

**UACM**

Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

*Nada humano me es ajeno*

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO**

**COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

**POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS**

**Determinar el posible mecanismo de regulación de la  
expresión génica de *mp50* de *Trichomonas vaginalis* en  
presencia de  $Zn^{2+}$**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS GENÓMICAS**

**P R E S E N T A :**

**JOSÉ LUIS VILLALPANDO AGUILAR**

**DIRECTORA**

**DRA MARÍA ELIZBETH ÁLVAREZ SÁNCHEZ**

**POSGRADO  
EN CIENCIAS  
GENÓMICAS**

Ciudad de México, Agosto, 2018

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

#### DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

## **INTEGRACIÓN DEL JURADO:**

Presidente: **Dra. Minerva Camacho Nuez UACM**

Secretario: **Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez UACM**

Vocal: **Dr. Rodrigo Arreola Alemón INPRF**

1<sup>er</sup>. Suplente: **Dra. Rosalía Lira Carmona IMSS**

Plantel de adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

## **DIRECTOR**

---

**Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez**

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

## **ASESORAS**

### **Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga**

Profesora Investigadora.

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

### **Dra. Minerva Camacho Nuez**

Profesora Investigadora.

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

### **Dra. Rossana Arroyo Verástegui**

Investigador titular

Departamento de infectómica y Patogénesis Molecular.

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

### **Dra. Itzel Quintas Granados**

Investigadora de Carrera

Universidad Mexiquense del Bicentenario,

Unidad de Estudios Superiores de Tultitlán

### **Dra. Rosalía Lira Carmona**

Unidad de Investigación Médica

en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias.

Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Instituto Mexicano del Seguro Social IMSS

## **Agradecimientos**

El presente proyecto de investigación fue realizado en el laboratorio 1 en el Posgrado de Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, bajo la dirección de Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez y bajo la asesoría de la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga, Dra Minerva Camacho Nuez, Dra. Rossana Arroyo Verástegui y la Dra. Itzel Quintas Granados.

El proyecto fue financiado con fondos del Instituto de Ciencia y tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) con No. de proyecto: PIFUTP08-150 número de convenio ICyTDF/321/2009 y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el No. de proyecto: 83808. Agradezco a las instituciones por su apoyo académico y económico beca: al SECITI (antes ICyTDF): SRI/65/2011, al COMECYT: 14BTD0104 y de la UACM: 2014-I-XIIPS45, 2014-II-SBA-896, 2015-I-RBD-2015-I-04158, 2015-II-RENDB18, 2016-I-RBD-2016-I-11087.

Aprovecho para externar mi agradecimiento a los lectores de tesis que analizaron y revisaron esta tesis (Dra. Minerva Camacho Nuez, Dr. Rodrigo Arreola Alemón y la Dra. Rosalia Lira Carmona) muchas gracias.

Por ultimo quiero agradecer a todo aquel que brindo apoyo, consejo o compartió sus conocimientos para poder culminar con este proyecto, son tantas personas. De verdad les agradezco su apoyo, voluntad, las críticas, las discusiones.

Sin duda, he de reconocer que fue un reto difícil que me puso contra las cuerdas en algunos capítulos, donde casi tiraba “la toalla”, sin embargo, siempre había alguien que me insistía en que continuar era el camino...

De todo corazón a todos... infinitas gracias ...

## **Dedicatoria**

Para mí amada familia Villalpando Aguilar, quienes me inspiran a cada paso, ni han dejado de apoyarme, esto es para mi papá Mario Villalpando Diosdado, mi mamá Enriqueta Aguilar Hernández, mis hermanas Celia, Liliana y Alina Villalpando Aguilar y mi hermano Mario Villalpando Aguilar, además lo dedico a mí cuñado Miguel González y a mis sobrinos Brayan, Francisco, Roberto y Rebeca.

De manera muy especial se lo dedico a mí esposa Itzel López Rosas y a su hermosa familia, su mamá la Sra. Silvia Rosas y sus Hijos.

Además lo dedico a la adversidad que nos permite aprender y superarnos a sí mismos en todo momento.

Principalmente lo dedico a mi gran pasión “la ciencia” que me llena de placeres que nunca jamás hubiera pensado disfrutar, que siempre es fresca y nos enseña que siempre hay algo nuevo que aprender.

## Abreviaturas

<i>ap33</i>	Gen que codifica a la adhesina de 33 kDa
<i>ap65</i>	Gen que codifica a la adhesina de 63 kDa
ArsR-SMTB	Represor metaloregulador transcripcional de procarionte
AP120	Adhesina de 120 kDa de <i>T. vaginalis</i>
AP65	Adhesina de 65 kDa de <i>T. vaginalis</i>
AP51	Adhesina de 51 kDa de <i>T. vaginalis</i>
AP33	Adhesina de 33 kDa de <i>T. vaginalis</i>
AP23	Adhesina de 23 kDa de <i>T. vaginalis</i>
AURE/ARE	elemento rico en adeninas (A) y uracilos (U)
$\beta$ HPP	Proteínasa procesadora hidrógenosomal subunidad $\beta$
c.b.p	Cuanto basta para
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
CNCD147	Aislado de <i>T. vaginalis</i> obtenido de mujer
CIP	Fosfatasa alcalina de intestino de camarón
CPs	Cisteín proteinasas
C2H2-ZNFm	Motivo dedo de zinc C2H2
D	Ácido aspártico
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNAg	DNA genómico
dNTPs	Deoxinucléotidos tri-fosfatados
E	Ácido glutámico
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilén diaiminotetra acético
ESTs	Marcas de secuencia de expresión
EMSA	Ensayo de retardo de movilidad electroforética
g	Gramos
GTP-BP	proteína de unión a GTP
H	Histidina
HCl	Ácido clorhídrico
HGMN01	Aislado de <i>T. vaginalis</i> obtenido de hombre
h	Horas
HN	Aislado HGMN01 crecido en ausencia de $Zn^{2+}$ de <i>T. vaginalis</i>
HZ	Aislado HGMN01 crecido en presencia de $Zn^{2+}$ de <i>T. vaginalis</i>
Inr	Elemento regulador del inicio de la transcripción
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D- tiogalactopiranosido
I.T.S.	Infecciones de transmisión sexual
IREs	Elemento de respuesta a hierro
IRPs	Proteínas reguladora por hierro
kDa	Kilodaltones
LB	Medio Luria –Broth

