un recuadro, nos indica que en efecto existe una interacción directa de los parásitos con las células HeLa, observándose como las membranas de los parásitos adquieren la forma de la célula HeLa. Además, se puede observar cómo, en este caso, más de un parásito puede unirse a una misma célula HeLa. Este proceso de adhesión de los parásitos a las células HeLa es el que desencadena los otros dos fenómenos descritos anteriormente, la formación de “blebbing” y la liberación de material de las células HeLa y su depósito en los parásitos.

La formación de “blebbing” muestra los primeros pasos de daño celular ocasionado por la interacción de los parásitos con las células HeLa. En la figura 18 se señala esta estructura con la cabeza de flecha, se observa como una protrusión de la membrana de la célula HeLa, indicativo del daño celular presente. En la figura 19 se observa este mismo fenómeno, en este caso la presencia de “blebbing es de diferentes tamaños”. Esto nos podría sugerir la presencia de diferentes etapas de daño celular, dependiendo del número y diámetro de estas estructuras por célula.

En la figura 19 y 20 se puede observar el tercer fenómeno descrito, la liberación de material en forma de vesículas extracelulares (Ves en rojo) de las células HeLa y su depósito en los parásitos. La figura 20 (donde mayoritariamente se encuentran parásitos) permite ilustrar la reproducibilidad del fenómeno, ya que todos los parásitos muestran sobre ellos numerosas VEs liberadas por las células HeLa. Estos resultados son consistentes con lo reportado, ya que las vesículas extracelulares pueden liberarse de los patógenos (virales, bacterianos y parásitos), así como de las células infectadas, y éstas son potencialmente relevantes para el proceso de infección y la respuesta inmune a la infección (Sampaio *et al.*, 2017).

Este fenómeno podría explicarse con tres posibles eventos. El primero de ellos, es como un mecanismo de defensa de las células HeLa contra el parásito, en el cual consiste en material liberado por las células HeLa en forma de VEs que en su interior pudiera contener sustancias que le permitan actuar contra el parásito. Por lo que la célula liberó estas VEs y se depositaron en la superficie de los parásitos.

El segundo evento podría tratarse de un mecanismo de evasión del sistema inmune del hospedero por parte del parásito. En la introducción de este trabajo se describieron diferentes mecanismos de evasión del sistema inmune que presenta *T. vaginalis*, en el cual uno de ellos era el recubrimiento de proteínas del hospedero. Por lo que podemos proponer que posiblemente el parásito durante la interacción fagocitó parte de la célula HeLa y recubrió su superficie con proteínas de la célula, logrando así evadir el sistema inmune. De esta manera, el tercer evento es que el anticuerpo anti-HeLa presente reactividad cruzada con las proteínas del parásito que ubica en su superficie con homología a proteínas del hospedero como las adhesinas AP65, AP51 y AP33. Así como también otras enzimas como la GADPH, enolasa, entre otras.

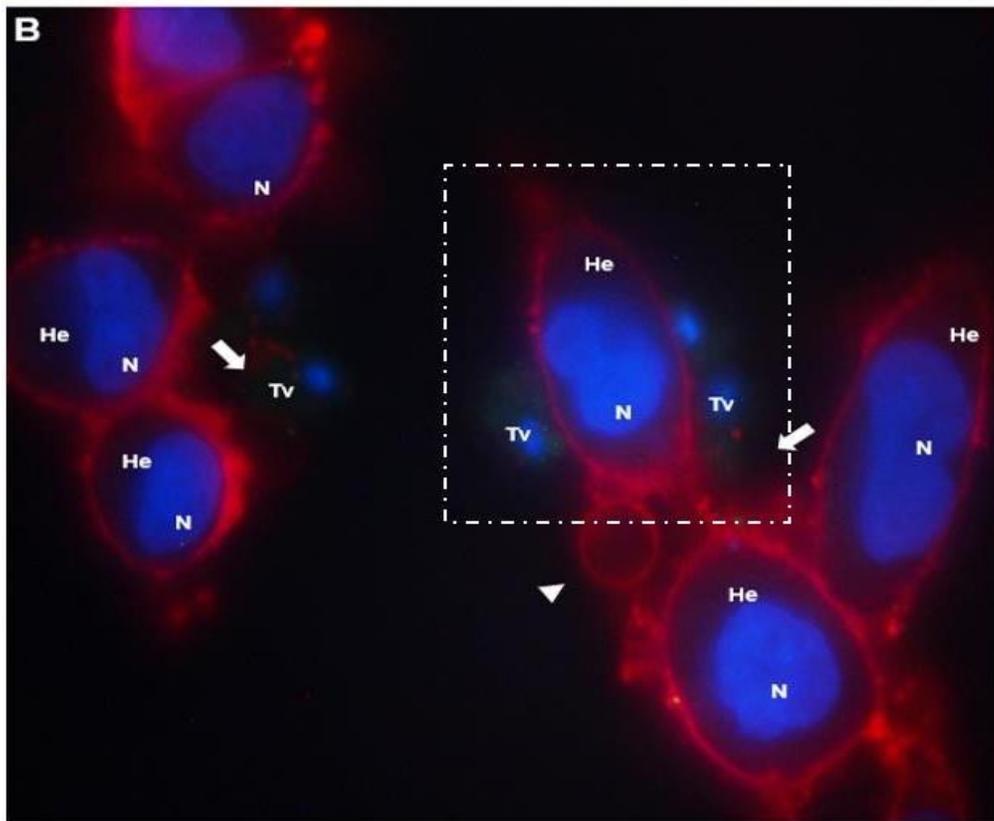
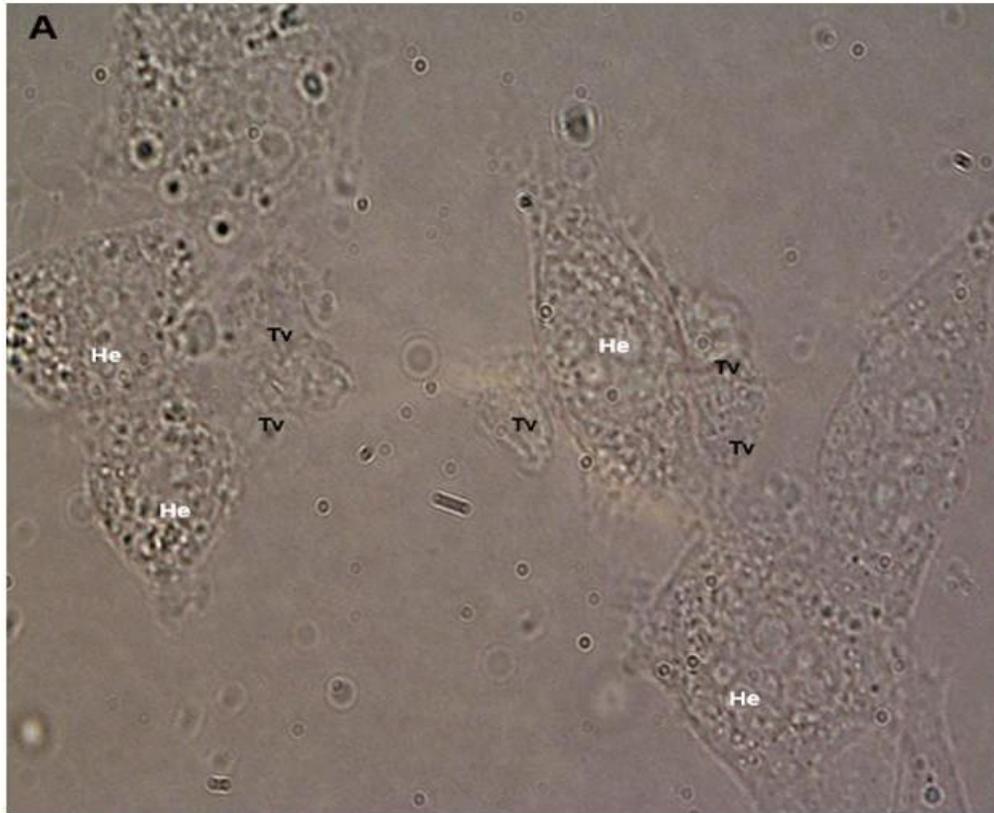


Figura 18. Adhesión de Tv a la superficie de las células HeLa resultado de la interacción Tv-células HeLa en altas concentraciones de hierro. Imágenes de epifluorescencia de la interacción entre parásitos en AH con monocapas de células HeLa incubadas con los anticuerpos anti-HeLa y anti-pepPFOAr. A) Nomarski. B) parásitos (Tv) con restos de material (vesículas) de células HeLa (flecha gruesa) y presencia de “blebbing” en células HeLa (cabeza de flecha). En el recuadro se representa el fenómeno de adhesión de los parásitos a la membrana de las células HeLa. Las imágenes se observaron en un microscopio de epifluorescencia.

Figura 19. Formación de “blebbing” en células HeLa provocadas por la interacción Tv-células HeLa en altas concentraciones de hierro. Imágenes de epifluorescencia de la interacción *in vivo* de parásitos en AH con monocapas de células HeLa que se fijaron, pero no se permeabilizaron antes de la incubación con los anticuerpos anti-HeLa y anti-pepPFOA. A) Nomarski. B) Epifluorescencia de parásitos (Tv), liberación de material (vesículas) de células HeLa (flecha gruesa) y presencia de “blebbing” de diferentes diámetros en células HeLa (cabeza de flecha).

