



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

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

**Análisis *in silico* de las cisteína proteinasas (TvAtg4) y
de las cinasas (TvAtg1) que participan en la autofagia
de *Trichomonas vaginalis* y efecto del hierro en la
expresión de *tvatg4.1*.**

TESIS QUE PRESENTA:

Q.F.B. MIRIAM GUADALUPE MATEO CRUZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

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

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ROSSANA ARROYO VERÁSTEGUI

CIUDAD DE MÉXICO

AGOSTO 2021

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

Este trabajo fue financiado parcialmente por el presupuesto del CINVESTAV y el donativo SEP-CINVESTAV 074 (a R.A.V). M.G.M.C fue becaria CONACyT, con el número de CVU 1002671.

¿Con qué he de irme?

¿Nada dejaré en pos de mí sobre la tierra?

¿Cómo ha de actuar mi corazón?

¿Acaso en vano venimos a vivir, a brotar sobre la tierra?

Dejemos al menos flores

Dejemos al menos cantos

Un recuerdo que dejó, Nezahualcóyotl

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por permitirme culminar esta etapa de mi formación académica con salud y paz.

A la **Dra. Rossana Arroyo Verástegui** por haberme aceptado en su laboratorio y en su grupo de investigación, por confiar y creer en mi y permitirme llevar a cabo este trabajo de investigación bajo su dirección. Gracias por orientarme y por sus enseñanzas.

Al **Dr. Jaime Ortega López** y a la **Dra. Patricia Talamás Rohana** por su asesoría durante este trabajo de investigación.

A la **Q.F.B Leticia Ávila González** a pesar de que las condiciones no me permitieron convivir demasiado, cuando necesite de su ayuda o apoyo, me transmitió su conocimiento.

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

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

A mis compañeros:

Al **Dr. Luis Alberto Rivera Rivas** por brindarme todo su apoyo, conocimiento y paciencia, así como por su amistad y consejo. Por su disposición al escuchar mis dudas y siempre resolverlas. Porque nunca se rindió al mostrarme las técnicas. ¡Gracias Luis!

A la **M. en C. Esly Alejandra Euceda Padilla**, por la paciencia en las técnicas enseñadas y por el conocimiento compartido. Gracias por brindarme tu amistad y escucharme y por todo el café compartido.

A la **M en C. Sarahi Rodríguez** a pesar de no convivir o conocerla por completo, recuerdo un correo donde me decías que no me sintiera desanimada, que todos pasamos por la misma etapa y que a pesar de que puede parecer difícil no lo es. ¡Gracias Saris!

Al **M en C. Sebastián Lorenzo Benito** por la convivencia en los seminarios de nuestro laboratorio y por todas las observaciones constructivas durante mis presentaciones.

A Ángel, Daniel y Valeri por su amistad brindada durante mi corta estancia presencial en el CINVESTAV.

DEDICATORIA

Dedico, este trabajo con esfuerzo a:

Ma. Del Carmen Cruz García, mami, gracias por siempre estar a mi lado, por transmitirme todo tu amor, confianza y fe. Por siempre apoyarme durante cada decisión que tomo y por qué cuando siento que debo rendirme, tú estás ahí enseñándome que debo ser fuerte y que el límite para todo lo que quiera realizar es el cielo. ¡Te amo infinitamente! **Gilberto Mateo Cruz**, papá, gracias por estar conmigo y apoyarme durante mi formación, por confiar y creer en mí.

¡Gracias siempre por todo su amor! Los amo y todo siempre será por ustedes.

Maricarmen Mateo Cruz y Citlali Mateo Cruz, hermanas queridas agradezco el tenerlas a mi lado y compartir cada derrota y cada helado con ustedes. Se que mi vida no sería igual si ustedes no estuvieran, tal vez sería hija única. Pero agradezco todo el amor que me dan y que siempre están acompañándome, animándome y riéndose conmigo. Con cariño su hermana.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción.....	3
1.1 Tricomoniasis.....	3
1.2 Tricomoniasis en México.....	3
1.3 Síntomas de la tricomoniasis	3
1.4 <i>Trichomonas vaginalis</i>	4
1.4.1 Ciclo de vida de <i>T. vaginalis</i>	4
1.4.2 Morfología de <i>T. vaginalis</i>	5
1.5 El papel del hierro en el desarrollo en la infección por <i>T. vaginalis</i>	8
1.6 Autofagia	8
1.6.1 Genes <i>atg</i> : maquinaria molecular central para la autofagia	10
1.6.2 El complejo cinas tipo Atg1/ unc-51 (ULK).....	11
1.6.3 Sistemas de conjugación y expansión de tipo ubiquitina	12
1.7 Proteasas.....	13
1.7.1 Cisteína proteasas	14
1.7.2 Cisteína proteasas del clan CA.....	15
1.7.3 Procesamiento de las CPs del clan CA.....	16
1.7.4 Estructura cristalina de las CPs del clan CA	17
1.8 Cisteína proteasa Atg4.....	18
1.8.1 Estructura secundaria y terciaria general de la CP Atg4.....	19
1.8.2 Autofagia en <i>Trichomonas vaginalis</i>	22
2. Justificación.....	34
3. Hipótesis.....	35
4. Objetivos	35
4.1 General	35
4.2 Específicos.....	35

4.2.1	Analizar <i>in silico</i> a los genes <i>tvatg4.1</i> y <i>tvatg4.4</i> y a las cisteína proteasas que codifican (TvAtg4.1 y TvAtg4.4).	35
4.2.2	Analizar <i>in silico</i> a las cinasas TvAtg1.1 y TvAtg1.5	35
4.2.3	Analizar la expresión a nivel de transcrito del gen <i>tvatg4.1</i> de <i>T. vaginalis</i> cultivada en diferentes concentraciones de hierro.	35
5.	Estrategia experimental	36
5.1	Analizar <i>in silico</i> a los genes <i>tvatg4.1</i> y <i>tvatg4.4</i> y a las cisteína proteasas que codifican (TvAtg4.1 y TvAtg4.4).	36
5.2	Analizar <i>in silico</i> a las cinasas TvAtg1.1 y TvAtg1.5	36
5.3	Analizar la expresión a nivel de transcrito del gen <i>tvatg4.1</i> de <i>T. vaginalis</i> cultivada en diferentes concentraciones de hierro.	37
6.	Materiales y métodos	38
6.1	Análisis <i>in silico</i> de los genes <i>tvatg4.1</i> y <i>tvatg4.4</i> y de las cisteína proteasas TvAtg4.1 y TvAtg4.4 y cinasas TvAtg1.1 y TvAtg1.5.	38
6.2	Condiciones de cultivo para <i>T. vaginalis</i> en diferentes concentraciones de hierro	38
6.3	Extracción de DNA genómico	39
6.4	Extracción del RNA total en diferentes condiciones de hierro.	40
6.5	Tratamiento con DNAsa I.	40
6.6	Retrotranscripción.	41
6.7	Amplificación por PCR del gen <i>tvatg4.1</i> .	41
7	Resultados	42
7.1	Genes <i>tvatg4</i> en <i>T. vaginalis</i> .	42
7.2	Localización de los genes <i>tvatg4.1</i> y <i>tvatg4.4</i> en el genoma de <i>T. vaginalis</i> .	43
7.3	Regiones regulatorias en el extremo 5' de los genes <i>tvatg4.1</i> y <i>tvatg4.4</i> .	45
7.4	Posibles sitios de poliadenilación en el extremo 3' para los transcritos <i>tvatg4.1</i> y <i>tvatg4.4</i> de <i>T. vaginalis</i> .	47

7.5	Proteínas TvAtg4 de <i>T. vaginalis</i>	49
7.6	Predicción de las estructuras terciarias para TvAtg4.1 y TvAtg4.4. .	53
7.7	Identificación de la triada catalítica y el dominio proteasa	54
7.8	Predicción de los bucles reguladores y el dominio de los dedos cortos para TvAtg4.1 y TvAtg4.4.	58
7.9	Identificación de los motivos pLIR para TvAtg4. 1 y TvAtg4.4	60
7.10	Serinas fosforilables para TvAtg4.1 y TvAtg4.4	62
7.11	Proteínas TvAtg1 en <i>T. vaginalis</i>	64
8	Discusión	75
9	Conclusiones	86
10	Perspectivas	86
11	Referencias	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>T. vaginalis</i> .	5
Figura 2. Ultraestructura de <i>T. vaginalis</i> .	6
Figura 3. Morfología de <i>T. vaginalis</i> .	7
Figura 4. Morfología de pseudoquiste para <i>T. vaginalis</i> .	7
Figura 5. Representación esquemática de la vía autofágica.	10
Figura 6. Regulación del complejo Atg1 por mTORC1.	11
Figura 7. Sistemas de conjugación similares a la ubiquitina. (a) Sistema de procesamiento de Atg7-Atg3-LC3(Atg8):	13
Figura 8. Reacción catalizada por la cisteína nucleofílica.	16
Figura 9. Representación esquemática del procesamiento de las CPs del clan CA.	17
Figura 10. Estructura terciaria de la cisteína proteasa de tipo papaína.	18
Figura 11. Estructura terciaria de HsAtg4b.	19
Figura 12. Dominio de los dedos cortos en HsAtg4b.	20
Figura 13. Bucles reguladores para HsAtg4b.	21
Figura 14. Distribución de los genes ortólogos atg en protistas parásitos.	24
Figura 15. Detección de autofagia en <i>T. vaginalis</i> .	27
Figura 16. Localización de TvAtg8a después del tratamiento de <i>T. vaginalis</i> en RG con el inhibidor de autofagia wortmanina.	28
Figura 17. Análisis de la expresión de TvAtg8a en <i>T. vaginalis</i> cultivada en RG mediante SDS-PAGE urea 6 M.	29
Figura 18. Detección de TvAtg8b con un anticuerpo anti-rTvAtg8b en diferentes condiciones inductoras de autofagia en <i>T. vaginalis</i> .	29
Figura 19. Localización de TvAtg8b en diferentes condiciones inductoras de autofagia.	31
Figura 20. Biogénesis del autofagosoma en <i>T. vaginalis</i> .	32
Figura 21. Mapa de la localización genómica para los genes <i>tvatg4.1</i> y <i>tvatg4.4</i> .	44
Figura 22. Regiones regulatorias en el extremo 5' para los genes <i>tvatg4.1</i> y <i>tvatg4.4</i> .	46
Figura 23. Identificación de las señales de poliadenilación en los transcritos <i>tvatg4.1</i> y <i>tvatg4.4</i> .	48

Figura 24. Localización de la triada catalítica para TvAtg1.1 y TvAtg4.4.	50
Figura 25. Esquemas para las diferentes proteínas TvAtg4 en <i>T. vaginalis</i> .	51
Figura 26. Árbol filogenético para las diferentes TvAtg4 de <i>T. vaginalis</i> .	53
Figura 27. Modelado molecular para las proteínas TvAtg4.1 y TvAtg4. 4.	55
Figura 28. Gráficos de Ramachandran para las diferentes Atg4.	56
Figura 29. Dominio auxiliar y dominio proteasa para TvAtg4.1 y TvAtg4.4.	57
Figura 30. Bucle regulador para TvAtg4.1 y TvAtg4.4.	59
Figura 31. Predicción de los dedos cortos para TvAtg4.1 y TvAtg4.4.	60
Figura 32. Motivos pLIR para las proteínas TvAtg4.1 y TvAtg4.4.	61
Figura 33. Modificaciones postraduccionales para las proteínas TvAtg4.1 y TvAtg4.4.	64
Figura 34. Esquema para las seis proteínas Atg1 de <i>T. vaginalis</i> .	65
Figura 35. Comparación de las proteínas TvAtg1.1 y TvAtg1.5 con ULK1 y ScAtg1.	67
Figura 36. Modelado molecular de la estructura terciaria de TvAtg1 de <i>T. vaginalis</i> .	69
Figura 37. Gráficos de Ramachandran para las diferentes Atg1.	70
Figura 38. Superposición de estructuras 3D de las diferentes Atg1.	72
Figura 39. Efecto del hierro en la expresión del gen <i>tvatg4.1</i> .	75
Figura 40. Identificación del elemento sensible a hierro en el gen <i>tvatg4.1</i> .	83
Figura 41. Esquema de la regulación del proceso autofágico en <i>T. vaginalis</i> .	84

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ortólogos putativos para los genes <i>atg</i> de <i>T. vaginalis</i> .	25
Tabla 2. Expresión de los genes <i>tvatg4</i> en condiciones de (RG).	26
Tabla 3. Características de los diferentes genes <i>tvatg4</i> de <i>T. vaginalis</i>	42
Tabla 4. Alineamiento múltiple de secuencias para las diferentes proteínas TvAtg4 de <i>T. vaginalis</i>	49
Tabla 5. Alineamiento múltiple de secuencias para diferentes Atg4 de otros organismos y TvAtg4.1 y TvAtg4.4 de <i>T. vaginalis</i> .	52
Tabla 6. Parálogos para Atg1 en <i>T. vaginalis</i> .	65

LISTA DE ABREVIATURAS

aa: aminoácidos

A: Asparagina

AH: Alto hierro

AG: Alta glucosa

atg: Proteínas relacionadas con la autofagia

Atg1: Proteína cinasa serina/treonina

Atg4: Proteína reguladora de la autofagia

ATP: Adenosín Trifosfato

CMA: Autofagia mediada por chaperona

C: cisteína

CP: cisteína proteasa

CPs: cisteína proteasas

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

DEPC: Dietilpirocarbonato

DNA: Ácido desoxirribonucleico

HsAtg4B: Proteína reguladora de la autofagia de *H. sapiens* parálogo B

Holo-Lf: Holo- lactoferrina

IDR: Región intrínsecamente desordenada

ITS: Infección de Transmisión Sexual

MIT 1: Dominio de interacción y transporte de microtúbulos 1

MIT 2: Dominio de interacción y transporte de microtúbulos 2

NH: Normal Hierro

OMS: Organización Mundial de la Salud

TvAtg4.1: Proteína reguladora de la autofagia en *T. vaginalis* parálogo 1

TvAtg4.4: Proteína reguladora de la autofagia en *T. vaginalis* parálogo 4

pb: pares de bases

PE: Fosfatidiletanolamida

RH: Restricción de Hierro

RG: Restricción de glucosa

RNA: Ácido ribonucleico

RT-PCR: Reacción en cadena de Polimerasa con retrotranscriptasa inversa

UBP: Proteínas deubiquitinantes

ULK1: Proteína Unc-51 cinasa activadora de la autofagia.

RESUMEN

Trichomonas vaginalis es el agente causal de la tricomoniasis una infección de transmisión sexual que infecta a más de 275 millones de personas cada año. Este parásito infecta principalmente el tracto urogenital donde se encuentra expuesto a diferentes condiciones ambientales y nutricionales. El hierro es un elemento esencial para mantener el estado crónico de la infección por este protozoo. En distintas concentraciones de hierro, este parásito regula la expresión diferencial de proteínas involucradas en la adhesión, citotoxicidad, hemólisis y apoptosis entre otras propiedades de virulencia. La macroautofagia se define como un sistema de degradación no selectivo que se activa drásticamente en condiciones nutricionales desfavorables. En estudios en *T. vaginalis* se observa el proceso autofágico en condiciones de restricción de hierro (RH) y restricción de glucosa (RG). Además, se propone a TvAtg8b como un marcador de la autofagia en este protozoario. Debido a que es necesario que TvAtg8b sea procesado por TvAtg4 para poder llevar a cabo sus funciones, el objetivo de este trabajo fue realizar un análisis *in silico* de las proteínas TvAtg4.1 y TvAtg4.4 y estudiar la expresión a nivel de transcrito de *tvatg4.1* en diferentes condiciones de hierro. Los resultados que se obtuvieron en el análisis *in silico* es que ambas proteínas TvAtg4 presentan los dominios y motivos necesarios para interaccionar con TvAtg8 y realizar su procesamiento. Además, se ha reportado que para que el proceso autofágico se lleve a cabo es necesario contar con una regulación de la actividad proteolítica de Atg4. Hasta ahora se menciona que la cinasa Atg1 podría participar en su regulación por la fosforilación de un residuo de serina de Atg4. En el genoma de *T. vaginalis* se encontraron seis genes que codifican para cinasas de tipo Atg1. A nivel proteoma se identificaron dos cinasas TvAtg1.1 y TvAtg1.5 en RH que pudieran regular la actividad de las TvAtg4 durante la autofagia.

ABSTRACT

Trichomonas vaginalis is the causative agent of trichomoniasis, a sexually transmitted infection that infects more than 275 million people worldwide each year. This parasite mainly infects the urogenital tract where it is exposed to different environmental and nutritional conditions. Iron is an essential element to maintain a chronic infection by this protozoan. Under distinct iron concentrations, this parasite regulates a differential expression of proteins involved in adhesion, cytotoxicity, hemolysis and apoptosis, among other virulence properties. Macroautophagy is defined as a non-selective degradation system that is drastically activated under unfavorable nutritional conditions. The autophagic process in *T. vaginalis* under iron (IR) and glucose (GR) restriction conditions. Furthermore, TvAtg8b can be considered a marker of autophagy in this protozoan. Thus, it is necessary for TvAtg8b to be processed by TvAtg4 to be able to carry out its functions. Therefore, the goal of this work was to perform an *in silico* analysis of the TvAtg4.1 and TvAtg4.4 proteins and to study the expression at the transcript level of *tvatg4.1* under different iron conditions. The results obtained during the *in silico* analysis is that both TvAtg4 proteins have the necessary domains and motifs to interact with TvAtg8 for its processing. In order for the autophagic process to take place, it is necessary to have a regulation of the Atg4 proteolytic activity. The Atg1 kinase could participate in its regulation by the phosphorylation of a serine residue. In the *T. vaginalis* genome there are at least six kinase encoding genes. At the proteome level two kinases, TvAtg1.1 and TvAtg1.5, have been detected under IR condition. Thus, these kinases may play a role in the regulation of the TvAtg4 activity during autophagy.

1. Introducción.

1.1 Tricomoniasis.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado que anualmente a nivel mundial hay 374 millones de caso nuevos de Infecciones de Transmisión sexual (ITS) curables causadas por *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum* y *Trichomonas vaginalis*. (WHO, 2021).

T. vaginalis es el agente causal de la tricomoniasis, la ITS no viral de mayor prevalencia (CDC, 2020) que infecta a más de 275 millones de personas cada año (Squire *et al.*, 2020). Esto representa una incidencia del 3.1 % para la enfermedad global. En el caso de las mujeres se ha reportado que la prevalencia para esta infección es del 8.1% mientras que para los hombres es de 1.0% (Kissinger, 2015b; Edwards *et al.*, 2016). Sin embargo, estos datos pueden estar subestimados, ya que más del 80% de los casos son asintomáticos (Squire *et al.*, 2020).

1.2 Tricomoniasis en México

En México, de acuerdo con los datos reportados en el Boletín Epidemiológico por la Secretaría de Salud hasta la semana 23, del 2 al 12 de junio del 2021, se observa un total de 9, 872 casos nuevos, de los cuales 9, 436 casos corresponden a mujeres, grupo más vulnerables para esta ITS, mientras que solo 436 corresponden a hombres infectados. También se muestra que los estados con una mayor tasa de infección son Puebla, Veracruz, Chiapas y Oaxaca.

1.3 Síntomas de la tricomoniasis

En las mujeres, los sitios comunes de la infección por *T. vaginalis* incluyen vagina, uretra y endocérvix. Los síntomas que presentan las mujeres infectadas con este protozooario son: secreción vaginal (a menudo es espumosa, maloliente y amarillo verdoso), prurito, irritación vulvar, dolor abdominal y edema, aumento en el pH vaginal (≥ 5.0). En los casos más graves se ha observado neoplasia cervical y enfermedad pélvica inflamatoria asociada a la presencia de infección por tricomonas (Kissinger, 2015a). En los hombres los síntomas que se observan

en la infección por *T. vaginalis* pueden ser irritación uretral, secreción o ardor leve después de orinar o eyacular, epididimitis y prostatitis. Sin embargo, se sabe que alrededor del 85 % de las mujeres y el 77 % de los hombres pueden ser portadores asintomáticos de tricomonas (De Waaij *et al.*, 2017; Mercer y Johnson, 2018).

Asimismo, la infección por *T. vaginalis* se asocia con infertilidad femenina y masculina, con partos prematuros, bajo peso en recién nacidos y una mayor susceptibilidad a la infección y transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Schwebke y Burgess, 2004; Schwebke *et al.*, 2011).

1.4 *Trichomonas vaginalis*

1.4.1 Ciclo de vida de *T. vaginalis*

T. vaginalis es un protista, flagelado y microaerófilico que pertenece al filo *Parabasalia* y que parasita al humano y se transmite por contacto sexual. El tracto urogenital es el nicho fisiológico de este parásito, donde se divide por fisión binaria longitudinal, sin la desaparición de la membrana nuclear, cumpliendo así con su ciclo de vida (Figura 1) (CDC, 2020; Schwebke y Burgess 2004).

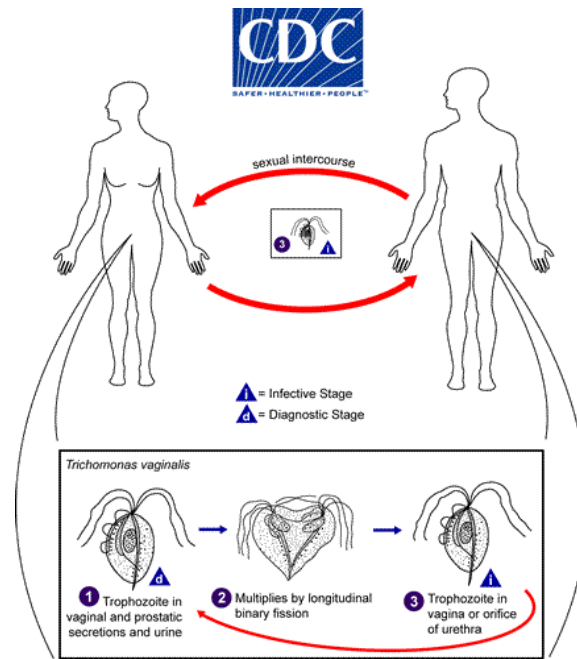


Figura 1. Ciclo de vida de *T. vaginalis*. Los números indican las etapas de la división celular mientras que las flechas rojas muestran la dirección del ciclo infeccioso (Tomada de CDC, 2020)

1.4.2 Morfología de *T. vaginalis*

Este protozoario presenta solo una etapa, la de trofozoíto con diferente morfología (piriforme, ameboide y esférica). Los trofozoítos miden de 23 a 39 μm de largo (de 8 -13 μm de longitud corporal, de 8 -15 μm de longitud flagelar) y de 5 a 7 μm de ancho (Ryu y Min, 2006). Este protista tiene cuatro flagelos anteriores y un quinto flagelo adosado a su membrana ondulante, la cual se extiende 2/3 de distancia hasta el extremo posterior del cuerpo (Figura 2A) (Cheon *et al.*, 2013). Los organelos internos incluyen un núcleo, un axostilo (3-14 μm de longitud) que atraviesa a la célula desde el extremo anterior al extremo posterior, donde protruye en forma de espícula. También posee, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, vacuolas e hidrogenosomas. Los hidrogenosomas son organelos electrodensos de doble membrana, caracterizados por tener una forma redonda u ovalada y su función principal es la producción de energía, ya que *T. vaginalis* carece de mitocondrias. A diferencia de las mitocondrias, los hidrogenosomas producen hidrógeno molecular como producto final del metabolismo, además de ATP. (Figura 2B) (Petrin *et al.*, 1998; Ryu y Min, 2006; Harp y Chowdhury, 2011).

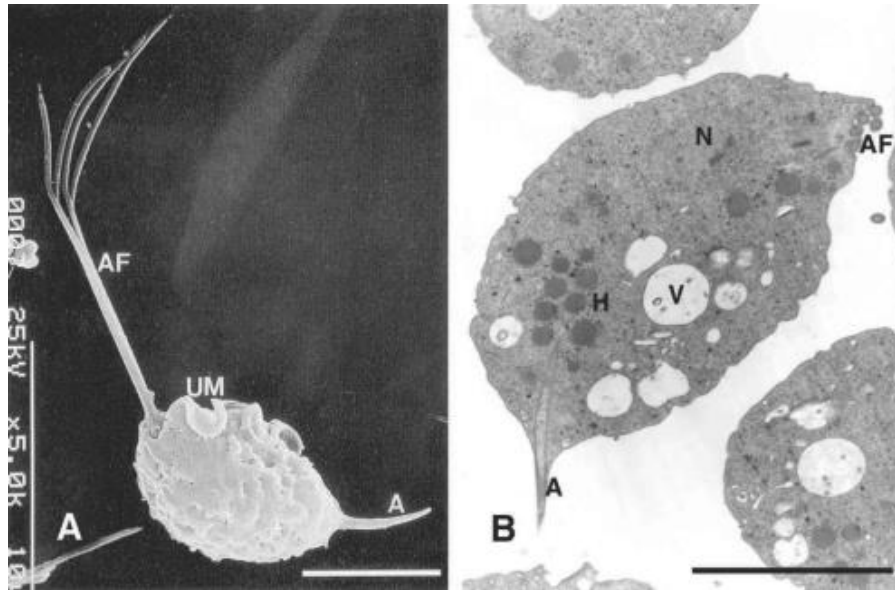


Figura 2. Ultraestructura de *T. vaginalis*. (A). Microscopía electrónica de barrido muestra las características morfológicas de los trofozoítos de *T. vaginalis*: Flagelos anteriores (AF), membrana ondulante (UM) y axostilo (A). (B). Microscopía electrónica de transmisión muestra la ubicación de los organelos internos de *T. vaginalis*: Núcleo (N), hidrogenosomas (H), vacuolas (V) y flagelos anteriores (AF) (Tomada de Ryu y Min, 2006).

Debido a que *T. vaginalis* infecta principalmente a mujeres en edad reproductiva, se encuentra expuesta a condiciones desfavorables como pH ácido, temperatura, cambios hormonales cíclicos del epitelio vaginal, nutrientes escasos, fluctuaciones en las concentraciones de poliaminas y hierro, moco cervical, flujo sanguíneo menstrual, potencial redox, entre otros factores que influyen en el desarrollo de este parásito durante su ciclo de vida (Arroyo *et al.*, 2015; Beri *et al.*, 2020).

T. vaginalis presenta diferentes morfologías: 1) La forma ovoide o de trofozoíto es considerada la forma activa, móvil e infecciosa del parásito que se transmite entre individuos durante el contacto sexual (Figura 3a). 2) La forma ameboide se caracteriza por un aumento en el contacto superficial con las células epiteliales de la vagina, cuello uterino y próstata (Figura 3b) (Arroyo *et al.*, 1993; Dias-Lopes *et al.*, 2017; Beri *et al.*, 2020).

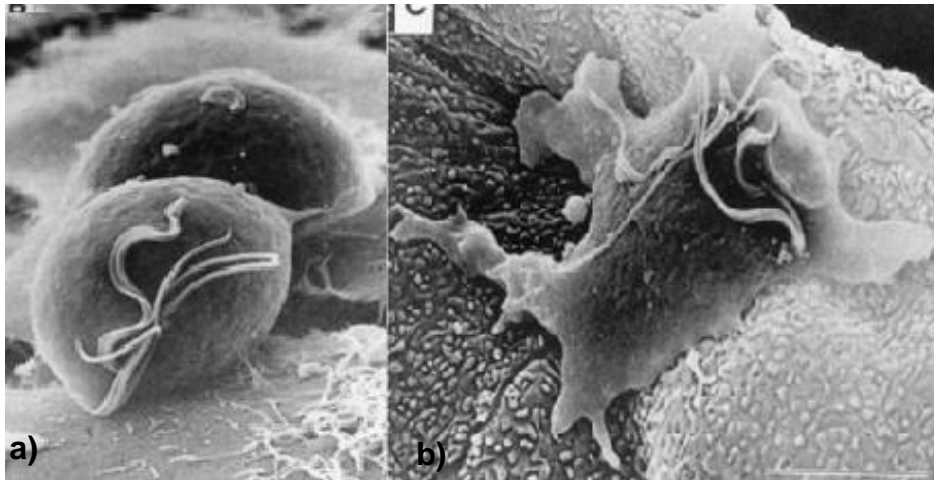


Figura 3. Morfología de *T. vaginalis*. (a) Trofozoito en forma ovoide de *T. vaginalis* adherido a la superficie de una célula epitelial cervical (HeLa). (b) Transformación morfológica ameboides de *T. vaginalis* al adherirse a una célula epitelial vaginal (Imagen tomada y modificada de Arroyo *et al.*, 1993).

3) Forma de pseudoquiste, recientemente se ha descrito la transformación morfológica de las formas ovoides y ameboides de tricomonas a pseudoquistes como mecanismo de defensa frente a condiciones ambientales desfavorables o en condiciones de cultivo axénico (Pereira-Neves *et al.*, 2011; Afzan y Suresh, 2012). Los pseudoquistes se describen como las formas compactas e inmóviles, sin una verdadera pared de quiste que han internalizado los flagelos (Figura 4) (Pereira-Neves, Ribeiro y Benchimol, 2003).

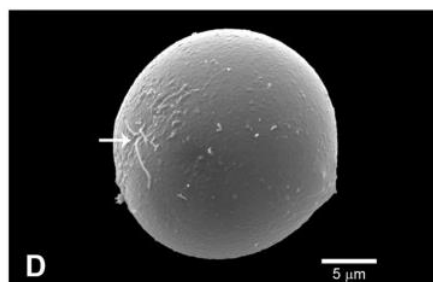


Figura 4. Morfología de pseudoquiste para *T. vaginalis*. Microscopía electrónica de barrido de parásitos cultivados en restricción de hierro que exhiben formas esféricas y compactas denominadas pseudoquistes (Tomada de Dias-Lopes *et al.*, 2017).

1.5 El papel del hierro en el desarrollo en la infección por *T. vaginalis*

El hierro es considerado un elemento esencial para la supervivencia de muchos protozarios patógenos en el huésped como los protistas amitocondriados, *Tritrichomonas*, *Trichomonas*, *Giardia* y *Entamoeba sp*, que requieren una alta concentración de hierro extracelular (50 a 300 μM) para su crecimiento y supervivencia en comparación con otras células procariotas o eucariotas (0.4 a 4 μM) (Sehgal *et al.*, 2012; Arroyo *et al.*, 2015).

En *T. vaginalis* el hierro es considerado un nutriente esencial para su supervivencia, metabolismo y multiplicación. Este protozoario requiere de grandes concentraciones de hierro exógeno que van desde los 250 a 300 μM (Arroyo *et al.*, 2015). El hierro en este protista parásito actúa como un regulador de sus factores de virulencia, Por ejemplo, TvCP2 es una cisteína proteasa (CP) que participa en la inducción de apoptosis a monocapas de células HeLa, la cual se regula negativamente por hierro (Rivera-Rivas *et al.*, 2020). Otro ejemplo es AP120 una adhesina que participa en la adhesión de los parásitos a la superficie de las células huésped cuando se encuentran expuestos a concentraciones altas de hierro (Moreno-Brito *et al.*, 2005). Otra proteína regulada por hierro es TvCP4, una CP del clan CA que se encuentra regulada positivamente por hierro, participa en la hemólisis y se expresa durante la infección (Cárdenas-Guerra *et al.*, 2013).

Debido a la importancia del hierro en la virulencia de *T. vaginalis* y sus altos requerimientos, este protozoario ha desarrollado múltiples sistemas de captación de hierro mediante el uso de adhesinas que le permiten adherirse a eritrocitos y unir hemoglobina de forma específica, un receptor de 136 kDa que le permite unir a hololactoferrina del huésped y también puede internalizar ferritina entre otros mecanismos de adquisición de hierro (Arroyo *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2015).

1.6 Autofagia

Para regular la homeostasis celular es necesario que exista un equilibrio constante entre los procesos biosintéticos y catabólicos. Las proteínas pueden sufrir degradación a gran escala por dos mecanismos, el proteosoma y la autofagia (Shintani y Klionsky, 2004). El término autofagia significa “comerse a sí mismo” y fue descrito por primera vez hace más de 40 años por Christian de

Duve (Glick *et al.*, 2010). La autofagia en general es utilizada para describir la degradación de componentes citoplasmáticos dentro de los lisosomas (Mizushima, 2007). Se han reconocido tres tipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperona (CMA). En la microautofagia las proteínas quedan atrapadas dentro de vesículas que se forman directamente por la invaginación de la membrana lisosómica (Cuervo y Wong, 2014), para la autofagia mediada por chaperonas, los componentes intracelulares se degradan selectivamente, gracias al reconocimiento del sustrato que generalmente contienen un motivo **KFERQ** (Yang *et al.*, 2019).