LPG	Lipofosfoglicanos
µg	Microgramos
µl	Microlitros
ml	Militros
mM	Milimolar
MRE	Elementos de respuesta a metal
MN	Aislado CNCD147 crecido en ausencia de Zn <sup>2+</sup> de <i>T. vaginalis</i>
MZ	Aislado CNCD147 crecido en presencia de Zn <sup>2+</sup> de <i>T. vaginalis</i>
NAAT	Prueba de amplificación de ácidos nucleicos
nm	Nanómetros
MS	Espectrometría de masas
<i>mp50</i>	Gen que codifica para la proteína TvMP50
MTF-1	Factor de transcripción de respuesta a metal 1
O.D.	Densidad Óptica
O.N.	Toda la noche
ORF	“Open Reading Frame” (Marco abierto de lectura)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida nativo
PAT-PCR	Análisis de longitudes de poli (A) por PCR
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDI	Proteína Disulfuro Isomerasa
PFO	Piruvato:ferrodoxin oxidoreductasa
pH	Potencial de hidrógeno
PI	Punto isoelectrico
PSA	Persulfato de amonio
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
RNA <sub>t</sub>	Ácido ribonucleico de transferencia
RNA <sub>i</sub>	Ácido ribonucleico de interferencia
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa retrotranscriptasa
SC	Suero de caballo
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante
SPI	Suero preinmune
T.A.	Temperatura ambiente
TAE	amortiguador-Tris-Acetato-EDTA
TAP	Pirofosfatasa acida de tabaco
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametiletilendiamina
TrichDB	Base de datos del genoma de <i>T. vaginalis</i>
TF	Factor de Transcripción
TvCP12	Cisteína proteinasa de 12 kDa de <i>T. vaginalis</i>
TvCP30	Cisteína proteinasa de 30 kDa de <i>T. vaginalis</i>
TvCP39	Cisteína proteinasa de 39 kDa de <i>T. vaginalis</i>

TvCP65	Cisteína proteinasa de 65 kDa de <i>T. vaginalis</i>
TvENO-1	Proteína Enolasa 1 de <i>T. vaginalis</i>
TvGP63	proteína de superficie tipo gp63 de <i>T. vaginalis</i>
TvGAPDH	Glyceraldehydo 3-fosfato deshidrogenasa de <i>T. vaginalis</i>
TMD	Dominio transmembranal
TpLRR	receptor rico en leucinas tipo bspa de <i>t. vaginalis</i>
TvF	Factor de 250 kDa de <i>T. vaginalis</i>
TvMP50	Metaloproteinasa de 50 kDa de <i>T. vaginalis</i>
<i>tvcp39</i>	Gen que codifica para la proteína TvCP39
<i>tvfim1</i>	Gen que codifica para la proteína Fimbrina 1
<i>tvznf1</i>	Gen que codifica para la proteína TvZNF1
TvZNF1	Proteína de dedos de zinc 1 de <i>T. vaginalis</i>
TvZNF1r	Proteína de dedos de zinc uno de <i>T. vaginalis recombinante</i>
TYM	Trypticasa-extracto de levadura y Maltosa
<i>T. vaginalis</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
UTR	Referente a la región no traducida de un gen
5'UTR	Región no traducida en el extremo 5' del DNA/RNAm
3'UTR	Región no traducida en el extremo 3' del DNA/RNAm
V	Volts
VECs	Células del epitelio vaginal
Zap1	Regulador transcripcional de respuesta a zinc 1
Zn <sup>2+</sup>	Elemento metálico Zinc (Cinc) con valencia +2
ZNFm	Motivo de dedo de zinc/Dominio de dedo zinc
ZNF	Proteína(s) con motivo(s) de dedo de zinc