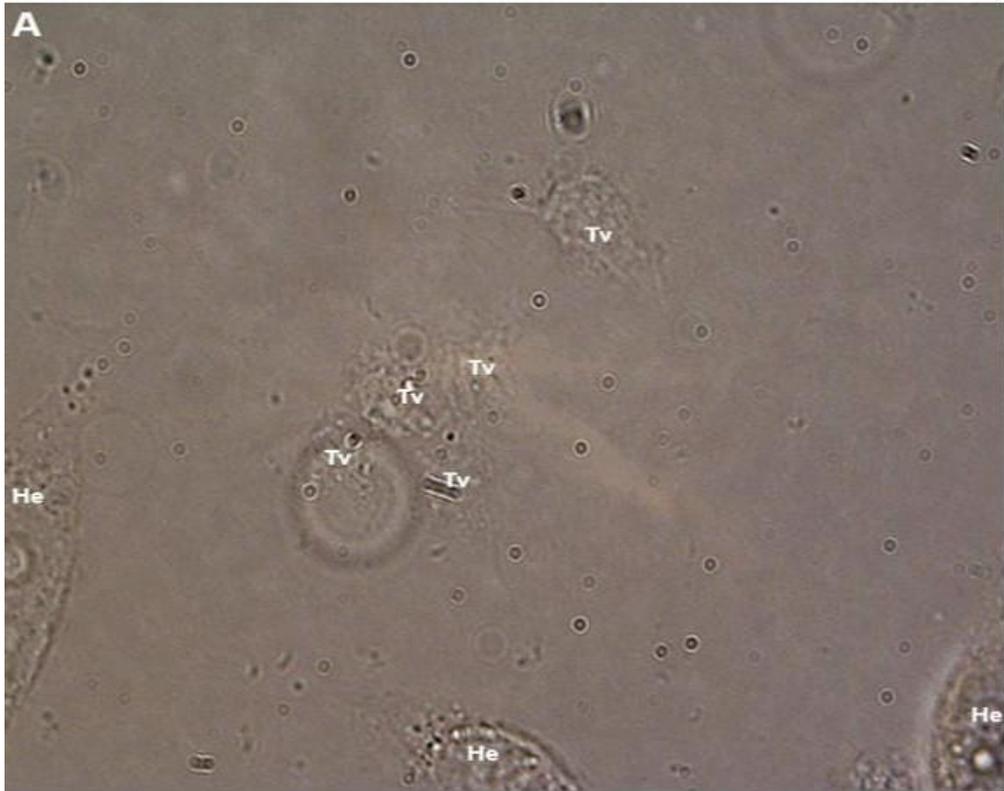


Figura 20. Liberación de VEs por las células HeLa producto de la interacción TV-células HeLa en altas concentraciones de hierro. Imágenes de epifluorescencia de la interacción *in vivo* de parásitos en AH con monocapas de células HeLa que se fijaron, pero no se permeabilizaron antes de la incubación con los anticuerpos anti-HeLa y anti-pepPFOA. A) Nomarski. B) Epifluorescencia, se observa la liberación de material (vesículas) de células HeLa (flecha gruesa) depositado en los parásitos (Tv).

Con los resultados anteriores se pudo observar de manera general, los efectos de la interacción de los parásitos con las células HeLa. Sin embargo, la resolución de la microscopía de epifluorescencia solo nos permitió observar la localización de la proteína AP120/PFO de *T. vaginalis* en los parásitos. Para detectar que la proteína se une a la superficie de las células HeLa, las mismas laminillas de las interacciones HeLa-Tv se observaron por microscopía confocal en un microscopio Zeiss y se analizaron las imágenes con el software ZEN 3.1 (Carl Zeiss, Germany).

Las Figuras 21 y 22 muestran de manera más clara la marca de proteína AP120/PFO de *T. vaginalis* tanto en los parásitos como en la superficie de las células HeLa. Tomando en cuenta que no están permeabilizadas, se asume que la proteína se encuentra solo en la superficie de las células y de los parásitos. Sin embargo, estos resultados sugieren que también se pudiera encontrar a la AP120/PFO de *T. vaginalis* dentro de las células HeLa debido al daño celular provocado por el parásito durante la interacción.

En la figura 21 se observa la presencia de la proteína AP120/PFO (en verde) dentro y en la superficie del parásito como es de esperarse, así como también sobre la superficie de las células HeLa (en rojo). Obsérvese en el acercamiento de la figura 21e indicado con la cabeza de flecha de color blanco, puntos de colocalización (en amarillo) entre la proteína AP120/PFO de *T. vaginalis* (en verde) con las proteínas de superficie de las células HeLa (en rojo) en la célula HeLa, así como también en los parásitos (Figura 21f). Estos resultados sugieren un proceso dinámico de respuesta de ambos tipos celulares durante la interacción Tv: células HeLa, en donde tanto las células como los parásitos liberan material y lo depositan sobre sus superficies. Sobre todo, confirma la unión de la proteína AP120/PFO a la superficie de las células HeLa cuando los parásitos vivos interaccionan con monocapas de células HeLa vivas en altas concentraciones de hierro, tal como se demostró con los ensayos *in vitro* utilizando extractos de parásitos con células HeLa fijadas.

En la figura 22 se muestra la colocalización (en amarillo) entre las proteínas de superficie de las células HeLa (en rojo) con la AP120/PFO de *T. vaginalis* (en verde) en la superficie de la mayoría de las células HeLa. Específicamente en el panel e, se muestra una célula HeLa no dañada con marca de colocalización en toda su superficie. Sin embargo, en el panel f, además de observar la colocalización en la superficie, se muestra abundante marca (en verde) de la proteína AP120/PFO de *T. vaginalis* en su interior. Esto sugiere que la interacción de los parásitos con las células HeLa provocó un daño que permitió que la proteína AP120/PFO se detectara en el interior de la célula HeLa. Sin embargo, con estos resultados no se puede afirmar este fenómeno. Por lo que la siguiente pregunta que nos surgió fue ¿Permite la interacción de parásitos-célula la internalización de la AP120/PFO de *T. vaginalis* a la célula HeLa?

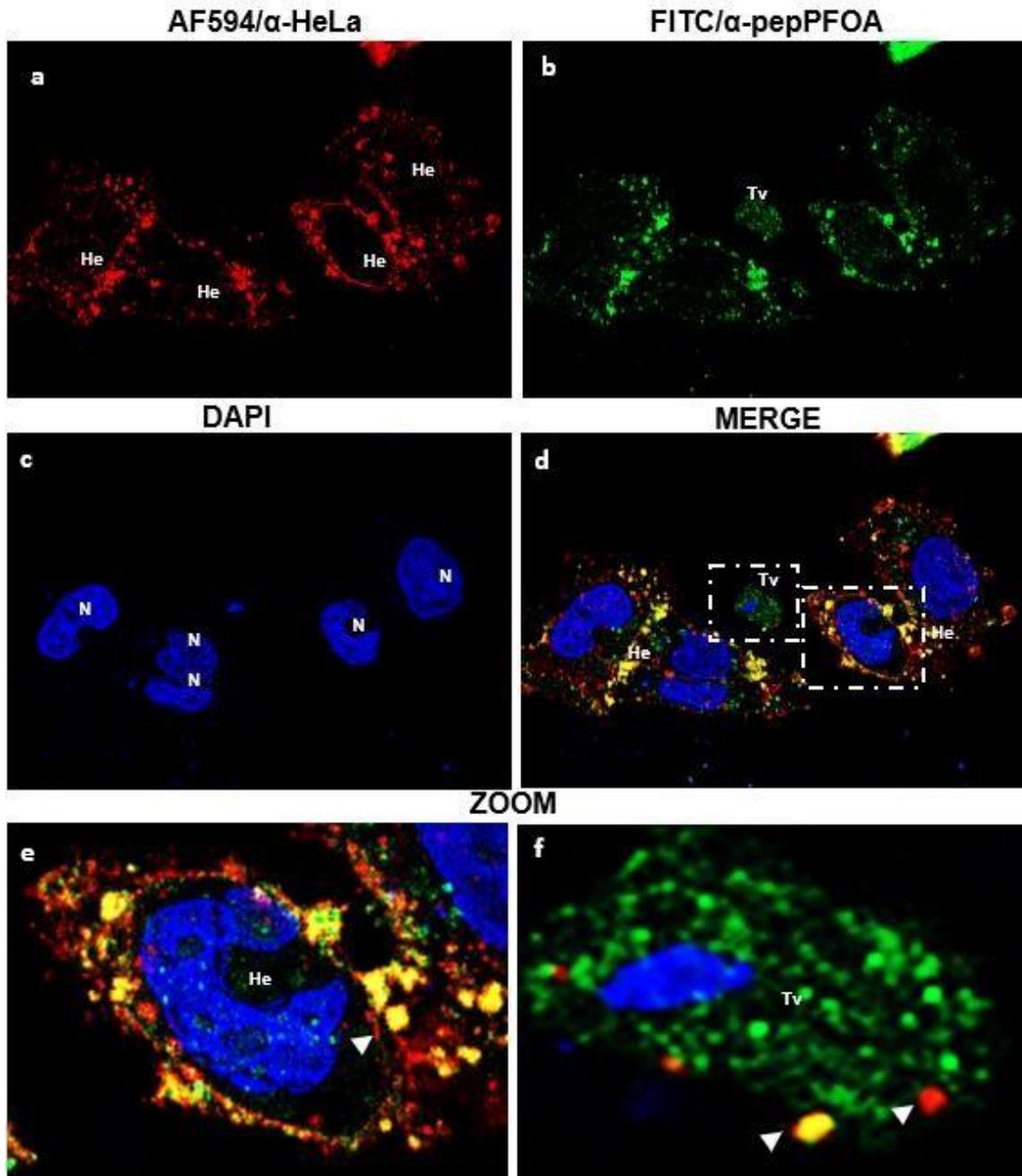


Figura 21. Microscopía confocal de la localización de la AP120/PFO de *T. vaginalis* en células HeLa después de su interacción. Imágenes de microscopía confocal del ensayo de inmunofluorescencia de la interacción *in vivo* de parásitos en AH con monocapas de células HeLa que se fijaron, pero no se permeabilizaron antes de la incubación con los anticuerpos anti-HeLa (panel a) y anti-pepPFOA (panel b). En el zoom (paneles e y f) se observa colocalización (en amarillo) entre la AP120/PFO de *T. vaginalis* (en verde) y las proteínas de superficie de células HeLa (en rojo) tanto en los parásitos (cabeza de flecha blanca) como en las células HeLa. Las interacciones se observaron por microscopía confocal en un microscopio Zeiss y las imágenes se analizaron con el software ZEN 3.1 (Carl Zeiss, Germany).