En el caso de la **macroautofagia**, en lo sucesivo denominada **autofagia**, se ha descrito como un sistema de degradación no selectivo (Mizushima, 2007), que se activa drásticamente en respuesta a las condiciones de estrés, como el agotamiento de nutrientes y cambios ambientales. Este mecanismo permite que las células puedan adaptarse y sobrevivir (Suzuki y Ohsumi, 2007; Xie y Klionsky, 2007). Sin embargo, se ha reportado que la autofagia también ocurre a niveles basales en la mayoría de los tejidos y contribuye al recambio rutinario de los componentes citoplasmáticos. Así mismo, se ha involucrado a la autofagia en diversas actividades celulares como, desarrollo, defensa inmunitaria, diferenciación, muerte celular programada, supresión de tumores y remodelación tisular en varios tejidos (Shintani y Klionsky, 2004; Xie y Klionsky, 2007).

El proceso **autofágico** puede describirse a nivel molecular por cinco etapas clave que incluyen; (1) **Inducción** de autofagia ; (2) **nucleación** de vesículas que consiste en la formación *de novo* de una doble membrana de aislamiento denominada fagóforo; (3) **expansión** del fagóforo o la doble membrana de aislamiento, así como reconocimiento de las proteínas cargo; (4) **formación del autofagosoma**, una vesícula de doble membrana que secuestra el material citoplasmático; (5) formación de “**autolisosomas**” o “**autofagolisosomas**” por fusión del autofagosoma con el lisosoma, donde se expone a las proteínas cargo a hidrolasas lisosomales para su degradación. Las macromoléculas resultantes son liberadas al citosol para su reciclaje (Figura 5). El conjunto de genes que codifican para las proteínas involucradas durante este proceso se han

denominado proteínas Atg (Klionsky, 2005; Mizushima, 2007; Levine y Kroemer, 2008).

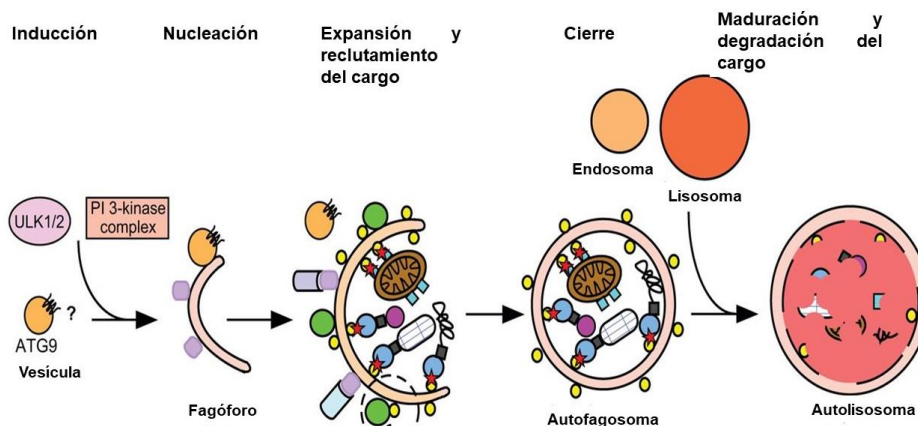


Figura 5. Representación esquemática de la vía autofágica. **Inducción:** Reclutamiento de proteínas Atg; **Nucleación:** Se forma una doble membrana de aislamiento, **Expansión o reclutamiento del cargo:** Inicio de la formación de la autofagosoma; **Cierre:** Formación del autofagosoma; **Maduración:** Fusión del autofagosoma con el lisosoma y degradación de las proteínas cargo (Tomada de Birgisdottir *et al.*, 2013).

1.6.1 Genes *atg*: maquinaria molecular central para la autofagia

Los productos génicos *atg* participan a lo largo del proceso autofágico (Periyasamy-Thandavan *et al.*, 2009). Hasta la fecha, se han descrito 31 genes *atg* en levadura, aunque normalmente se requieren 15 genes para el funcionamiento de la maquinaria relacionada con la biogénesis de las membranas autofágicas. El subconjunto de estos genes es considerado como la maquinaria molecular “central” para la autofagia (Nakatogawa *et al.*, 2009).

Los genes *atg* centrales se transcriben y traducen a las proteínas Atg centrales, funcionalmente organizadas en seis subgrupos: (1) El complejo de serina/treonina cinasa tipo Atg1/unc-51 (ULK); (2) El complejo PtdIns3K clase III donde se encuentran las proteínas VPS34, VPS15 y beclin 1; (3) El complejo WIPI/Atg18-Atg2 de unión a PtdIns3P; (4) dos proteínas de membrana, Atg9/mAtg9 y VMP1 y (5) dos sistemas de conjugación de proteínas similares a la ubiquitina (Atg12 y Atg8/LC3) (Yang y Klionsky, 2010; Wesselborg y Stork, 2015).

1.6.2 El complejo cinasa tipo Atg1/ unc-51 (ULK)

En la **macroautofagia** la inducción de la formación de los autofagosomas requiere de dos complejos: El complejo PtdIns3K clase III y el complejo tipo serina/treonina cinasa Atg1/unc-51 (ULK). Atg1 requiere de su asociación con Atg13, Atg17, Atg29 y Atg31 para formar el complejo cinasa y regular la formación de los autofagosomas. Por otro lado, el complejo Tor 1 (mTORC1) tiene un efecto regulador durante la inducción de la autofagia al detectar las condiciones de los nutrientes. mTORC1 regula el estado de fosforilación de Atg13. En condiciones ricas en nutrientes mTORC1 está activo e hiperfosforila a Atg13. Atg13 hiperfosforilado tiene una afinidad menor por Atg1 y Atg17 produciendo un efecto regulador negativo en la activación de la vía autofágica (Figura 6). Al contrario, en condiciones de inanición o cuando las células se tratan con rapamicina un inhibidor de mTORC1, Atg13 se desfosforila e interactúa con Atg1 y Atg17 con una mayor afinidad, permitiendo así la formación del complejo Atg1-Atg13-Atg17 y la posterior activación de la actividad cinasa de Atg1 que tiene como función principal regular el reclutamiento de las proteínas Atg para iniciar la autofagia (Figura 6) (Jung *et al.*, 2010; Badadani, 2012; Wesselborg y Stork, 2015).

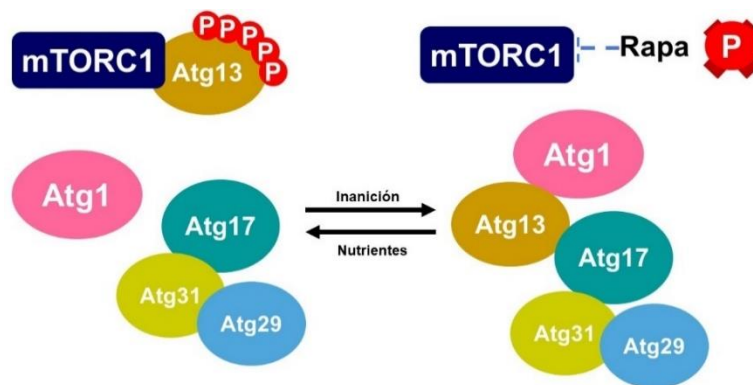


Figura 6. Regulación del complejo Atg1 por mTORC1. En la imagen de lado izquierdo en condiciones ricas en nutrientes mTORC1 hiperfosforila a Atg13 esto evita la formación del complejo Atg1. De lado derecho en condiciones de inanición o usando rapamicina la actividad de mTORC1 es inhibida, evitando la fosforilación de Atg13, de esta manera se permite la formación del complejo Atg1 y hay inducción de la autofagia (Imagen tomada y modificada de Jung *et al.*, 2010).

1.6.3 Sistemas de conjugación y expansión de tipo ubiquitina

Para que la expansión del fagóforo se lleve a cabo es necesario contar con dos sistemas de conjugación similares a la ubiquitina (Ub1). Las proteínas Atg12 y Atg8 están involucradas en este proceso y se ha considerado que ambas tienen similitud estructural con la ubiquitina, pero no son homólogos reales (Yin *et al.*, 2016). Atg12 participa en el sistema de conjugación Atg5- Atg12-Atg16, mientras que Atg8 contribuye al sistema de procesamiento Atg7-Atg3- LC3 (Atg8).

El sistema de conjugación implica la unión covalente de la glicina de Atg12 en su extremo C-terminal a Atg5 a través de Atg10 (Periyasamy-Thandavan *et al.*, 2009). Atg12 se activa de manera dependiente de ATP gracias a la hidrólisis y la formación de un enlace tioéster de alta energía entre la glicina en su extremo C-terminal con la cisteína del sitio activo de Atg7, que actúa como una enzima activadora de ubiquitina E1. Atg12 se transfiere a Atg5 por Atg10, una proteína portadora de ubiquitina similar a E2. El conjugado Atg5-Atg12, se asocia con Atg16, formando un complejo trimérico. Este complejo trimérico se homodimeriza para formar un complejo multimérico de 800 kDa, denominado complejo Atg16. El complejo Atg16 se localiza en las membranas de aislamiento, mientras que la mayor parte se difunde por todo el citoplasma. Además, el Atg5 de este complejo es esencial para el alargamiento de la membrana de aislamiento (Figura 7a) (Fujita *et al.*, 2008; Longatti y Tooze, 2009; Glick *et al.*, 2010).

Por otra parte, el sistema de procesamiento en el que participa Atg8 conduce al primer evento de conjugación de LC3B/Atg8 con el lípido fosfatidiletanolamina (PE) por Atg7 y Atg3. LC3B/Atg8 se expresa como una proteína completa, que debe ser escindida proteolíticamente en el extremo C-terminal por Atg4 (una cisteína proteasa) para generar LC3B-I, la cual se activa por Atg7 de manera dependiente de ATP. LC3B-I activada se transfiere a Atg3, una proteína portadora de tipo E2, para conjugarse con PE a través de un enlace amida y generar a la LC3B-II procesada. La LC3B-II, en su forma lipidada se asocia tanto en las superficies internas como externas de las membranas o vesículas autofágicas, donde desempeña un papel en la hemifusión de membranas para formar el autofagosoma. La Atg8, también participa en la selección de las proteínas cargo para su posterior degradación (Figura 7b). Este proceso de lipidación es reversible, ya que la proteasa Atg4 también es capaz de catalizar la

deslipidación de LC3/Atg8 asociada a la membrana externa de los autofagosomas, la cual es necesaria para la fusión de los autofagosomas con los lisosomas. La LC3/Atg8 también se ha utilizado comúnmente como un marcador para la autofagia (Figura 7a) (Fujita *et al.*, 2008).

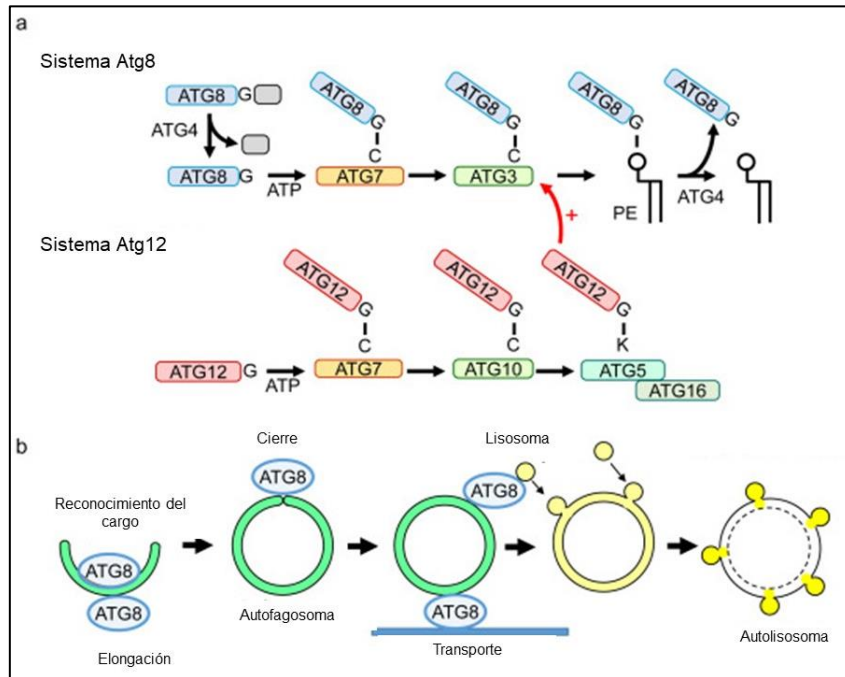


Figura 7. Sistemas de conjugación similares a la ubiquitina. (a) Sistema de procesamiento de Atg7-Atg3-LC3(Atg8): Atg8 es procesado por Atg4, y es activada por Atg7. Después Atg8 forma un enlace tioéster con Atg3. Finalmente, Atg8 se une de manera covalente a la fosfatidiletanolamina (PE); **Sistema de conjugación similar a la ubiquitina:** Atg12 se conjuga con Atg7, después Atg12 es transferido a Atg10. Atg12 se conjuga con Atg5. Atg5 interactúa con Atg16 y forman un complejo trimérico. **(b)Diferentes funciones para Atg8 durante la autofagia:** Elongación del fagóforo, reconocimiento de las proteínas cargo, cierre y transporte del autofagosoma antes de la fusión con lisosomas (Tomada de Mizushima, 2020).

1.7 Proteasas.

Las proteasas se definen como enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos (Hooper, 2002). En todo tipo de organismos el 2% de todos los genes codifican proteasas o sus homólogos (Rawlings y Barrett, 1999; Rawlings *et al.*, 2004). Las proteasas participan en el control de múltiples procesos biológicos como: coagulación sanguínea, activación del complemento, inducción de apoptosis, recambio proteico intracelular, activación y catabolismo de péptidos bioactivos,

remodelación tisular y digestión de alimentos entre otros (Rawlings y Barrett, 2005). Dada la relevancia de las proteasas es necesario contar con un sistema de clasificación para éstas. Alan J. Barrett, ha dividido a las proteasas en tres clases principales.

La primera está basada en el tipo de reacción proteolítica que catalizan y, por tanto, se divide en exopeptidasas y endopeptidasas. La segunda es de acuerdo con el tipo de mecanismo catalítico del sitio activo. Esto ha permitido clasificar a las proteasas en cinco grupos; de tipo aspártico, cisteína, metalo, serina y treonina proteasas. El tercer sistema fue propuesto por Rawlings y Barrett en 1993, en función de sus relaciones evolutivas y lo denominaron **sistema MEROPS**.

El **sistema MEROPS** es un sistema jerárquico en el que las peptidasas individuales se reconocen y se agrupan primero en familias. Las familias son un grupo de enzimas en las que cada miembro muestra una relación evolutiva con al menos otro, ya sea a lo largo de toda la secuencia o al menos en la parte de la secuencia responsable de la actividad catalítica. Las familias se agrupan en clanes que comprenden un grupo de familias para las que existen indicios de relación evolutiva. Tales indicios provienen del orden de los motivos de secuencia y la estructura terciaria (Rawlings y Barrett, 1993; Barrett, 2000; Dunn, 2003). Hasta ahora se han reportado 248 familias de proteasas y 61 clanes (Rawlings y Barrett, 2014).

1.7.1 Cisteína proteasas

Las cisteína proteasas (CPs) son una de las familias de peptidasas presente en protozoarios parásitos que se consideran componentes esenciales por su participación en procesos biológicos como invasión de las células huésped, evasión de la respuesta inmune, patogénesis y virulencia (Mottram *et al.*, 2003). Las CPs son definidas por la presencia de un grupo tiol en su residuo de cisteína que actúa como un nucleófilo y ataca al carbono del enlace peptídico reactivo (Barrett y Rawlings, 1996).

De acuerdo con la base de datos de peptidasas en **MEROPS**, las CPs se clasifican en nueve clanes; el clan CA (papaína), clan CD (legumainas), clan CE (adenaína), clan CF (piroglutamil peptidasa), clan CH (proteína hedgehog), clan CL (sortasa B), clan CM (peptidasa 2 del virus de la hepatitis C), clan CN (peptidasa nsP2 del tipo de virus sindbis) y clan CO (dipeptidil peptidasa VI) (Atkinson *et al.*, 2009).

1.7.2 Cisteína proteasas del clan CA

Las CPs de organismos parásitos se dividen en dos clanes principales, CA y CD. El clan CA incluye a la mayoría de las secuencias conocidas en las CPs de los parásitos. De las 24 familias de este clan, 12 incluyen peptidasas dominantes de helmintos y protozoarios (McKerrow, 2018). Las proteasas “similares a la papaína” o clan CA se denominan así debido a su alta homología de secuencia con la CP de *Carica papaya* (Papaya) (Atkinson *et al.*, 2009).

Este clan se caracteriza por tener tres residuos catalíticos con el orden de secuencia: Cisteína (C), Histidina (H) y Asparagina (N) que comprenden la triada catalítica (Verma *et al.*, 2016). Esta triada cataliza la reacción donde el azufre de la cisteína nucleofílica se acerca al carbonilo del enlace peptídico para escindirlo. El residuo de histidina presente en el sitio activo actúa como un donante de protones mejorando la capacidad nucleofílica de la cisteína (Figura 8) (Atkinson *et al.*, 2009).

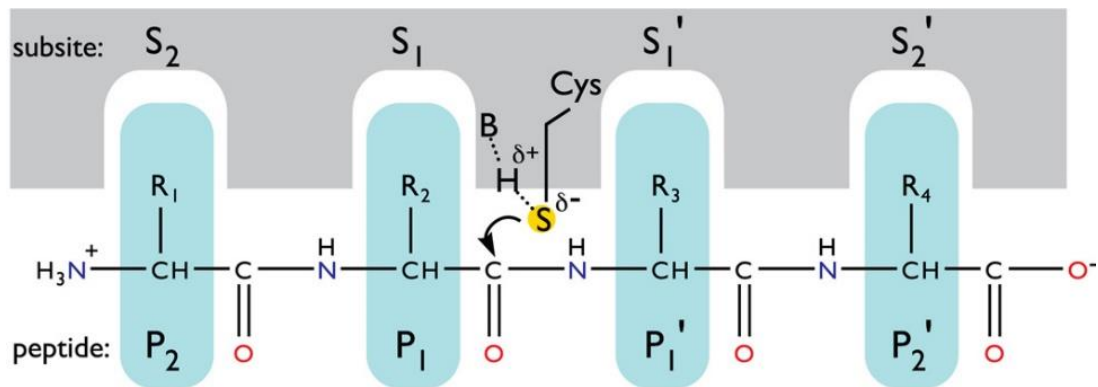


Figura 8. Reacción catalizada por la cisteína nucleofílica. El azufre de la cisteína escinde el enlace peptídico, ya que es altamente nucleofílico gracias a la histidina que actúa como un donante de protones. Los residuos y subsitos (S) de los enlaces peptídicos se numeran y se designan como primarios (P) y no primarios en función de su posición con respecto al enlace peptídico objetivo (Tomada de Atkinson *et al.*, 2009).

1.7.3 Procesamiento de las CPs del clan CA

Las CPs tienen una localización lisosomal, y en su secuencia de aminoácidos incluyen un péptido señal, propéptido y dominio catalítico que representa a la enzima madura proteolíticamente activa. El péptido señal lleva a cabo la traslocación al retículo endoplásmico (RE) durante la traducción. Al propéptido se le atribuyen tres funciones como: 1) andamio para el plegamiento del dominio catalítico de la proteasa, 2) acompañante para el transporte de la pro-enzima e 3) inhibidor reversible de alta afinidad que previene la activación prematura del dominio catalítico. Debido a su localización las CPs son activadas en un pH ácido, siendo el pH óptimo alrededor de 5. También el entorno reductor presente en el compartimento lisosómico, endosómico evita la oxidación del grupo tiol del residuo de cisteína del sitio activo y, por tanto, la inactivación. Además, cuando las CPs están fuera de los lisosomas o extracelularmente, pueden inactivarse de forma rápida e irreversible a un pH neutro (Figura 9) (Brömme y Wilson, 2011; Turk *et al.*, 2012).

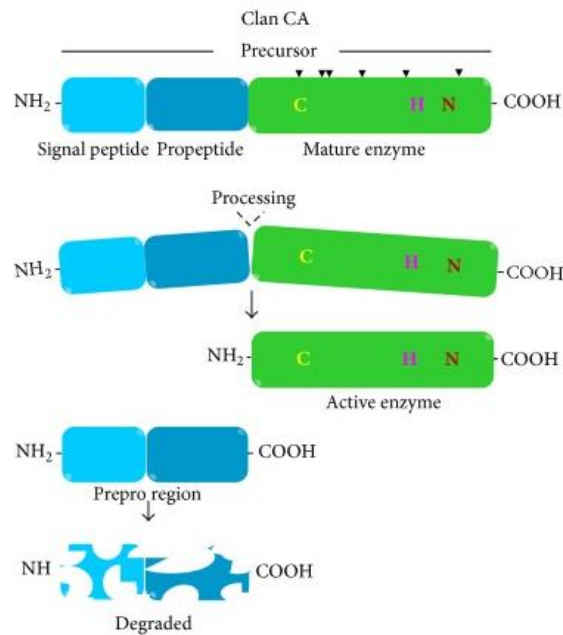


Figura 9. Representación esquemática del procesamiento de las CPs del clan CA. En el esquema se muestran los pasos necesarios para el procesamiento y activación de las CPs del clan CA. Así mismo, se observa la estructura de la proteína: el péptido señal (azul claro), en el extremo N terminal el propeptido (azul oscuro) y el dominio catalítico (verde) (Tomada y modificada de Arroyo *et al.*, 2015).

1.7.4 Estructura cristalina de las CPs del clan CA

La estructura cristalina de las CPs, generalmente se compone de dos cadenas (pesada y ligera) conectadas por puentes disulfuro. Las enzimas similares a la papaína se componen de dos dominios, izquierdo (L) y derecho (R) con la hendidura del sitio activo en forma de V que se extiende a lo largo de la interfaz de los dominios (Figura 10) (Turk *et al.*, 2000, 2001; Turk *et al.*, 2012).

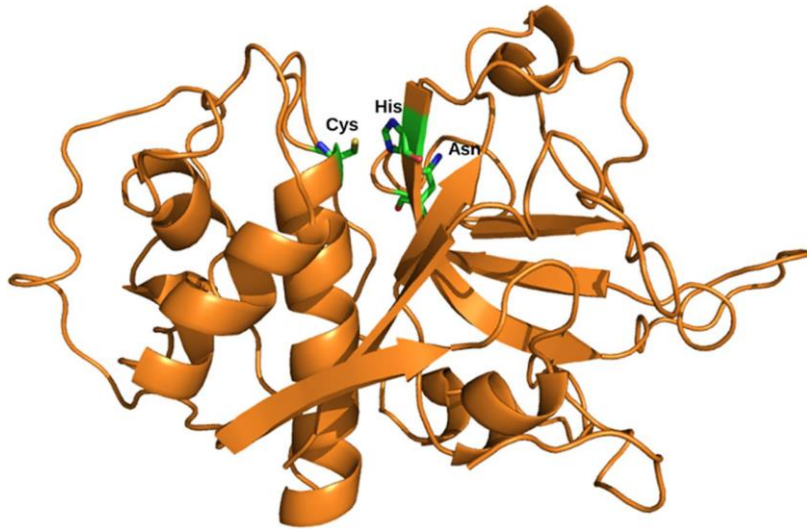


Figura 10. Estructura terciaria de la cisteína proteasa de tipo papaína. Estructura 3D cristalina de la cisteína proteasa (código PDB: 3PNR), de lado derecho se encuentra el dominio R y del lado izquierdo se encuentra el dominio L. En el centro se observa la tríada del sitio catalítico (Tomada de Verma *et al.*, 2016).

1.8 Cisteína proteasa Atg4

La Atg4 o autofagina, se considera la única proteasa entre las proteínas Atg. Está CP pertenece a la familia C54 del clan CA y conservada evolutivamente desde la levadura hasta los mamíferos, en eucariotes superiores se conservan múltiples homólogos para esta CP. Sin embargo, la actividad de proteasa es diferente entre los homólogos. La susceptibilidad entre los homólogos de Atg8 para cada homólogo de Atg4 es diferente (Maruyama y Noda, 2018). En el caso de los mamíferos, las proteasas Atg4 tienen un tamaño aproximado de 393 a 474 aminoácidos (aa) y una triada catalítica que se encuentra en el orden de secuencia: cisteína, ácido aspártico e histidina que es inusual entre las CPs similares a papaína (Kumanomidou *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2017). Atg4 tiene como función participar en el proceso de lipídación de Atg8 a través de 2 pasos. En la primera reacción Atg4 procesa proteolíticamente a Atg8 en su extremo C-terminal para exponer un residuo de Gly. Esta Atg8 con el residuo de Gly expuesto mediante una serie de reacciones de tipo ubiquitina se une de manera covalente a la PE para formar el conjugado Atg8-PE. El conjugado Atg8-PE es necesario para su unión a las vesículas autofágicas. En la segunda reacción, Atg4 hidroliza el enlace amida entre Atg8 y la PE para que Atg8 se libere de las vesículas y pueda ser reutilizado (Shu *et al.*, 2010).

1.8.1 Estructura secundaria y terciaria general de la CP Atg4.

En humanos se han encontrado cuatro homólogos para Atg4: Atg4A, Atg4B, Atg4C y Atg4D. Hasta ahora se considera a Atg4B como el homólogo principal en mamíferos. Estudios *in vitro* muestran que Atg4B tiene el espectro más amplio con afinidad y eficiencia catalítica similar hacia cada una de las isoformas de Atg8 en mamíferos (Li *et al.*, 2011, 2017; Agrotis *et al.*, 2019). Los estudios cristalográficos de Atg4 se han limitado a *Homo sapiens* cuya primera estructura informada ha sido HsAtg4b (código PDB: 2CY7) (Sugawara *et al.*, 2005).

La proteína HsAtg4b adopta una estructura general con pliegues α/β que consta de 13 hebras β (β 1- β 13) y ocho hélices α (α 1- α 8). Además, se compone de un lóbulo izquierdo y un lóbulo derecho, designados como “dominio proteasa” y “dominio auxiliar” (Figura 11a) respectivamente. El dominio proteasa coincide con la CP de la superfamilia de la papaína (Figura 11b). Este a su vez se divide en dos subdominios distintos. El sitio activo de la HsAtg4b se encuentra entre los dos subdominios distintos. El dominio auxiliar, contiene dos hebras β y dos hélices α y no mantiene la estructura de la superfamilia de la papaína. Aunque no se conoce una función particular para este dominio se le atribuye una posible participación en el reconocimiento de sustratos (Kumanomidou *et al.*, 2006).

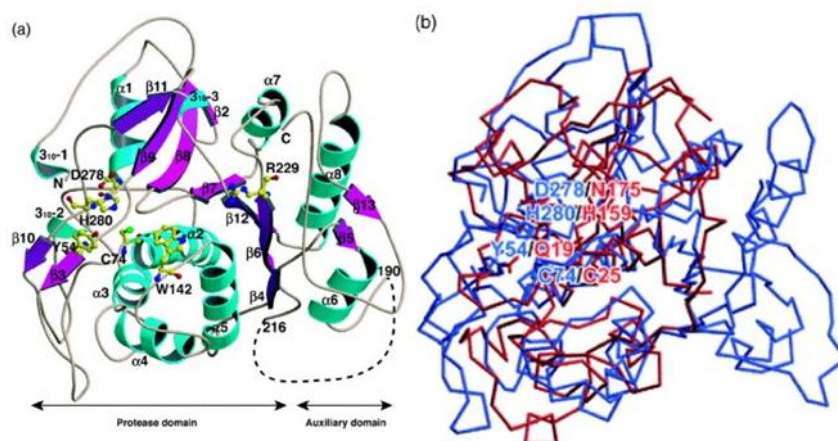


Figura 11. Estructura terciaria de HsAtg4b. (a) Los residuos del sitio activo se muestran en representación de bola y palo, los códigos de color para los elementos de la estructura son: α -hélice (verde); hebras- β , (moradas); bucles (gris). (b) Diagrama que muestra la superposición de HsAtg4b (azul) y papaína (rojo). (Kumanomidou *et al.*, 2006).

Para las proteasas de procesamiento específico de tipo ubiquitina (UBP) se ha descrito una región denominada dominio de los dedos que es responsable del reconocimiento de las ubiquitinas. En el caso de HsAtg4b se ha observado la presencia de este dominio, aunque es más corto, por esto se le denomina dominio de los dedos cortos. Este dominio está compuesto por hélices α y cadenas β (Figura 12A) (Sugawara *et al.*, 2005).

En el caso de la triada catalítica, el residuo de cisteína nucleofílico para HsAtg4b se encuentra en la posición 74 del extremo N-terminal de una hebra β , el ácido aspártico se encuentra en la posición 278 y está ubicado en el extremo C-terminal de otra hebra β . El residuo de histidina se encuentra en un bucle en la posición 280 entre dos hebras β . Esta ubicación es una característica única de las proteasas de la familia Atg4. La geometría y el orden de secuencias de estas posiciones corresponde a la tríada catalítica canónica de las CPs (Sugawara *et al.*, 2005).

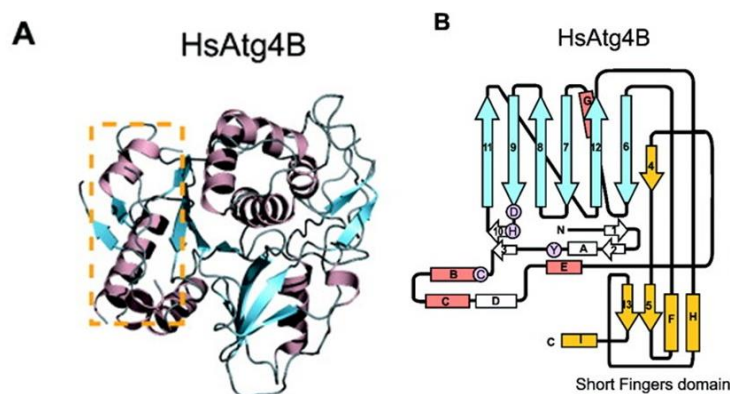


Figura 12. Dominio de los dedos cortos en HsAtg4b. (A) Estructura cristalina en 3D de Atg4, en el recuadro amarillo se encuentra a la región de los dedos cortos. **(B)** Estructura secundaria de Atg4 B, en color azul se encuentran las hebras β y en color rosa las hélices α , en amarillo se encuentra la región de los dedos cortos (Tomado de Maruyama y Noda, 2018).

Hasta ahora se ha mencionado que Atg4 actúa como un zimógeno ya que es necesario que tenga ciertos cambios conformacionales para llevar a cabo su actividad de proteasa. Primero debe reconocer a su sustrato, como se observa en la figura 13a, HsAtg4b tiene una región de color verde que se encuentra conformada por los aminoácidos lisina (K137), triptófano (W142), glicina (G144), prolina (P145), serina (S316) y arginina (R229). Se cree que la función de esta región es permitir el reconocimiento del sustrato, por esto se encuentra cercana a la triada catalítica (región roja). Además, contiguo a la región podemos

encontrar una superficie cóncava que comprende el dominio de los dedos cortos (Figura 13a, marco amarillo) antes descrito. Se ha considerado que este sitio es importante ya que es un posible sitio de unión para el posicionamiento del extremo carboxilo de Atg8.

Por otro lado, se sabe que la cisteína encargada de la actividad catalítica se encuentra autoinhibida por los aminoácidos: lisina (K259), prolina (P260), asparagina (N261) y serina (S262) que se encuentran entre la región verde y la región de la triada catalítica. A esta región se le ha denominado bucle inhibitorio (Figura 13b, color azul fuerte). Este bucle inhibitorio mantiene interacción con otro residuo, triptófano 142 (W142), convirtiendo así a este último residuo como un segundo bucle inhibitorio (Figura 13b, azul claro). Estos dos bucles inhibitorios deberán ser susceptibles a cambios conformacionales, que se proponen como un requisito previo para la hidrólisis del sustrato por HsAtg4b (Sugawara *et al.*, 2005).