# Índice

	Página
Portada	I
Integración del jurado	II
Asesoras	III
Agradecimientos	IV
Dedicatoria	V
Abreviaturas	VI
Índice	IX
Índice de tablas	XII
Índice de figuras	XIII
Resumen	1
Abstract	2
1 Introducción	3
1.1 Epidemiología	4
2 Manifestaciones clínicas	6
2.1 Tricomoniasis femenina	6
2.2 Tricomoniasis masculina	7
3 Morfología de <i>T. vaginalis</i>	7
4 Genoma de <i>T. vaginalis</i>	10
4.1 Expansión del genoma de <i>T. vaginalis</i>	10
4.2 Genes del metabolismo de <i>T. vaginalis</i>	12
5 Metabolismo en <i>T. vaginalis</i>	12
5.1 Carbohidratos y metabolismo energético	12
5.2 Metabolismo de lípidos en <i>T. vaginalis</i>	13
5.3 Metabolismo de aminoácidos en <i>T. vaginalis</i>	13
5.4 Metabolismo de nucleótidos en <i>T. vaginalis</i>	14
5.5 Metabolismo de poliaminas en <i>T. vaginalis</i>	14
6 Ciclo de vida de <i>T. vaginalis</i>	14
7 Diagnóstico de tricomoniasis	16
8 Tratamiento de tricomoniasis	17
8.1 Resistencia de <i>T. vaginalis</i> a metronidazol	17
9 Patogenicidad	18
9.1 Citoadherencia	18
9.2 Citotoxicidad	20
9.3 Apoptosis	21
9.4 Fagocitosis	22
9.5 Hemólisis	22
9.6 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune	23
10 Regulación génica en eucariontes	24
10.1 Interrelación entre inicio de la transcripción vs estabilidad del RNAm	29
11 Estudio de los metales pesados en la célula	30
11.1 Regulación génica en respuesta a metales pesados	32
12 Factores de transcripción tipo dedos de zinc C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	36
13 Metaloproteinasas	38
14 Regulación de la expresión génica de metaloproteinasas	42
15 Regulación de la expresión génica en <i>T. vaginalis</i>	44
15.1 Regulación génica mediado por hierro en <i>T. vaginalis</i>	47
15.2 Regulación post transcripcional mediante el sistema IRE/IRP en <i>T. vaginalis</i>	47
15.3 Regulación génica mediado por poliaminas en <i>T. vaginalis</i>	48

16	Estudio de los factores de transcripción en <i>T. vaginalis</i>	50
17	Metaloproteinasas en <i>T. vaginalis</i> .	51
18	Antecedentes directos	53
19	Justificación	56
20	Hipótesis	57
21	Objetivo general	57
21.1.	Objetivos particulares	57
22	Estrategia experimental	58
23	Materiales y Métodos	59
23.1.	Cultivos celulares y aislados de <i>T. vaginales</i>	59
23.1.1.	Cultivo de parásitos <i>T. vaginalis</i>	59
23.1.2.	Cultivos de líneas celulares	59
23.2	Caracterización del RNAm de <i>mp50</i> de <i>T. vaginalis</i>	59
23.2.1.	Diseño de oligonucleótidos	59
23.2.2.	Extracción de DNA genómico de <i>T. vaginalis</i>	61
23.2.3.	Extracción de RNA total de <i>T. vaginalis</i>	61
23.2.4.	Tratamiento de RNA con DNAsal (Promega)	62
23.2.5.	Síntesis de cDNA	62
23.2.6.	Ensayo de 5'RACE de <i>mp50</i> de <i>T. vaginalis</i>	62
23.2.7.	PAT-PCR (Salles y Strickland, 1995)	65
23.2.8.	Ensayo de estabilidad de RNAm de <i>mp50</i> de <i>T. vaginalis</i>	66
23.2.9.	Amplificación por PCR de la región intergénica 5' de <i>mp50</i> de <i>T. vaginalis</i> .	67
23.3.	Expresión génica de <i>tvznf1</i> , clonación, Subclonación y expresión de TvZNF1r de <i>T. vaginalis</i> .	67
23.3.1.	Expresión de RNAm de <i>tvznf1</i> en ausencia y presencia de Zn <sup>2+</sup> de <i>T. vaginalis</i>	67
23.3.2.	Amplificación por RT-PCR del gen completo de <i>tvznf1</i> de <i>T. vaginalis</i>	68
23.3.3.	Purificación de productos de PCR desde gel de agarosa.	68
23.3.4.	Preparación de <i>E. coli</i> químicamente competentes: DH5α, TOP10, BL21 y M15.	69
23.3.5.	Clonación en el vector pCR 2.1 TOPO	69
23.3.6.	Clonación en el vector pJET 1.2/BLUNT extremos romos	70
23.3.7.	Extracción de DNA plásmidico por Miniprep.	70
23.3.8	Secuenciación	71
23.3.9.	Subclonación del gen <i>tvznf1</i> en el vector pQE-80L	71
23.4.	PCR de colonia	72
23.4.1.	Expresión de la proteína TvZNF1r	73
23.4.2.	Purificación de TvZNF1r	73
23.4.3.	Ensayo de Western blot	74
23.4.4.	Protocolo de hibridación de sondas	75
23.4.5.	Preparación de extractos citoplasmáticos y nucleares de <i>T. vaginalis</i> .	75
23.4.6.	Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA)	76
23.5.	Herramientas computacionales	77
23.5.1	Análisis bioinformático del promotor de <i>mp50</i> de <i>T. vaginalis</i>	77
23.5.2.	Análisis bioinformático de la región 3'UTR de <i>mp50</i> de <i>T. vaginalis</i>	77
23.6.	Análisis bioinformático de la proteína TvZNF1	78
23.6.1.	Búsqueda de secuencias homologas en la base de datos	78
23.6.2	Análisis de predicción de dominios en las bases de datos	78
23.6.3.	Predicción de estructura secundaria de la proteína TvZNF1	79
23.6.4.	Análisis de traza evolutiva	79
23.6.5.	Modelaje de la estructura de la proteína TvZNF1	79
23.6.6.	Alineamiento de motivos C2H2-ZNFm de TvZNF1 vs MTF-1.	80
24.	Resultados.	82