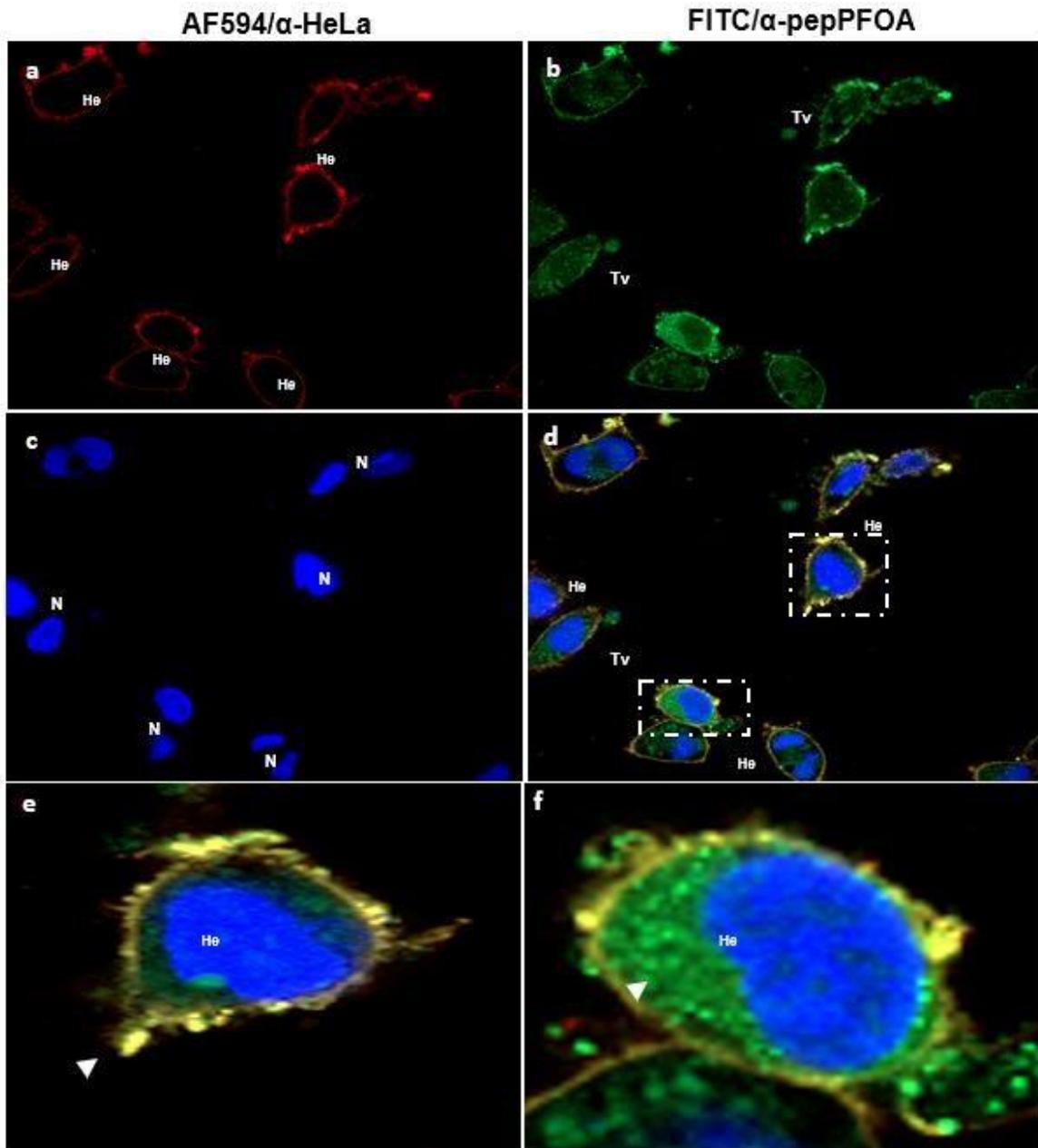


Figura 22. Microscopia confocal de los efectos causados por la interacción Tv-células HeLa sobre las células HeLa. Imágenes de microscopía confocal de la interacción *in vivo* de parásitos en AH con monocapas de células HeLa que se fijaron, pero no se permeabilizaron antes de la incubación con los anticuerpos anti-HeLa (panel a) y anti-pepPFOAr (panel b). DAPI (panel c). En el zoom (paneles e y f) se observa colocalización entre la AP120/PFO de *T. vaginalis* y las proteínas de superficie de células HeLa en la célula HeLa (cabeza de flecha). También se observa a la proteína AP120/PFO de *T. vaginalis* en el citoplasma de las células HeLa. Las interacciones se observaron por microscopía confocal en un microscopio Zeiss y se analizaron las imágenes con el software ZEN 3.1 (Carl Zeiss, Germany).

Para responder la pregunta planteada ¿permite la interacción de parásitos-célula la internalización de la AP120/PFO de *T. vaginalis* a la célula HeLa? Se realizó una segunda metodología para el análisis de la interacción. Después de la interacción Tv: células HeLa las células se fijaron y se permeabilizaron con Tritón X-100 antes de la IFI con los anticuerpos anti-tubulina, para detectar proteínas internas de las células HeLa y anti-PFO50r, para detectar a la adhesina AP120/PFO de *T. vaginalis*, se analizaron por epifluorescencia y microscopía confocal.

A diferencia de los resultados de las interacciones entre parásitos y células HeLa que en el procesamiento se fijaron, pero no se permeabilizaron, en estas figuras, las células HeLa no presentan el fenómeno de “blebbing” antes descrito. Sin embargo, la morfología de las células sí parece haberse alterado. A su vez, el número de parásitos es mayor al número de células y la marca de la proteína de tricomonas depositada sobre las células HeLa también parece ser mayor.

En la figura 23A se muestra el campo claro de la interacción célula-parásito en la que se señala a las células HeLa (He) y a los parásitos (Tv). En esta figura se muestra el fenómeno de adhesión en los recuadros, en donde se observa a parásitos adheridos a la superficie de las células HeLa. También se observa que un mismo parásito puede adherirse a dos células HeLa simultáneamente. Estos resultados concuerdan con los resultados anteriores de las interacciones sin permeabilizar, mostrando que no se trata de un fenómeno fortuito. Esto se confirmó por inmunofluorescencia representada en la figura 23B, en donde se observa claramente la adhesión de los parásitos a las células HeLa. En la figura 24, se muestra principalmente la presencia de la AP120/PFO de *T. vaginalis* en el interior de las células HeLa, representada con las cabezas de flecha.

En la figura 25B se muestra la imagen de epifluorescencia de la interacción y se observa a las células HeLa (He) con una red de filamentos de tubulina reconocidos por el anticuerpo anti-tubulina (en rojo) en mayor proporción que parásitos (Tv) (en verde).

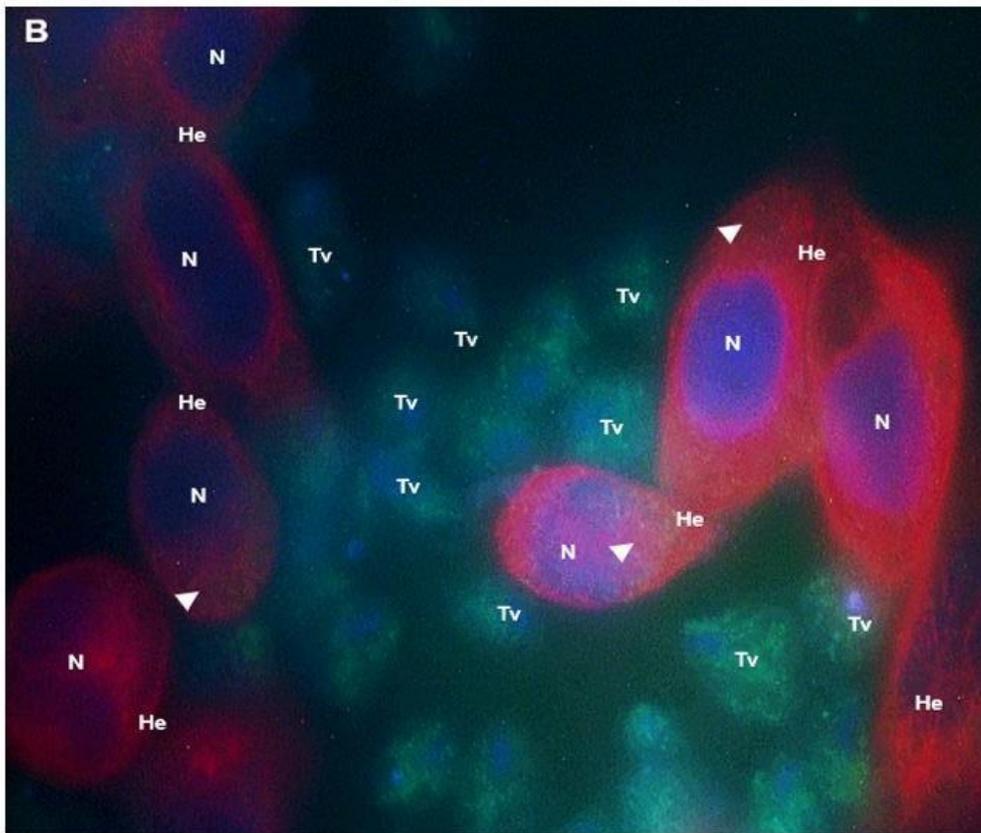


Figura 23. Adhesión de Tv a la superficie de las células HeLa resultado de la interacción permeabilizada de Tv-células HeLa en altas concentraciones de hierro. Imágenes de epifluorescencia de la interacción *in vivo* de parásitos en AH con monocapas de células HeLa que se fijaron y permeabilizaron antes de la incubación con los anticuerpos anti-tubulina y anti-PFO50r. A) Nomarski: en los recuadros se muestra el proceso de adhesión. B) Epifluorescencia de parásitos (Tv), células HeLa (He) en donde se señala el núcleo (N) y marca de la proteína AP120/PFO de *T. vaginalis* depositada en el interior de las células HeLa (cabeza de flecha blanca). Esta metodología se aplicó a las siguientes figuras (24-27).