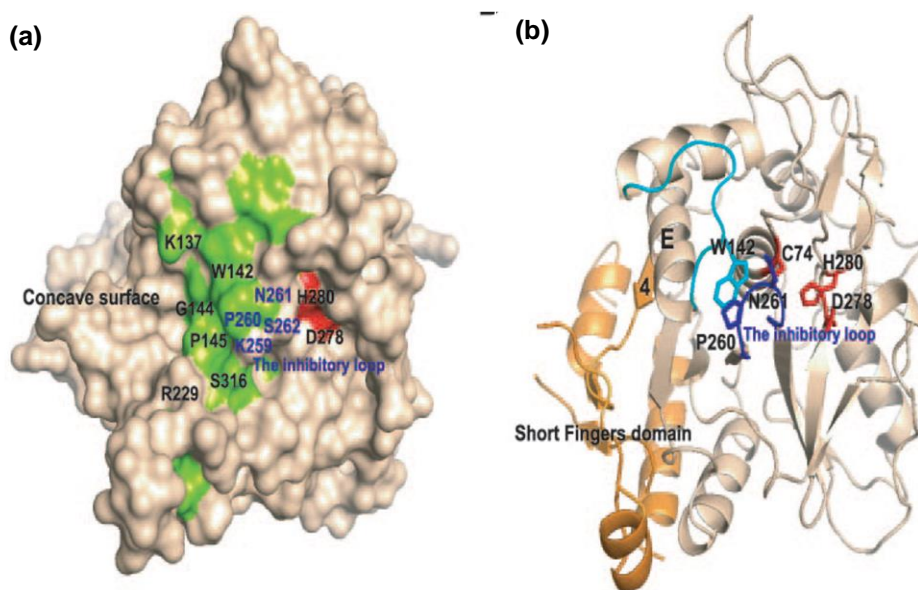


Figura 13. Bucles reguladores para HsAtg4b. (a) Esquema de la superficie de HsAtg4b. En color verde se encuentran los aminoácidos responsables del reconocimiento de Atg8; en color rojo se encuentran los residuos que comprenden la triada catalítica; en color azul los residuos de aminoácidos que conforman el primer bucle inhibitorio. (b) Esquema de listones y palos de la estructura terciaria de HsAtg4b : En color naranja se observa el dominio de los dedos cortos; en color azul claro se observa el segundo bucle inhibitoria conformado por Triptófano 142; en color azul oscuro se tiene al primer bucle inhibitorio y en color rojo la triada catalítica (Tomada de Sugawara *et al.*, 2005).

1.8.2 Autofagia en *Trichomonas vaginalis*.

La autofagia es considerada una característica antigua y conservada en la biología celular eucariota. En varios protozoarios se ha encontrado que este proceso no es igual al identificado en modelos animales y de levadura ya caracterizados. En los protistas, la autofagia también participa en la supervivencia, diferenciación del ciclo de vida y patogenicidad (Brennand *et al.*, 2011). Ejemplo de ello es *Leishmania sp.* Durante su ciclo de vida este parásito debe ser liberado como amastigote para continuar con la infección en macrófagos. Por lo que al bloquear la autofagia en *Leishmania sp.*, se evita la diferenciación de este estadio. Otro ejemplo es la ausencia de virulencia en las mutantes de *Leishmania mexicana* deficientes de CPA y CPB ortólogos de las catepsinas lisosomales de mamíferos relevantes para la autofagia y diferenciación del parásito. En el caso de los *Apicomplexa*, específicamente para *Plasmodium sp.*, se ha observado la participación de la autofagia durante la conversión de esporozoíto a trofozoíto. En este cambio morfológico existe una remodelación interior en *Plasmodium sp.*, con la eliminación de muchos organelos (Duszenko *et al.*, 2011).

Durante la autofagia uno de los eventos moleculares importantes es la formación de los autofagosomas por los dos sistemas de conjugación de tipo ubiquitina. Brennand y col., en 2011 realizaron un perfil filogenómico donde se observa la presencia o ausencia de genes ortólogos *atg* en diferentes protistas (Figura 14). En una búsqueda a nivel genómico en *T. vaginalis* se identificó la presencia de cuatro parálogos para *atg4* y 2 parálogos para *atg8* que forman parte del segundo sistema de conjugación de tipo ubiquitina (Figura 14).

Por otro lado en un estudio realizado por Huang *et al.*, (2014), en una búsqueda a nivel de BLAST para identificar los posibles ortólogos de los genes ***atg*** en el genoma de *T. vaginalis*, identificaron 10 genes que tienen similitud de secuencia con los genes ***atg*** de levadura y mamífero (Tabla 1) (Huang *et al.*, 2014). En este análisis se identificó como posibles ortólogos putativos a 5 parálogos para ***atg4*** y 2 parálogos para ***atg8***, corroborando lo antes reportado por Brennand y col., en 2011. Algo interesante que se observa en ambos estudios por los dos grupos de trabajo es que no reportan a nivel genómico ningún posible ortólogo putativo para el segundo sistema de conjugación (Atg12) similar a la ubiquitina.

Además, en este estudio se observaron cambios a nivel de transcrito en condiciones de restricción de glucosa (RG). En el caso de la autofagia encontraron que *T. vaginalis* codifica un repertorio limitado de proteínas **Atg** putativas. En específico para TvAtg4, se identificaron 5 genes parálogos (Tabla 2), siendo ***tvatg4.1* (TVAG_023970)** el transcrito más abundante entre los diferentes parálogos con sus niveles de expresión regulados positivamente en RG seguido de ***tvatg4.4* (TVAG_397150)**. Mientras que al nivel de transcrito los genes ***tvatg4.2*, *tvatg4.3* y *tvatg4 5*** no mostraron ningún cambio aparente en condiciones de RG (Huang *et al.*, 2014).

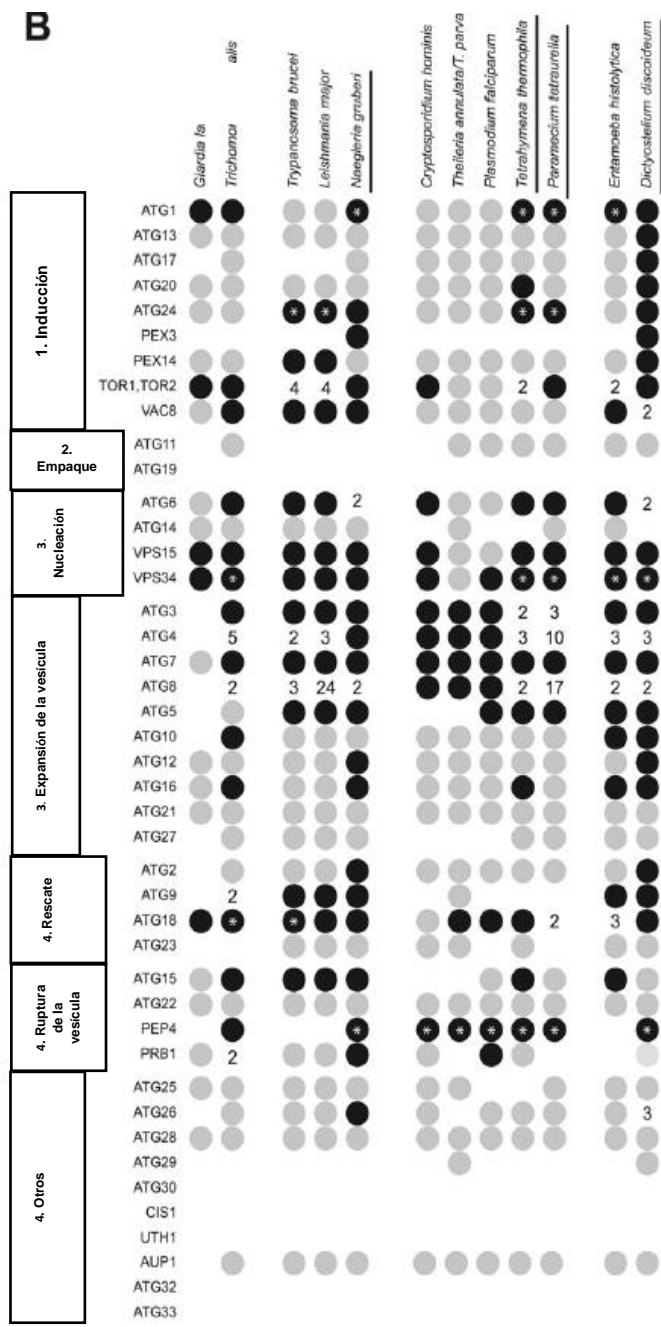


Figura 14. Distribución de los genes ortólogos *atg* en protistas parásitos. Puntos de color negro sugieren secuencias ortólogas para otros organismos detectadas usando las secuencias *atg* de levadura al consultar la base de datos de los genomas de los diferentes organismos. Puntos en color gris predicción de secuencias homólogas. Los números indican el número de parálogos presentes para un gen en un organismo. Los asteriscos son para aquellos parálogos de un gen en específico para el cual el número de parálogos aún no está claro (Rigden *et al.*, 2009; Brennand *et al.*, 2011; Duszenko *et al.*, 2011).

Tabla 1. Ortólogos putativos para los genes *atg* de *T. vaginalis*.

GEN	ID DEL GEN	GEN	ID DEL GEN
Atg1	TVAG_074920	ATG9	TVAG_283090
	TVAG_334190		TVAG_426560
	TVAG_136340	ATG18	TVAG_483310
	TVAG_175440	VAC8	TVAG_035230
	TVAG_292810		TVAG_136270
	TVAG_468570	VPS15	TVAG_073880
ATG3	TVAG_447140		TVAG_410040
ATG4	TVAG_023970	VPS34	TVAG_006610
	TVAG_122030		TVAG_045170
	TVAG_258880		TVAG_046650
	TVAG_397150		TVAG_247270
	TVAG_456380		TVAG_332500
ATG7	TVAG_092470		TVAG_046650
ATG8	TVAG_486080		TVAG_247270
	TVAG_239800		TVAG_332500

Búsqueda de ortólogos putativos de los diferentes genes ***atg***. Columna de la derecha, número de acceso o identificación del gen en la base de datos del genoma de *T. vaginalis* **TrichDB**.

Tabla 2. Expresión de los genes *tvatg4* en condiciones de (RG).

Parálogos Atg	ID Gen	RPKM			
		1%_12h	GR_12h	GR_24h	GR_36h
ATG4.1	TVAG_023970	11.5	49.2	74.6	25.9
ATG4.2	TVAG_122030	2.1	0.1	1.3	1.2
ATG4.3	TVAG_258880	0.4	0.7	0.4	0.7
ATG4.4	TVAG_397150	15.4	18.4	24.8	19.1
ATG4.5	TVAG_456380	2.1	4.2	2.4	5.8

Expresión de los genes *atg4* en *T. vaginalis* a diferentes tiempos en condiciones de RG y alta glucosa (1%) (AG)(Huang *et al.*, 2014). **RPKM** (Lecturas por kilobase de transcripción, por millón de lecturas mapeadas).

Huang y col., en 2014 además del análisis a nivel de transcrito de los genes *atg* y su aparente regulación positiva por RG evaluaron si *T. vaginalis* en condiciones de RG era capaz de inducir autofagia. Para lo cual tiñeron a las tricomonas con Cyto-ID™, un rastreador de autofagia que exhibe fluorescencia en vesículas de tipo autofagosomas y autolisosomas. Los resultados obtenidos mostraron que en cultivos ricos en glucosa en fase logarítmica no se observaban señales puntuadas de color verde, lo que les sugería la ausencia de vacuolas similares a autofagosomas. Por el contrario, en cultivos en RG las células en fase logarítmica presentaban un patrón abundante de señales puntuadas de color verde que mostraban la presencia de vesículas de tipo autofagosoma (Figura 15). Estos datos sugieren que *T. vaginalis* en condiciones de RG podría presentar una respuesta de tipo autofágico (Huang *et al.*, 2014).

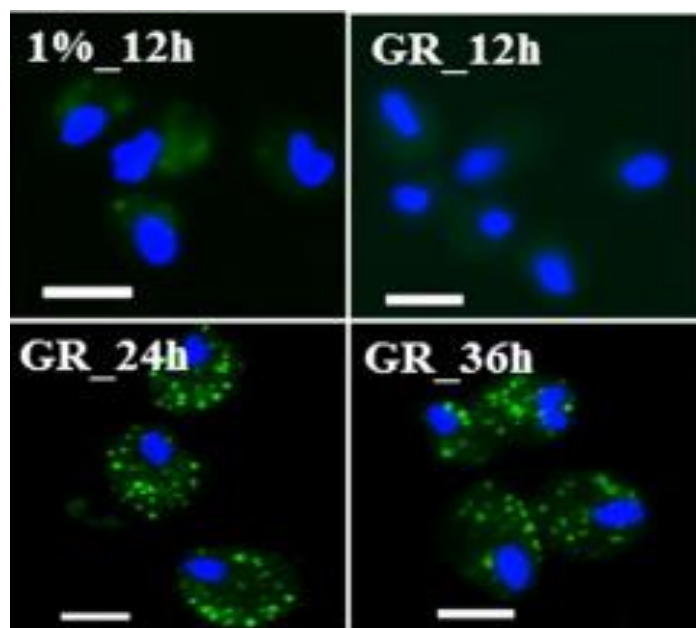


Figura 15. Detección de autofagia en *T. vaginalis*. Células teñidas con Cyto ID™ para detectar vesículas de tipo autofagosoma en diferentes concentraciones de glucosa. Panel superior izquierdo, células en condiciones ricas en glucosa (1%) después de 12 h; se observa la ausencia de vesículas de tipo autofagosoma. Panel derecho superior y paneles inferiores en GR a las 12 h, 24 h y 36 h respectivamente. La presencia de señales fluorescentes corresponde a vesículas de tipo autofagosoma (Tomado de Huang *et al.*, 2014).

En la autofagia Atg8 tiene un papel importante durante la formación del autofagosoma y es esencial para el alargamiento de la membrana autofágica. De ahí que Atg8 se ha usado ampliamente como un marcador de autofagosomas en varios organismos (Shpilka *et al.*, 2011).

Por lo anterior Huang y col., (2019) investigaron la participación de Atg8 de *T. vaginalis* en condiciones de RG. Este protozoo presenta dos proteínas parálogas para Atg8: TvAtg8a (TVAG_486080) y TvAtg8b (TVAG_239800). En este estudio por ensayos de inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos policlonales generados contra la TvAtg8a recombinante determinaron que parásitos en condiciones de RG TvAtg8a mostraron un patrón punteado (verde). Los autores atribuyen que esta localización podría corresponder a vesículas de tipo autofagosoma. Para corroborar lo anterior, se utilizó el inhibidor wortmanina, observándose una disminución en las señales puntuadas (verde) dependiente de la dosis (Figura 16). Las conclusiones de este estudio son que TvAtg8a está asociado a vacuolas de tipo autofagosoma en RG por lo que se consideró a

TvAtg8a un posible marcador de autofagosomas en la autofagia de *T. vaginalis* inducida en RG (Huang *et al.*, 2019).

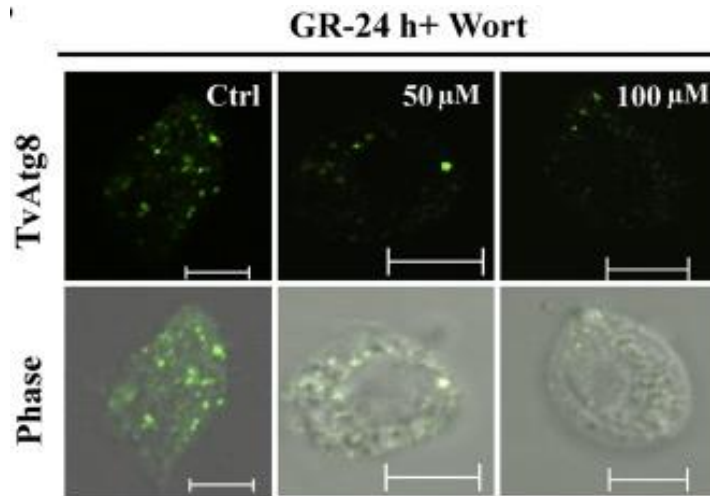


Figura 16. Localización de TvAtg8a después del tratamiento de *T. vaginalis* en RG con el inhibidor de autofagia wortmanina. La disminución de las señales punteadas de color verde sugiere que TvAtg8a podría ser un posible marcador de autofagia en *T. vaginalis* (Tomada de Huang *et al.*, 2019).

Además, para que TvAtg8a pueda unirse a las vacuolas de tipo autofagosoma y participar en su formación es necesario que sufra un procesamiento previo por la CP Atg4 de *T. vaginalis*. Mediante electroforesis SDS-PAGE con urea 6 M, que permite la separación de TvAtg8a lipidado del no lipidado, evaluaron si TvAtg8a pudo haber sufrido un procesamiento previo tras la inducción de la autofagia. Los resultados obtenidos por los autores mostraron un incremento progresivo de TvAtg8a lipidado durante un cultivo en RG (Figura 17) (Huang *et al.*, 2019).

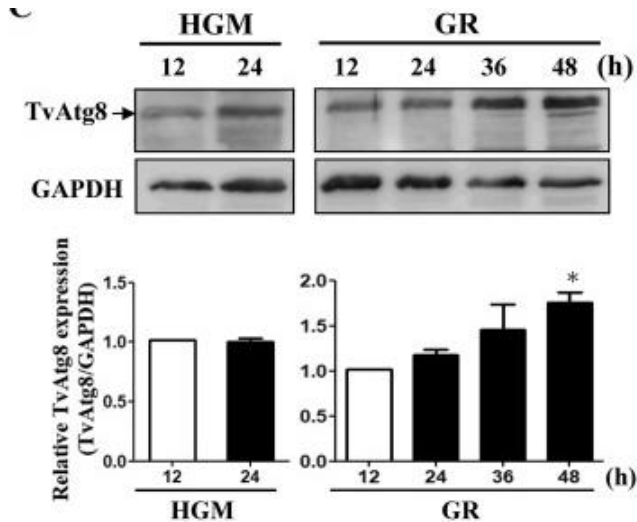


Figura 17. Análisis de la expresión de TvAtg8a en *T. vaginalis* cultivada en RG mediante SDS-PAGE urea 6 M. Se observa mediante SDS-PAGE que la expresión de TvAtg8a lipídado incrementa de manera progresiva con respecto al tiempo (Tomada de Huang *et al.*, 2019).

Por otro lado, Hernández -García *et al.*, (2019), en un ensayo de WB usando un anticuerpo policlonal contra la TvAtg8b recombinante detectaron dos bandas de 17 y 9 kDa en los lisados de proteínas de *T. vaginalis* en condiciones de cultivo normales, con rapamicina, restricción de hierro y de glucosa (N, Rapa, RH, RG). El reconocimiento de ambas bandas corresponde a las isoformas de TvAtg8b no lipídado (TvAtg8b-I) y TvAtg8b-PE lipídado (TvAtg8b-II) (Figura 18).

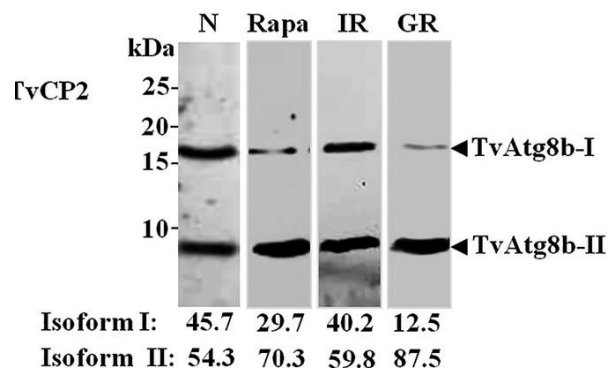


Figura 18. Detección de TvAtg8b con un anticuerpo anti-rTvAtg8b en diferentes condiciones inductoras de autofagia en *T. vaginalis*. Se observa la detección de dos bandas en el mismo carril para la forma soluble (TvAtg8b-I) y la forma lipídada (TvAtg8b-II) en las diferentes condiciones inductoras de autofagia en *T. vaginalis* (Tomado y modificado de Hernández García *et al.*, 2019)

Así mismo la autofagia ha sido descrita como un mecanismo que se activa en respuesta a condiciones nutricionales desfavorables. Hernández García *et al.*, (2019) indujo el proceso autofágico en *T. vaginalis* en diferentes condiciones inductoras de autofagia, en presencia de rapamicina (Rapa) y en dos condiciones de privación de nutrientes, RH y RG. Específicamente estudió la participación del segundo ortólogo de Atg8 de este parásito (TvAtg8b) Por inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo policlonal generado contra la proteína recombinante TvAtg8b observó que en RG el porcentaje de células con vesículas positivas a TvAtg8b fue el más alto y el número de vesículas TvAtg8b-positivas por célula fue también el más alto, en comparación con otras condiciones inductoras de autofagia. Por otro lado, en condiciones de RH, las estructuras positivas a TvAtg8b fueron visualizadas en formas de “puntos” y se observaron en menor proporción (Figura 19) (Hernández-García *et al.*, 2019).

En conclusión, ambos grupos de trabajo sugieren que TvAtg8b y TvAtg8a se encuentra asociado a las vacuolas de tipo autofagosoma y por lo tanto podrían participar como marcadores de la autofagia en *T. vaginalis*.

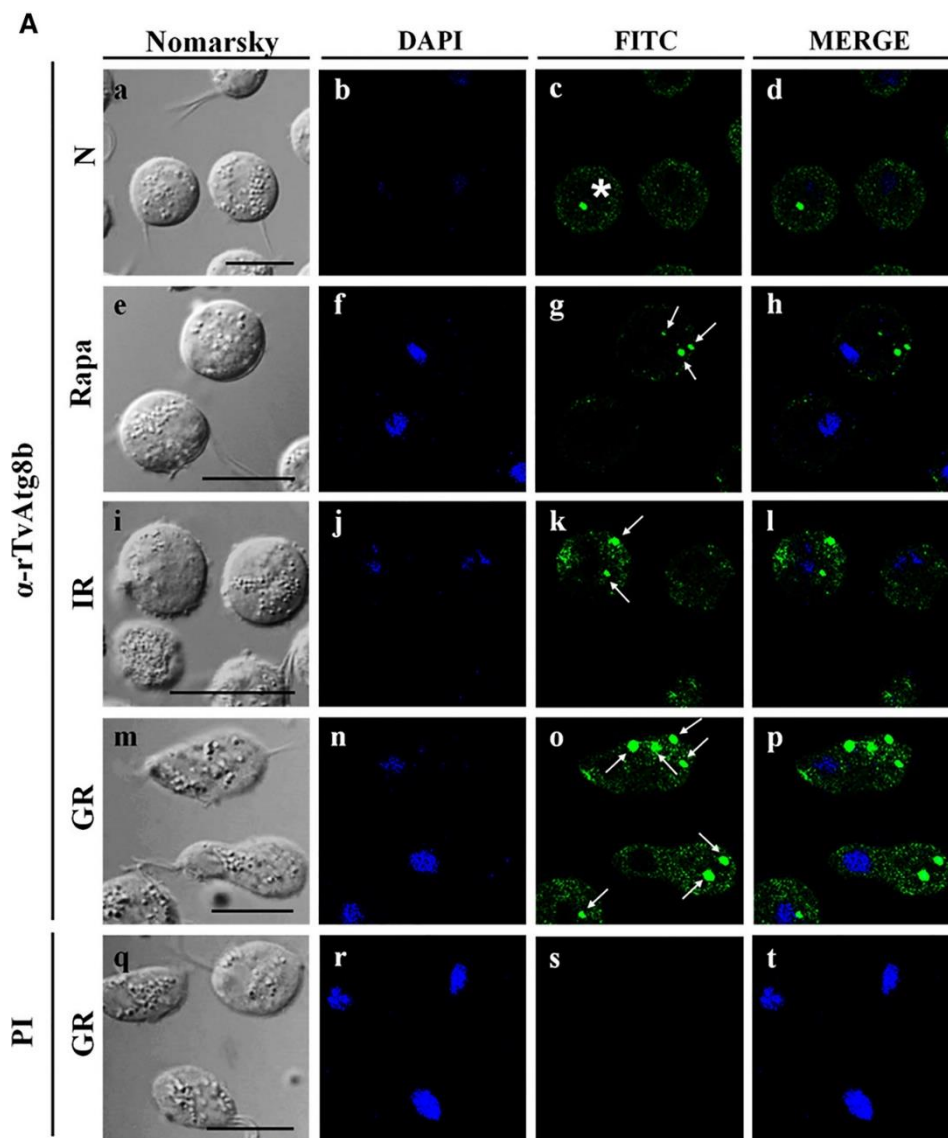


Figura 19. Localización de TvAtg8b en diferentes condiciones inductoras de autofagia. Condiciones normales de cultivo (N), cultivo en RG, cultivo en RI. Células tratadas con rapamicina (Rapa) como inductor de autofagia (Tomada de Hernández García *et al.*, 2019).

Además, durante este estudio Hernández García *et al.*, (2019) siguieron la biogénesis del autofagosoma a nivel celular por microscopía electrónica de transmisión. Los resultados muestran que en ambas condiciones inductoras de autofagia por restricción de nutrientes existe la formación de vesículas de tipo autofagosoma. Sin embargo, en las condiciones de RH la vesícula de tipo autofagosoma aparentemente solo presenta una membrana de aislamiento (Figura 20), mientras que en RG el autofagosoma presenta doble membrana similar a la que se observa en Rapa (Hernández-García *et al.*, 2019).

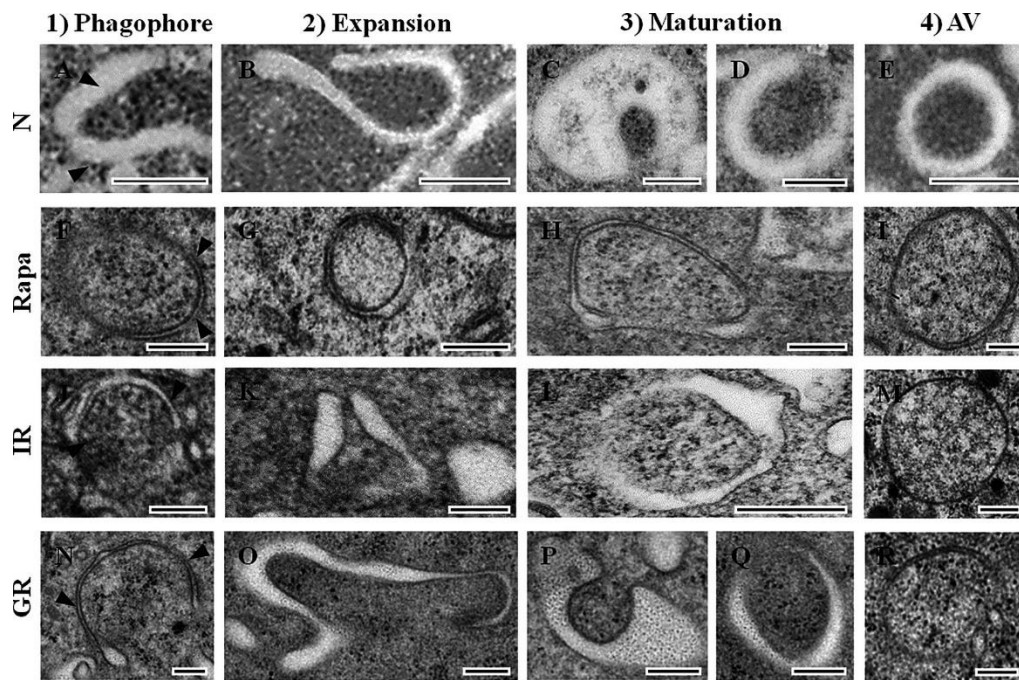


Figura 20. Biogénesis del autofagosoma en *T. vaginalis*. La formación de vesículas de tipo autofágico se observa en cada una de sus etapas. 1. Fagóforo, formación *de novo* de una doble membrana de aislamiento; 2. Expansión, la doble membrana se expandirá para posteriormente formar el autofagosoma; 3. Formación del autofagosoma y 4. Formación de la vesícula de tipo autofágico (VA) (Tomado de Hernández García *et al.*, 2019).

Días-Lopes *et al.*, en 2018 realizaron un análisis comparativo a nivel proteómico usando un modelo *in vitro* para inducir la transformación de trofozoíto a pseudoquiste en *T. vaginalis* cultivada en medio TYM- DIP (Medio TYM que contiene 2,2- dipirilo quelante de hierro) como medio inductor. A nivel proteómico observaron que había cambios significativos en el contenido de proteínas entre trofozoítos y pseudoquistes. Para el caso de la autofagia se identificaron 27 proteínas. Dentro de estas proteínas se encuentra TvAtg8, TvAtg4.4 y TvAtg1 (Días-Lopes *et al.*, 2018). El conjunto de los resultados hasta ahora por los diferentes grupos de trabajo sugiere que la autofagia podría ser un mecanismo de supervivencia que se activa rápidamente en condiciones nutricionales desfavorables que pueden ser por restricción o por exceso de nutrientes.

En conjunto, los datos reportados hasta ahora por los diferentes grupos de trabajo sugieren que la autofagia en *T. vaginalis* es un mecanismo de adaptación y supervivencia que se activa rápidamente en respuesta a condiciones nutricionales desfavorables como RG y RH. Además, se ha reportado que la autofagia puede inducirse como un sistema compensatorio de degradación

proteica en *T. vaginalis* en condiciones ricas en glucosa (Hernández-García *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2019) o como una vía no convencional de movilización de proteínas hidrogenosomales como la PFO a la superficie de tricomonas en alto hierro para participar como adhesina (Meza-Cervantez *et al.*, 2011; Hernández-García *et al.*, 2019, Tesis de doctorado).

2. Justificación

La autofagia en *T. vaginalis* es considerada un mecanismo de adaptación al estrés en condiciones nutricionales desfavorables como restricción de glucosa, de hierro o de suero. El hierro es considerado un elemento esencial para el crecimiento, multiplicación y metabolismo de *T. vaginalis* por lo que el parásito modula diferencialmente la expresión de múltiples genes como un mecanismo de adaptación, que le permite la supervivencia en el hospedero y mantener la cronicidad de la infección.

En *T. vaginalis* se ha identificado un único sistema de conjugación de tipo ubiquitina el complejo Atg7-Atg3-Atg8, donde Atg4 (cisteína proteasa) es necesaria para el procesamiento de Atg8. Por su parte Atg4 requiere de un modulador de la actividad catalítica por medio de la Atg1 (cinasa). En el parásito se han identificado 2 parálogos para Atg8, 5 para Atg4 y 6 para Atg1.

Dada la importancia de la autofagia y el papel del hierro en la infección por *T. vaginalis* consideramos necesario estudiar mediante un análisis *in silico* las características de las cisteína proteasas (TvAtg4.1 y TvAtg4.4) y de las cinasas (TvAtg1.1 y TvAtg1.5) y analizar la expresión a nivel de transcrito de la cisteína proteasa TvAtg4.1.

3. Hipótesis

- a) Las cisteína proteinasas TvAtg4.1 y TvAtg4.4 y las cinasas TvAtg1.1 y TvAtg1.5 poseen los dominios funcionales necesarios para su posible participación en la autofagia.
- b) La cisteína proteasa TvAtg4.1 de *T. vaginalis* que participa en la autofagia se modulan diferencialmente por hierro a nivel de transcrito.

4. Objetivos

4.1 General

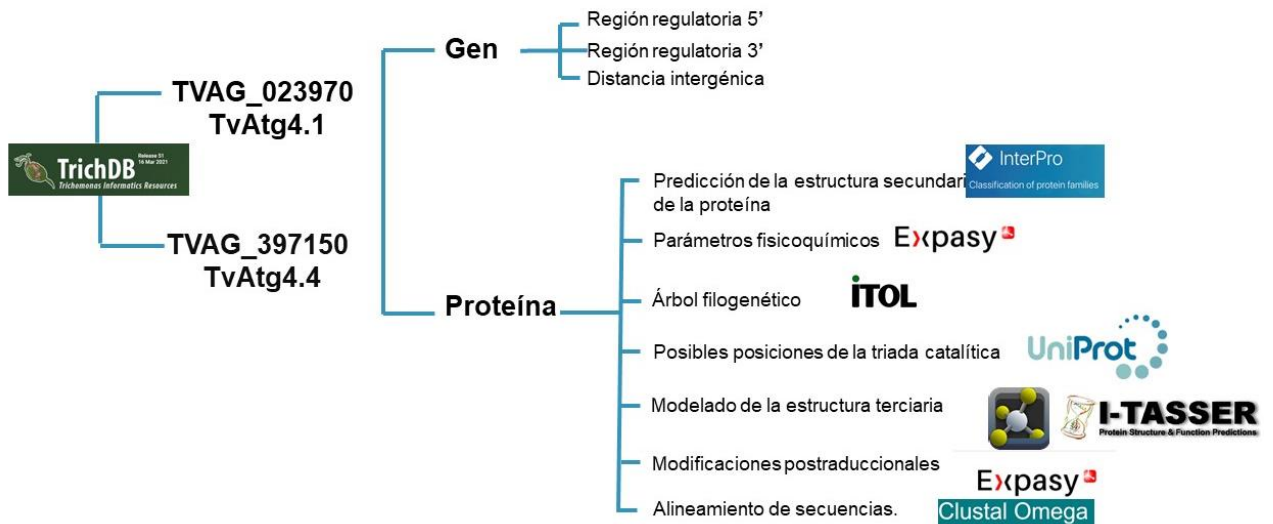
Buscar mediante análisis *in silico* los dominios funcionales de las cisteína proteinasas (TvAtg4.1 y TvAtg4.4) y las cinasas (TvAtg1.1 y TvAtg1.5) de *Trichomonas vaginalis* y analizar el efecto del hierro en la expresión de *tvatg4.1*.