24.1.	Análisis de la estabilidad de <i>mp50</i> mediado por $Zn^{2+}$ en <i>T. vaginalis</i> .	82
24.2.	Secuenciación y alineamiento de la región intergénica 5' de <i>mp50</i> en los aislados CNC147 y HGMN01 de <i>T. vaginalis</i> .	85
24.3.	Amplificación y secuenciación de la región 5'UTR del RNAm de <i>mp50</i> en los aislados CNC147 y HGMN01.	88
24.4.	Análisis <i>in silico</i> del promotor de <i>mp50</i> de <i>T. vaginalis</i>	91
24.5.	Análisis de la región 3' del RNAm de <i>mp50</i> en ausencia y presencia de $Zn^{2+}$ de <i>T. vaginalis</i> .	95
24.6.	Análisis bioinformático de TvZNF1	103
24.7.	Comparación de motivos C2H2-ZNFm de TvZNF1 y MTF-1.	107
24.8.	Análisis de traza evolutiva (ET) de TvZNF1	108
24.9.	El análisis de residuos traza en C2H2-ZNFm de TvZNF1	109
25.	Mapeo de los residuos traza en estructura de los dominios de TvZNF1.	110
25.1.	Modelaje teórico de TvZNF1	111
25.2.	Análisis estructural de TvZNF1 y residuos predichos de unión a DNA	119
25.3.	Expresión de <i>tvznf1</i> en <i>T. vaginalis</i>	123
25.4.	Clonación, expresión y purificación de TvZNF1 recombinante (TvZNF1r)	125
25.5.	Reconocimiento de TvMREs localizados en la región 5' intergénica de <i>mp50</i> por proteínas de <i>T. vaginalis</i> .	129
25.6.	Análisis de la formación de complejos de proteínas nucleares y citoplasmáticas de <i>T. vaginalis</i> con TvMREs del promotor de <i>mp50</i> en presencia y ausencia de $Zn^{2+}$ .	134
25.7.	Complejos de TvMRE155 con extractos nucleares de <i>T. vaginalis</i> en presencia de $Zn^{2+}$ son catión dependientes.	134
25.8.	TvZNF1 tiene la capacidad de unión a DNA con las sondas control MRE2, TvMRE155 y TvMRE282.	139
26.	Discusión de resultados	142
27.	Conclusiones	154
28.	Perspectivas	155
29.	Referencias	156
30.	Apéndices	169
30.1.	Apéndice I. Medios de cultivos y suplementos	169
30.2.	Apéndice II. Ácidos nucleicos	170
30.3.	Apéndice III. Proteínas	172
31.	Anexos	177
31.1.	Anexo I. Ácidos nucleicos	177
31.2.	Anexo II. Publicaciones.	178

## Índice de tablas.

<b>TABLA</b>	<b>Pagina</b>
<b>TABLA 1.-</b> Estructura del genoma de <i>T. vaginalis</i>	11
<b>TABLA 2.</b> Clasificación de los elementos AURE/ARE	28
<b>TABLA 3.-</b> Número de proteinasas liberado por MEROPS	39
<b>TABLA 4.</b> Oligonucleótidos utilizados en este estudio	59
<b>TABLA 5</b> Secuencias de la región 5'UTR de <i>mp50</i> de los aislados CNCD147 y HGMN01 en ausencia y presencia de Zn <sup>2+</sup>	90
<b>TABLA 6-</b> Sitios de reconocimiento de factores de transcripción predichos en la secuencia intergénica 5' de <i>mp50</i> .	93
<b>TABLA 7.-</b> Región 3'UTR de <i>mp50</i> de los aislados de <i>T. vaginalis</i> crecidos en ausencia y presencia de Zn <sup>2+</sup> .	99
<b>TABLA 8.-</b> Análisis de ESTs de <i>mp50</i> .	101
<b>TABLA 9.-</b> Residuos expuestos y ocultos en los C2H2-ZNFm de TvZNF1.	116
<b>TABLA 10.-</b> Valores de confianza de la predicción estructural de TvZNF1.	117