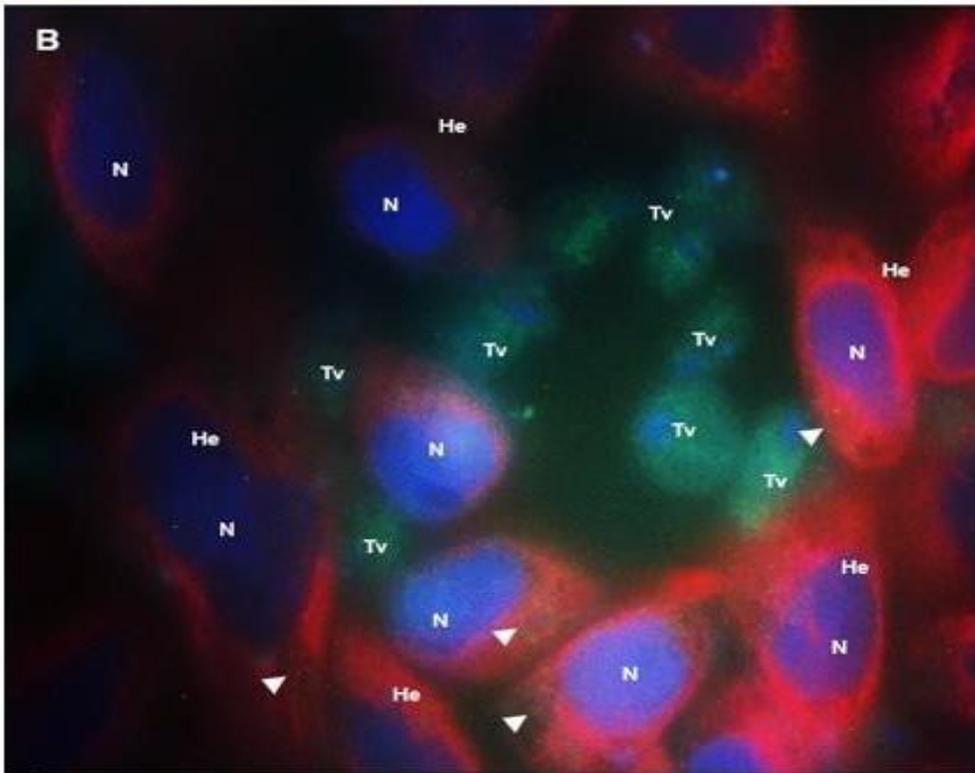


Figura 24. Localización de la AP120/PFO de *T. vaginalis* en células HeLa después de la interacción permeabilizada de Tv-células HeLa. Imágenes de epifluorescencia de la interacción *in vivo* de parásitos en AH con monocapas de células HeLa que se fijaron y permeabilizaron antes de la incubación con los anticuerpos anti-tubulina y anti-PFO50r. A) Nomarski. B) Epifluorescencia de parásitos (Tv), células HeLa (He) en donde se señala el núcleo (N, en azul) y marca (en amarillo) de la proteína AP120/PFO de *T. vaginalis* depositada en el interior de las células HeLa (cabeza de flecha blanca).

Figura 25. Reconocimiento de filamentos de tubulina en células HeLa mediante epifluorescencia de la interacción permeabilizada de Tv-células HeLa. Imágenes de la interacción *in vivo* de parásitos en AH con monocapas de células HeLa que se fijaron y permeabilizaron antes de la incubación con los anticuerpos anti-tubulina y anti-PFO50r. A) Nomarski. B) Epifluorescencia de parásitos (Tv), células HeLa (He) en donde se señala el núcleo (N) y marca de la proteína AP120/PFO de *T. vaginalis* depositada en el interior de las células HeLa (cabeza de flecha blanca). Obsérvense los filamentos de tubulina de las células HeLa.

Las interacciones *in vivo* entre los parásitos en AH con monocapas de células HeLa que posteriormente se fijaron y permeabilizaron antes de la incubación con los anticuerpos, también se analizaron por microscopía confocal con el software ZEN 3.1 (Carl Zeiss, Germany). En las figuras 26 y 27 se muestran los resultados de las interacciones.

En ambas figuras se muestra a las células HeLa (He) con sus filamentos de tubulina (en rojo) y con marca de la proteína AP120/PFO (en verde) de *T. vaginalis* en su interior. En la Figura 26 panel d se muestra un gran acumulo de proteína AP120/PFO de *T. vaginalis* depositado en las células HeLa, representado por cabeza de flecha. Al igual que en las imágenes de epifluorescencia mostradas previamente, se observa un gran número de parásitos conteniendo a la proteína AP120/PFO. Esto puede deberse a que el contacto con las células provoca la producción y a su vez la secreción de la proteína AP120/PFO, depositándose en última instancia en las células HeLa.

En la figura 27 además se observa como la marca de la proteína AP120/PFO (en verde) en la célula HeLa (en rojo) se encuentra entre los filamentos de tubulina. Como este es un marcador de estructuras internas, se considera que la marca de la proteína observada se encuentra dentro de las células, no en la superficie como se observó con los resultados anteriores con las muestras no permeabilizadas.

Esto nos permite entonces concluir que, además de que la interacción entre parásitos vivos en AH con monocapas de células HeLa vivas permite la secreción de la proteína AP120/PFO de *T. vaginalis*; también permite que una vez secretada se internalice la AP120/PFO en la célula HeLa para cumplir con una tercera función aún desconocida. Por lo tanto, estos datos sugieren: 1) que la interacción entre parásitos y células HeLa permiten la internalización de la proteína a la célula HeLa y 2) la multifuncionalidad de la proteína AP120/PFO de *T. vaginalis* cuando se cultivan en AH.

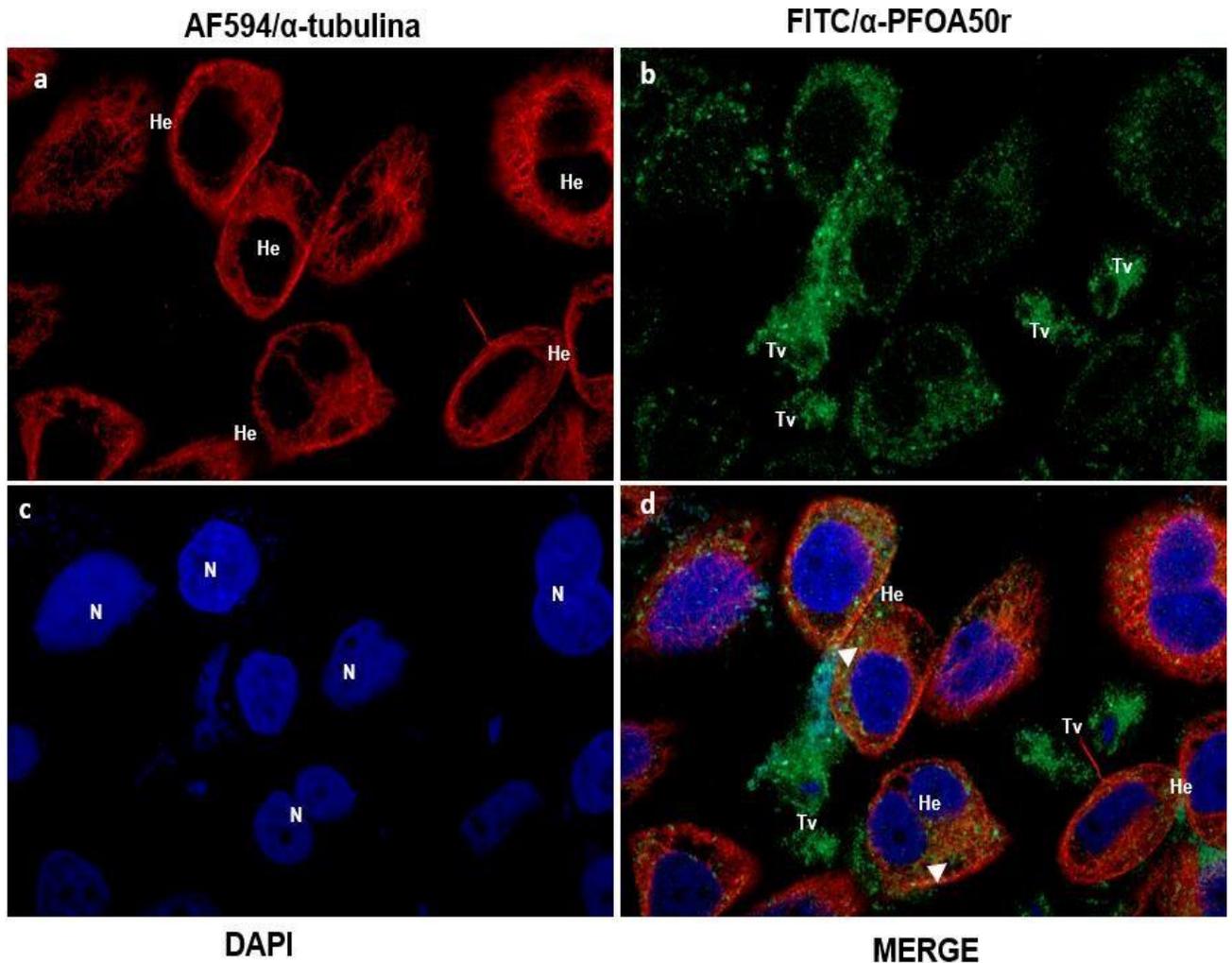


Figura 26. Microscopía confocal de la AP120/PFO de *T. vaginalis* en el interior de las células HeLa después de la interacción permeabilizada de Tv-células HeLa. Imágenes de microscopía confocal del ensayo de inmunofluorescencia indirecta de la interacción de parásitos en AH (Tv) con monocapas de células HeLa (He) que se fijaron y permeabilizaron antes de la incubación con los anticuerpos anti-tubulina (panel a) y anti-PFO50r (panel b). Se señalan los núcleos de las células HeLa (N). En el panel d se señala la presencia de la AP120/PFO de *T. vaginalis* en el interior de las células HeLa. Las imágenes se analizaron con el software ZEN 3.1 (Carl Zeiss, Germany).