4.2 Específicos

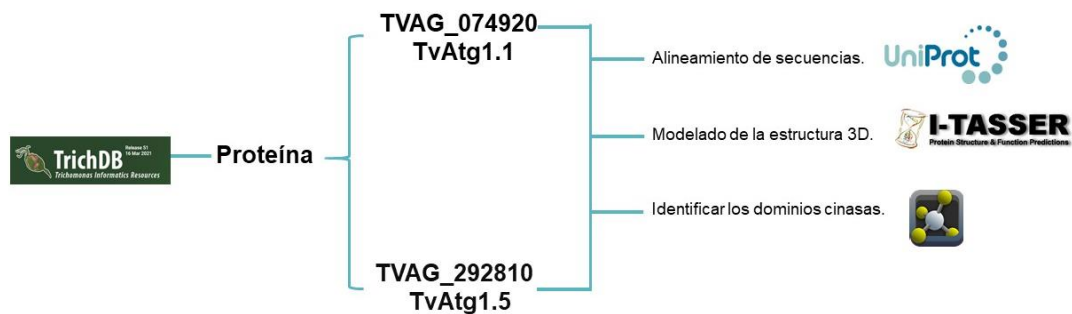
- 4.2.1 Analizar *in silico* a los genes *tvatg4.1* y *tvatg4.4* y a las cisteína proteasas que codifican (TvAtg4.1 y TvAtg4.4).
- 4.2.2 Analizar *in silico* a las cinasas TvAtg1.1 y TvAtg1.5
- 4.2.3 Analizar la expresión a nivel de transcrito del gen *tvatg4.1* de *T. vaginalis* cultivada en diferentes concentraciones de hierro.

5. Estrategia experimental

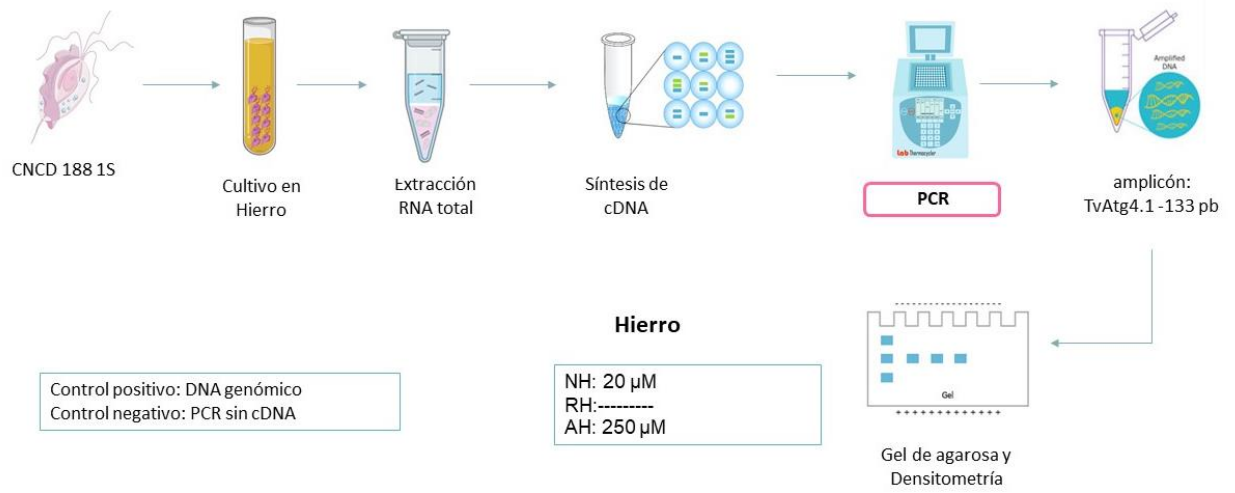
5.1 Analizar *in silico* a los genes *tvatg4.1* y *tvatg4.4* y a las cisteína proteasas que codifican (TvAtg4.1 y TvAtg4.4).



5.2 Analizar *in silico* a las cinasas TvAtg1.1 y TvAtg1.5



5.3 Analizar la expresión a nivel de transcrito del gen *tvatg4.1* de *T. vaginalis* cultivada en diferentes concentraciones de hierro.



6. Materiales y métodos

6.1 Análisis *in silico* de los genes *tvatg4.1* y *tvatg4.4* y de las cisteína proteasas TvAtg4.1 y TvAtg4.4 y cinasas TvAtg1.1 y TvAtg1.5.

A partir del ID de los genes *tvatg4.1* (TVAG_023970) y *tvatg4.4* (TVAG_397150) *tvatg1.1* (TVAG_074920) y *tvatg1.5* (TVAG_292810) se realizó una búsqueda inicial en la base de datos **TrichDB** (<https://trichdb.org/trichdb/app>). Posteriormente con ayuda de la base de datos Expasy, Uniprot, Interpro y Clustal omega se identificaron los posibles dominios reportados en la literatura. Con ayuda del servidor I-TASSER y la base de datos PyMol se realizó el análisis de los modelados de la estructura terciaria predicha para ambas proteínas TvAtg4. También se realizó un árbol filogenético de las cinco proteínas TvAtg4 con el servidor iTOL.

6.2 Condiciones de cultivo para *T. vaginalis* en diferentes concentraciones de hierro.

Parásitos del aislado CNCD 188 de *T. vaginalis* de 1 semana de descongelación se cultivaron a 37°C 24 h en condiciones normales de hierro [20 µM] en 30 ml de medio TYM (Tryptona- extracto de levadura- maltosa) suplementado con 10% de suero bovino de adulto (TYM-SBA) inactivado por calor con un inóculo inicial de 8×10^6 parásitos. Para los cultivos en condiciones de RH y AH el medio de cultivo requirió un tratamiento previo. Para la condición de RH al medio TYM-SBA se le añadió 150 µM de 2,2'-dipirilo y se dejó quelando toda la noche. Para la condición de AH, al medio TYM -SBA se le añadió 250 µM de sulfato ferroso amoniacal. Ambos cultivos se dejaron a 4°C toda la noche para que tuvieran el mismo tratamiento. Al día siguiente se le añadió un inóculo inicial de 35×10^6 y 4×10^6 parásitos para la condición de RH y AH respectivamente. Los parásitos se incubaron durante 24 h a 37°C.

6.3 Extracción de DNA genómico

A partir de 20×10^6 de parásitos del aislado CNCD 188 de 1 semana de descongelación crecido en condiciones normales de hierro [NH] se realizó la extracción del DNA. Los parásitos se lavaron 3 veces con PBS pH 7 y el botón de parásitos se resuspendió en 2 ml de PBS y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se centrifugó a 14000 rpm/ 1 min, se descartó el sobrenadante y el botón de parásitos se resuspendió con el líquido sobrante, se le agregó 300 μ l de amortiguador de extracción (0.2% SDS, 100 mM NaCl, 10mM EDTA y 10 mM Tris-HCl pH 8.0) y 300 μ l de fenol, se centrifugó a 14000 rpm/ 3 min. La fase superior (acuosa) se colocó en un tubo Eppendorf nuevo con 300 μ l de fenol y 300 μ l de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó igual que el paso anterior. La fase superior se colocó en otro tubo Eppendorf con 500 μ l de cloroformo, se mezcló y se centrifugó con las mismas condiciones. La fase superior se colocó en otro tubo Eppendorf limpio y se precipitó con etanol agregando 40 μ l de acetato de sodio 3M pH 4.5, se mezcló y se adicionó 1ml de etanol absoluto, se mezcló, se dejó precipitar 2h a -20°C , y se centrifugó a 14000 rpm/ 20 min/ 4°C . El sobrenadante se eliminó y el botón de ácidos nucleicos se lavó con 1 ml de etanol frío al 70%, se decantó el sobrenadante, se quitó el exceso de etanol y se dejó secar el botón durante 5 min hasta que quedó transparente. El botón de DNA/RNA se resuspendió con 50 μ l de TE y se le agregó 0.5 μ l de RNAsa y se incubó a 37°C / 30 min. El DNA obtenido se resguardó a -20°C hasta su uso.

6.4 Extracción del RNA total en diferentes condiciones de hierro.

De las diferentes condiciones de cultivo [RH, AH y NH] se utilizaron 20×10^6 de parásitos de cada condición, se colocaron en tubos Eppendorf nuevos y estériles de 1.5 ml, se centrifugaron a 18,000 rpm/5 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y al botón de parásitos, se le agregó 1 ml de Trizol y 200 µl de cloroformo, se mezcló, se incubó 2 min a 27°C (TA), se mezcló por inversión 15x, se incubó 15 min a TA, se centrifugó a 8000 rpm/ 20 min a 4°C, se recuperó la fase acuosa (sin tocar la fase intermedia), se transfirió a otro vial, se le agregó 500 µl de isopropanol grado biología molecular y se mezcló 10x por inversión, se centrifugó a 8000 rpm/ 15 min/ a 4°C y se decantó el sobrenadante. La pastilla se lavó con etanol al 70% en agua DEPC, se centrifugó a 8000 rpm/ 10 min a 4°C se decantó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar durante 5 min y se resuspendió en 50 µl de agua DEPC. En un gel de agarosa se corrió 3 µl del RNA extraído con 1 µl del amortiguador de muestra (BM 6x) y se evaluó la integridad de las subunidades del RNA ribosomal 28S y 18S. El RNA obtenido se cuantificó en el Nanodrop.

6.5 Tratamiento con DNAsa I

Del RNA previamente cuantificado en el paso anterior se tomó una alícuota de 10 µg de cada condición y se trataron con DNAsa I. A la alícuota de RNA se le agregó 4 µl de amortiguador 10x, 1 µl de DNAsa I (2000 U/mL) (NEW ENGLAND BioLabs) y la cantidad necesaria de H₂O estéril para tener un volumen final de 40 µl. La mezcla se incubó a 37°C por 12 min y después se añadió: 1 µl de EDTA 0.5 M y 59 µl de H₂O inyectable estéril. La mezcla se incubó 12 min a 75°C y se añadió 10 µl de acetato de sodio 3M pH 4.5 con agua DEPC y 250 µl de etanol absoluto frío y se dejó precipitar a -70°C toda la noche.

6.6 Retrotranscripción

Los 10 µg de RNA tratados con la DNAsa I y precipitados se centrifugaron a 14 000 rpm/ 10 min a 4°C y el sobrenadante se descartó, la pastilla se resuspendió con 14 µl de H₂O inyectable estéril y se tomó una alícuota de 3 µl que se guardó para posteriormente usarla como control de RT-PCR. Los 11 µl restantes se trataron con el kit de síntesis de cDNA “SCRIPT cDNA synthesis Kit” y se siguieron las instrucciones del fabricante. Se adicionó 1 µl del oligo DT, 4 µl de reactivo SCRIPT 5x, 1 µl de dNTPs (10 mM), 1 µl de DTT 100mM, 1 µl del inhibidor de RNAsa, 0.5 µl de transcriptasa reversa SCRIPT y 1 µl de H₂O estéril inyectable, se incubó a 10 min a 42°C 1 h a 50°C y 10 min a 75 °C para inactivar a la enzima. El cDNA sintetizado se colocó en hielo y se cuantificó con el Nanodrop para determinar la concentración y pureza del cDNA a 260/280.

6.7 Amplificación por PCR del gen *tvatg4.1*

Para la reacción de amplificación por PCR en un tubo Eppendorf nuevo se agregó 500 ng del cDNA sintetizado en diferentes condiciones de hierro [RH, AH y NH], 5 µl de amortiguador 10x, 2 µl de MgCl₂ (50mM), 1 µl de dNTP´s 0.2 mM, 1 µl de cada uno de los oligos (directo y reverso) para el gen *tvatg4.1*. El oligo directo fue 5´ - CCT CAG TTA CGG CCA TCC AG -3´ y el oligo reverso 5´ GCC TCC GAC AAC ACC AAC T – 3´. La reacción se llevó a un volumen final de 50 µl. Como control positivo se preparó una reacción con 500 ng de DNA genómico y para los controles negativos se prepararon reacciones de 50 µl una con RNA tratado con DNAsa I y otra reacción sin DNA. Las condiciones de la PCR para amplificar el gen *tvatg4.1* fueron las siguientes: 94°C durante 2 min, la desnaturalización 94°C por 1 min, alineamiento 55°C durante 1 min, 72°C por 1 min y 72°C durante 7 min que se repitió por 30 ciclos. El producto final de la reacción de PCR se almacenó a -20°C hasta su análisis. Como control de carga se usó α-tub (Santos *et al.*, 2015). Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio (0.5 ug/ul) en amortiguador TBE 1x a 60 V durante 60 min

7 Resultados

7.1 Genes *tvatg4* en *T. vaginalis*

Hasta el momento se han reportado en *T. vaginalis* cinco genes que codifican para cinco proteínas parálogos de Atg4 (Tabla 3). Por lo anterior realizamos una búsqueda de las características de los genes Atg4 en este protozooario. Encontramos que el tamaño aproximado de los genes *tvatg4* va de 855 a 1227 pb y todos se encuentran en diferente contig (Tabla 3).

Tabla 3. Características de los diferentes genes *tvatg4* de *T. vaginalis*

ID GEN	Nombre	CONTIG	Sentido	TAMAÑO (pb)
TVAG_023970	<i>tvatg4.1</i>	DS114357	Negativo	894
TVAG_122030	<i>tvatg4.2</i>	DS113332	Positivo	855
TVAG_258880	<i>tvatg4.3</i>	DS114140	Negativo	1227
TVAG_397150	<i>tvatg4.4</i>	DS113262	Positivo	891
TVAG_456380	<i>tvatg4.5</i>	DS113186	Negativo	855

Las características de cada uno de los genes se encontraron en la base de datos **TrichDB** (<https://trichdb.org/trichdb/app>) usando el ID de cada gen.

7.2 Localización de los genes *tvatg4.1* y *tvatg4.4* en el genoma de *T. vaginalis*

Durante este estudio consideramos necesario conocer la localización en el genoma de los genes de nuestro interés. Para ello realizamos una búsqueda utilizando la base de datos del genoma de *T. vaginalis*, **TrichDB**. El gen *tvatg4.1* (TVAG_023927) tiene un tamaño de 894 pb y se localizó en el contig **DS114357**, hacia el extremo 5´ se encuentra a 630 pb el gen *MAD I*, mientras que hacia el extremo 3´ del gen a 898 pb se encontró un gen que codifica para una proteína hipotética (Figura 21a).

Para el gen *tvatg4.1* se encontró que este tiene un sentido negativo es decir la secuencia genómica se encuentra en la cadena complementaria.

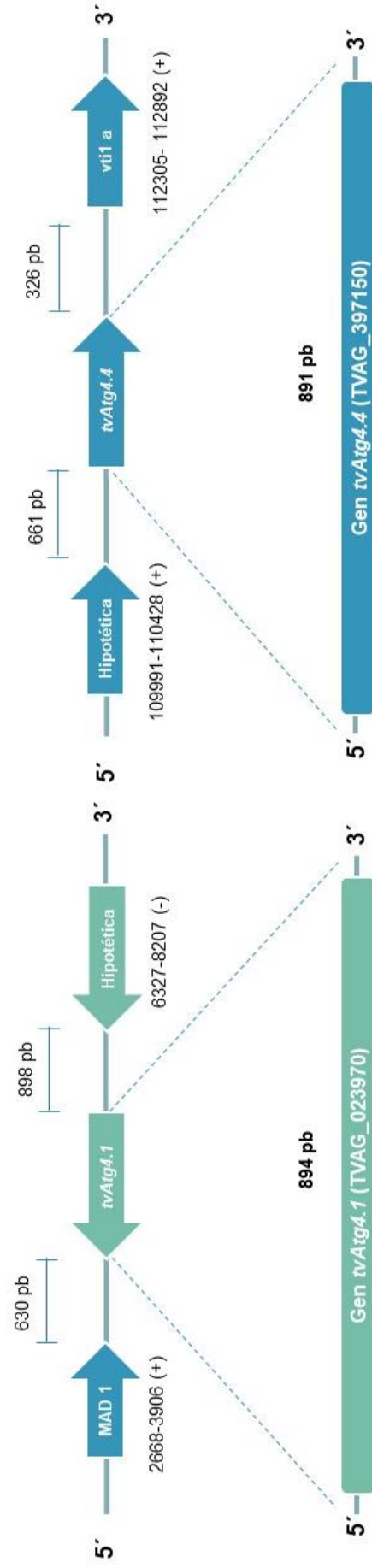
El gen *tvatg4.4* tiene un tamaño de 891 pb y se localizó en el contig **DS113260**. Hacia el extremo 5´ del gen a 661 pb de bases se encontró un gen que codifica para una proteína hipotética, mientras que hacia el extremo 3´ a 326 pb se encontró el gen *vti1a* (Figura 21b). Con este análisis podemos observar que ambos genes muestran una secuencia codificadora única y un contexto genómico distinto.

a) *tvatg4.1*

Contig DS114357

b) *tvatg4.4*

Contig DS113260



4536-5429 (-)

111089-111979 (+)

Figura 21. Mapa de la localización genómica para los genes *tvatg4.1* y *tvatg4.4*. a) Localización genómica del gen *tvatg4.1*. Flechas en color verde indican a aquellos genes que se encuentran en la hebra complementaria y en color azul aquellos genes que se encuentran en la hebra codificante. b) Localización genómica del gen *tvatg4.4*. En color azul los genes que se encuentran en la hebra codificante.

7.3 Regiones regulatorias en el extremo 5' de los genes *tvatg4.1* y *tvatg4.4*.

Ya que la regulación transcripcional determina si un gen es expresado o silenciado, realizamos un análisis del extremo 5' para cada gen (*tvatg4.1* y *tvatg4.4*). Tomamos 100 pb río arriba del codón de inicio de la traducción y buscamos si estos presentaban el elemento Inr. El Inr es una región regulatoria tipo iniciador que funciona como un promotor basal y que se localiza de 6 a 20 nucleótidos (nt) río arriba del codón de inicio de la traducción (ATG), cuya secuencia consenso T C A + 1 Py (T/A) es considerada un homólogo estructural y funcional del Inr de metazoos (Liston y Johnson, 1999).

Para el gen *tvatg4.1* encontramos tres posibles secuencias que cumplían con las características de la secuencia consenso. Sin embargo, la secuencia **TCAAA** se encontraba más cerca al codón de inicio de la traducción con una distancia de 32 nt río arriba (Figura 22a).

Para el gen *tvatg4.4* se encontraron dos secuencias que cumplen con las características de la secuencia consenso, pero la secuencia **TCACT** se encontraba más cercana al codón de inicio de la traducción a 17 nt río arriba (Figura 22b)

Por lo tanto, las secuencias **TCAAA** y **TCACT** identificadas en este análisis *in silico* podrían ser propuestas como los elementos Inr para cada gen, respectivamente.

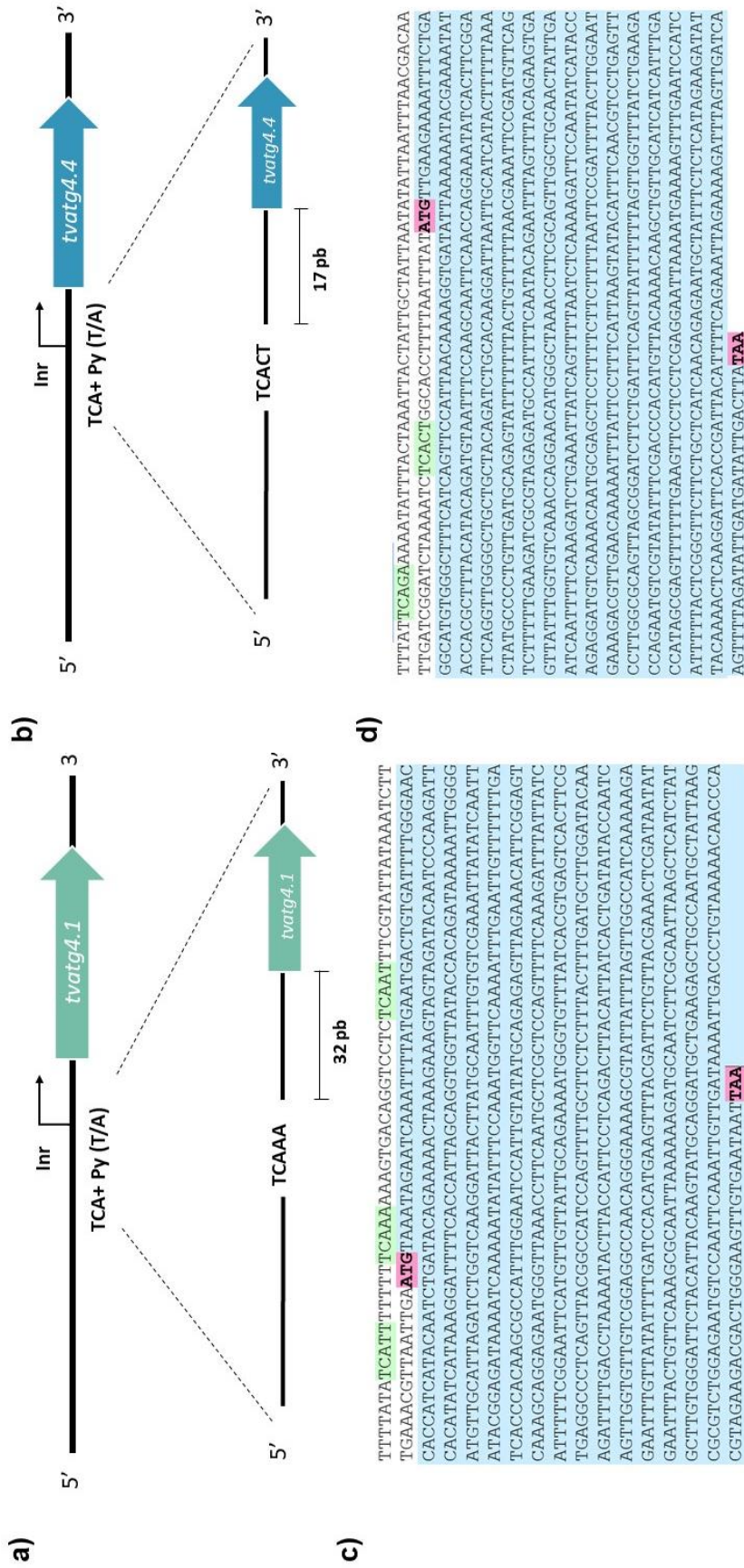


Figura 22. Regiones regulatorias en el extremo 5' para los genes tvatg4.1 y tvatg4.4. a) Esquema donde se identifica el elemento Inr para el gen *tvatg4.1*. b) Esquema para el gen *tvatg4.4*. c) Secuencia codificante para el gen completo *tvatg4.4*. Para ambos genes en color azul se encuentra la región codificante; en color rosa se muestra el codón de inicio de la traducción y el codón de término, en color verde se marcan las posibles secuencias Inr identificadas.

7.4 Posibles sitios de poliadenilación en el extremo 3' para los transcritos *tvatg4.1* y *tvatg4.4* de *T. vaginalis*.

Debido a que el procesamiento del mRNA es necesario para la expresión génica revisamos si los genes *tvatg4.1* y *tvatg4.4* analizados con anterioridad al ser transcritos contaban con posibles señales de poliadenilación. Para el transcrito *tvatg4.1* se identificó en el extremo 3' contiguo al codón de paro una "A" formando el motivo **UAAA**. Este motivo podría ser identificado como la posible señal de poliadenilación para este transcrito, la cual se encuentra acoplada al codón de paro. Además, 17 nt río abajo se encontró la secuencia **UAAUU** que podría ser el posible sitio de escisión o corte y 8 nt río abajo del sitio de corte se localizó la secuencia rica en **U** con un tamaño de 4 nt (Figura 23b).

Para el transcrito *tvatg4.4* la posible señal de poliadenilación con la secuencia **UAAA** se encontró 32 nt río abajo del codón de paro, 11 nt río abajo encontramos la secuencia **UAUU** como posible sitio de corte o escisión y 12 nt río abajo se encontró la región rica en U con 4 nt (Figura 23c).

Por lo tanto, las secuencias identificadas para cada uno de los transcritos cumplían con lo reportado por Espinosa *et al.*, en 2002 (Figura 23a) por lo tanto podrían considerarse como posibles señales de poliadenilación funcionales.

En este análisis bioinformático realizado a nivel genómico y de transcrito identificamos en ambos genes (*tvatg4.1* y *tvatg4.4*) elementos y motivos necesarios para ser expresados. Por lo tanto, realizamos también un análisis a nivel de proteína.

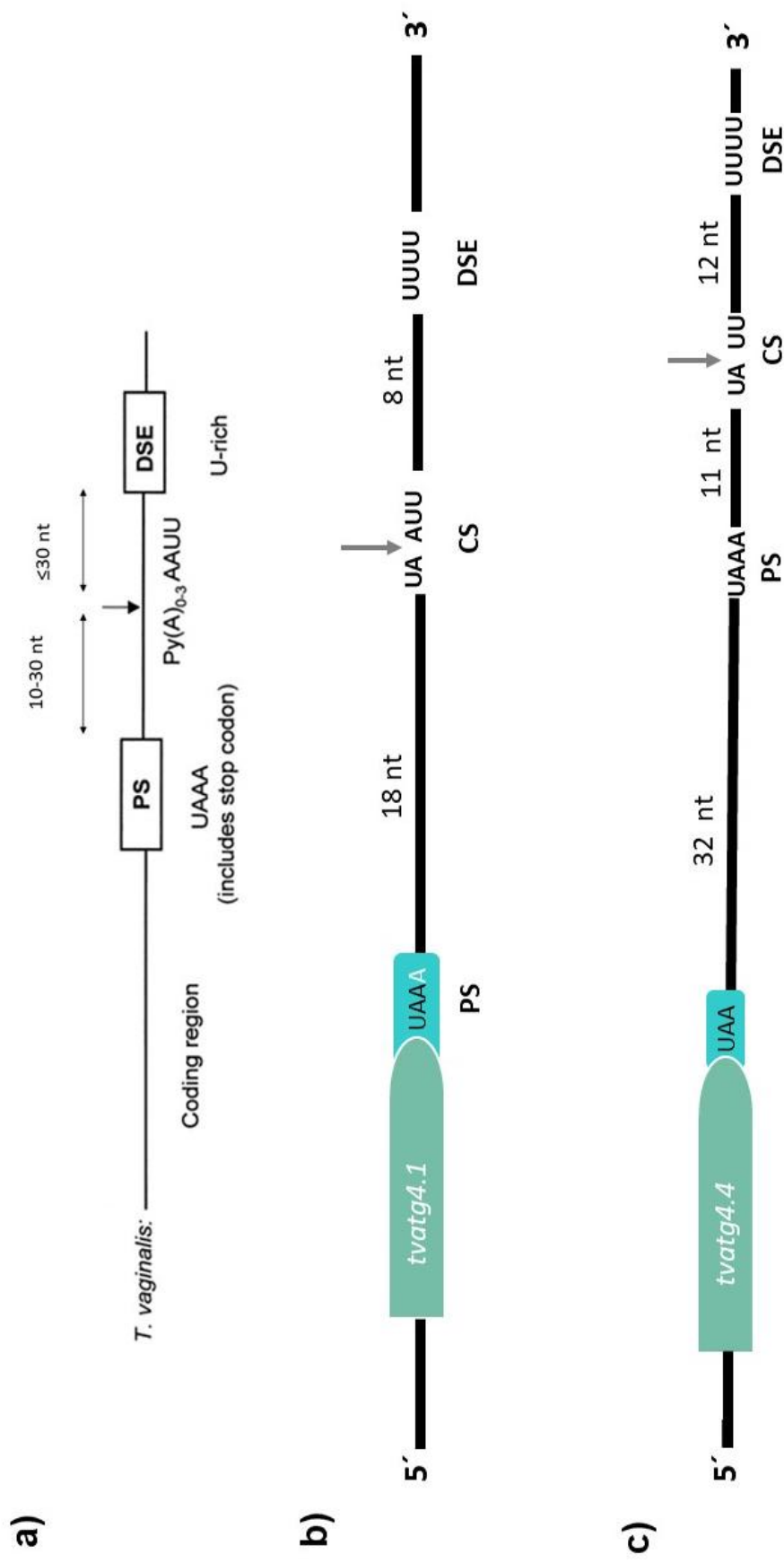


Figura 23. Identificación de las señales de poliadenilación en los transcritos *tvatg4.1* y *tvatg4.4*. a) Esquema propuesto por Espinosa et al., 2002 para los posibles sitios de poliadenilación en *T. vaginalis*; PS (Posible señal de poliadenilación), CS (Sitio de escisión) y DSE (región rica en uridinas). **b)** Esquema para el transcrito *tvatg4.1* **c)** Esquema para el transcrito *tvatg4.4*. Los recuadros en color verde son para demostrar el tamaño del gen completo; recuadros en color azul se encuentra el codón de paro; las flechas indican el posible sitio de escisión.

7.5 Proteínas TvAtg4 de *T. vaginalis*

Primero determinamos si la triada catalítica se encontraba conservada para las diferentes proteínas TvAtg4 con respecto a Atg4 de humano (HsAtg4b) y de levadura (ScAtg4) mediante un alineamiento de secuencias de aa con ayuda del servidor Uniprot. Este alineamiento múltiple se realizó con las CPs antes mencionadas (HsAtg4b y ScAt4), ya que la posición de la triada catalítica ha sido reportada previamente (Kirisako *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2017).

El alineamiento múltiple muestra que los residuos cisteína, ácido aspártico e histidina que conforman la triada catalítica para las CPs tipo Atg4 se encuentran altamente conservados entre las diferentes proteínas TvAtg4 y mantienen el orden de secuencia reportado para esta triada (Figura 24). Sin embargo, el porcentaje de identidad entre las Atg4 analizadas fue del 16.6% ya que del total de aa solo presentaron 51 posiciones idénticas y 87 posiciones similares en relación con los otros organismos (Tabla 4).

Tabla 4. Alineamiento múltiple de secuencias de aa para las diferentes proteínas TvAtg4 de *T. vaginalis*

Organismo	% de Identidad	Posiciones idénticas	Posiciones similares
<i>T. vaginalis</i>	16.6%	51	87

Se muestra el porcentaje de similitud entre las diferentes proteínas TvAtg4 de *T. vaginalis*, obtenido del alineamiento múltiple de secuencias realizado con el servidor Uniprot (Figura 24).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este alineamiento múltiple de secuencias ahora buscamos las posibles posiciones que ocuparía la triada catalítica para las dos proteínas TvAtg4 de nuestro interés (Figura 24).