## Índice de figuras.

<b>FIGURAS</b>	<b>Pagina</b>
<b>FIGURA 1.-</b> Número de casos presente en población mexicana.	5
<b>FIGURA 2.</b> Morfología de <i>T. vaginalis</i> .	9
<b>FIGURA 3.</b> Ciclo de vida de <i>T. vaginalis</i> .	15
<b>FIGURA 4.-</b> Zap1 y MTF-1 son factores de transcripción de respuesta a Zn <sup>2+</sup> .	35
<b>FIGURA 5.</b> Maquinaria y elementos reguladores de la transcripción en <i>T. vaginalis</i> .	46
<b>FIGURA 6.-</b> Estabilidad de RNAm de <i>mp50</i> en ausencia y presencia de Zn <sup>2+</sup> .	83
<b>FIGURA 7.</b> Análisis densitométrico del perfil de estabilidad de <i>mp50</i> del aislado HGMN01 de <i>T. vaginalis</i> en ausencia y presencia de Zn <sup>2+</sup> .	84
<b>FIGURA 8.</b> Perfil de amplificación de la región 5' intergénica de <i>mp50</i> de los aislados CNCD147 y HGMN01.	86
<b>FIGURA 9.-</b> Alineamiento de la región 5' intergénica de <i>mp50</i> de los aislados CNCD147, HGMN01 y del aislado secuenciado G3.	87
<b>FIGURA 10.-</b> Perfil de amplificación de la región 5'UTR de <i>mp50</i> de los aislados CNCD147 y HGMN01.	89
<b>FIGURA 11.-</b> Análisis de la región promotora del gen <i>mp50</i> de <i>T. vaginalis</i> .	94
<b>FIGURA 12.-</b> Perfil de la longitud del tracto de poli (A) de <i>mp50</i> en ausencia y presencia de Zn <sup>2+</sup> de <i>T. vaginalis</i> .	98
<b>FIGURA 13.-</b> Determinación de la señal y el sitio de corte y poliadenilación en la región 3'UTR de <i>mp50</i> de <i>T. vaginalis</i> .	100
<b>FIGURA 14.-</b> Determinación de la estructura secundaria del RNAm de <i>mp50</i> de los aislados CNCD147 y HGMN01 y secuencias de ESTs.	102
<b>FIGURA 15.</b> Análisis <i>in silico</i> de TvZNF1	106
<b>FIGURA 16.</b> C2H2-ZNFm (ZNFm2 a ZNFm4) núcleo de unión de MTF-1 se comparó con todas las posibles combinaciones de tres C2H2-ZNFm de TvZNF1.	112
<b>FIGURA 17.</b> Secuencias de estructuras similares a los motivos C2H2-ZNFm de TvZNF1.	113
<b>FIGURA 18.</b> Árbol filogenético de traza evolutiva de C2H2-ZNFm de TvZNF1.	114
<b>FIGURA 19.</b> Residuos traza conservados en C2H2-ZNFm de TvZNF1.	115
<b>FIGURA 20.</b> Mapeo de los aminoácidos traza en los C2H2-ZNFm de TvZNF1.	118
<b>FIGURA 21.</b> Comparación del modelo de TvZNF1 con estructuras cristalizadas.	121
<b>FIGURA 22.</b> Residuos de predichos unión a DNA en los C2H2-ZNFm de TvZNF1.	122

<b>FIGURA 23.</b> Perfil de expresión de RNAm de <i>tvznf1</i> desde los aislados CNCD147 y HGMN01 en ausencia y presencia de Zn <sup>2+</sup> .	124
<b>FIGURA 24.</b> Clonación de <i>tvznf1</i> completo.	126
<b>FIGURA 25.-</b> Selección de clonas positivas para la construcción pQE-80L- <i>tvznf1</i>	127
<b>FIGURA 26.-</b> Proceso de expresión y purificación de TvZNF1r	128
<b>FIGURA 27.</b> Sondas TvMRE155 y TvMRE282 reconocidas por proteínas nucleares de células HeLa crecidas en presencia de Zn <sup>2+</sup>	130
<b>FIGURA 28.</b> EMSA de TvMRE155 con extractos nucleares de <i>T. vaginalis</i> en ausencia y presencia de Zn <sup>2+</sup> .	131
<b>FIGURA 29.</b> EMSA de TvMRE282 con extractos nucleares de <i>T. vaginalis</i> en ausencia y presencia de Zn <sup>2+</sup> .	132
<b>FIGURA 30.-</b> Ensayo de competencias de la sonda TvMRE155.	133
<b>FIGURA 31.</b> Complejos de proteínas nucleares y citoplasmáticas de <i>T. vaginalis</i> con el MRE2 de <i>H. sapiens</i> .	135
<b>FIGURA 32.-</b> Complejos de proteínas nucleares y citoplasmáticos de <i>T. vaginalis</i> en ausencia y presencia de Zn <sup>2+</sup> con el TvMRE155 de <i>T. vaginalis</i> .	136
<b>FIGURA 33.</b> Complejos de proteínas nucleares y citoplasmáticos de <i>T. vaginalis</i> en ausencia y presencia de Zn <sup>2+</sup> con la sonda TvMRE282 de <i>T. vaginalis</i> .	137
<b>FIGURA 34.</b> Complejos dependientes de Zn <sup>2+</sup> de TvMRE155 y extractos nucleares de <i>T. vaginalis</i> en presencia de Zn <sup>2+</sup> .	138
<b>FIGURA 35.</b> TvZNF1 reconoce las sondas MRE2 de <i>H. sapiens</i> y TvMRE155 y TvMRE282 de <i>T. vaginalis</i>	140
<b>FIGURA 36.</b> EMSA de competencias de TvMRE155 con las sondas frías MRE2 y TvMRE282.	141