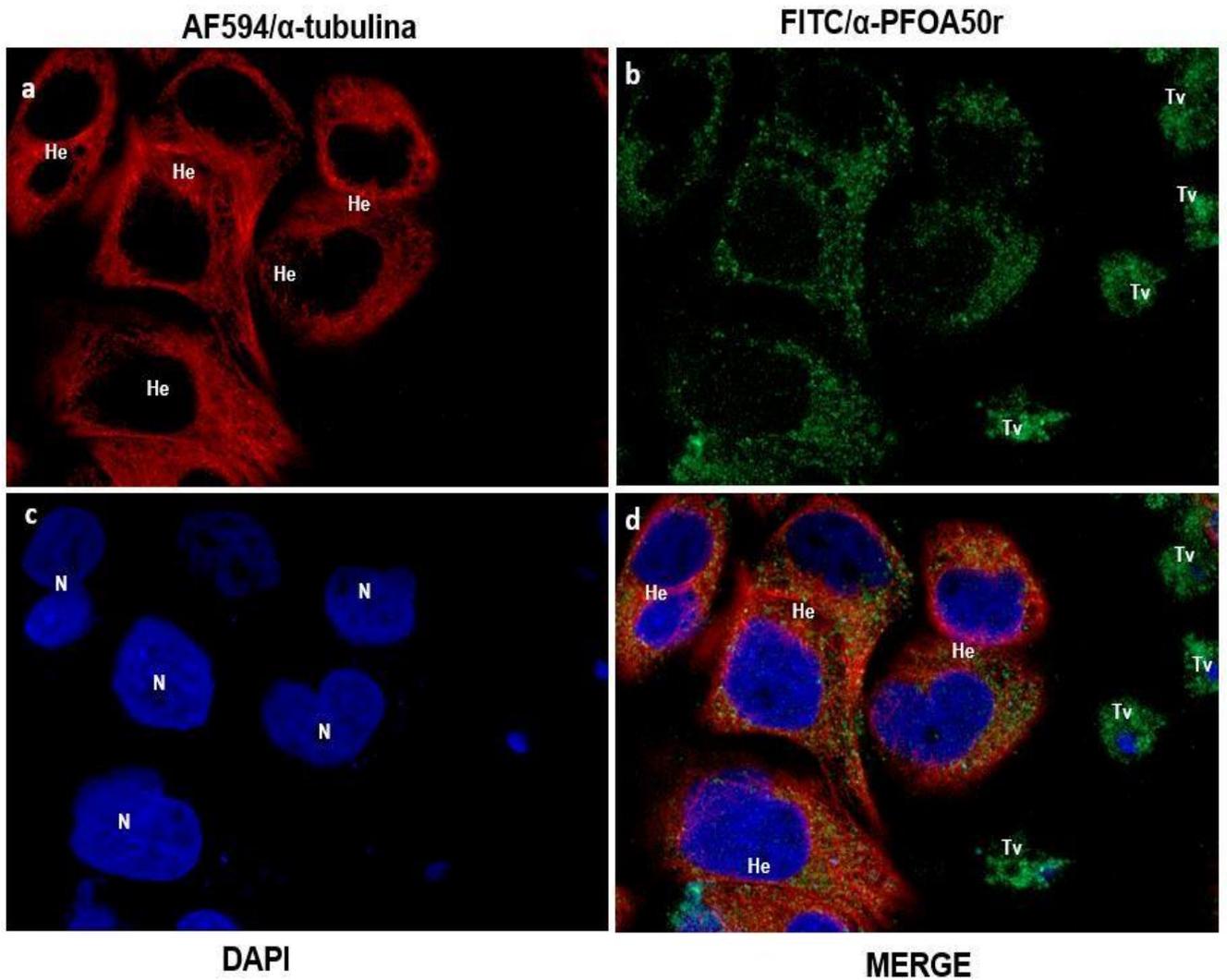


Figura 27. Reconocimiento de filamentos de tubulina en células HeLa mediante microscopia confocal de la interacción permeabilizada de Tv-células HeLa. Imágenes de confocal de la interacción *in vivo* de parásitos en AH (Tv) con monocapas de células HeLa (He) que se fijaron y permeabilizaron antes de la incubación con los anticuerpos anti-tubulina (panel a) y anti-PFO50r (panel b). Se señalan los núcleos de las células HeLa (N, panel c). En el panel d se observa marca de la AP120/PFO de *T. vaginalis* en el interior de las células HeLa.

A manera de control y de demostrar que la presencia de la AP120/PFO de *T. vaginalis* en las células HeLa es producto de su secreción y su posterior depósito e internalización en las células HeLa, se realizó un BLAST entre la proteína AP120/PFO de *T. vaginalis* contra el genoma del *Homo sapiens*, se trabajó con la secuencia de la proteína PFOA con el TVAG_198110 en la base de datos TrichDB y se realizó el BLAST en la base de datos de NCBI con la proteína completa y con el fragmento PFO50 de la región COOH-terminal contra la que se hizo el anticuerpo utilizado en este trabajo.

Los resultados no mostraron identidad entre la secuencia de la proteína AP120/PFO de *T. vaginalis* con ninguna secuencia del genoma humano (figura 28) por lo que podemos comprobar el hecho de que esta proteína es una proteína única del parásito, tal y como se describió en los antecedentes de este trabajo. Esto nos indica que, en efecto, la proteína AP120/PFO encontrada en las células HeLa proviene del parásito. De esta manera podemos confirmar que el parásito secreta la proteína AP120/PFO y la deposita en la superficie de las células HeLa y posteriormente se internaliza en las células.

Además, se realizó el BLAST contra la región C-terminal de la proteína PFO de *T. vaginalis* y el genoma del *Homo sapiens*. Esta región es la región que se utilizó para producir el anticuerpo anti-PFO50r utilizado para los experimentos en este trabajo. Los resultados no mostraron identidad con ninguna secuencia del genoma humano, por lo que nos afirma que la proteína se encuentra únicamente en el parásito.

A

BLAST[®] » blastp suite » results for RID-H1USRSF3014

[< Edit Search](#)

[Save Search](#)

[Search Summary](#) ▾

i Your search is limited to records that include: Homo sapiens (taxid:9606)

Job Title	PFO T.vaginalis vs Homo sapiens		
RID	H1USRSF3014	Search expires on 07-18 08:04 am	Download All ▾
Program	? Citation	▾	
Database	nr	See details ▾	
Query ID	AAV74342.1		
Description	pyruvate:ferredoxin oxidoreductase A-like protein [Trichomo ...		
Molecule type	amino acid		
Query Length	1157		
Other reports	?		



No significant similarity found. For reasons why, [click here](#)

B

BLAST[®] » blastp suite » results for RID-J67V8H2Y01R

[< Edit Search](#)

[Save Search](#)

[Search Summary](#) ▾

i Your search is limited to records that include: Homo sapiens (taxid:9606)

Job Title	Region C-terminal PFO de T. vaginalis vs genoma homo sapiens		
RID	J67V8H2Y01R	Search expires on 08-01 03:28 am	Download All ▾
Program	? Citation	▾	
Database	nr	See details ▾	
Query ID	lcl Query_67577		
Description	None		
Molecule type	amino acid		
Query Length	398		
Other reports	?		



No significant similarity found. For reasons why, [click here](#)

Figura 28. Alineamiento entre la secuencia de PFO de *T. vaginalis* con genoma en *Homo sapiens*. A) BLAST entre la secuencia de la proteína completa PFO de *T. vaginalis* y el genoma de humano. B) BLAST entre la secuencia C-terminal de la proteína PFO de *T. vaginalis* y el genoma humano. Se trabajó en la base de datos NCBI con la secuencia de la proteína PFO de *T. vaginalis* con el TVAG_198110 obtenido de la base de datos TRICHDB.

DISCUSIÓN

La AP120/PFO de *T. vaginalis* se conoce como una “moonlighting protein” o proteína multifuncional debido a que posee más de una función. Generalmente la segunda función no tiene relación alguna con la primera. En los hidrogenosomas tiene una función como enzima metabólica y en la superficie del parásito como una adhesina. Dicha función como adhesina se siguió mediante una cinética a tiempos cortos de parásitos en altas concentraciones de hierro y se siguió a la AP120/PFO por ensayos de IFI y en las imágenes de microscopía confocal se observó que en los primeros 20 min de exposición al hierro la proteína se encontraba en la superficie del parásito. Sin embargo, a los 60 min la marca de la proteína desapareció de la superficie del parásito, volviendo a encontrarse minutos después. Este fenómeno aparece de manera cíclica, en donde se pierde la marca de la proteína y minutos después aparece sobre la superficie siempre y cuando se mantenga el estímulo de alto hierro. Además, se demostró que la AP120/PFO se encuentra presente en secreciones vaginales y hay anticuerpos anti-AP120/PFO en sueros de pacientes positivos a tricomoniasis. Todo lo anterior nos llevó a preguntarnos qué pasa con la proteína cuando desaparece de la superficie de los parásitos, ¿se degrada? O ¿se secreta?

En este trabajo se demostró que la proteína multifuncional AP120/PFO de *T. vaginalis* no se degrada y, que, además, en condiciones de AH se secreta al medio extracelular como una proteína de 120 kDa (su peso esperado). Esto explica porque en los ensayos de inmunofluorescencia la marca desaparece de la superficie de los parásitos a los 40 a 60 min de exposición a la condición de AH.

En los ensayos de secreción *in vitro* de parásitos en diferentes concentraciones de hierro se detectó una banda de 120 kDa correspondiente a la AP120/PFO de *T. vaginalis* en las PT de ambas condiciones; sin embargo, únicamente se detectó en las PS de los parásitos en AH, pero no en las PS de parásitos en RH (Figura 14). Esto nos indica que la condición de AH es la que promueve la sobre expresión y a su vez la secreción de la AP120/PFO, ya que como se mostró en la cinética de parásitos a tiempos cortos (Figura 10), luego de

desaparecer la proteína de la membrana se volvió a incrementar su producción en el citoplasma de los parásitos y el fenómeno se repite de manera cíclica. Estos datos sugieren que mientras la condición de AH se mantenga, el parásito continuará con la producción excesiva de la AP120/PFO y la secreción de la proteína.