ATG4B_HUMAN	-----GTGPTSDTGWGCMRLRCQMIFAQALVCRHLGRDWRWTQRK	102
ATG4_YEAST	SLNLLVVRTNPITIEDYIANPDCFNTDIGWGMIRTGQSLLGNALQILHLGRDFRVNGNE	175
TvAtg4.1	-----GG-YTTDKNWGCCIRSGQGLLMQFVSK--LYQLYGDKIKN	74
TvAtg4.3	-----GG-FTTDKNWGCCIRSAQGLIMQFITK--LYKHLGDDIRN	74
TvAtg4.4	-----PGNITSDSGWGCCYRSAQGLIASYFLN--YAPVDAEYFFT	78
TvAtg4.2	-----NSTLSCDSGWGCCFRSSQGLVCQYILR--LHKNFPDLYNS	71
TvAtg4.5	-----NSLLTDTKGWGCCRSTQGLLCQYILK--LHRKFRSLYDQ	71
	. * .*** * * : . . .	
ATG4B_HUMAN	PLVLLIPLRLGLTDINEAYVETLKHCFMM-PQSLGVIIGKPNSAHYFIGYVGE-ELIYLD	278
ATG4_YEAST	RILFLLGVKLGINAVNESYRESICGILSS-TQSVGIAGGRPSSSLYFFGYQGN-EFLHF'D	322
TvAtg4.1	PVLLLF'TLMLGYKDFDLKYL'PFLRLTLSLIYQSVGVVGGQ'QKAYYL'VGHQKE-NLLYFD	213
TvAtg4.3	PVLLLF'TLMLGYENFELKYL'PFLKLTLSLIYQSVGVVGGQ'QKAYF'IVGHQKE-KLLYFD	213
TvAtg4.4	P'FLLLIPI'LLGMKDVEQKF'IPFIKYTFQR-PEFLGAVSGSSDFSY'FLVGLSE'QNVVYFD	214
TvAtg4.2	PVLLIIPGLF'GLEKIEKPYISFIFLSLCM-NSSLGFVSGHNDSAFY'FIGFDS'D-YFYYFD	207
TvAtg4.5	PALILIPSLFGLSKMDDSYLS'FLLLCICI-ESSLGFVSGQNASAY'FVGF'DLE-DFYYFD	207
	::*: :* .: : : : .:* .* : ::* : . :*:	
ATG4B_HUMAN	PH'TTQPAVEPTDGC'FIPDES'FHCQHP'PCRMSIAELDPSIAV'GFFCKTED'DFNWCQ'QVKK	338
ATG4_YEAST	PH'IPQPAVEDSF-----VESCHTSK'FGKQLQ'LEMDP'SMLIGILIK'GEKDWQ'QWKL'VEAE	376
TvAtg4.1	PHEVYDSVTKLDN-----MNL'LFKAQL'KKMQSSQL'SSMLV'GFYITSMQDAEEL'PMLLSA	268
TvAtg4.3	PHDVNESITKIDQ-----INQLFKP'PLKVPADT'LSSSMLV'GFFITNLQDAEEL'PMLLNQ	268
TvAtg4.4	PHVTKQAVASSFD-----HSEFF'EVPPRGI'KMKSLNPS'FL'LGFFCSSTENAI'SLIEDITK	269
TvAtg4.2	PHVTKQALTGPP-----YDSL'FELK'LKSMKIE'INP'SVLLG'FYCDDSIQEL--IMQLMG	259
TvAtg4.5	PHVTKEAVVSP-----YDSFF'DLEL'KSMKES'INP'SVLLG'FYCDGSIDDL--IMQLTG	259
	** : : . : : : : : . : * . * : : * : : : *	

Figura 24. Localización de la triada catalítica para TvAtg1.1 y TvAtg4.4. a) Se muestra el alineamiento múltiple de secuencias de aa para las diferentes proteínas TvAtg4; en color rosa se observa la posición de la cisteína (C), en color azul el ácido aspártico (D) y en amarillo la histidina (H), conformando la triada catalítica para esta proteasa.

Propusimos un esquema para cada una de las cinco proteínas TvAtg4 señalando la posición de la triada catalítica, así como sus parámetros físico- químicos. En los esquemas observamos que el tamaño de las proteínas va de 284 a 298 aa, con un punto isoeléctrico para cada uno que va de 4.3 a 6.7. El peso molecular varía en las TvAtg4, entre 31.9 kDa y 33.8 kDa. Específicamente encontramos que TvAtg4.1 tiene un tamaño de 297 aa con un peso molecular 33.5 kDa y un punto isoeléctrico de 6.7 mientras que el tamaño reportado para TvAtg4.4 es de 296 aa con un peso molecular de 33.4 kDa y un punto isoeléctrico de 4.7 (Figura 25b). Ambas proteínas presentan un porcentaje de similitud del 27.6%.

Por otro lado, el orden de secuencia propuesto para la tríada catalítica de TvAtg4.1 son las posiciones 48, 213 y 215 para la cisteína, ácido aspártico e histidina, respectivamente; mientras que para la proteína TvAtg4.4 las posiciones propuestas son 52, 214 y 215 para cada residuo de la tríada catalítica. Otra característica que encontramos en el alineamiento múltiple y que se puede apreciar en el esquema es que cada uno de los residuos que conforman la triada catalítica se encuentran dentro del dominio C54 o autofagina y es característico de las CPs Atg4 (Figura 25a).

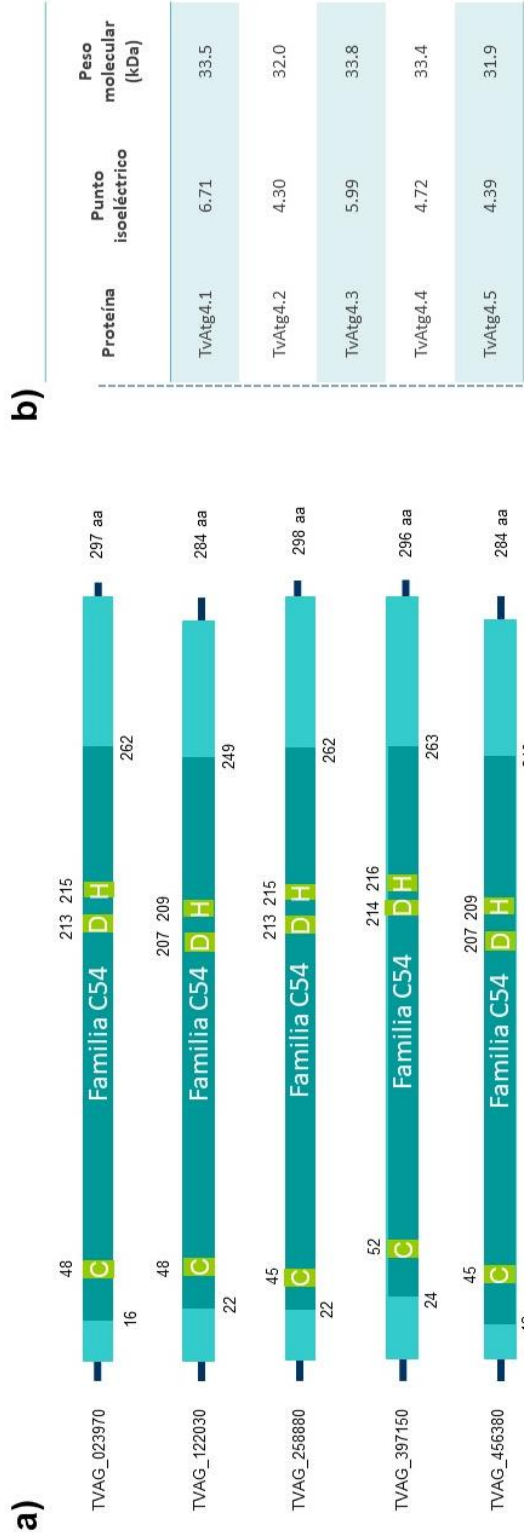


Figura 25. Esquemas para las diferentes proteínas TvAtg4 en *T. vaginalis*. a) Esquema propuesto para cada una de las proteínas TvAtg4. Recuadros en color verde claro: proteína completa; color verde oscuro para el dominio C54 o familia autofagina. b) Tabla con las características fisicoquímicas para cada proteína.

En el alineamiento múltiple de secuencias de aa entre las dos TvAtg4 de nuestro interés y Atg4 de diferentes organismos que realizamos, observamos que para las dos TvAtg4, el mayor porcentaje de similitud se mantiene con el protista *Trypanosoma brucei brucei* con un 22.3 % y 22.24%, respectivamente y el menor porcentaje de similitud lo mantiene con *Plasmodium falciparum* con un 5.4 % y 5.6% para TvAtg4.1 y TvAtg4.4, respectivamente (Tabla 5). Con los resultados obtenidos también elaboramos un árbol filogenético donde se observa que las diferentes TvAtg4 emergen de un clado en común. Sin embargo, dentro de ese clado TvAtg4.1 emerge junto a TvAtg4.3 en otro clado, mientras que la proteína TvAtg4.4 emerge por sí sola de un clado (Figura 26).

Tabla 5. Alineamiento múltiple de secuencias para diferentes Atg4 de otros organismos y TvAtg4.1 – TvAtg4.4 de *T. vaginalis*.

Organismo		% de identidad TvAtg4.1	% de identidad TvAtg4.4
<i>Drosophila melanogaster</i>	Atg4a	18.9	16.3
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Atg 4.1	18.2	15.1
	Atg 4.2	12.8	12.6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Apg4/Aut2	14.3	13.2
<i>Candida Albicans</i>	Atg4	17.4	15.5
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Atg4	5.9	5
<i>Leishmania major</i>	Atg4.2	19.3	15.6
<i>Entamoeba histolytica</i>		14.9	16.6
<i>Eucalyptus grandis</i>		17.3	17.4
<i>Plasmodium falciparum</i>	Atg4	5.5	5.6
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>		22.3	22.2
<i>Homo sapiens</i>	Atg4 A	19.2	18.2
	Atg4 B	20.5	20

Alineamiento múltiple de secuencias entre TvAtg4.1 y TvAtg4.4 con Atg4 de otros organismos. Los números de acceso para cada una de las especies se indican a continuación: *D. melanogaster* Atg4a (M9PBM3); *C. elegans* Atg 4.1 (K8ESC5), Atg 4.2 (Q9U1N6); *S. cerevisiae* Apg4 (P53867); *C. albicans* Atg4 (Q59UG3); *C. neoformans* Atg4 (P0CQ10); *L. major* Atg4.2 (Q4Q7T2); *E. histolytica* Atg4 (C4M7A8); *E. grandis* Atg4 (A0A059A7J2); *P. falciparum* Atg4 (Q8ILS3); *T. brucei brucei* Atg4 (Q585P2) y *H. sapiens* Atg4A (Q8WYN0) y Atg4B (Q9Y4P1).

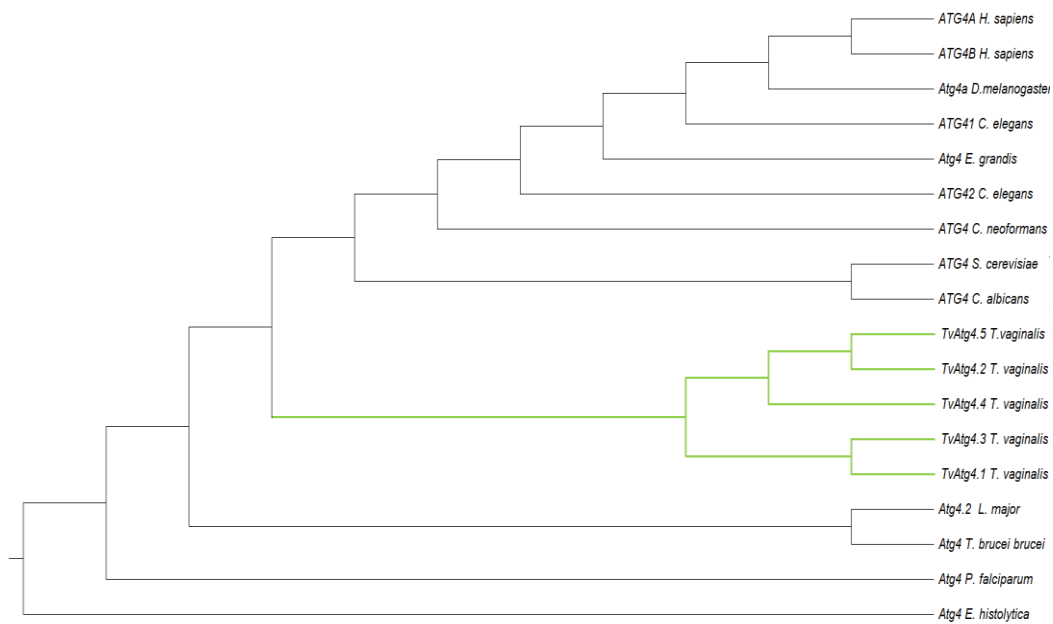


Figura 26. Árbol filogenético para las diferentes TvAtg4 de *T. vaginalis*. Árbol filogenético realizado para las cinco Atg4 de tricomonas incluyendo TvAtg4.1 y TvAtg4.4 con otras Atg4 de otros organismos. Líneas que emergen de color verde claro son para las TvAtg4 de *T. vaginalis*. Los números de acceso para cada una de las especies se indican a continuación: *D. melanogaster* Atg4a (M9PBM3): *C. elegans* Atg 4.1 (K8ESC5), Atg 4.2 (Q9U1N6): *S. cerevisiae* Apg4 (P53867): *C. albicans* Atg4 (Q59UG3): *C. neoformans* Atg4 (P0CQ10): *L. major* Atg4.2 (Q4Q7T2): *E. histolytica* Atg4 (C4M7A8): *E. grandis* Atg4 (A0A059A7J2): *P. falciparum* Atg4 (Q8ILS3): *T. brucei brucei* Atg4 (Q585P2) y *H. sapiens* Atg4A (Q8WYN0) y Atg4B (Q9Y4P1).

A nivel de secuencia de aa encontramos tanto para TvAtg4.1 como para TvAtg4.4 que ambas proteínas cumplen hasta ahora de acuerdo con el análisis *in silico* con la triada catalítica reportada la cual se encuentra dentro del dominio autofagina. Por lo que continuamos con el análisis a nivel de estructura terciaria (3D) de las proteínas de nuestro interés.

7.6 Predicción de las estructuras terciarias para TvAtg4.1 y TvAtg4.4.

Como parte del análisis *in silico* también hicimos una predicción de las estructuras terciarias para las dos proteínas TvAtg4.1 y TvAtg4.4. Con ayuda de la plataforma I-TASSER enviamos la secuencia de aa para el modelado de la estructura terciaria y con ayuda del servidor PyMOL realizamos el análisis de los modelos moleculares de ambas proteínas y una superposición de cada estructura terciaria con HsAtg4b (código PDB 2D1I). En la elección de la

estructura terciaria tomamos en cuenta el C-score que es una puntuación de confianza que estima la calidad de los modelos predichos por I-TASSER para cada proteína. Este valor se encuentra normalmente entre **-5** y **2** donde una puntuación más alta para el valor de C significa un modelo con alto grado de confianza. El C-score de TvAtg4.1 fue de 1.51 (Figura 27b) y para TvAtg4.4 el C-score fue de 1.23 (Figura 27c). De acuerdo con estos valores ambas estructuras tienen un nivel alto de confianza. Para validar la calidad de las estructuras 3D utilizamos el programa MOLPROBITY usando los gráficos de Ramachandran para todos los casos. Los gráficos de Ramachandran describen la distribución bidimensional de los ángulos de torsión de la proteína permitidos (Φ , ψ) y se usan para la validación de las conformaciones de la cadena principal de las mismas (Sobolev *et al.*, 2020). En caso de la estructura cristalina de HsAtg4b (código PDB 2D11) el 93.4% de todos los residuos de aa se encuentran en las regiones favorecidas en el gráfico de Ramachandran que abarcan los contornos azul claro cómo se observa en la Figura 28a. Para TvAtg4.1 el 85.1% de todos los residuos de aa se encuentran en las regiones favorecidas mientras que para TvAtg4.4 solo el 76.5% (Figura 28b y c).

7.7 Identificación de la triada catalítica y el dominio proteasa

En la literatura se mencionó que HsAtg4b tiene dos dominios, el dominio proteasa y el dominio auxiliar (Kumanomidou *et al.*, 2006). Por ello buscamos e identificamos estos dominios en ambas TvAtg4. En el acercamiento de la estructura terciaria propuesta identificamos la posición de la triada catalítica para TvAtg4.1 y TvAtg4.4. En la Figura 29, se observa que la triada catalítica para ambas proteínas mantiene posiciones estructuralmente similares con HsAtg4b. Además, ambas estructuras presentaron el dominio auxiliar y el dominio proteasa. Por otro lado, la triada catalítica se mantiene en el dominio proteasa cumpliendo así con lo observado para HsAtg4b (Figura 29a y b).

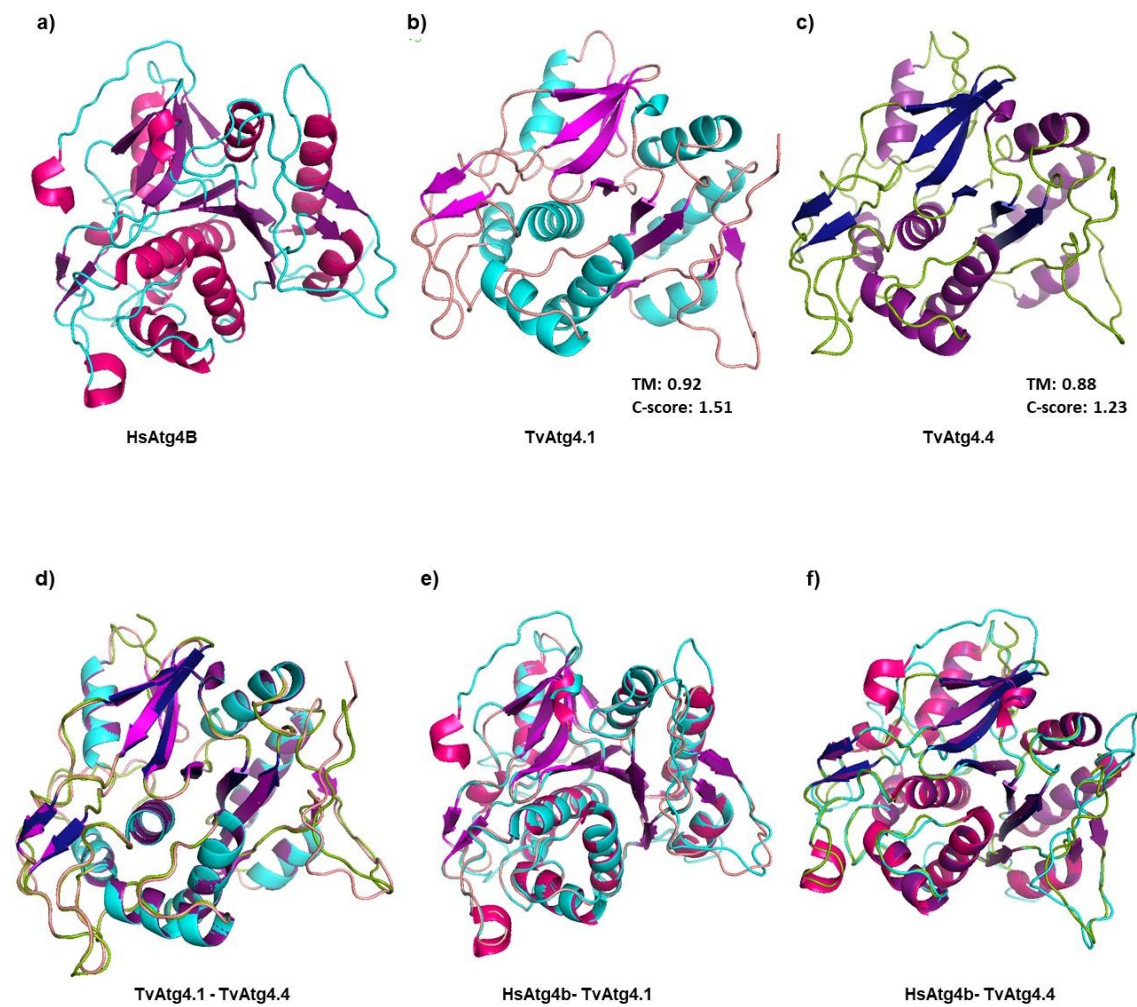
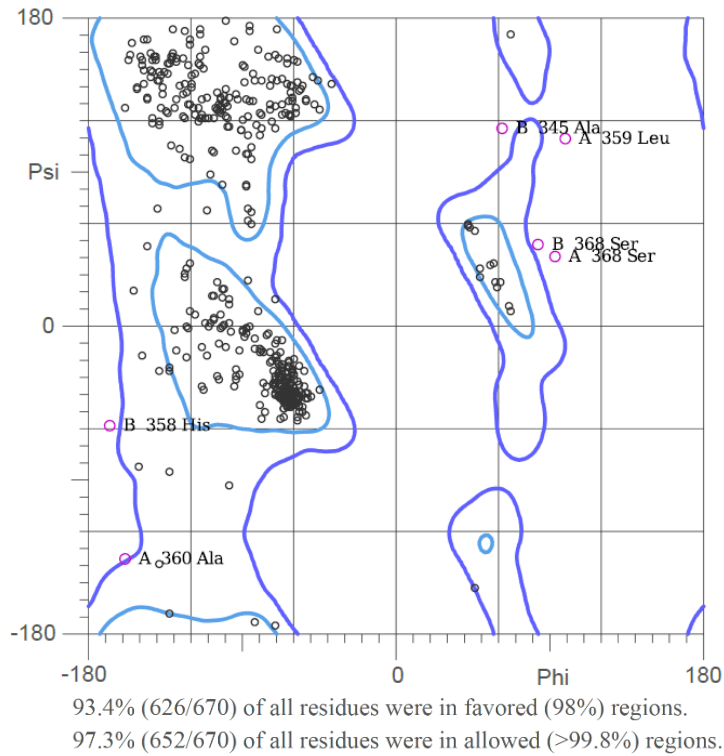


Figura 27. Modelado molecular para las proteínas TvAtg4.1 y TvAtg4.4. **a)** Estructura terciaria HsAtg4B, código de colores: en color rosa las α -hélices, en color morado las hojas β -plegadas y en color azul las asas. **b)** Estructura terciaria para **TvAtg4.1**, código de colores: en color azul las hojas α -hélices, en color morado las β -plegadas y las asas en color rosa. **c)** Estructura terciaria para **TvAtg4.4**, código de colores; color morado las α -hélices, en color azul fuerte las hojas β -plegadas; y en color verde las asas. **d)** Comparación de las estructuras terciarias **TvAtg4.1** y **TvAtg4.4**. **e)** Comparación de las estructuras terciarias HsAtg4B y **TvAtg4.1**. **f)** Comparación de las estructuras terciarias HsAtg4B y **TvAtg4.4**.

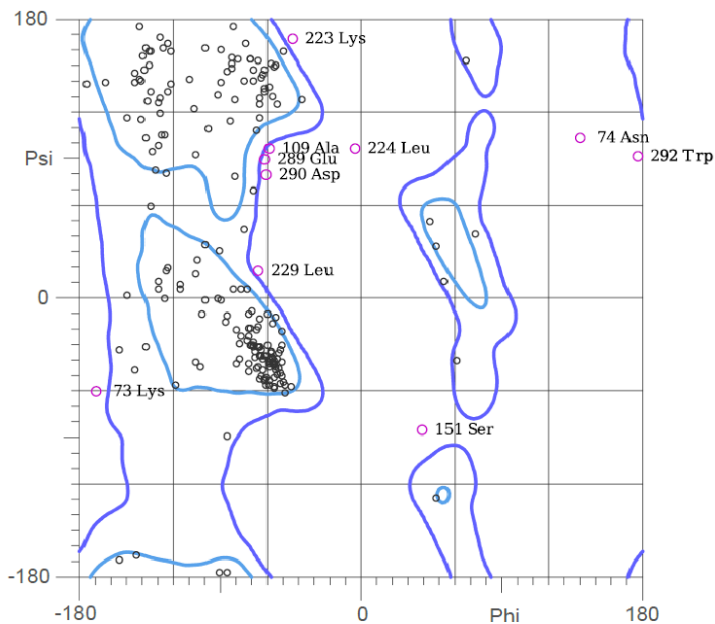
a)

HsAtg4b



b)

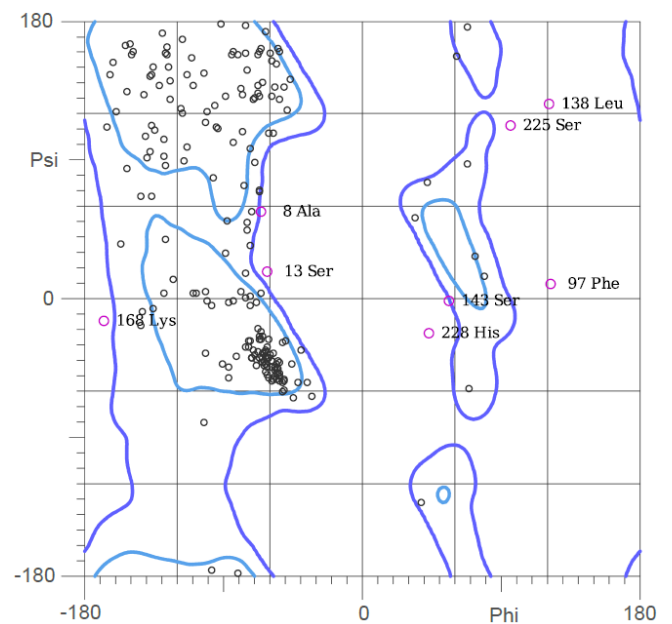
TvAtg4.1



85.1% (251/295) of all residues were in favored (98%) regions.
95.3% (281/295) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

c)

TvAtg4.4



76.5% (225/294) of all residues were in favored (98%) regions.
94.2% (277/294) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

Figura 28. Gráficos de Ramachandran para las diferentes Atg4. a) Gráfico de Ramachandran para la estructura 3D de HsAtg4b. b) Gráfico de Ramachandran para la estructura 3D de TvAtg4.1. c) Gráfico de Ramachandran para la estructura 3D de TvAtg4.4. En color azul claro se encuentran todos los residuos de aa en las regiones favorecidas para todos los casos.

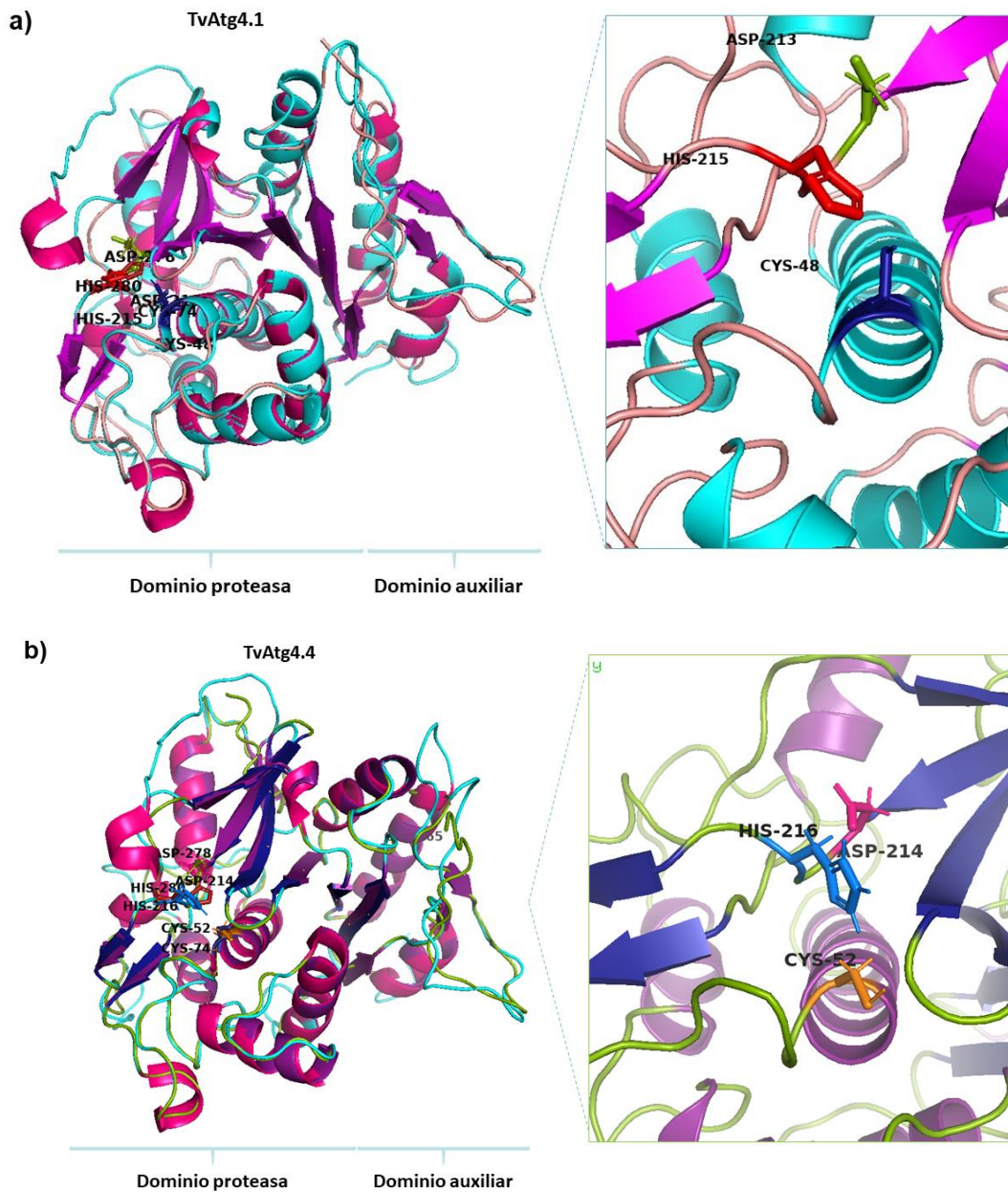


Figura 29. Dominio auxiliar y dominio proteasa para TvAtg4.1 y TvAtg4.4. a) Superposición para **TvAtg4.1** y HsAtg4b se identifica el dominio auxiliar y el dominio proteasa, acercamiento para la triada catalítica. **b)** Superposición para **TvAtg4.4** y HsAtg4b, se identifica el dominio proteasa y dominio auxiliar para **TvAtg4.4**, acercamiento de la triada catalítica.

Con estos resultados se confirmó a nivel estructural que las proteínas **TvAtg4.1** y **TvAtg4.4** mantienen homología estructural con la proteína HsAtg4b la única CPs en la que se han realizado estudios cristalográficos (Sugawara *et al.*, 2005). Otra de las características reportadas hasta ahora para HsAtg4b es que es una proteasa que actúa como un zimógeno y esto es gracias a que presenta ciertos motivos o secuencias que le permiten volver inaccesible al sitio activo. Por lo anterior averiguamos si estos motivos o secuencias de aa también estaban presentes en **TvAtg4.1** y **TvAtg4.4**.

7.8 Predicción de los bucles reguladores y el dominio de los dedos cortos para **TvAtg4.1** y **TvAtg4.4**.

Hasta ahora se ha informado de dos bucles reguladores presentes en HsAtg4b(Sugawara *et al.*, 2005; Kumanomidou *et al.*, 2006). Mediante análisis *in silico* buscamos si las proteínas **TvAtg4.1** y **TvAtg4.4** presentaban los bucles reguladores. Primero, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias de aa para las diferentes TvAtg4 con ScAtg4 y HsAtg4b. En este alineamiento se puede observar que la secuencia de aa del primer bucle regulador **KPNS** no se encontraba conservado en las diferentes TvAtg4 de tricomonas.

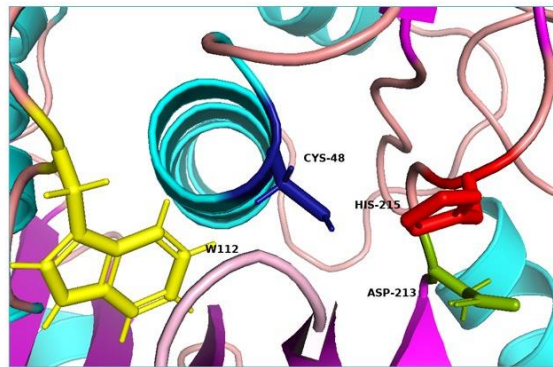
Por otro lado, el triptófano (**W**) en la posición 142 se ha identificado como un segundo bucle regulador para HsAtg4b (Sugawara *et al.*, 2005). En la Figura 30a se puede observar que este residuo **W** si se encuentra conservado entre las diferentes TvAtg4. Por lo que se propone que este aminoácido pudiera tener la función de un bucle regulador para las cinco TvAtg4 incluyendo **TvAtg4.1** y **TvAtg4.4**, en las posiciones **W 112** y **W 116**, respectivamente (Figura 30a).