## Resumen

La tricomoniasis masculina es una infección de transmisión sexual poco estudiada, la mayoría de los casos son asintomáticos y debido a la falta de métodos diagnósticos los datos son subestimados. El presente estudio estuvo enfocado en dilucidar como se activa la expresión de genes de *Trichomonas vaginalis* modulados por  $Zn^{2+}$ , por ello cabe resaltar que no hay hasta el momento un reporte que explique el posible mecanismo de regulación de la expresión génica mediado por  $Zn^{2+}$  en *T. vaginalis*. El gen *mp50* de *T. vaginalis*, que codifica para una metaloproteinasa de 50 kDa se utilizó como modelo porque se sobre expresa a nivel de transcrito y de proteína en parásitos crecidos en presencia de  $Zn^{2+}$ . Primero, se determinó la vida media del RNAm de *mp50* en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$  mostrando que el transcrito es más estable en presencia del catión. A continuación, se analizó la región intergénica 5' del gen *mp50* de *T. vaginalis* encontrándose conservada con respecto a la secuencia del aislado de referencia (G3). Además, se obtuvo la secuencia 5'UTR de RNAm de *mp50*, lo cual permitió sugerir el posible sitio de inicio de la transcripción a -10 nt del ATG. A través del análisis bioinformático, se propuso que en la región 5' intergénica de *mp50* se encontraron los elementos de respuesta a metal (MRE) homólogos al MRE de humano que se encuentra reportado en regiones reguladoras de genes de respuesta a  $Zn^{2+}$  con la secuencia TGCRNC reportada como núcleo de promotor en *H. sapiens*. Por otra parte se realizó el análisis de la región 3'UTR de *mp50*, lo que permitió obtener la talla de la cola de poli (A) de ~ 737 pb en parásitos crecidos en presencia de  $Zn^{2+}$  y de ~237 pb en condición de ausencia de  $Zn^{2+}$ . También la región 3'UTR de *mp50* mostró que la señal de poliadenilación concuerda con lo reportado para este parásito y de manera interesante se observó que posiblemente tiene dos sitios de corte y poliadenilación, además de presentar la formación de un elemento tallo burbuja en la región 3'UTR. Por otro lado, se buscó una proteína homologa a MTF-1 en el genoma de *T. vaginalis* y fue denominada como: TvZNF1 describiéndose como una proteína tipo dedos de  $Zn^{2+}$  (C2H2-ZNFm). Entonces esta proteína de *T. vaginalis*, se expresó y purificó como TvZNF1 recombinante (TvZNF1r). Además con el objetivo de evaluar el reconocimiento de dos MREs putativos en la región reguladora de *mp50*, se utilizó a TvZNF1r y aunado a esto se probaron proteínas de extractos nucleares y citoplasmáticos de *T. vaginalis* crecidos en presencia y ausencia de  $Zn^{2+}$  mediante ensayos de EMSA que mostraron la formación de complejos. En conclusión, en este estudio 2 de los 12 MREs putativos en la región reguladora del gen *mp50* de *T. vaginalis* fueron reconocidos por TvZNF1r y por proteínas nucleares de *T. vaginalis* y de manera interesante el genoma de *T. vaginalis* conserva un gen que codifica para una proteína tipo dedos de  $Zn^{2+}$ , semejante al sistema de homeostasis de  $Zn^{2+}$  en humano, lo que sugiere que posiblemente esté ocurriendo un mecanismo similar en respuesta a altas concentraciones de  $Zn^{2+}$  en este parásito.

## Abstract

Male trichomoniasis is a poorly studied sexually transmitted infection, most cases are asymptomatic due to the lack of diagnostic methods and the results are underestimated. The present study was focused on elucidating how the expression genes of *Trichomonas vaginalis* modulated by  $Zn^{2+}$ , this research is the first report by to explain the possible regulation mechanism of gene expression mediated by  $Zn^{2+}$  in *T. vaginalis*. The mp50 gene of *T. vaginalis*, which codes for a 50 kDa metalloproteinase, was used as a model because it is over expressed at the transcript and protein level in parasites grown in the presence of  $Zn^{2+}$ . First, the half-life of the mp50 mRNA in the absence and presence of  $Zn^{2+}$  was determined by showing that the transcript is more stable in the presence of the  $Zn^{2+}$ . On the other hand, the 5' intergenic region of mp50 gene was obtained from the *T. vaginalis* genome, showing to be conserved with respect to the sequence of the reference isolate (G3). In addition, the 5'UTR sequence of mp50 mRNA was obtained, which allowed us to suggest the possible start site of transcription at -10 nt of the ATG. The bioinformatic analysis, showed that in the 5'-intergenic region of mp50 the metal response elements (MRE) homologous to the MRE of human was found that is reported in regulatory regions of genes responding to  $Zn^{2+}$  with the sequence TGCRCNC reported as promoter nucleus in *H. sapiens*. In addition, the 3'UTR region of mp50 mRNA was analyzed and showed details in the tail size of poly (A) between of ~ 737 bp from parasites grown in the presence of  $Zn^{2+}$  and ~ 237 bp in absence condition of  $Zn^{2+}$ . The 3'UTR region of mp50 also showed that the polyadenylation signal agrees with that reported for this parasite and interestingly it was observed that 3'UTR of mp50 mRNA possibly has two polyadenylation cleavage sites, which could be implicated with the formation of a bubble stem element in the region 3'UTR. On the other hand, a protein homologous to MTF-1 was searched for in the genome of *T. vaginalis* and was named as: TvZNF1, described as a  $Zn^{2+}$  finger type protein (C2H2-ZNFm). Then this *T. vaginalis* protein was expressed and purified as recombinant TvZNF1 (TvZNF1r). In addition, in order to evaluate the recognition of two putative MREs in the regulatory region of mp50, TvZNF1r was used and nuclear and cytoplasmic extracts proteins of *T. vaginalis* grown in the presence and absence of  $Zn^{2+}$  were tested using EMSA assays, and the results showed the formation of complexes. In conclusion, in this study 2 of the 12 putative MREs in the regulatory region of the mp50 gene of *T. vaginalis* were recognized by TvZNF1r and by *T. vaginalis* nuclear proteins. Interestingly the genome of *T. vaginalis* conserve a gene that encodes for a  $Zn^{2+}$  finger type protein, similar to the human  $Zn^{2+}$  homeostasis system, suggesting that a similar mechanism is possibly occurring in response to high concentrations of  $Zn^{2+}$  in this parasite.

## 1. Introducción

*T. vaginalis* es un parásito protozoario flagelado causante de la tricomoniasis, infección de transmisión sexual no viral más común en el mundo. Este parásito infecta el tracto urogenital humano y fue descubierto por primera vez por Donné en 1837 (1). La tricomoniasis urogenital humana, no es mortal pero tiene una gran incidencia que muestra el reporte de 180 millones de casos cada año alrededor del mundo y millones de casos no diagnosticados por ser una patología asintomática (2,3).