Esta proteína a diferencia de las otras adhesinas con capacidad de multifuncionalidad es una proteína única del parásito, es muy inmunogénica y se encuentra presente en secreciones vaginales de pacientes positivas a tricomoniasis. Esto muestra que la AP120/PFO de *T. vaginalis* se expresa y se secreta durante la infección en altas concentraciones de hierro. Esto se puede interpretar desde el punto de vista del parásito como un mecanismo para sobrevivir al flujo menstrual en la mujer y mantener la infección. El parásito adquiere el hierro y comienza su proceso de sobreexpresión de proteínas encargadas de la adhesión (adhesinas) en su superficie, permitiendo adherirse a las células vaginales y así colonizar la mucosa urogenital. Sin embargo, dado que la AP120/PFO es muy inmunogénica, solo la expresa en su superficie en presencia de altas concentraciones de hierro y después la retira para evitar ser detectada por los anticuerpos que se generan en su contra. Una forma de deshacerse de ella es mediante su secreción y de esta manera puede contribuir a evadir al sistema inmune del hospedero al atrapar los anticuerpos con la proteína secretada.

No es nuevo el hecho de que una proteína multifuncional de *T. vaginalis* sea secretada. Tal es el caso de la adhesina AP65 o enzima málica descarboxilante, cuya secreción quedó demostrada (García *et al.*, 2007; Kucknoor *et al.*, 2007). Se sabe que tricomonas es capaz de secretar enzimas metabólicas que pueden mediar importantes interacciones entre patógeno-hospedero, ya sea provocando síntomas, evadiendo al sistema inmune y en la patogenicidad. Sin embargo, una característica que presentan estas proteínas con capacidad multifuncional es que carecen de secuencia señal de secreción, de péptidos dirigidos a membrana y de motivos de anclaje. Por lo que el mecanismo de secreción de estas proteínas aún no se conoce.

En los últimos años se han descrito adhesinas e invasinas de bacterias Gram positivas en la superficie celular que no poseen una secuencia señal o motivos de

anclaje de membrana. A pesar de que los mecanismos de secreción se desconocen, se demostró que estas proteínas representan una nueva clase de factores de virulencia (Chhatwal, 2002).

No siendo la excepción, la AP120/PFO de *T. vaginalis* se secreta al medio extracelular en donde podría jugar un papel importante en la biología de la interacción patógeno-hospedero. Sin embargo, aun desconocemos la función que ésta puede tener al ser secretada.

Además de realizar el ensayo de secreción de parásitos en diferentes concentraciones de hierro en tubo, también se realizó sobre laminillas. Esto con el objetivo de visualizar el material particulado que los parásitos secretan. En los resultados analizados por microscopía óptica se logró observar a los parásitos viables con un contenido abundante y muy homogéneo depositado sobre las laminillas tipo vesículas extracelulares. En la figura 15 se observa como un parásito presenta sobre su superficie estas vesículas lo que podría sugerir que ese material lo secreta el parásito. Este material secretado por los parásitos se ultracentrifugó y se analizó por microscopía de fluorescencia. Los resultados mostraron que el material recuperado, las vesículas extracelulares, fue similar al observado anteriormente en el ensayo de secreción *in vitro* sobre laminillas, lo que nos lleva a confirmar que el material secretado por el parásito en condiciones de AH corresponde a vesículas extracelulares. Estas vesículas extracelulares presentan la característica de ser muy homogéneas en tamaño, las cuales oscilan entre 2-3 μm de diámetro. Realizando una comparación entre las vesículas secretadas por parásitos en AH con las secretadas en la condicione de AG logramos observar que hay mucha diferencia. Ya que las vesículas secretadas por parásitos en condiciones de AG son muy heterogéneas, con tamaños entre 0.5 y 5 μm de diámetro (Rodríguez-Cruz, tesis de maestría, 2018). Estos resultados muestran que *T. vaginalis* es capaz de secretar vesículas extracelulares que varían en tamaño y posiblemente en contenido, dependiendo de la condición ambiental en la que se encuentre.

Entre los antecedentes de este trabajo se describieron dos posibles vías de secreción de la AP120/PFO de *T. vaginalis*. Una de ellas es mediante la secreción convencional, ya que en ensayos de microscopía electrónica de transmisión de parásitos en AH se observó a la proteína dentro de vesículas. Es por esto por lo que nos dimos a la tarea de obtener las vesículas extracelulares secretadas por parásitos en AH. Sin embargo, en este trabajo no se logró determinar si la AP120/PFO de *T. vaginalis* es secretada dentro de estas vesículas extracelulares en esta condición, solamente demostramos que se secreta. Por lo que queda como perspectiva del trabajo.

Ya que se demostró que la AP120/PFO de *T. vaginalis* se secreta al medio extracelular en la condición de alto hierro, lo siguiente que nos propusimos fue determinar su participación en la interacción parásito célula. En los antecedentes de este trabajo se describió que la proteína se une a la superficie de las células HeLa, lo que permitió caracterizarla como una adhesina. Los ensayos realizados para demostrar ese fenómeno se realizaron utilizando extractos de parásitos en altas concentraciones de hierro con monocapas de células HeLa previamente fijadas. Sin embargo, en este trabajo quisimos reproducir este fenómeno, pero de una manera más cercana a la infección *in vivo*. Para esto utilizamos parásitos vivos cultivados en altas concentraciones de hierro y monocapas de células HeLa sin fijar y los dejamos interaccionar por 45 min en medio de interacción en presencia de hierro y luego las analizamos por microscopía de epifluorescencia y microscopía confocal. Para este ensayo decidimos utilizar dos metodologías diferentes. La primera, en la que la interacción se analizó por IFI sin permeabilizar y la segunda por IFI ya permeabilizados, esto con el propósito de observar las diferentes localizaciones que pudiera tener la proteína AP120/PFO secretada sobre las células HeLa.

El no permeabilizar la interacción nos permite conservar la membrana intacta y así poder observar la localización de la proteína AP120/PFO en la superficie de las células HeLa. En los resultados de la interacción se observaron varios fenómenos importantes tanto en los parásitos como en las células HeLa. El primero de ellos fue la adhesión de los parásitos a la superficie de las células HeLa. En los

resultados se logró observar cómo varios parásitos se encontraban adheridos a una misma célula, así como también cómo un solo parásito se adhirió a dos células distintas. Esto nos permite concluir que el proceso de adhesión de los parásitos a las células HeLa es muy efectivo y es de esperarse, ya que se ha demostrado que el hierro estimula la expresión de adhesinas, entre ellas la AP120/PFO, que facilita la adhesión de los parásitos a las células hospederas. Lógicamente, para que pueda llevarse a cabo cualquier otro mecanismo de patogenicidad por parte del parásito, éste debe en primera instancia, adherirse a las células hospederas. Por lo que el adherirse a las células desencadenó otros fenómenos importantes.

El segundo fenómeno observado en los resultados de la interacción entre parásitos-células fue un fenómeno conocido como “blebbing” en las células HeLa. El “blebbing” son protrusiones de la membrana plasmática que están asociadas a las primeras etapas en el proceso de apoptosis. La tamaño de estas estructuras puede variar (Charras, 2008), y se observaron en la gran mayoría de las células HeLa. Esto nos confirma que la interacción de *T. vaginalis* con las células HeLa aún en alto hierro, provoca un daño en las células HeLa.

Por último, otro fenómeno observado en los resultados de la interacción parásitos-células no permeabilizado fue la secreción de material de las células HeLa en lo que sugerimos son vesículas extracelulares y su depósito sobre los parásitos. Este fenómeno se logró observar en varios parásitos por lo que no es un fenómeno fortuito. El hecho de que las células HeLa pudiesen estar liberando material en forma de vesículas extracelulares es muy probable, ya que puede entenderse como un mecanismo de defensa por parte de éstas al daño provocado por los parásitos. Estas vesículas extracelulares secretadas y depositadas sobre los parásitos pueden contener moléculas que pueden resultar tóxicas para los parásitos. Se sabe que las vesículas extracelulares pueden funcionar como potentes vehículos de comunicación intracelular, tanto en procariontes como en eucariotes, debido a su capacidad de transferir proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Yáñez-Mó *et al.*, 2015).

Sin embargo, este fenómeno observado en la interacción puede ser explicado desde el punto de vista del parásito. En la introducción de este trabajo se

habló de los mecanismos de evasión del sistema inmune que presenta *T. vaginalis*. Uno de ellos es el recubrimiento del parásito con proteínas del huésped. Por lo que, en los resultados, en lugar de observar el material de células HeLa depositado sobre los parásitos lo que puede observarse son restos de células HeLa fagocitados por el parásito y el recubrimiento de éstos sobre la superficie del parásito. Sin embargo, se necesitarían más experimentos para comprobar cualquiera de estas dos hipótesis.

Debido a la poca resolución que permite la microscopía de epifluorescencia no fue posible observar la proteína AP120/PFO en las células HeLa. Por lo cual se analizaron por microscopía confocal. Con esta técnica se logró observar que la AP120/PFO de *T. vaginalis* se encuentra tanto en los parásitos como en la superficie de las células HeLa. Así mismo, se logró observar puntos de colocación en la superficie de las células HeLa entre la AP120/PFO de *T. vaginalis* con las proteínas de las células HeLa, lo que nos permite confirmar que la AP120/PFO de *T. vaginalis* si se une a la superficie de las células HeLa. Fenómeno que nos confirma los ensayos *in vitro* de adhesina-ligando en los que se observó que la AP120/PFO de *T. vaginalis* se une a las células HeLa fijadas a partir de un extracto. También se observó material de las células HeLa depositado sobre los parásitos tal y como se observó mediante la microscopía de epifluorescencia. Debido a que la interacción no se permeabilizó asumimos que la marca de la proteína sobre las células HeLa se encuentra en la superficie, no en su interior. Sin embargo, en la figura 22 se puede observar el contraste entre una célula sin daño aparente con la marca de la proteína sobre la superficie con una célula HeLa ya dañada por el parásito, lo cual hizo permeable la membrana de las células HeLa a proteínas del parásito, entre ellas la AP120/PFO detectada con el anticuerpo anti-PFOr por lo que algunas células HeLa parecen presentar a la proteína AP120/PFO en el interior de la célula hospedera. Esto nos llevó a la siguiente pregunta ¿Es posible que la interacción entre parásito-célula permita la internalización de la AP120/PFO de *T. vaginalis* a las células HeLa?