De igual manera buscamos la posición del posible **W** regulador en la estructura 3D para determinar si se encontraba conservado en **TvAtg4.1** y **TvAtg4.4** Observamos que a nivel de estructura 3D el residuo **W** para las dos proteínas se encuentra adyacente o cercano a la cisteína catalítica encargada de la actividad de proteasa (Figura 30b y c).

a)

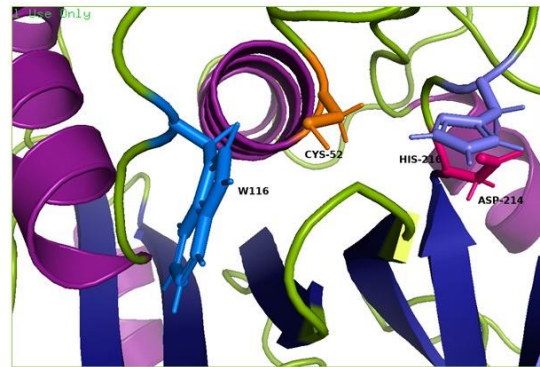
sp Q9Y4P1 ATG4B_HUMAN	PLVLLIPLRLGLTDINEAYVETLKHCFMM-PQSLGVIIGGKPN ^{SAHYFIGYVGE-ELIYLD}	278
sp P53867 ATG4_YEAST	RILFLLGVKLGINAVNESYRESICGLISS-TQSVGIAGGRPSSSLYFFGYQGN-EFLHFD	322
tr A2G433 TvAtg4.1	PVLLLF ^T LM ^L GYKDFDLKYL ^P FLRLT ^L SLIYQSVGVGGQ ^Q GKAY ^L LVGHQKE-NLLYFD	213
tr A2FYD4 TvAtg4.3	PVLLLF ^T LM ^L GYENFELKYL ^P FLKLT ^L SLIYQSVGVGGQ ^Q GKAY ^L FIVGHQKE-KLLYFD	213
tr A2DXA2 TvAtg4.4	PFLLLIPI ^L LLGMKDV ^E QKFI ^P FIKYTFQR-PEFLGAVSGSSDFSYFLVGLSE ^D QNVVYFD	214
tr A2E9B4 TvAtg4.2	PVLI ^L I ^P GLFGL ^E KIEKPY ^I SFIFLSLCM-NSSLGFVSGHNSAFYF ^I GFDS ^D -YFYYFD	207
tr A2DBW2 TvAtg4.5	PALILI ^P SLFGLSKMDDSYLSFLL ^L CLCI-ESSLGFVSGQNASAYYFVGF ^D LE-DFYYFD	207
	::*: :* .: : : : .:* . * : : : . : : *	
sp Q9Y4P1 ATG4B_HUMAN	RQPD ^S YF ^S VLN ^A FID ^R KDSY ^S SIHQ ^I AQMG-VGEGKSI ^G QWY ^G PNTVAQVLK ^L LAVF ^D TW	161
sp P53867 ATG4_YEAST	SLE-RESK ^F VNWFND ^T PEAP ^F SLHNFV ^S AGTE ^L SDKRPGE ^W F ^G PAATARS ^I QSLI ^Y GFPE	234
tr A2G433 TvAtg4.1	I ^F P--NGSK ^F EL ^F FDHPQ ^A PF ^G IHC ^R EL-ETFG ^V KAGE ^W WK ^P SMLAPV ^F FDLLS ^F FGI	131
tr A2FYD4 TvAtg4.3	I ^F P--TNSKY ^E LFY ^D LPSP ^F GLPH ^I CAEL-QSYGV ^M PGEW ^W K ^P SLLAPV ^I KEIMN ^F FRI	131
tr A2DXA2 TvAtg4.4	VFN--E ^I PM ^F SLFED ^R VEM ^P FSIQ ^N LVYRS-ELFG ^V KPGT ^W AK ^P SQ ^L AAT ^I ES ^I FKDL ^K L	135
tr A2E9B4 TvAtg4.2	TFG-IDKN ^P LDL ^F LDI ^P EA ^P PF ^G IQ ^N LV ^T HA-NSL ^G LP ^I GN ^W AK ^P SI ^I ASAY ^K SIFQ ^S LHL	129
tr A2DBW2 TvAtg4.5	VFG-QNVN ^P LDL ^F LDI ^P SA ^P PF ^G IQ ^N LV ^T KNA-FAI ^G LPV ^G E ^W AK ^P SIMAA ^T IK ^L I ^F DTL ^N L	129
	. * * : : : . * * * * : :	

b)



TvAtg4.1

c)



TvAtg4.4

Figura 30. Bucle regulador para TvAtg4.1 y TvAtg4.4. a) Alineamiento múltiple de secuencias de aa para las diferentes TvAtg4 de *T. vaginalis*, recuadro en color verde para identificar el primer bucle regulador, recuadro en color azul para el segundo bucle regulador. b) Estructura terciaria de **TvAtg4.1** en forma de listones y palos; código de colores: amarillo el segundo bucle regulador (**W 112**); azul fuerte la cisteína; rojo para histidina y en color verde el ácido aspártico. c) Estructura terciaria de **TvAtg4.4** el código de colores es: en color azul el segundo bucle regulador (**W116**) inhibitorio; en color naranja la cisteína; en color morado la histidina y en color rosa el ácido aspártico.

También determinamos la presencia del dominio de los dedos cortos en estas proteínas, al superponer cada estructura terciaria de estas CPs con HsAtg4b (Figuras 31a y b).

Otros motivos funcionales reportados en este caso para ScAtg4 son los motivos **pLIR**, que se encuentran en el extremo amino (**APPEAR**) y en el extremo carboxilo (**cLIR**) para cada proteína y que permiten la interacción de Atg4 con Atg8 (Abreu *et al.*, 2017). Por lo que buscamos si en las proteínas **TvAtg4.1** y **TvAtg4.4** estaban presentes estos motivos.

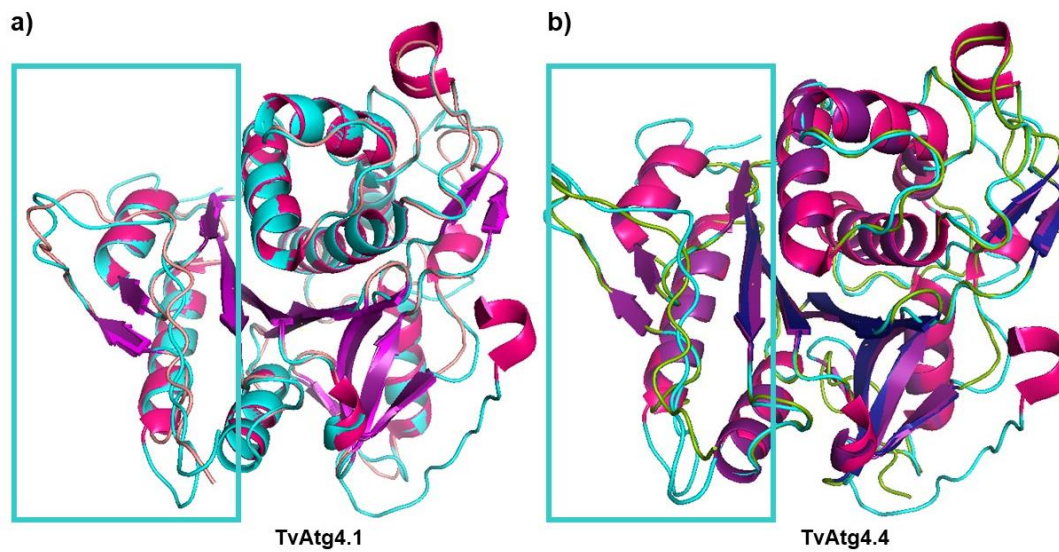


Figura 31. Predicción de los dedos cortos para TvAtg4.1 y TvAtg4.4. a) Estructura terciaria de **TvAtg4.1** en forma de listones y palos; en el recuadro azul se observa el dominio de los dedos cortos. b) Estructura terciaria de **TvAtg4.4** en forma de listones y palos, en el recuadro azul se observa el dominio de los dedos cortos.

7.9 Identificación de los motivos pLIR para TvAtg4. 1 y TvAtg4.4

También identificamos si **TvAtg4.1** y **TvAtg4.4** contaban con motivos **pLIR** de interacción para TvAtg8. Con un nuevo alineamiento múltiple de secuencias de aa entre las diferentes TvAtg4 con ScAtg4 donde ya se han identificado dos motivos **pLIR**, buscamos si todas las TvAtg4 tenían conservados estos motivos con respecto a los identificados en levadura.

Encontramos 4 secuencias que cumplen con las características de la secuencia consenso (**W/F/Y-x-x-L/I/V**) reportada para los motivos **pLIR**. Sin embargo, solo una de ellas se encontraba conservada con la secuencia consenso reportada en levadura. A pesar de que los otros motivos no mostraban similitud de secuencia con la de ScAtg4 (**FVPI**), si se mostraba conservada esta región entre ellas (Figura 32).

pLIR 2 APEAR		
W/F/Y-x-x-L/I/V		
ATG4_YEAST	YRGEAVSDGFLSSFLGREI---SSYTKFELLDVQSRVNFYRTR FVPI ARAPDGPSPLSL	117
TvAtg4.1	-----MTVILGTTIIQ--SDTEKLLKVVDTIPRFTYHKG FSPLA -----	37
TvAtg4.3	-----MTVILGTTIII--SDTEKQRKLEETIPRFTYHKN FAPLQ -----	37
TvAtg4.4	-----MLKKISEACGLSSVPLTKGDIKKYENIPRFTYRCN FQAIQ -----	40
TvAtg4.2	-----MKVIN-----SDDTNVDANQILAEIPRFCYRNN FQAI E-----	33
TvAtg4.5	-----MKVIS-----TNGEDREIKDVIADIPRFCYRYN LSDLA -----	33
	.: : . * * : : :	
W/F/Y-x-x-L/I/V		
ATG4_YEAST	ERESKFVNWFNDTPEAPFSLHNFVSAGTELSDKRPGEWFGPAATARSIQSLIYGFPECGI	237
TvAtg4.1	P-NGSKFELFFDHPQAPFGIHICREL-ETFGVKAGEWVKPSMLAPVFKDLLS FFGI ---	131
TvAtg4.3	P-TNSKYELFYDLPHSPFGLPHICAEL-QSYGVMPGEWVKPSLLAPVIKEIMN FFRT ---	131
TvAtg4.4	N-EIPMFSLFEDRVEMPFSIQNLVYRS-ELFGVKPGTWAKPSQLAATIESI FKDLKL ---	135
TvAtg4.2	GIDKNPLDLFLDIPEAPFGIQNIVTHA-NSLGLPIGNWAKPSIIASAYKSI FQSLHL ---	129
TvAtg4.5	GQNVNPLDLFLDIPSAFPGIQNLTKNA-FAIGLPVGEWAKPSIIMAATIKLI FDLNL ---	129
	. * * * * : : . * * * * : : :	
W/F/Y-x-x-L/I/V		
ATG4_YEAST	DDCIVSVSSGDIYENEVEKVFENPNSRILFLLGVKLGINAVNESYRESICGLSS-TQS	296
TvAtg4.1	-HVVIAENGCLSRESL-RE--ALSYGHPVLLLF TLMLGYKDFDLKYL FLRL TL SLIYQS	187
TvAtg4.3	-PVVIAEHGCLSREVL-NE--ALSHNIPVLLLF TLMLGYENFELKYL FLKL TL SLIYQS	187
TvAtg4.4	-SVLISKDSNIIPED-----VKTMRAPFLLIPI LLGMKDVEQKFI FIKY TFQR-PEF	187
TvAtg4.2	-NCIVPQDSTFIYEE-----LESTNYPVLIPI PLFGLGKIEKPYIS FIFL SLCM-NSS	181
TvAtg4.5	-SCII SQDLTLDSD-----IKHTKYPALILIPSLFGLSKMDDSYLS FLLC LCI-ESS	181
	: : : * : * : * : : : : :	
pLIR 4 cLIR		
W/F/Y-x-x-L/I/V		
ATG4_YEAST	VGIAGGRPSSSLYFFGYQGN-EFLHFDPHIQPAVEDSF-VESCHTSKFGKQLQSEMDP	354
TvAtg4.1	VGVVGGQQGKA YVLV GHQKE-NLLYFDPHEVYDSVTKLDNMNLLFKAQLKMKMQSSQLSSS	246
TvAtg4.3	VGVVGGQQGKA YFIV GHQKE-KLLYFDPHDVNESITKIDQINQLFKPPLKVM PADTLSSS	246
TvAtg4.4	LGAVSGSSDF SYFLV GLSEdqNVVYFDPHVTKQAVASSFDHSEFFVEVPPRGIKMKSLNPS	247
TvAtg4.2	LGFVSGHNDS AFYFI GFDSD-YFYFDPHVTKQALTGPP-YDSL FELKLSMKIENINPS	239
TvAtg4.5	LGFVSGQNAS AYFV GFDLE-DFYFDPHVTKQAVVSP-YDSFFDELKSMKKEINPS	239
	: * . . * : : : * . : . : * * * * : : . . : . : . *	

Figura 32. Motivos pLIR para las proteínas TvAtg4.1 y TvAtg4.4. En el extremo amino terminal se encuentra el motivo conservado para las diferentes TvAtg4 (en color rosa) con respecto al motivo pLIR (W/F(Y-x-x-L/I/V) identificado en levadura (FVPI). En el extremo carboxilo terminal se encuentran los motivos identificados en todas las TvAtg4 que no muestran similitud con respecto a la secuencia de los motivos pLIR de levadura, pero que sí cumplen con la secuencia consenso (W/F(Y-x-x-L/I/V) de los motivos pLIR (en color verde, azul, rosa).

Otra regulación importante para las CPs Atg4 es la posible fosforilación en un residuo de serina que permite su activación o inactivación por la cinasa Atg1. Para levadura se ha propuesto una serina en la posición 307 que se encuentra en Atg4 que puede ser fosforilada y desfosforilada por Atg1 (Sánchez-Wandelmer y Reggiori, 2017). Para la Atg4 de humano, la serina en la posición 316 puede ser fosforilada por Atg1, pero no puede ser desfosforilada por esta proteína, se requiere de una fosfatasa (Pengo *et al.*, 2017). Nosotros buscamos si TvAtg4.1 y TvAtg4.4 contaban con estas serinas fosforilables por Atg1.

7.10 Serinas fosforilables para TvAtg4.1 y TvAtg4.4

Con un alineamiento múltiple de secuencias de aa identificamos a las serinas ya reportadas en las Atg4 de levadura y de humano (Pengo *et al.*, 2017; Sánchez-Wandelmer y Reggiori, 2017), buscamos si este residuo se encontraba conservado para las diferentes TvAtg4. En el caso de la serina fosforilable tipo Atg4 de levadura (**S307**) se puede observar que solamente en TvAtg4.4 (**S197**) se encuentra conservada (Figura 33a residuos en color morado). Sin embargo, para la serina fosforilable tipo Atg4 de humano (**S316**), todas las Atg4 tanto de levadura como las cinco Atg4 de *T. vaginalis* se muestran conservadas en este residuo (Figura 33a residuos en color verde).

De acuerdo con los resultados anteriores, investigamos con ayuda del servidor NetPhos las posibles modificaciones postraduccionales que podrían sufrir **TvAtg4.1** y **TvAtg4.4**. Para ambas proteínas encontramos que podían sufrir fosforilaciones, ubiquitinaciones y o-glicosilación. Pero nos interesaba conocer de acuerdo con el análisis bioinformático específicamente la posición de las serinas que podrían sufrir fosforilaciones. En ambas proteínas encontramos diferentes residuos de serina que podrían ser fosforilados como se muestran en la Figura 33b y c para **TvAtg4.1** y **TvAtg4.4** respectivamente.

a)

ATG4B_HUMAN	PLVLLIPLRLGLTDINEAYVETLKHCFMM-PQSLGVIIGGKPN	SAHYFIGYVGE-ELIYLD	278								
ATG4_YEAST	RILFLLGVKLGINAVNESYRESICGILSS-TQSVGIAGGRPSS	SLYFFGYQGN-EFLHFD	322								
TvAtg4.1	PVLLLF ¹ TLMLGYKDFDLKYL ² PFLRL ³ TL ⁴ SLI ⁵ YQSVGVGGQ ⁶ GKAY ⁷ LVGHQ ⁸ KE-NLLY ⁹ FD		213								
TvAtg4.3	PVLLLF ¹ TLMLGYENFELKYL ² PFLKL ³ TL ⁴ SLI ⁵ YQSVGVGGQ ⁶ GKAY ⁷ FIVGHQ ⁸ KE-KLLY ⁹ FD		213								
TvAtg4.4	PFLLLI ¹ PILLGMKDVEQKFI ² PFIKY ³ TFQR-PEFLGAVSGSSDF ⁴ SYFLVGLSE ⁵ DQNVVY ⁶ FD		214								
TvAtg4.2	PVLILI ¹ PGLFGLKIEKPYI ² SFIFLSLCM-NSSLGFVSGHNDSAFY ³ FIGFSD ⁴ -YFYY ⁵ FD		207								
TvAtg4.5	PALILI ¹ PSLFGLSKMDDSYLSFLLLC ² LCI-ESSLGFVSGQNASAY ³ FVGF ⁴ DLE-DFYY ⁵ FD		207								
	::*:	:*	: :	: :	: :	: *	.*	:	::.*	: :	::*
ATG4B_HUMAN	PHTTQPAVEPTDGC	FIPDES	FHCQHPPCRMSIAELDP	SI	AVGFFCKTEDDFNDWCQQVKK	338					
ATG4_YEAST	PHIPQPAVEDSF	-----	VESCHTSKFGKQLQ	SEM	DPSMLIGILIKGEKDWQWKLEVAE	376					
TvAtg4.1	PHEVYDSVTKLDN	-----	MNLLFKAQLK	KMQSSQLSS	SMLVGFYITSMQDAEELPMLLSA	268					
TvAtg4.3	PHDVNESITKIDQ	-----	INQLFKPPLK	VMPADTLSS	SMLVGFYITNLQDAEELPMLLNQ	268					
TvAtg4.4	PHVTKQAVASSFD	-----	HSEFFEVP	PRGIKMKSLNP	SFLLGFFCSSTENAI	SLIEDITK	269				
TvAtg4.2	PHVTKQALTGPP	-----	YDSL	FELKLSMKIENINP	SVLLGFYCDSDIQEL--IMQLMG	259					
TvAtg4.5	PHVTKEAVVSP	-----	YDSF	FDELKSMKESINP	SVLLGFYCDGSIDDL--IMQLTG	259					
	**	::	.	:	:	::	.*	::*	:	:	:

b)

>TvAtg4.1 (TVAG_023970)

MTVILG**T**TIIQ**S**D**T**E**K**L**K**KVVVD**T**I**P**RF**T**Y**H**K**G**F**S**PLAGGY**T**T**D**KNWGCC**I**R**S**GQGLLMQFVSKLYQLYGDKIKNIFPN**S**
KFELFDHPQAPFGIHCICRELE**T**FGVKAGEWVKP**S**MLAPVFKDLL**S**FFGIHVVIAENG**C**L**S**RE**S**LREAL**S**Y**G**HPVLLLF
 TLM**L**G**Y**KDFDLKYL**P**F**L**RL**T**L**S**L**I**Y**Q**SVGVVGGQ**G**KAY**L**VGHQ**K**ENLL**Y**FD**P**HEV**Y**DSV**T**KLDN**M**LL**F**KA**Q**L**K**K**M**Q**S**
SQL**S**SS**S**MLVGFY**I**T**S**MQDAEELPMLLSA**S**G**E**CP**I**Q**I**VD**K**ID**P**V**K**T**T**HVEDDWEVVNN



c)

>TvAtg4.4 (TVAG_397150)

ML**K**K**I**S**E**ACGL**S**S**V**PL**T**K**G**DI**K**Y**E**NI**P**RF**T**Y**R**C**N**FQ**A**I**Q**P**G**N**I**T**S**D**S**GW**G**CC**Y**RS**A**Q**G**L**I**AS**Y**FL**N**Y**A**P**V**DA**E**Y**F**F**T**V**F**
 NE**I**PM**F****S**L**F**ED**R**VE**M**PF**S**I**Q**N**L**V**R**SE**L**F**G**V**K**PG**T**W**A**K**P****S**Q**L**A**T**I**E**S**I**FK**D**L**K**L**S**V**L**I**S**K**D****S**N**I**I**P**ED**V**K**T**MR**A**PF**L**L**L**
 I**P**ILL**G**M**K**D**V**E**Q**K**F**I**P**F**I**K**Y**T**F**Q**R**PE**F**L**G**AV**S****G**S**S**DF**S****Y**FL**V**GL**S**ED**Q**N**V**V**Y**FD**P**H**V**T**K**Q**A**V**A****S**S**F**D**H****S**E**F**FE**V**P**P**RG**I**K
MK**S**L**N**PS**F**LL**G**FF**C****S**S**T**EN**A**I**S**L**I**ED**I**T**K**L**K**D**S**P**I**T**F****S**E**I**R**K**D**L**V**D**Q**V**L**D**I**D**I**D**I**D**L



Figura 33. Modificaciones postraduccionales para las proteínas TvAtg4.1 y TvAtg4.4. a) Alineamiento múltiple de secuencias de aa. En la parte superior, se identifica a la serina tipo Atg4 de levadura en color morado. En color verde se muestra el alineamiento para las serinas tipo Atg4 de humano. b) Modificaciones postraduccionales para **TvAtg4.1**. En la parte superior se muestra la secuencia de aa de la proteína completa. Código de colores: en azul las posibles ubiquitinaciones; en rosa las fosforilaciones. En la parte inferior se muestra el esquema donde solo se colocaron las posibles fosforilaciones para los residuos de serina en **TvAtg4.1**. c) Secuencia de aa completa para proteína **TvAtg4.4**. En la parte superior, con colores se muestran los aa que sufren modificaciones postraduccionales. Código de colores: en verde los aa que podrían ser glicosilados; en rosa los aa que pueden ser fosforilados y en azul los aa que podrían ser ubiquitinados. En la parte inferior se muestra el esquema donde solo contiene las posibles fosforilaciones para los residuos de serina en **TvAtg4.4**.

7.11 Proteínas TvAtg1 en *T. vaginalis*

Hasta ahora la cinasa capaz de fosforilar a Atg4 es Atg1. Esta proteína una vez activada actúa en dos procesos durante la autofagia. Primero participa en el reclutamiento de las proteínas Atg. En segundo lugar, participa en la fosforilación de la CP Atg4 (Yin *et al*, 2016; Sánchez-Wandelmer y Reggiori, 2017).

Por esto buscamos cuántas proteínas TvAtg1 se han reportado hasta ahora en *T. vaginalis*. En nuestros antecedentes directos encontramos que en una búsqueda de BLAST a nivel de gen se han propuesto seis parálogos para *tvatg1* y cada uno codifica para sus proteínas correspondientes. Estas proteínas pertenecen a cuatro familias de cinasas, TKL, AGC STE y CAMK. También se observa que el tamaño de las proteínas Atg1 es muy diferente entre las diferentes familias; incluso, el tamaño de las proteínas dentro de las familias es diferente (Huang *et al.*, 2014). Ejemplo de ello es la familia CAMK que presenta una proteína con un tamaño de 199 aa y otra con un tamaño de 467 aa (Figura 34a) (Tabla 6).

Tabla 6. Parálogos para Atg1 en *T. vaginalis*.

	ID GEN	Familia cinasa	Tamaño
TvAtg1.1	TVAG_074920	CAMK	467 aa
TvAtg1.2	TVAG_334190	AGC	388 aa
TvAtg1.3	TVAG_136340	TKL	356 aa
TvAtg1.4	TVAG_175440	CAMK	199 aa
TvAtg1.5	TVAG_292810	STE	409 aa
TvAtg1.6	TVAG_458570	STE	362 aa

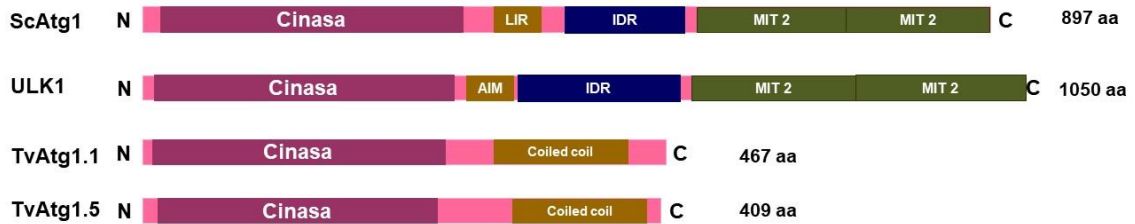
Las cinasas son la familia de proteínas más grande, que se caracterizan por su dominio cinasa y se ha establecido que su regulación es fundamental en diversos procesos celulares (Rauch *et al.*, 2011). Nosotros identificamos el dominio cinasa de cada una de las proteínas Atg1 de *T. vaginalis*. En la Figura 34 se puede observar que a pesar de la diferencia de tamaños en las proteínas TvAtg1, el dominio cinasa es muy similar entre todas las proteínas cinasas Atg1 de *T. vaginalis*.



Figura 34. Esquema para las seis proteínas Atg1 de *T. vaginalis*. Esquema para las diferentes proteínas TvAtg1, en color rosa oscuro se observa el dominio cinasa.

Debido a que las proteínas con actividad cinasa para Atg4 han sido observadas en humano (HsAtg1) y en levadura (ScAtg1) (Pengo *et al.*, 2017; Sánchez-Wandelmer *et al.*, 2017) realizamos un alineamiento múltiple de secuencias de aa con **TvAtg1.1** y **TvAtg1.5**, identificamos de manera singular que el tamaño de las proteínas HsAtg1 y ScAtg1 es casi el triple de grande con respecto a las TvAtg1 de *T. vaginalis* (Figura 35a). Además, el porcentaje de identidad de este alineamiento es del 2.8%, que sugiere la poca similitud que hay entre estas proteínas. A pesar de esto, se puede observar que todas las proteínas comparten el dominio cinasa (Figura 35b)

a)



b)

```

HsULK1      -----MEPGRGGTETVGKFEFSRKDLIGHGAFVAVFKGRHREK 38
ScAtg1      -----MGDIKNKDHT-TSVNHNLMASAG--NYTAEKEIGKGSFATVYRGHLTSD 46
GlAtg1      MPKTDKVDRAVDDACPPDASREDQDTKKIRVKRVGNIIIGKTI GEGSFSKVR LGTHVLT 60
TvAtg1.1    -----MIING--KIKIGEELGRGSFATVYKSTIVGN 29
TvAtg1.5    -----MINFPNSISHYKFIEPIGRGSTSEVL SAICLDN 33
              . . . : * . * : : * .

HsULK1      H-----DLEVAVKCI--NKKNLAKSQTLLGKEIKILKELKHENIVALYDFQEMANSVYLV 91
ScAtg1      K-----SQHVAIKEVSRAKLKNKKLLENLEIEIAILKKIKHPHIVGLIDCERTSTDFYLI 101
GlAtg1      N-----ERIALKIIIEKSKITEAADIERITREIQILKLLNHPNVIKLYEIVDTPRHVYIV 114
TvAtg1.1    YPPLQIGDVVAVKSI STNKFSTPEEREKLENEINLMKKLSHTNIVKLYGVERTSSTYFLV 89
TvAtg1.5    Q-----NEISIKKIDM--EKYP IEFLEFLRQEVSWSSSAHPNVVGYGVSFVEGTVIYIL 85
              :::* : . : * : . * ::: : ::

HsULK1      MEYCNNGDLADYLHAMR-----TLSEDT-IRLFLQQIAGAM 126
ScAtg1      MEYCALGDLTFLLKRRKELMENHPLLRTVFEKYP PPSENHNGLHRAF-VLSYLQQLASAL 160
GlAtg1      QEYMNNGELFDYIVAKGR-----LSEKE-ACRFLCQLLNGL 149
TvAtg1.1    MEYCETGDLHFFLKKFGL-----GISPEM-LYNFIQQIIGNGL 125
TvAtg1.5    MEYCSAGSIYDIMRYGFP-----RGFNDEFI IATILKGVNLAL 123
              ** *.: : : : : : : : : : : :

HsULK1      RLLHSKGI IHRDLKPQNILLSNPAGR-----RANPNSIRVKIADFGFARYLQS 174
ScAtg1      KFLRSKNLVHRDIKPQNLLLSTPLIGYHDSKSFHELGFVGIYNLPILKIADFGFARFLPN 220
GlAtg1      HFLHSRRIVHRDLKPENLLLTAN-----NDIKIIDFGLSNIFHD 188
TvAtg1.1    QYLKSQEI IHRDLKPQNIMIKGQ-----WPDITLKLADFGFARFLHD 167
TvAtg1.5    NYIHSNGQIHRDIKPGNILLCAD-----GSVKIGDGFVAASLFQ 162
              . :.*. :***:* *::: :*: ***. : : .

HsULK1      N----MMAATLCGSPMYMAPEVIMS-QHYDGKADLWSIGTIVYQCLTGKAPFQASSP-QD 228
ScAtg1      T----SLAETLCGSPLYMAPEILNY-QKYNADLWSVGT VVFEMCCGTPPFRASNH-LE 274
GlAtg1      T----FMKTCCGSPAYAPPEMIQKGLYSGPSADLWSTGII LYAMLGCLPFEFGSTT-QS 242
TvAtg1.1    N----DMAETICGSP IYMAPEIQFN-SPYTSAVDMWLSGVII YEMIVSQPPFPNCKSPFE 222
TvAtg1.5    DGQRQRARYTVIGTPCYMAPEVLTEDHGYTEKADIWLSLGITAI ELATGEAPYSKLP-ME 221
              * *:* * ** : .:* ** * . * : . .

HsULK1      LRLFYEKNKTLVPTIPRET--SAPLRQLLLALLQRNHKDRMDFDEFFHHPFLDASPSVR- 285
ScAtg1      LFKKIK-RANDVITFPSYCNIEPELKE LICSLTDFDPAQRIGFEEFFANKV VNE DLSSYE 333
GlAtg1      LYIKIL---SGEFSTPSY--LSQGA KDVLKALLTVNPDDRVTIEELITYPWIQKNWALNH 297
TvAtg1.1    LTNEIKKLGSRPIEVPKSISCPDLLRDLVSKLLTVDPTRRMTLKEFVEHQYFKSPPKSS- 281
TvAtg1.5    IMVKI--LKSPSKLPTNAPYSAEFRNFVEKCLQSDPMNRATAEELLRHPFIAKAKSDSY 279
              : . * : : : * : * .*: . .

```

Figura 35. Comparación de las proteínas TvAtg1.1 y TvAtg1.5 con ULK1 y ScAtg1. a) Identificación del dominio cinasa de las proteínas Atg1 en otros organismos y **TvAtg1** de *T. vaginalis* (color rosa fuerte): dominio IDR (color azul): dominio MIT (color verde). **b)** Alineamiento de secuencias para las diferentes proteínas Atg1 de otros organismos con las proteínas **TvAtg1** de *T. vaginalis*. En color azul claro se muestra el dominio cinasa en las diferentes Atg1.

Una vez que realizamos un alineamiento múltiple de secuencias de aa para las Atg1 de diferentes organismos, buscamos a nivel estructura 3D, si este dominio se mantenía en las dos proteínas TvAtg1 de nuestro interés. Para el modelado molecular de las estructuras terciarias la secuencia de aa de **TvAtg1.1** y **TvAtg1.5** fueron enviadas al servidor I-TASSER y después fueron modeladas con PyMoL. Para **TvAtg1.1** el “C-score” de esta estructura fue – 0.60, mientras que C-Score para **TvAtg1.5** fue de -1.69 que se encuentran dentro del rango establecido. Además, realizamos una comparación con HsULK1, ya que esta estructura ha sido cristalizada (Lazarus *et al.*, 2015). En la Figura 36a se puede observar la estructura cristalina de HsULK1 de manera visual no parecía mostrar homología estructural con **TvAtg1.1** y **TvAtg1.5** (Figura 36b y c). Para validar las estructuras 3D de TvAtg1.1 y TvAtg1.5 usamos los gráficos de Ramachandran. Para el caso de TvAtg1.1 el 74% de todos los residuos de aa se encontraban en regiones favorecidas mientras que para TvAtg1.5 fue el 75.7%.