*T. vaginalis* infecta el tracto urogenital humano, enfrentándose en el caso de la mujer a las concentraciones  $Fe^{2+}$  cambiantes en función del flujo menstrual, lo cual promueve el desarrollo de la infección de 4-28 días después del contacto sexual con una persona infectada (4).

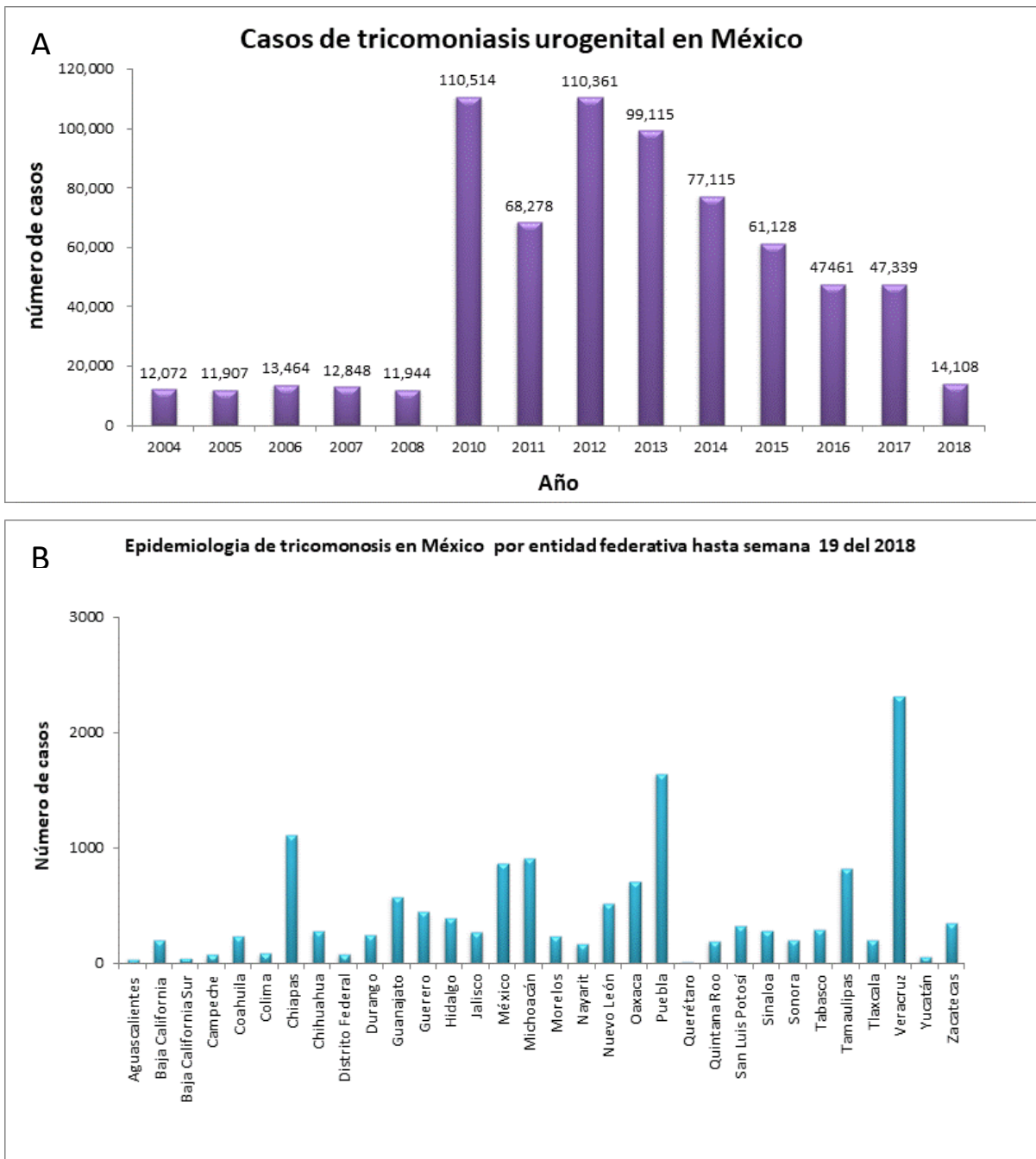
En el hombre la mayoría de los casos son asintomáticos e incluso tardan mucho tiempo para el desarrollo de síntomas, principalmente se ha observado el desarrollo de uretritis no-gonococcal, esto porque se ha reportado que la infección se resuelve sin tratamiento debido a las concentraciones de  $Zn^{2+}$  presente en las secreciones prostáticas (5). Sin embargo, el desarrollo de la tricomoniasis en mujeres y hombres con lleva a consecuencias como el incremento en la probabilidad de adquirir VIH o el desarrollo de cáncer de cérvix o próstata respectivamente (6,7).

Por lo tanto, es importante evitar tener un comportamiento sexual de alto riesgo de contagio, evitando tener múltiples parejas sexuales, acudir regularmente al ginecólogo para llevar a cabo el diagnóstico y tratamiento de otras infecciones de transmisión sexual (I.T.S.) y de igual manera en el caso de presentar co-infecciones con Gonorrea u otros microorganismos. Además de monitorear el pH vaginal, el cual no sea mayor a 4.5 y evitar fallas en el uso del condón (4,8,9). Por ello es de gran importancia el estudio de *T. vaginalis*, enfocado en el entendimiento de su biología para encontrar blancos farmacéuticos que ayuden a mejorar el diagnóstico y con ello optimizar el tratamiento y mejorar la calidad de vida de las personas.