Es por esto por lo que también analizamos la interacción Tv-HeLa permeabilizándola después de la fijación. Los resultados muestran que la marca de la proteína AP120/PFO si pudiera encontrarse en el interior de la célula HeLa. Sin embargo, se requiere de más experimentos para confirmar este fenómeno. No es de extrañarse el hecho de que una proteína de *T. vaginalis* sea secretada y posteriormente internalizada en células hospederas para cumplir una función importante en la misma. Como, por ejemplo, la modulación de la respuesta inmunitaria que ocurre con la TvTIM en altas concentraciones de glucosa, como se reportó recientemente (Miranda-Ozuna *et al.*, 2016), pudiendo ser el caso de la AP120/PFO de *T. vaginalis* en altas concentraciones de hierro. El hecho de encontrar a esta proteína en el interior de las células recalca el potencial de ser una proteína multifuncional, actuando como una enzima metabólica en los hidrogenosomas, como una adhesina en la superficie y con una tercera función, aún desconocida, en el interior de las células hospederas.

Finalmente, en conclusión y con base en los resultados obtenidos, en la figura 29 proponemos un modelo de la participación de la proteína multifuncional AP120/PFO en la interacción de *Trichomonas vaginalis* con las células HeLa en altas concentraciones de hierro. El estímulo de las altas concentraciones de hierro desencadena: la secreción de la proteína AP120/PFO por parte del parásito y ésta a su vez se deposita sobre la superficie de las células o bien, se internaliza en las mismas (3); la adhesión del parásito a las células (1), la formación de “blebbing” (2) y la liberación de material (vesículas extracelulares) el cual deposita sobre los parásitos (3).

Participación de la proteína multifuncional AP120/PFO en la interacción *Trichomonas vaginalis*-células HeLa en altas $[Fe^{2+}]$

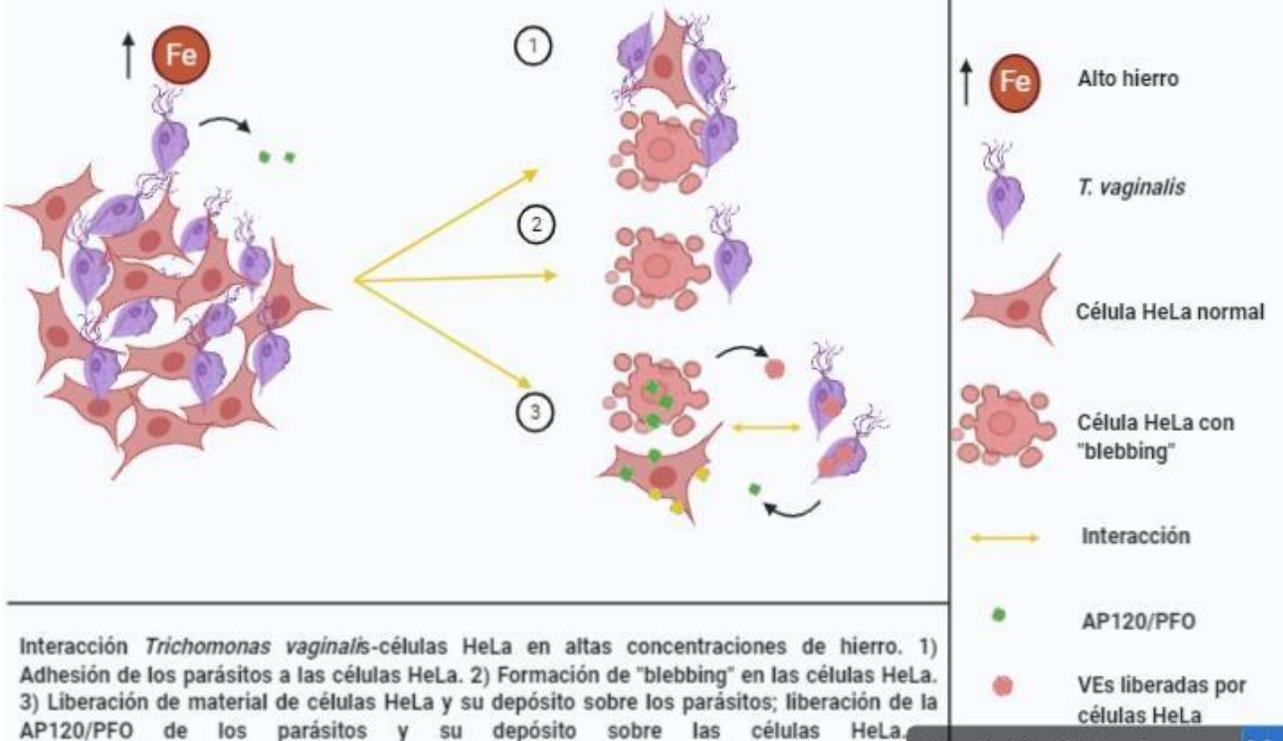


Figura 29. Modelo propuesto de la participación de la proteína AP120/PFO en la interacción *Trichomonas vaginalis*-células HeLa en altas concentraciones de Fe²⁺.

CONCLUSIONES

- La proteína multifuncional AP120/PFO de *T. vaginalis* se secreta al medio extracelular cuando los parásitos se encuentran en altas concentraciones de hierro.
- La interacción de parásitos vivos en AH con monocapas de células HeLa viables permite la unión de la AP120/PFO de *T. vaginalis* a la superficie de las células HeLa.
- Además de la secreción y de la unión de la AP120/PFO de Tv a la superficie de las células HeLa, los resultados sugieren su internalización en la célula hospedera.

PERSPECTIVAS

- Determinar si la AP120/PFO de *T. vaginalis* se encuentra en el interior de las vesículas extracelulares secretadas por parásitos en altas concentraciones de hierro.
- Confirmar la presencia de la AP120/PFO de *T. vaginalis* en el interior de las células HeLa en interacción con parásitos en AH.
- Determinar la función que desempeña la AP120/PFO de *T. vaginalis* en el interior de la célula hospedera.
- Evaluar el contenido de las vesículas extracelulares secretadas por las células HeLa en la interacción con parásitos en AH.
- Determinar la modulación de la expresión de la AP120/PFO de parásitos en restricción de hierro cuando interaccionan con células HeLa.

BIBLIOGRAFÍA

Alderete, J. F., O'Brien, J. L., Arroyo, R., Engbring, J. A., Musatovova, O., López, O., & Nguyen, J. (1995). Cloning and molecular characterization of two genes encoding adhesion proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Molecular Microbiology*, 17(1), 69-83.

Alderete, J. F., Millsap, K. W., Lehker, M. W., & Benchimol, M. (2001). Enzymes on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry and functional diversity. *Cellular Microbiology*, 3(6), 359-370.

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

Beltrán, N. C., Horváthová, L., Jedelský, P. L., Šedinová, M., Rada, P., Marcincíková, M., & Tachezy, J. (2013). Iron-induced changes in the proteome of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *PLoS One*, 8(5), e65148.

Benchimol, M., Ribeiro, K. C., Mariante, R. M., & Alderete, J. F. (2001). Structure and division of the Golgi complex in *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas foetus*. *European Journal of Cell Biology*, 80(9), 593-607.

Benchimol, M., de Andrade Rosa, I., da Silva Fontes, R., & Dias, Â. J. B. (2008). *Trichomonas* adhere and phagocytose sperm cells: adhesion seems to be a prominent stage during interaction. *Parasitology Research*, 102(4), 597-604.

Bouchemal, K., Bories, C., & Loiseau, P. M. (2017). Strategies for Prevention and Treatment of *Trichomonas vaginalis* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(3), 811–825. <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-16>

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

- Chhatwal, G. S. (2002). Anchorless adhesins and invasins of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors. *Trends in Microbiology*, 10(5), 205-208.
- Charras, G. T. (2008). A short history of blebbing. *Journal of Microscopy*, 231(3), 466-478.
- Crouch, M. L., Benchimol, M., & Alderete, J. F. (2001). Binding of fibronectin by *Trichomonas vaginalis* is influenced by iron and calcium. *Microbial Pathogenesis*, 31(3), 131-144.
- Diamond, L. S. (1957). The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *The Journal of Parasitology*, 43(4), 488-490.
- Edwards, T., Burke, P., Smalley, H., & Hobbs, G. (2016). *Trichomonas vaginalis*: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(3), 406-417.
- Ellis, J. E., Williams, R., Cole, D., Cammack, R., & Lloyd, D. (1993). Electron transport components of the parasitic protozoon *Giardia lamblia*. *FEBS Letters*, 325(3), 196-200.
- Engbring, J. A., & Alderete, J. F. (1998). Characterization of *Trichomonas vaginalis* AP33 adhesin and cell surface interactive domains. *Microbiology*, 144(11), 3011-3018.
- 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), 3354–3395. doi:10.3390/biom5043354.
- Garcia, A. F., & Alderete, J. F. (2007). Characterization of the *Trichomonas vaginalis* surface associated AP65 and binding domain interacting with trichomonads and host cells. *BMC Microbiology*, 7(1), 116.
- Garcia, A. F., Chang, T. H., Benchimol, M., Klumpp, D. J., Lehker, M. W., & Alderete, J. F. (2003). Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. *Molecular Microbiology*, 47(5), 1207-1224.

Gorrell, T. E. (1985). Effect of culture medium iron content on the biochemical composition and metabolism of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Bacteriology*, 161(3), 1228-1230.

Guenther, P. C., Secor, W. E., & Dezzutti, C. S. (2005). *Trichomonas vaginalis*-induced epithelial monolayer disruption and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication: implications for the sexual transmission of HIV-1. *Infection and Immunity*, 73(7), 4155-4160.

Hernández-García, M. S. (2012). Estudio de la autofagia de hidrogenosomas en *Trichomonas vaginalis*. Tesis de maestría.

Hernández-García, M. S. (2019). Estudio de la autofagia inducida por restricción o exceso de nutrientes (glucosa o hierro): Participación de la hidrogenofagia inducida por hierro como vía de transporte no convencional de la adhesina AP120/PFO A del hidrogenosoma a la superficie de *Trichomonas vaginalis*. Tesis de doctorado.

Huberts, D. H., & van der Klei, I. J. (2010). Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1803(4), 520-525.

Ibáñez-Escribano, A., & Gómez-Barrio, A. (2017, March). *Trichomonas vaginalis*: la versatilidad de un parásito tenaz. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* (Vol. 83, No. 1) 10-47.