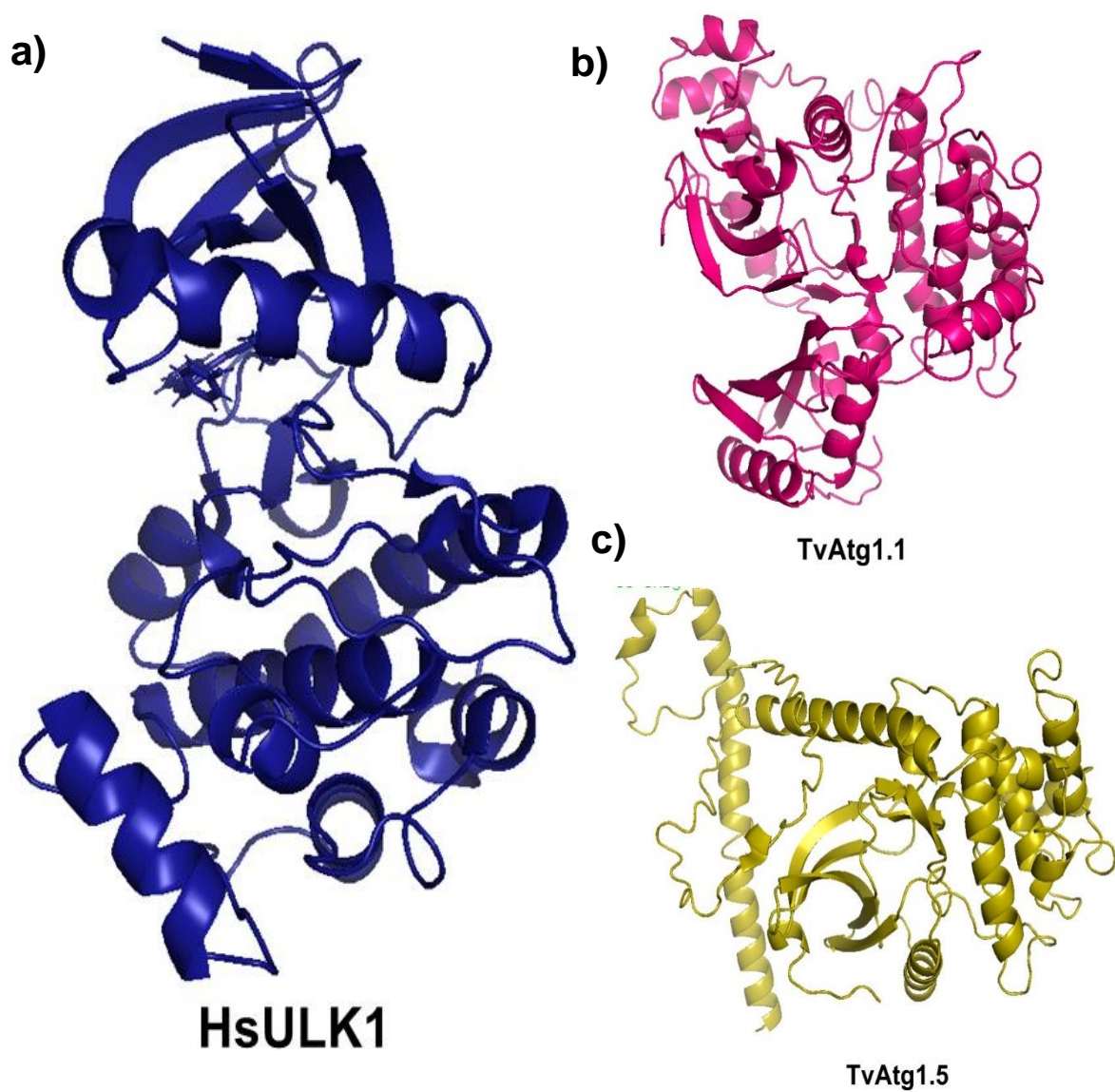
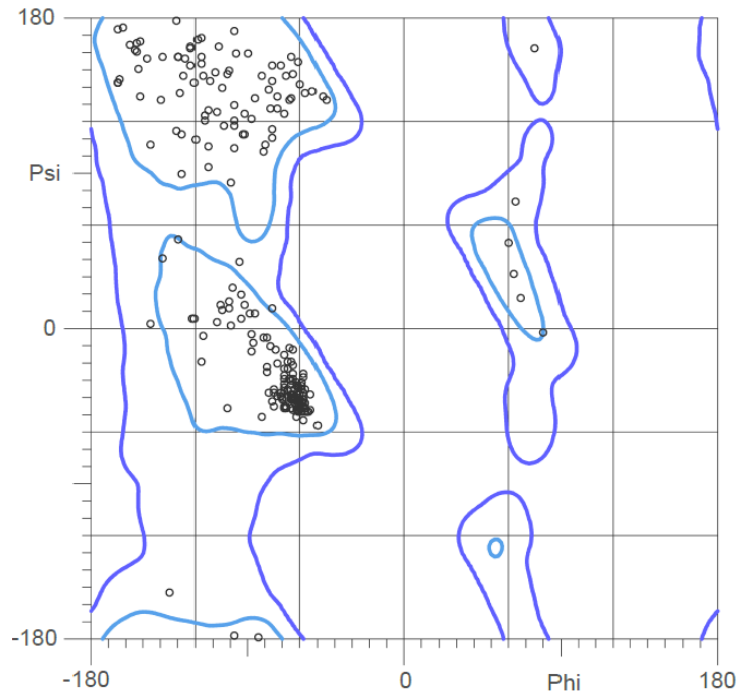


Figura 36. Modelado molecular de la estructura terciaria de TvAtg1 de *T. vaginalis*. a) Estructura cristalina de ULK1 de *H. sapiens*, código PDB: 4WNO. b) Modelado de la estructura terciaria de **TvAtg1.1**. c) Modelado de la estructura terciaria de **TvAtg1.5**. Ambas estructuras se enviaron al servidor de I-TASSER y fueron modeladas con PyMol.

a)

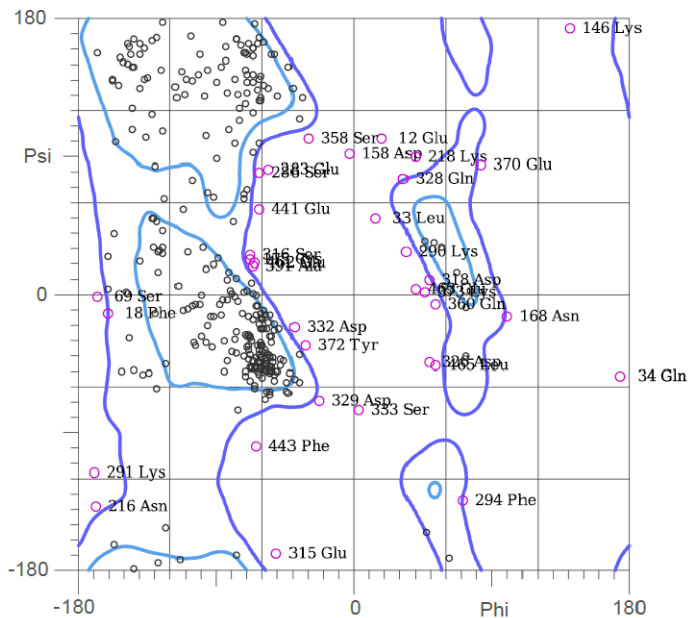
HsULK1



97.9% (277/283) of all residues were in favored (98%) regions.
100.0% (283/283) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

b)

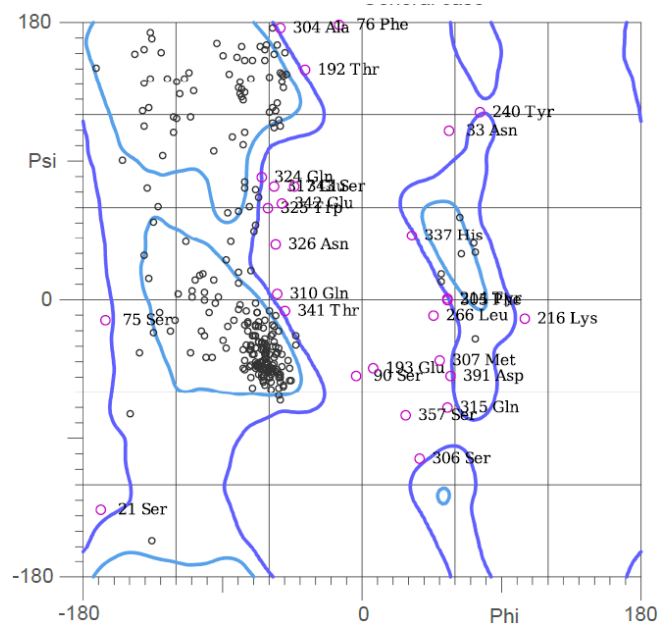
TvAtg1.1



74.0% (344/465) of all residues were in favored (98%) regions.
89.5% (416/465) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

c)

TvAtg1.5



75.7% (308/407) of all residues were in favored (98%) regions.
88.9% (362/407) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

Figura 37. Gráficos de Ramachandran para las diferentes Atg1. a) Gráfico de Ramachandran para la estructura 3D de HsULK1. b) Gráfico de Ramachandran para la estructura 3D de TvAtg1.1. c) Gráfico de Ramachandran para la estructura 3D de TvAtg1.5. En color azul claro se encuentran todos los residuos de aa en las regiones favorecidas para todos los casos.

A nivel secuencia de aa las proteínas TvAtg1 parecían tener homología de secuencia con el dominio cinasa en todos los casos, pero a nivel de estructura 3D las proteínas se mostraban muy diferentes. Por lo que realizamos una superposición de la estructura terciaria HsULK1 con las dos proteínas TvAtg1 de nuestro interés. Como se observa en la Figura 38a, al realizar la superposición de estructuras 3D entre HsULK1 y **TvAtg1.1** mostraron homología estructural solo en ciertas partes de la estructura así que identificamos en cada estructura 3D el dominio cinasa para cada proteína. En la Figura 38b en color azul más claro y en color rosa más pálido se marcan el dominio cinasa para cada proteína, se puede observar que de acuerdo a la superposición, el dominio cinasa en ambas proteínas es el que presenta homología estructural. En el caso de la estructura 3D de **TvAtg1.5** con la estructura terciaria de HsULK1 podemos observar que aunque parecía que estas estructuras son demasiado diferentes a nivel visual, se observa que al superponer ambas estructuras mantienen la homología a nivel estructura con el dominio cinasa (Figura 38c y d).

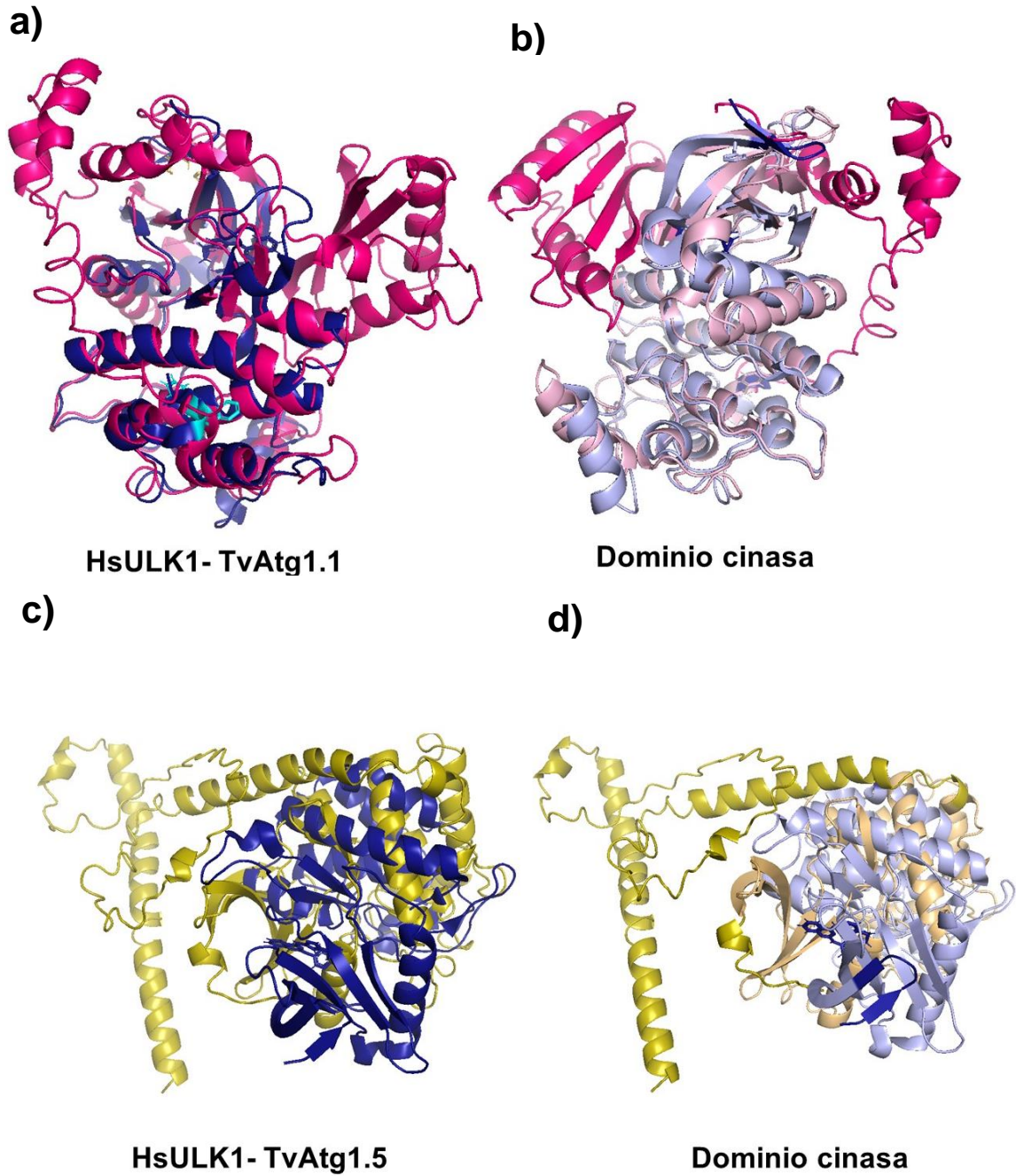


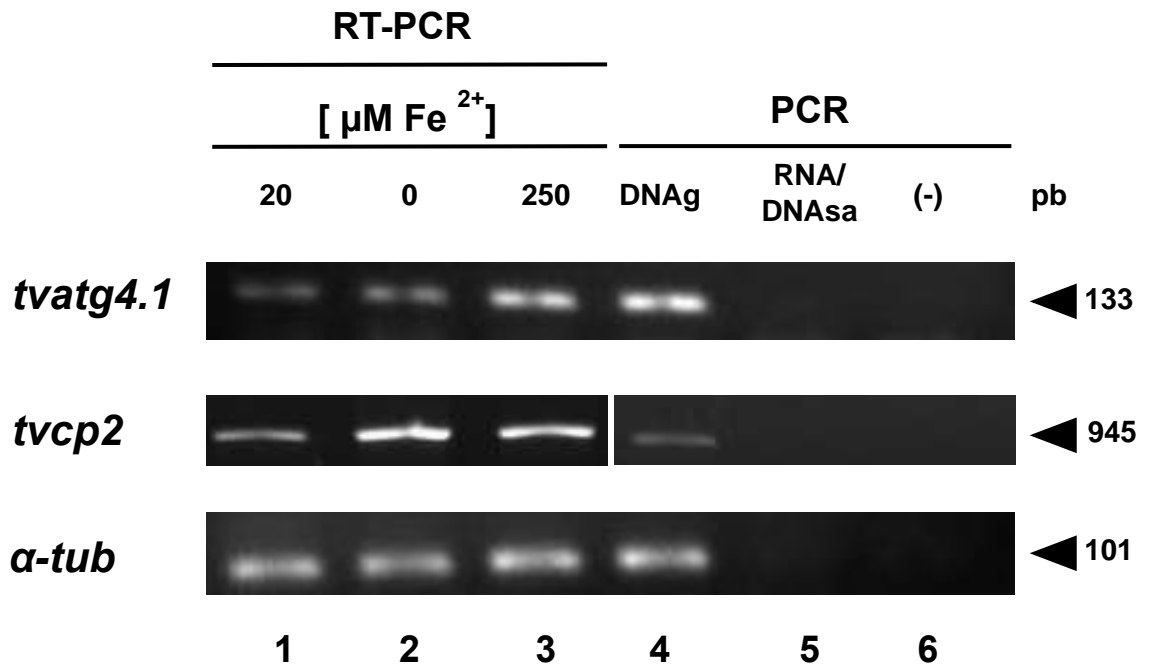
Figura 38. Superposición de estructuras 3D de las diferentes Atg1. a) Superposición de la estructura 3D de HsULK1 y TvAtg1.1 en forma de listones de palos. b) Identificación del dominio cinasa en las estructuras 3D de HsULK1 y TvAtg1.1. c) Superposición de las estructuras terciarias HsULK1- TvAtg1.5. d) Identificación del dominio cinasa en las estructuras 3D de HsULK1 en color azul claro y del dominio cinasa de TvAtg1.5 en color amarillo claro.

Los resultados obtenidos hasta ahora nos sugieren que **TvAtg4.1** y **TvAtg4.4** son proteínas que cuentan con los dominios, motivos y secuencias reguladoras reportados para las diferentes Atg4 lo que sugiere que sean funcionales como autofaginas. Por otro lado, para las proteínas TvAtg1 se ha identificado a nivel estructural y a nivel secuencia de aa el dominio cinasa que tiene un papel fundamental en la regulación de Atg4. Pero ¿Para qué necesita tricomonas cinco parálogos de Atg4 o seis de Atg1? Esto nos llevó a lo siguiente, nos interesa saber a nivel experimental bajo diferentes condiciones de hierro ¿Qué pasa a nivel de transcrito? ¿Cómo es la expresión de estas proteínas? Además, ahora que se observa la participación de TvAtg1 como un posible regulador de TvAtg4 también será interesante en un futuro incluir a esta proteína para observar su expresión a nivel de transcrito bajo las diferentes condiciones de hierro.

7.12 Efecto del hierro en la expresión a nivel de transcrito de TvAtg4.1

Para evaluar el efecto del hierro en la expresión a nivel de transcrito del gen *tvatg4.1* realizamos ensayos de RT-PCR semicuantitativa a partir del RNA total extraído de parásitos del aislado CNCD 188 cultivado en diferentes concentraciones de hierro (20 μ M, 0 μ M, 250 μ M), como condiciones normales, de restricción y alto hierro respectivamente. El cDNA de cada condición se sintetizó y se utilizó como molde para amplificar un fragmento del gen *tvatg4.1* y α - tub como control de carga. El DNA genómico del aislado CNCD 188 se usó como control positivo de la reacción, y como controles negativos se usó RNA tratado con DNAasa I para corroborar que la amplificación del cDNA no se deba a restos de DNA genómico y una reacción sin DNA. En la Figura 39a se muestra el amplicón de 133 pb que es el fragmento del gen *tvatg4.1* esperado, en los resultados se observa que es más abundante en la condición de alto hierro comparado con las condiciones normales y de restricción de hierro. Estos resultados indican que a nivel de transcrito el gen *tvatg4.1* es regulado positivamente por hierro.

a)



b)

Análisis densitométrico de RT-PCR del gen *tvatg4.1* en diferentes condiciones de hierro

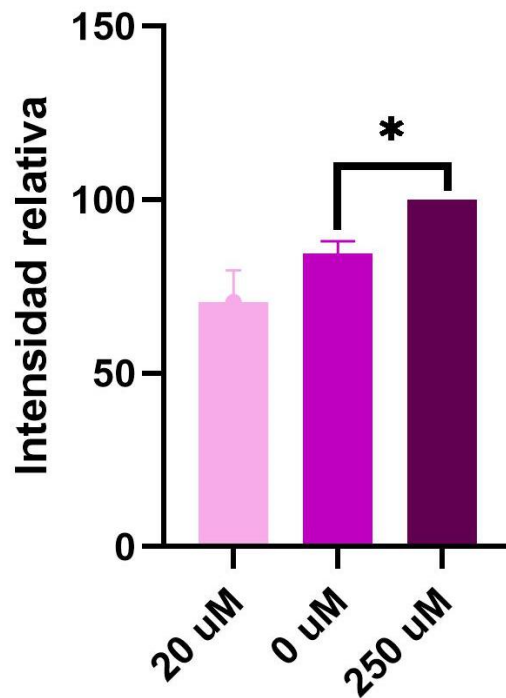


Figura 39. Efecto del hierro en la expresión del gen *tvatg4.1*. **a)** Se muestra un gel de agarosa al 2%, donde se observa el amplicón de 133 pb que es el esperado para el gen *tvatg4.1* en condiciones normales, restricción y alto hierro, además se observa el amplicón de α -tubulina, como control de carga. Como control positivo usamos DNA genómico del aislado CNCD 188, los controles negativos fueron RNA tratado con DNAsa I y una reacción de PCR sin DNA. La amplificación del gen *tvcp2* fue usada como control para determinar la calidad del cDNA. Estos resultados se realizaron por duplicado en experimentos independientes. **b)** Análisis densitométrico de las bandas de los amplicones mostrados en (a) relativas a la intensidad de las bandas de los amplicones de la α -tubulina utilizada como control de carga.

8 Discusión

La macroautofagia se ha descrito como un proceso catabólico altamente conservado en las células eucariotas (Yin *et al.*, 2016). Este proceso fue descrito por primera vez en 1960 en células de mamíferos y con el paso del tiempo se ha descrito la maquinaria central autofágica en levadura. Para el caso de los protistas parásitos los análisis bioinformáticos han logrado mapear la distribución de los genes ortólogos relacionados con la autofagia. Sin embargo, algo que han observado los diferentes grupos de trabajo es que normalmente solo se encuentran algunos de los genes relacionados con la maquinaria central de la autofagia. A pesar de la falta de genes Atg existe evidencia morfológica, secuencial y funcional de la presencia de autofagia en protistas parásitos (Besteiro, 2013). La autofagia se encuentra involucrada en una serie de procesos fisiológicos, como la adaptación a la falta de nutrientes, la senescencia, la homeostasis de los orgánulos y los mecanismos inmunitarios (Sakamoto *et al.*, 2021).

T. vaginalis es un protozoo que ve afectado su crecimiento, desarrollo y metabolismo por diferentes condiciones nutricionales como en diferentes concentraciones de hierro, glucosa, zinc, poliaminas, etc. (Arroyo *et al.*, 2015). Por esto, este protista ha desarrollado la expresión diferencial de ciertos genes frente a condiciones nutricionales desfavorables (hierro y glucosa) (Figueroa-Angulo *et al.*, 2012).

El hierro juega un papel muy importante en el establecimiento de la infección por *T. vaginalis*, ya que regula la expresión diferencial de sus genes frente a diferentes concentraciones de hierro. A la autofagia se le considera un mecanismo de adaptación a la falta de nutrientes. En este trabajo se realizó un análisis *in silico* de las proteínas **TvAtg4.1** y **TvAtg4.4** y **TvAtg1.1** y **TvAtg1.5** de *T. vaginalis* que se sabe participan durante el proceso autofágico y se estudió el efecto del hierro en la expresión a nivel de transcrito del gen *tvatg4.1*.

En los antecedentes directos observamos que, de acuerdo con los reportado por Huang *et al.*, 2019 en condiciones de RG de glucosa *T. vaginales* presenta autofagia y en ese mismo año Hernández – García *et al.*, 2019 como parte de su tesis de doctorado observaron autofagia en este protozoo en condición de RH y RG. Además, en los antecedentes también se mencionó que a nivel genómico este parásito solo cuenta con un único sistema de tipo ubiquitina, el sistema de procesamiento que incluye a las proteínas Atg8-Atg4-Atg3, esto nos llevó a plantearnos alguna pregunta. A pesar de que *T. vaginalis* cuenta con una maquinaria críptica central para la autofagia, se ha observado autofagia en este protozoario. Entonces ¿cómo *T. vaginalis* es capaz de procesar a Atg8, qué proteínas regulan la actividad de Atg4 y cuáles proteínas participan en la conjugación de Atg8 con la fosfatidiletanolamina?

Uno de nuestros enfoques centrales fue analizar *in silico* a dos genes *tvatg4* (*tvatg4.1* y *tvatg4.4*) que codifican para las proteínas **TvAtg4.1** y **TvAtg4.4**, ya que esta CPs son necesarias para uno de los primeros pasos en el procesamiento de TvAtg8. En el primer resultado del análisis *in silico* identificamos si los genes que codifican para las proteínas antes mencionadas presentaban en el extremo 5' los elementos promotores basales que se encuentran muy próximos al codón de inicio de la traducción. Identificamos en ambos genes a un Inr putativo, considerado como el responsable del sitio de inicio de la transcripción (TSS). Esto nos lleva a sugerir que a nivel genómico los genes cuentan con los elementos basales para iniciar la transcripción. A pesar de que en linajes eucariotas de divergencia temprana como *T. vaginalis* la búsqueda de estos elementos promotores basales ha representado un reto debido a la inmensa divergencia que existe en estos organismos (Liston y Johnson, 1999).

Una vez que se tiene el mRNA, el procesamiento postranscripcional en eucariotas superiores es necesario ya que le dan estabilidad al mRNA y permiten la exportación del mismo desde el núcleo hasta el citoplasma (Espinosa *et al.*, 2002) . Por esto, en nuestro segundo resultado del análisis *in silico* identificamos las señales de poliadenilación implicadas en el procesamiento del extremo 3' de los genes de interés. En ambos transcritos identificamos posibles señales de poliadenilación y para cada uno se cumplía con las características propuestas por Espinosa y col., en 2002. Curiosamente para el transcrito **TvAtg4.4**, la posible señal de poliadenilación se encontraba muy lejana del codón de paro, algo hasta ahora poco usual en los transcritos de *T. vaginalis*, mientras que en **TvAtg4.1** esta señal se encontró acoplada al codón de paro. De acuerdo con nuestros resultados de esta segunda estrategia *in silico* podemos proponer que los transcritos pudieran estar siendo procesados a nivel postranscripcional y esto les daría estabilidad a ambos.

Otra estrategia a nivel *in silico* fue realizar un alineamiento múltiple de secuencias en aa para identificar las posibles posiciones que ocuparía la tríada catalítica en ambas proteínas. Encontramos que para **TvAtg4.1** y **TvAtg4.4** el orden que conforman la triada catalítica y los residuos de aminoácidos que se encuentran alrededor de ellos se muestran muy conservados (Figura 24). A pesar de que el alineamiento a nivel de secuencias de aa con las Atg4 de otros organismos era muy bajo, esta similitud concuerda con lo reportado para ScAtg4, donde se menciona que las estructuras primarias de las proteínas comparadas con otras Atg4 de otros organismos exhiben poca homología, pero hay conservación de los residuos que se encuentran alrededor de la cisteína y la histidina (Pérez-Pérez *et al.*, 2021). De acuerdo con este resultado, podemos sugerir que los aminoácidos que se muestran conservados podrían estar formando parte de la triada catalítica tanto para **TvAtg4.1** y **TvAtg4.4** (Kirisako *et al.*, 2000) de acuerdo con la familia C54 a la que pertenecen.

Otros de los dominios identificados en **TvAtg4.1** y **TvAtg4.4** son: el dominio proteasa y el dominio auxiliar. Se sabe que estas proteínas mantienen cierta homología estructural con las proteasas de la familia de tipo papaína exclusivamente en el dominio proteasa, donde se encuentra albergada la triada catalítica para estas proteínas (Kumanomidou *et al.*, 2006). Una de las

características mencionadas anteriormente es que HsAtg4b actúa como un zimógeno ya que se encuentra autoinhibida en su forma libre (Kumanomidou *et al.*, 2006). Por lo anterior, identificamos en las TvAtg4 de nuestro interés los bucles reguladores que participan en esta autoinhibición. Encontramos que **TvAtg4.1** y **TvAtg4.4** solo tienen un bucle regulador correspondiente al **W** en la posición 112 y 116, respectivamente, el único residuo que se mostró conservado. Una de las cualidades de este bucle regulador es que por impedimento estérico no permite que la cisteína de la triada catalítica esté accesible al sustrato (Kumanomidou *et al.*, 2006). Nuestros resultados a nivel de estructura identificaron la posición de este aminoácido y observamos que el **W** se encontraba cercano a la cisteína en ambas proteínas TvAtg4 (Figura 30b). Esto nos llevó a sugerir que de acuerdo con la posición ocupada por el **W** podría volver a la cisteína inaccesible y actuar como el bucle regulador de las proteínas Atg4 de tricomonas.

Al mismo tiempo identificamos en ambas TvAtg4 el dominio de los dedos cortos (Figuras 31a y b). Sabemos que el dominio de los dedos cortos participa en el posicionamiento del extremo carboxilo terminal en la Atg8 para su posterior procesamiento (Sugawara *et al.*, 2005). Por otra parte, en el análisis *in silico* también se observó la ausencia del primer bucle inhibitorio y del conjunto de aminoácidos que está encargado del reconocimiento de Atg8, además de que permite el cambio conformacional de Atg4 para que se vuelva accesible la triada catalítica (Sugawara *et al.*, 2005). La ausencia del último conjunto de aa para **TvAtg4.1** y **TvAtg4.4** podría significar un paso limitante en el procesamiento de TvAtg8 ya que no existiría un cambio conformacional y tampoco un procesamiento como ocurre en HsAtg4b (Sugawara *et al.*, 2005). Sin embargo, se sabe que en el caso de las proteínas DUB el dominio de los dedos reconoce al sustrato y esto provoca un reordenamiento en la estructura terciaria inducido por el sustrato. De esta manera se eliminan los impedimentos estéricos (Amerik y Hochstrasser, 2004)

A pesar de lo anterior hasta ahora podemos decir que **TvAtg4.1** y **TvAtg4.4** muestran ausencia de ciertas secuencias, pero al mismo tiempo se observa la presencia de otras. Por lo tanto, proponemos lo siguiente; de acuerdo con nuestro análisis a nivel *in silico* la superficie cóncava o dominio de los dedos

cortos permite el posicionamiento del extremo carboxilo terminal de TvAtg8, lo que provoca un reordenamiento de la estructura terciaria como el mencionado en las proteínas DUB. (Amerik y Hochstrasser, 2004). De esta manera la cisteína catalítica que se encuentra en la α -hélice autoinhibida por el **W** se podrá volver accesible y así podrá procesar a la TvAtg8.

Una pregunta importante hasta ahora es: ¿Cómo Atg4 puede regular su activación? Se dice que esta proteasa debe tener una regulación espacio-temporal, que le permita en un primer momento escindir el extremo carboxilo de Atg8 que se encuentra libre y en un segundo momento escindir al conjugado Atg8-PE asociado a la membrana externa del autofagosoma (Licheva *et al.*, 2021). Si Atg4 siempre se encontrará activo no se podría llevar a cabo la formación del autofagosoma y por lo tanto no habría autofagia. Por esto Abreu *et al.*, 2017, proponen que ScAtg4 presenta motivos de interacción con Atg8 o también nombrados motivos **pLIR**. Estos motivos presentan una secuencia consenso característica para todas las proteínas que participan en el reconocimiento de Atg8 y es W/F/Y/ x-x /L/I/V donde x es cualquier aminoácido (Birgisdottir *et al.*, 2013). En específico, para levadura se encontraron cuatro secuencias pLIR que cumplían con la secuencia consenso, dos de las cuales se encontraban conservadas y eran responsables de la interacción de Atg4 con Atg8: a) el motivo **cLIR** para el procesamiento de Atg8 en su forma libre y b) el motivo **APEAR** para el procesamiento del conjugado Atg8-PE (Abreu *et al.*, 2017). Para los 5 parálogos de TvAtg4 de *T. vaginalis* encontramos que todas las TvAtg4 presentaron 4 posibles motivos que cumplen con las características de la secuencia consenso pLIR. Sin embargo, solo uno de ellos se mostró conservado con los motivos pLIR de ScAtg4 (Abreu *et al.*, 2017). Una particularidad de estos motivos es que uno se encuentra en el extremo C-terminal y otra en el extremo N-terminal de la proteína. Por eso en la Figura 32 en color rosa identificamos los probables motivos APEAR y cLIR para **TvAtg4.1** y **TvAtg4. 4** que podrían estar mediando la interacción con TvAtg8 en su forma libre y en su forma conjugada, descartando a los otros dos motivos ya que se encuentran en la parte intermedia de la proteína.

Sin embargo, no solo se ha propuesto esta posible regulación. También se mencionó que la actividad proteolítica de Atg4 de tipo levadura y humano puede ser regulada por la fosforilación en un residuo de serina por la cinasa Atg1, esto podría activarla o inactivarla (Pengo *et al.*, 2017; Sánchez-Wandelmer *et al.*, 2017). Por ello también buscamos en las cinco Atg4 de tricomonas las posibles serinas que podrían ser fosforiladas. Encontramos que la **S** fosforilable de tipo Atg4 de levadura solo se encuentra conservada para **TvAtg4.4** y la de tipo Atg4 de humano se encontró conservada en todas la **TvAtg4** incluida la Atg4 de levadura. Esto nos lleva a preguntarnos ¿**TvAtg4.4** podría ser fosforilada en cualquiera de las dos serinas identificadas? ¿La fosforilación en ambas serinas, pero en diferentes momentos podría regular su actividad bajo diferentes condiciones nutricionales? o ¿Debido a que la posible fosforilación se presenta en las dos TvAtg4, la activación de una u otra podría ser de acuerdo con las condiciones nutricionales en las que se encuentre *T. vaginalis*? Aún faltan demasiados experimentos para poder dilucidar si se requiere de ambas o de solo una de las serinas fosforilables para la regulación de la actividad proteolítica de las diferentes TvAtg4 de tricomonas durante la autofagia inducida por diferentes condiciones ambientales y mediada por proteína cinasas como la Atg1.