Jeffery, C. J. (1999). Moonlighting proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(1), 8-11.

Jeffery, C. J. (2016). Protein species and moonlighting proteins: very small changes in a protein's covalent structure can change its biochemical function. *Journal of Proteomics*, 134, 19-24.

Jeffery, C. J. (2019). An enzyme in the test tube, and a transcription factor in the cell: moonlighting proteins and cellular factors that affect their behavior. *Protein Science*.

Kucknoor, A. S., Mundodi, V., & Alderete, J. F. (2007). The proteins secreted by *Trichomonas vaginalis* and vaginal epithelial cell response to secreted and episomally expressed AP65. *Cellular Microbiology*, 9(11), 2586–2597. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00979.x>

Land, K. M., Delgadillo-Correa, M. G., Tachezy, J., Vanacova, S., Hsieh, C. L., Sutak, R., & Johnson, P. J. (2004). Targeted gene replacement of a ferredoxin gene in *Trichomonas vaginalis* does not lead to metronidazole resistance. *Molecular Microbiology*, 51(1), 115-122.

Lehker, M. W., & Alderete, J. F. (1992). Iron regulates growth of *Trichomonas vaginalis* and the expression of immunogenic trichomonad proteins. *Molecular Microbiology*, 6(1), 123-132.

Meites, E., Gaydos, C. A., Hobbs, M. M., Kissinger, P., Nyirjesy, P., Schwebke, J. R., Secor, W. E., Sobel, J. D., & Workowski, K. A. (2015). A Review of Evidence-Based Care of Symptomatic Trichomoniasis and Asymptomatic *Trichomonas vaginalis* Infections. *Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 61 Suppl 8(Suppl 8), S837–S848. <https://doi.org/10.1093/cid/civ738>.

Menezes, C. B., Frasson, A. P., & Tasca, T. (2016). Trichomoniasis - are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide?. *Microbial Cell* (Graz, Austria), 3(9), 404–419. <https://doi.org/10.15698/mic2016.09.526>

Meza-Cervantez, P. (2005). Clonación y expresión del tercer gen de la Piruvato-ferredoxín oxido reductasa (PFOR A) de *Trichomonas vaginalis*. Tesis de Licenciatura.

Meza-Cervantez, P. (2007). Relocalización de la Piruvato-ferredoxín oxido reductasa (PFOR) a la superficie de *Trichomonas vaginalis* en presencia de hierro. Tesis de maestría.

Meza-Cervantez, P. (2011). Participación de la Piruvato-ferredoxin oxido reductasa A (PFOR A) de *Trichomonas vaginalis* en la adhesión y su potencial diagnóstico. Tesis de doctorado.

Meza-Cervantez, P., Gonzalez-Robles, A., Cárdenas-Guerra, R. E., Ortega-Lopez, J., Saavedra, E., Pineda, E., & Arroyo, R. (2011). Pyruvate: ferredoxin oxidoreductase (PFO) is a surface-associated cell-binding protein in *Trichomonas vaginalis* and is involved in trichomonal adherence to host cells. *Microbiology*, 157(12), 3469-3482.

Midlej, V., & Benchimol, M. (2010). *Trichomonas vaginalis* kills and eats—evidence for phagocytic activity as a cytopathic effect. *Parasitology*, 137(1), 65-76.

Mielczarek, E., & Blaszkowska, J. (2016). *Trichomonas vaginalis*: pathogenicity and potential role in human reproductive failure. *Infection*, 44(4), 447-458.

Miranda-Ozuna, J. F., Hernández-García, M. S., Briebe, L. G., Benítez-Cardoza, C. G., Ortega-López, J., González-Robles, A., & Arroyo, R. (2016). The glycolytic enzyme triosephosphate isomerase of *Trichomonas vaginalis* is a surface-associated protein induced by glucose that functions as a laminin-and fibronectin-binding protein. *Infection and Immunity*, 84(10), 2878-2894

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

Müller, M. (1993). The hydrogenosome. *Microbiology*, 139(12), 2879-2889.

Peterson, K. M., & Alderete, J. F. (1982). Host plasma proteins on the surface of pathogenic *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*, 37(2), 755-762.

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

Piatigorsky, J., & Wistow, G. J. (1989). Enzyme/crystallins: gene sharing as an evolutionary strategy. *Cell*, 57(2), 197-199.

Poole, D. N., & McClelland, R. S. (2013). Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. *Sexually Transmitted Infections*, 89(6), 418–422. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2013-051075>.

Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*. 200(4), 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>.

Rendón-Maldonado, J. G., Espinosa-Cantellano, M., González-Robles, A., & Martínez-Palomo, A. (1998). *Trichomonas vaginalis*: in vitro phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes, and erythrocytes. *Experimental Parasitology*, 89(2), 241-250.

Rodríguez, M. A., Hidalgo, M. E., Sánchez, T., & Orozco, E. (1996). Cloning and characterization of the *Entamoeba histolytica* pyruvate: ferredoxin oxidoreductase gene. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 78(1-2), 273-277.

Rodríguez-Cruz, S. (2018). La Triosafofosfato isomerasa de *Trichomonas vaginalis* (TvTIM) se localiza en diferentes vesículas de secreción inducidas por glucosa e interaccionan con la célula hospedera. Tesis de maestría.

Rowley, J., Vander Hoorn, S., Korenromp, E., Low, N., Unemo, M., Abu-Raddad, L. J., ... & Thwin, S. S. (2019). Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bulletin of the World Health Organization*, 97(8), 548-562.

Sampaio, N. G., Cheng, L., & Eriksson, E. M. (2017). The role of extracellular vesicles in malaria biology and pathogenesis. *Malaria Journal*, 16(1), 245.

Sutcliffe, S., Giovannucci, E., Alderete, J. F., Chang, T. H., Gaydos, C. A., Zenilman, J. M., ... & Platz, E. A. (2006). Plasma antibodies against *Trichomonas vaginalis* and subsequent risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 15(5), 939-945.

Van Der Pol B. (2016). Clinical and Laboratory Testing for *Trichomonas vaginalis* Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(1), 7–12. <https://doi.org/10.1128/JCM.02025-15>.

Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., Gursel, M., ... De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>

Apéndice

Acrilamida al 30%/bisacrilamida al 0.8%

- Acrilamida 30 g
- N, N´metilbisacrilamida 0.80 g

Disolver en 40 ml de agua destilada. Una vez disuelto aforar hasta 100 ml. Filtrar a través de papel filtro "Whatman" no.1. Almacenar a 4 °C hasta 1 mes, previamente protegido de la luz.

Nota: Descartar después de 30 días, ya que gradualmente la acrilamida se hidroliza a ácido acrílico y amonio.

Amortiguador de muestra 1x (BM 1x)

- SDS/amortiguador 2x 500 µl
- β-mercaptoetanol 10% 50 µl
- Azul de bromofenol 50 µl (stock 10 mg/ml)
- Agua desionizada 400 µl

Amortiguador de muestra 2x (BM 2x)

- SDS/amortiguador 2x 400 µl
- β-mercaptoetanol 10% 50 µl
- Azul de bromofenol 50 µl (stock 10 mg/ml)

Amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.0

- NaCl (Merck) 137 mM 8.00 g
- KCl (Merck) 2.7 mM 0.20 g
- Na₂HPO₄ (Merck) 10 mM 1.42 g
- KH₂PO₄ (Merck) 2 mM 0.27 g
- Agua destilada 1000 ml

Mezclar todos los reactivos en 800 ml de agua destilada. Una vez disuelto ajustar el pH a 7.0 y aforar a un litro.

Amortiguador de corrida 5x (SDS-PAGE electroforesis)

➤ Trizma base	30.2 g
➤ Glicina	144 g
➤ SDS	10 g
➤ Agua destilada	2000 ml

Amortiguador de transferencia para membrana de nitrocelulosa

➤ Tris-base 25 mM	3.03 g
➤ Glicina 192 mM	14.25 g
➤ Metanol absoluto	200 ml
➤ Agua destilada	800 ml

Disolver primero el Trizma y la glicina. Una vez disueltos agregar el metanol, finalmente aforar a 1 litro con agua destilada. Enfriar a 4 °C.

Solución 2,2 Dipiridilo (C₁₀H₈N₂) 15 mM

➤ 2,2 Dipiridilo	0.02 g
➤ Agua destilada	10 ml

Se mezcla bien, se afora en matraz volumétrico de 10 ml y se esteriliza por filtración (0.2 µm). Se almacena a 4 °C cubierto de la luz (no debe utilizarse después de dos semanas).

Solución Decolorante

➤ Ácido acético	50 ml
➤ Metanol	165 ml
➤ Agua destilada	1000 ml

Solución Sulfato ferroso amoniacal 25 mM (solución stock)

➤ Ácido sulfosalicílico (Sigma) 50 mM	0.1271 g
---------------------------------------	----------

- Agua destilada 10 ml

En esta solución se disuelve el sulfato ferroso

- Sulfato ferroso (Sigma) 25 mM 0.098 g

Se mezcla bien, se afora en matraz volumétrico de 10 ml, se esteriliza por autoclave y se almacena a 4 °C cubierto de la luz (no debe ser utilizado por más de una semana).

Tris-Cl/SDS pH 6.8

- Trizma-base (Sigma) 5 mM 6.05 g
- SDS (Sigma) 0.13 mM 0.40 g
- Agua destilada 100 ml

Disolver en 80 ml de agua destilada y ajustar el pH a 6.8. Aforar a volumen final de 100 ml con agua destilada. Se filtra por 0.45 µm, se almacena a 4 °C

Tris-Cl/SDS pH 8.8

- Trizma-base (Sigma) 15 mM 18.16 g
- SDS (Sigma) 0.13 mM 0.40 g

Se debe ajustar el pH 8.8.

- Agua destilada 100 ml

Disolver en 80 ml de agua destilada y ajustar el pH a 8.8. Aforar a volumen final de 100 ml con agua destilada. Se filtra por 0.45 µm, se almacena a 4 °C

Persulfato de amonio al 10%

10 mg (0.01 g) en 1 ml de agua destilada.

Nota: Almacenar en alícuotas hasta 2 semanas a -20 °C