Para saber a nivel bioinformático cuál de estas fosforilaciones tenía más probabilidad de llevarse a cabo, decidimos identificar con ayuda del programa NetPhos las posibles fosforilaciones en serina para ambas TvAtg4. Encontramos que para el caso de la **TvAtg4.1** la serina de tipo Atg4 de humano en la posición 246 sí fue reconocida como probable residuo fosforilable en el análisis bioinformático.

El método de red neuronal (NetPhos) es una predicción que incluye todos los sitios de fosforilación. Sin embargo, no podemos concluir que la S246 de **TvAtg4.1** puede ser la única serina fosforilable, a pesar de que este método de predicción bioinformático tiene varias ventajas ya que se consideran rápido, reproducible, está disponible públicamente y se ha demostrado ser suficientemente preciso no se puede afirmar el haber incluido todos los sitios posibles de fosforilación. Por lo que es importante complementar con conocimientos adicionales sobre sitios de fosforilación verificados experimentalmente (Blom *et al*, 1999).

Otro mecanismo de regulación para Atg4 reportado hasta ahora es la regulación por condiciones REDOX, ya que la actividad de esta CP se puede inhibir por la oxidación de un residuo de cisteína ubicado cerca de la cisteína catalítica. En levadura las proteínas Atg4 se activan por reducción y se inhiben reversiblemente por oxidación, esta modificación postraduccional también participa en el control de la actividad proteolítica de Atg4 (Pérez-Pérez *et al.*, 2021). Así que no descartamos que en las diferentes concentraciones de hierro pueda modificarse la actividad proteolítica de Atg4 en tricomonas por condiciones REDOX.

De acuerdo con la secuencia de aa de ambas proteínas TvAtg4 de *T. vaginalis* podría ocurrir un mecanismo similar en una regulación por condiciones REDOX al descrito en levadura.

Finalmente, ya que se había predicho a nivel bioinformático y corroborado con la literatura que las serinas presentes en **TvAtg4.1** y **TvAtg4.4** podrían estar siendo fosforiladas por cinasas como **TvAtg1.1** y **TvAtg1.5** en el siguiente esquema de trabajo incluimos las conclusiones del trabajo (Figura 41). En levadura se ha observado que la activación o el inicio de la autofagia es orquestado por la proteína cinasa Atg1. Esta proteína requiere unirse a un complejo de proteínas que incluyen a Atg13-Atg17-Atg29-Atg31. La activación de Atg1 es importante pues de esta manera podrá regular la actividad proteasa de Atg4 y así se puede llevar a cabo el proceso autofágico (Turco *et al.*, 2020).

¿Qué sucede en *T. vaginalis*? En este protozoo las proteínas que forman parte del complejo de activación para TvAtg1 están ausentes lo que nos lleva a la siguiente pregunta ¿Cómo se estará activando TvAtg1 en *T. vaginalis*? ¿Qué proteínas participan en el inicio del proceso autofágico?.

En nuestros resultados del análisis *in silico* de las proteínas **TvAtg1. 1** y **TvAtg1.5**, notamos que el tamaño de las proteínas es mucho más pequeño con respecto a HsULK1 y ScAtg1, esta diferencia importante en tamaños nos llevó a preguntarnos si ¿*Giardia lamblia* presentaba proteínas Atg1?, ya que como sabemos *T. vaginalis* y *G. lamblia* son los protistas de divergencia temprana. Y de ser así ¿Cuál era el tamaño de estas proteínas? De acuerdo con lo reportado por Rigden *et al.*, 2009, en su búsqueda de la maquinaria autofágica en diferentes protistas parásitos, *G. lamblia* presenta una proteína Atg1, sin

embargo, al buscar esta proteína en la base de datos del genoma de Giardia, encontramos que el código de identificación pertenece a una viroporina, continuamos con la búsqueda y encontramos que para *G. lamblia* hasta ahora solo se ha reportado un homólogo para la proteína Atg1 (ID de identificación: GL50803_17566), esta proteína tiene un tamaño de 643 aa, siendo más grande que las diferentes TvAtg1 de *T. vaginalis*. Al realizar el alineamiento de secuencias de aa observamos que, a pesar de la diferencia significativa en cuanto al tamaño, todas parecen conservar el dominio cinasa. Además, en el caso de HsULK1 y ScAtg1 la secuencia de aa que no pertenece al dominio cinasa, pertenece a los dos dominios MIT o dominios de interacción de microtúbulos (MIT1 y MIT2) en el extremo C-terminal y a una región que conecta al dominio cinasa con los dominios MIT que se encuentra intrínsecamente desordenada (IDR). En el caso de ULK1 la región IDR es mucho más grande. También se sabe que los dominios MIT interaccionan con los dominios MIT de Atg13 necesarios para la activación del complejo Atg1/ULK1 (Noda y Mizushima, 2016). La ausencia de estos dominios en TvAtg1.1 y TvAtg1.5 de *T. vaginalis* podría explicarse en que hasta ahora no se ha reportado que *T. vaginalis* presente un homólogo para la proteína Atg13 y por lo tanto no sea necesaria la interacción con la misma. Sin embargo, continuamos con la misma pregunta ¿Cómo se activa el complejo cinasa en *T. vaginalis*? Faltarían más estudios para identificar primero que proteínas forman parte del complejo cinasa y posteriormente saber cuál es su mecanismo de interacción.

Las CP son importantes factores de virulencia del protozoario parásito *T. vaginalis*, reguladas positiva o negativamente por hierro a nivel postranscripcional, mediante un sistema similar a IRE/IRP. Un ejemplo es TvCP4 regulada positivamente por hierro; en el extremo 5' del mRNA tiene estructuras tallo burbuja tipo IRE que unen proteínas tipo IRP (α -actinina-3) en restricción de hierro impidiendo que se unan los ribosomas y que no se realice la traducción del mensajero. En cambio, cuando se encuentra en altas concentraciones de hierro la proteína tipo IRP pierde la afinidad a las estructuras tallo burbuja, permitiendo la unión de los ribosomas y, por lo tanto, la traducción del mRNA (Calla-Choque *et al.*, 2014; Solano-González *et al.*, 2007; Torres-Romero y Arroyo, 2009).

Los resultados obtenidos en la RT-PCR para el gen *tvatg4.1*, en distintas concentraciones de hierro sugieren una regulación positiva por hierro a nivel de transcrito. Para identificar el tipo de mecanismo de regulación mediada por hierro primero buscamos en el extremo 5' río arriba del codón de inicio de la traducción del gen *tvatg4.1*, el elemento de ADN de respuesta a hierro, este promotor se caracteriza por tener una secuencia consenso **AGATAACGA** y hasta ahora solamente ha sido identificado en el gen *ap65-1* que codifica a AP65, una de las adhesinas más abundantes de tricomonas. La presencia de este elemento de respuesta a hierro en el gen *ap65-1* regula su transcripción de manera positiva inducida por hierro (Tsai *et al*, 2002). Sin embargo, no encontramos algo parecido al promotor de respuesta a hierro en el gen *tvatg4.1* (Figura 40).

```
>DS114357 | Trichomonas vaginalis G3 | 4336 to 5629 (reverse-
complement)
TCTTTACAGCCTCACTGCAAATGTGGAAATTTAGGTTCCACATCCTTTTATTCTTGTTCT
AGCTCCATTTTACATTATGATTAATAAAAAATTACCTCTTTTTTATATCATTTTTTTTCA
AAAAAGTGACAGGTCTCTCAATTTTCGTATTATAAATCTTTGAAACGTTAATTGAATGTA
AATAGAATCAAATTTTATGAATGACTGTGATTTTGGGAACCACCATCATACAATCTGATA
```

Figura 40. Identificación del elemento sensible a hierro en el gen *tvatg4.1*. En color azul claro se observa el codón de inicio de la *traducción*, se tomaron 200 nucleótidos río arriba del codón de inicio de la *traducción*.

Lo que corrobora hasta ahora que este tipo de regulación sólo se ha encontrado en el gen *ap65-1*. Además, con los análisis obtenidos hasta la fecha no podríamos confirmar que se trate de una regulación a nivel postranscripcional mediante un sistema tipo IRE/IRP, ya que solo hemos obtenido resultados a nivel transcrito. Por lo que necesitamos hacer más experimentos. Sin embargo, no podemos dejar de lado que tampoco conocemos la expresión del gen *tvatg4.1* al nivel de proteína y en qué condiciones ambientales se encuentra regulada. Pero si observamos que las diferentes condiciones ambientales a nivel de transcrito influyen en el nivel de expresión.

Por otro lado, a nivel de transcrito en restricción de glucosa se han reportado niveles de expresión altos para TvAtg4.1 (Huang *et al.*, 2014) y a nivel de proteína en la inducción del pseudoquiste en restricción de hierro se ha reportado a la proteína **TvAtg4.4** (Dias-Lopes *et al.*, 2018), así también en este proteoma se ha reportado a la cinasa **TvAtg1.5** y en la búsqueda a nivel de Blast una de las primeras proteínas identificadas como cinasa fue **TvAtg1.1** (Rigden *et al.*, 2009).

En estudios previos se ha confirmado la presencia de autofagia en *T. vaginalis*, se proponen que ambos parálogos de Atg8 de este protozooario funcionan como marcadores de autofagia. Tomando en cuenta los resultados reportados hasta ahora por los diferentes grupos de trabajo, podemos observar que *T. vaginalis* realiza el proceso autofágico con la maquinaria mínima. Finalmente, el conjunto de nuestros resultados nos permite proponer el estudio de las cisteína proteasas **TvAtg4.1** y **TvAtg4.4** en un futuro para dilucidar el papel que tienen durante el proceso autofágico en *T. vaginalis*.

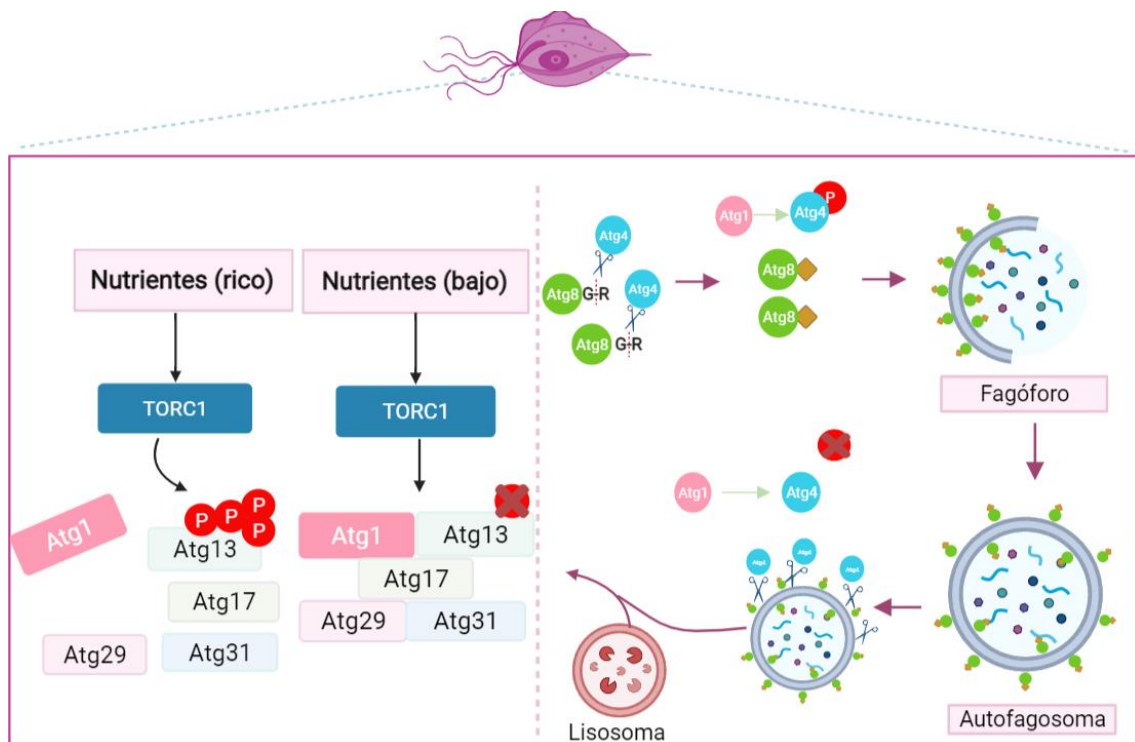


Figura 41. Esquema de la regulación del proceso autofágico en *T. vaginalis*. Recuadro en la parte izquierda, se observa la activación de la proteína cinasa Atg1 posiblemente por acción directa del complejo de iniciación (Atg13, Atg17, Atg29, Atg31 representados en color pálido) que

se encuentra ausente en *T. vaginalis*. Recuadro en la parte derecha, se observa el flujo autofágico que debería seguirse durante la formación de autofagosomas y autolisosomas (Esquema adaptado de Xie y Klionsky, 2007; Sánchez-Wandelmer *et al.*, 2017) .

9 Conclusiones

En este trabajo identificamos por análisis *in silico* en TvAtg4.1 y TvAtg4.4 los dominios y secuencias necesarios para mantener una interacción con Atg8, así como también para la activación de las CPs. También identificamos a las cinasas TvAtg1.1 y TvAtg1.5 que podrían regular la actividad proteolítica de TvAtg4 mediante ciclos de fosforilación y desfosforilación. Además, encontramos que al menos en el gen *tvatg4.1* las condiciones ambientales influyen en su expresión a nivel de transcrito. Sin embargo, aún queda mucho por explorar a nivel experimental para poder asegurar que las interacciones entre estas moléculas (TvAtg1-TvAtg4-TvAtg8) se puedan llevar a cabo durante la autofagia en tricomonas.

10 Perspectivas

- Caracterizar a la CP TvAtg4.4.
- Identificar el mecanismo de regulación mediado por hierro de la expresión de TvAtg4.4.
- Identificar si TvAtg8b funciona como sustrato de TvAtg4.4 y si ésta depende de hierro.
- Identificar la regulación de la actividad proteolítica de TvAtg4.4 posiblemente mediada por fosforilación y desfosforilación de algunas de sus serinas.
- Identificar la posible interacción entre TvAtg4.4 y TvAtg1 y el efecto de hierro en dicha interacción.

11 Referencias

- Abreu, S. *et al.* (2017) 'Conserved Atg8 recognition sites mediate Atg4 association with autophagosomal membranes and Atg8 deconjugation', *EMBO reports*. EMBO, 18(5), pp. 765–780.
- Afzan, M. Y. y Suresh, K. (2012) 'Pseudocyst forms of *Trichomonas vaginalis* from cervical neoplasia', *Parasitology Research*. Springer, 111(1), pp. 371–381.
- Agrotis, A. *et al.* (2019) 'Redundancy of human ATG4 protease isoforms in autophagy and LC3/GABARAP processing revealed in cells', *Autophagy*. Taylor and Francis Inc., 15(6), pp. 976–997.
- Amerik, A. Y. y Hochstrasser, M. (2004) 'Mechanism and function of deubiquitinating enzymes', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier, pp. 189–207.
- Arroyo, R. *et al.* (2015) 'Trichomonas vaginalis cysteine proteinases: Iron response in gene expression and proteolytic activity', *BioMed Research International*. Hindawi Limited.
- Atkinson, H. J., Babbitt, P. C. y Sajid, M. (2009) 'The global cysteine peptidase landscape in parasites', *Trends in Parasitology*, 25(12), pp. 573–581.
- Badadani, M. (2012) 'Autophagy Mechanism, Regulation, Functions, and Disorders', *ISRN Cell Biology*. Hindawi Limited, 2012, pp. 1–11.
- BAGCHI, S. *et al.* (2012) 'Programmed cell death in *Giardia*', *Parasitology*. Cambridge University Press, 139(7), pp. 894–903
- Barrett, A. J. (2000) 'Proteases', *Current Protocols in Protein Science*. Wiley, 21(1), pp. 21.1.1-21.1.12.
- Barrett, A. J. y Rawlings, N. D. (1996) Families and clans of eysteine peptidases.
- Beri, D. *et al.* (2020) 'Demonstration and Characterization of Cyst-Like Structures in the Life Cycle of *Trichomonas vaginalis*', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A., 9, p. 430.

Besteiro, S. (2013) 'Autophagy in Parasitic Protists', in *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*. Elsevier Inc., pp. 185–195.

Birgisdottir, Á. B., Lamark, T. y Johansen, T. (2013) 'The LIR motif - crucial for selective autophagy', *Journal of Cell Science*. The Company of Biologists Ltd, pp. 3237–3247.

Blom, N., Gammeltoft, S. y Brunak, S. (1999) 'Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites', *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 294(5), pp. 1351–1362.

Brennan, A. *et al.* (2011) 'Autophagy in parasitic protists: Unique features and drug targets', *Molecular and Biochemical Parasitology*. Elsevier B.V., pp. 83–99.

Brömme, D. y Wilson, S. (2011) 'Role of Cysteine Cathepsins in Extracellular Proteolysis', in *Extracellular Matrix Degradation*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 23–51.

Cárdenas-Guerra, R. E. *et al.* (2013) 'The iron-induced cysteine proteinase TvCP4 plays a key role in *Trichomonas vaginalis* haemolysis', *Microbes and Infection*. Elsevier Masson, 15(13), pp. 958–968.

Cheon, S. H. *et al.* (2013) 'The dimension of *Trichomonas vaginalis* as measured by scanning electron microscopy', *Korean Journal of Parasitology*. The Korean Society for Parasitology and Tropical Medicine, 51(2), pp. 243–246.

Cuervo, A. M. y Wong, E. (2014) 'Chaperone-mediated autophagy: Roles in disease and aging', *Cell Research*. Nature Publishing Group, pp. 92–104. doi: 10.1038/cr.2013.153.

Dias-Lopes, G. *et al.* (2017) 'Morphologic study of the effect of iron on pseudocyst formation in *Trichomonas vaginalis* and its interaction with human epithelial cells', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. Fundacao Oswaldo Cruz, 112(10), pp. 664–673.

Dias-Lopes, G. *et al.* (2018) 'In-Depth Quantitative Proteomic Analysis of Trophozoites and Pseudocysts of *Trichomonas vaginalis*', *Journal of Proteome Research*. American Chemical Society, 17(11), pp. 3704–3718.

- Dunn, B. M. (2003) 'Peptidases', *Current Protocols in Protein Science*. Wiley, 32(1), pp. 21.0.1-21.0.2.
- Duszenko, M. *et al.* (2011) 'Autophagy in protists', *Autophagy*. Taylor and Francis Inc., 7(2), pp. 127–158.
- Edwards, T. *et al.* (2016) 'Trichomonas vaginalis: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis', *Critical Reviews in Microbiology*. Taylor and Francis Ltd, pp. 406–417.
- Espinosa, N. *et al.* (2002) 'Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in Trichomonas vaginalis mRNAs', *Gene*. Elsevier, 289(1–2), pp. 81–86.
- Figuroa-Angulo, E. E. *et al.* (2012) 'The effects of environmental factors on the virulence of Trichomonas vaginalis', *Microbes and Infection*. Elsevier Masson, 14(15), pp. 1411–1427.
- Fujita, N. *et al.* (2008) 'The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy', *Molecular Biology of the Cell*. The American Society for Cell Biology, 19(5), pp. 2092–2100.
- Glick, D., Barth, S. y Macleod, K. F. (2010) 'Autophagy: Cellular and molecular mechanisms', *Journal of Pathology*. NIH Public Access, pp. 3–12.
- Harp, D. F. y Chowdhury, I. (2011) 'Trichomoniasis: Evaluation to execution', *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. Elsevier Ireland Ltd, pp. 3–9.
- Hernández-García, M. S. *et al.* (2019) 'Biogenesis of Autophagosome in Trichomonas vaginalis during Macroautophagy Induced by Rapamycin-treatment and Iron or Glucose Starvation Conditions', *Journal of Eukaryotic Microbiology*. Blackwell Publishing Inc., 66(4), p. jeu.12712.
- Hooper, N. M. (2002) 'Proteases: A primer', *Essays in Biochemistry*. Portland Press Ltd., pp. 1–8.
- Huang, K. Y. *et al.* (2014) 'Adaptive responses to glucose restriction enhance cell survival, antioxidant capability, and autophagy of the protozoan parasite Trichomonas vaginalis', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. Elsevier, 1840(1), pp. 53–64.

- Huang, K. Y. *et al.* (2019) 'Potential role of autophagy in proteolysis in *Trichomonas vaginalis*', *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. Elsevier Ltd, 52(2), pp. 336–344.
- Jung, C. H. *et al.* (2010) 'mTOR regulation of autophagy', *FEBS Letters*. Elsevier, pp. 1287–1295.
- Kirisako, T. *et al.* (2000) 'The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway', *Journal of Cell Biology*. The Rockefeller University Press, 151(2), pp. 263–275.
- Kissinger, P. (2015a) 'Epidemiology and Treatment of Trichomoniasis', *Current Infectious Disease Reports*. Current Medicine Group LLC 1, p. 484.
- Kissinger, P. (2015b) 'Trichomonas vaginalis: A review of epidemiologic, clinical and treatment issues', *BMC Infectious Diseases*. BioMed Central Ltd., pp. 1–8.
- Klionsky, D. J. (2005) 'The molecular machinery of autophagy: Unanswered questions', *Journal of Cell Science*. The Company of Biologists, 118(1), pp. 7–18.
- Kumanomidou, T. *et al.* (2006) 'The crystal structure of human Atg4b, a processing and de-conjugating enzyme for autophagosome-forming modifiers', *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 355(4), pp. 612–618.
- Lazarus, M. B., Novotny, C. J. y Shokat, K. M. (2015) 'Structure of the Human Autophagy Initiating Kinase ULK1 in Complex with Potent Inhibitors', *ACS Chemical Biology*. American Chemical Society, 10(1), pp. 257–261.
- Levine, B. y Kroemer, G. (2008) 'Autophagy in the Pathogenesis of Disease', *Cell*. Cell Press, pp. 27–42.
- Li, M. *et al.* (2011) 'Kinetics comparisons of mammalian Atg4 homologues indicate selective preferences toward diverse Atg8 substrates', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 286(9), pp. 7327–7338.
- Li, M. *et al.* (2017) 'Measurement of the Activity of the Atg4 Cysteine Proteases', in *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc., pp. 207–225.

- Licheva, M. *et al.* (2021) 'Phosphoregulation of the autophagy machinery by kinases and phosphatases', <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1909407>. Taylor & Francis.
- Liston, D. R. y Johnson, P. J. (1999) 'Analysis of a Ubiquitous Promoter Element in a Primitive Eukaryote: Early Evolution of the Initiator Element', *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology, 19(3), pp. 2380–2388.
- Longatti, A. y Tooze, S. A. (2009) 'Vesicular trafficking and autophagosome formation', *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group, pp. 956–965.
- Maruyama, T. y Noda, N. N. (2018) 'Autophagy-regulating protease Atg4: Structure, function, regulation and inhibition', *Journal of Antibiotics*. Nature Publishing Group, pp. 72–78.
- McKerrow, J. H. (2018) 'The diverse roles of cysteine proteases in parasites and their suitability as drug targets', *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Edited by P. J. Brindley. Public Library of Science, 12(8), p. e0005639.
- Mercer, F. y Johnson, P. J. (2018) 'Trichomonas vaginalis: Pathogenesis, Symbiont Interactions, and Host Cell Immune Responses', *Trends in Parasitology*. Elsevier Ltd, pp. 683–693.
- Meza-Cervantez, P. *et al.* (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*. Microbiology Society, 157(12), pp. 3469–3482.
- Mizushima, N. (2007) 'Autophagy: Process and function', *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 2861–2873.
- Mizushima, N. (2020) 'The ATG conjugation systems in autophagy', *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Ltd, pp. 1–10.
- Moreno-Brito, V. *et al.* (2005) 'A Trichomonas vaginalis 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron', *Cellular Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 7(2), pp. 245–258.

- Mottram, J. C. *et al.* (2003) 'Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa', *Trends in Parasitology*. Elsevier Ltd, pp. 182–187.
- Nakatogawa, H. *et al.* (2009) 'Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: Lessons from yeast', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, pp. 458–467. d
- Noda, N. N. y Mizushima, N. (2016) 'Atg101: Not Just an Accessory Subunit in the Autophagy-initiation Complex', *Cell Structure and Function*. Japan Society for Cell Biology, 41(1), pp. 13–20.
- Pengo, N. *et al.* (2017) 'A reversible phospho-switch mediated by ULK1 regulates the activity of autophagy protease ATG4B', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 8(1), pp. 1–10.
- Pereira-Neves, A. *et al.* (2011) 'Identification of *Tritrichomonas foetus* pseudocysts in fresh preputial secretion samples from bulls', *Veterinary Parasitology*. Elsevier B.V., 175(1–2), pp. 1–8.
- Pereira-Neves, A., Ribeiro, K. C. y Benchimol, M. (2003) 'Pseudocysts in Trichomonads - New Insights', *Protist*. Elsevier GmbH, 154(3–4), pp. 313–329.
- Pérez-Pérez, M. E., Lemaire, S. D. y Crespo, J. L. (2021) 'The ATG4 protease integrates redox and stress signals to regulate autophagy', *Journal of Experimental Botany*. Oxford Academic, 72(9), pp. 3340–3351.
- Periyasamy-Thandavan, S. *et al.* (2009) 'Autophagy: Molecular machinery, regulation, and implications for renal pathophysiology', *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. American Physiological Society, pp. 244–256.
- Petrin, D. *et al.* (1998) 'Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*', *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology, pp. 300–317.
- Rauch, J. *et al.* (2011) 'The secret life of kinases: Functions beyond catalysis', *Cell Communication and Signaling*, 9.
- Rawlings, N. D. y Barrett, A. J. (1993) Evolutionary families of peptidases, *Biochem. J.*

Rawlings, N. D. y Barrett, A. J. (1999) 'MEROPS: The peptidase database', *Nucleic Acids Research*. Oxford Academic, pp. 325–331.

Rawlings, N. D. y Barrett, A. J. (2005) 'Peptidases, families, and clans', in *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. John Wiley & Sons, Ltd.

Rawlings, N. D. y Barrett, A. J. (2014) 'Peptidases', in *eLS*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

Rawlings, N. D., Tolle, D. P. y Barrett, A. J. (2004) 'MEROPS: The peptidase database', *Nucleic Acids Research*. Oxford Academic, 32(DATABASE ISS.), pp. D160–D164.

Rigden, D. J., Michels, P. A. y Ginger, M. L. (2009) 'Autophagy in protists: Examples of secondary loss, lineage-specific innovations, and the conundrum of remodeling a single mitochondrion', *Autophagy*. Taylor and Francis Inc., 5(6), pp. 784–794.

Rivera-Rivas, L. A. *et al.* (2020) 'The effect of iron on *Trichomonas vaginalis* TvCP2: A cysteine proteinase found in vaginal secretions of trichomoniasis patients', *Parasitology*. Cambridge University Press, 147(7), pp. 760–774.

Ryu, J. S. y Min, D. Y. (2006) 'Trichomonas vaginalis and trichomoniasis in the Republic of Korea.', *The Korean journal of parasitology*. The Korean Society for Parasitology, pp. 101–116.

Sakamoto, H., Nakada-Tsukui, K. y Besteiro, S. (2021) 'The Autophagy Machinery in Human-Parasitic Protists; Diverse Functions for Universally Conserved Proteins', *Cells*. NLM (Medline).

Sánchez-Wandelmer, J. *et al.* (2017) 'Atg4 proteolytic activity can be inhibited by Atg1 phosphorylation', *Nature Communications* 2017 8:1. Nature Publishing Group, 8(1), pp. 1–10.

Sánchez-Wandelmer, J. y Reggiori, F. (2017) 'Atg4 in autophagosome biogenesis', *Oncotarget*. Impact Journals LLC, pp. 108290–108291.

Santos, O. dos *et al.* (2015) 'Optimal Reference Genes for Gene Expression Normalization in *Trichomonas vaginalis*', PLOS ONE. Public Library of Science, 10(9), p. e0138331.

Schwebke, J. R. *et al.* (2011) 'Molecular testing for *Trichomonas vaginalis* in women: Results from a prospective U.S. clinical trial', Journal of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology Journals, 49(12), pp. 4106–4111. doi: 10.1128/JCM.01291-11.

Schwebke, J. R. and Burgess, D. (2004) 'Trichomoniasis', Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology Journals, pp. 794–803.

Sehgal, R., Goyal, K. y Sehgal, A. (2012) 'Trichomoniasis and lactoferrin: Future prospects', Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology.

Shintani, T. y Klionsky, D. J. (2004) 'Autophagy in health and disease: A double-edged sword', Science. American Association for the Advancement of Science, pp. 990–995.

Shpilka, T. *et al.* (2011) 'Atg8: An autophagy-related ubiquitin-like protein family', Genome Biology. BioMed Central, 12(7), p. 226.

Shu, C. W. *et al.* (2010) 'Synthetic substrates for measuring activity of autophagy proteases: Autophagins (Atg4)', Autophagy. Taylor and Francis Inc., 6(7), pp. 936–947.

Sobolev, O. V. *et al.* (2020) 'A Global Ramachandran Score Identifies Protein Structures with Unlikely Stereochemistry', Structure. Cell Press, 28(11), pp. 1249-1258.e2.

Squire, D. S. *et al.* (2020) 'Population structure and genetic diversity of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates in Australia and Ghana', Infection, Genetics and Evolution. Elsevier B.V., 82, p. 104318.

Solano-González, E. *et al.* (2007) 'The trichomonad cysteine proteinase TVCP4 transcript contains an iron-responsive element', FEBS Letters. No longer published by Elsevier, 581(16), pp. 2919–2928

Sugawara, K. *et al.* (2005) 'Structural basis for the specificity and catalysis of human Atg4B responsible for mammalian autophagy', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 280(48), pp. 40058–40065.

Suzuki, K. y Ohsumi, Y. (2007) 'Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*', *FEBS Letters*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 2156–2161.

Torres-Romero, J. C. y Arroyo, R. (2009) 'Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: Evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE/IRP-like system', *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier, 9(6), pp. 1065–1074.

Turco, E., Fracchiolla, D. y Martens, S. (2020) 'Recruitment and Activation of the ULK1/Atg1 Kinase Complex in Selective Autophagy', *Journal of Molecular Biology*. Elsevier, 432(1), p. 123.

Turk, B., Turk, D. y Turk, V. (2000) 'Lysosomal cysteine proteases: More than scavengers', *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. Elsevier, pp. 98–111.

Turk, V. *et al.* (2012) 'Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers', *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. Elsevier, pp. 68–88.

Turk, V., Turk, B. y Turk, D. (2001) 'Lysosomal cysteine proteases: Facts and opportunities', *EMBO Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 4629–4633.

Tsai, C. D., Liu, H. W. y Tai, J. H. (2002) 'Characterization of an Iron-responsive Promoter in the Protozoan Pathogen *Trichomonas vaginalis*', *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier, 277(7), pp. 5153–5162.

Verma, S., Dixit, R. y Pandey, K. C. (2016) 'Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets', *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A., 7(APR), p. 107.

Vieira, P. de B. et al. (2015) 'Iron from haemoglobin and haemin modulates nucleotide hydrolysis in *Trichomonas vaginalis*', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. Fundacao Oswaldo Cruz*, 110(2), pp. 201–208.

De Waaij, D. J. et al. (2017) 'Prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection and protozoan load in South African women: A cross-sectional study', *BMJ Open*. BMJ Publishing Group, 7(10), p. e016959.

Wesselborg, S. y Stork, B. (2015) 'Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks', *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG, 72(24), pp. 4721–4757.

Xie, Z. y Klionsky, D. J. (2007) 'Autophagosome formation: Core machinery and adaptations', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, pp. 1102–1109.

Yang, Q., Wang, R. y Zhu, L. (2019) 'Chaperone-Mediated Autophagy', in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, pp. 435–452.

Yang, Z. y Klionsky, D. J. (2010) 'Mammalian autophagy: Core molecular machinery and signaling regulation', *Current Opinion in Cell Biology*. NIH Public Access, pp. 124–131.

Yin, Z., Pascual, C. y Klionsky, D. J. (2016) 'Autophagy: Machinery and regulation', *Microbial Cell*. Shared Science Publishers OG, pp. 588–596.