## 1.1. Epidemiología

La tricomoniasis es la infección de transmisión sexual (STI) no viral más común en el mundo. La organización mundial de la salud estima que hubo 276.4 millones de casos en el 2008, el 90% de estas infecciones se produjeron entre personas que viven en zonas de escasos recursos (2,8). La tricomoniasis es más prevalente que la Clamidiasis, Gonorrea y sífilis. La prevalencia global de tricomoniasis ha sido estimada en un 8.1% para mujeres y 1.0% para hombres. Estos rangos pueden estar subestimados debido a que no son producto de estudios donde se utilicen métodos de diagnóstico sensibles como lo es la microscopía o el uso de los ácidos nucleicos, los cuales aún no son utilizados formalmente en los institutos de salud. El valor de la prevalencia difiere de acuerdo a las pruebas que se usan. Un estudio de prevalencia de tricomoniasis en dos poblaciones de EUA utilizando una prueba de PCR (NAAT) mostró que hay una prevalencia de 2.3 % entre adolescentes y un 3.1 % entre mujeres de 14-49 años (6,8). Un estudio en población africana mostró una alta prevalencia en Zimbabue encontrando un 9.5 % para ambos géneros utilizando la prueba de anticuerpos específicos (10). Otros estudios que utilizan NAAT muestran en población de hombres en Tanzania una prevalencia de 11% (8). En mujeres de Papau Nueva Guinea, se ha encontrado un alto rango desde 21% en mujeres embarazadas a 42.6 % en población general (8). Datos de baja prevalencia utilizando prueba de NAAT mostraron 1 % en una zona rural de Vietnam y un 37 % en Flanders en Bélgica y un 2.9 % en Shandong Provincia de China (8).

En el caso de México, el sistema nacional de vigilancia epidemiología de la secretaria de salud es el órgano encargado de llevar a cabo el estudio epidemiológico de las enfermedades y reportó 520 casos de hombres y 13,588 casos de mujeres a la semana 19 del año 2018 (Figura 1), sin embargo,, estos datos son subestimados por que incluyen casos probables y además no se utilizan técnicas moleculares en el sistema de salud para el diagnóstico de tricomoniasis en México (11).



**Figura 1. Número de casos presente en población mexicana.** A) Número de casos totales de prevalencia de tricomoniasis desde año 2004 hasta 2018. B) Número de casos de prevalencia de tricomoniasis por entidad federativa de México.

## 2. Manifestaciones clínicas

### 2.1. Tricomoniasis femenina

La mujer es la más afectada al infectarse con *T. vaginalis* por tener relaciones sexuales con una persona con tricomoniasis, el periodo de incubación es de 4 a 28 días para establecer la infección y presentar signos y síntomas leves como: vulvitis, que en ocasiones se confunde con vulvitis bacteriana, en el caso de presentar una fase aguda la infección muestra descargas mucopurulentas vaginales (verdes o amarillentas) con un olor fétido característico a aminas, prurito descrito como comezón en la vulva o uretra, irritación, disuria e inflamación y el característico cérvix de fresa (puntos hemorrágicos localizados en el cérvix). Por otra parte, durante la fase crónica, las pacientes presentan dolor en el bajo vientre, dolor en las caderas y dispareunia (4,6,8,12).

La tricomoniasis ocasiona consecuencias graves en las mujeres embarazadas infectadas como: partos prematuros y abortos, debido a la ruptura de las membranas amnióticas por la participación de factores de virulencia del parásito como las cisteín proteinasas (13). Por otra parte la enfermedad causa infertilidad, debido a que *T. vaginalis* es capaz de inmovilizar a los espermatozoides al enredar los flagelos del parásito con los de los espermatozoides (14). La inflamación crónica ocurre debido al daño al tejido lo que propicia la activación de la respuesta inmune, provocando la respuesta inflamatoria a través de la alta expresión de IL-1 $\beta$ , CCL2, and CXCL8 (15), asimismo la tricomoniasis incrementa la predisposición a desarrollar cáncer cervicouterino (16), demostrado en estudios donde se observó que *T. vaginalis* ocasiona que las células cervicales sean irregulares con un patrón nuclear que se asemeja a los observados en lesiones pre- neoplásicas (8,16,17). En estudios de mujeres diagnosticadas con cáncer cervicouterino se demostró la presencia de anticuerpos séricos contra *T. vaginalis* y se observó la reactividad positiva de las pacientes estableciendo el aumento de más de tres veces en la prevalencia de anticuerpos anti-*T. vaginalis* en las pacientes con cáncer cervicouterino comparado con mujeres sanas (18).

Además *T. vaginalis* favorece la susceptibilidad al contagio por VIH/SIDA, encontrándose un aumento en las concentraciones de partículas virales en mujeres con VIH e infectadas con *T. vaginalis* (19). Estudios de cohorte han indicado un alto riesgo para adquirir VIH en mujeres con tricomoniasis diagnosticada.

La gran susceptibilidad biológica se debe a tres razones: 1) Respuesta inflamatoria a *T. vaginalis* que resulta en el incremento de células blanco del VIH. 2) *T. vaginalis* puede perjudicar la barrera mecánica al VIH vía puntos hemorrágicos. 3) *T. vaginalis* puede cambiar la flora normal de la vagina, promoviendo la vaginitis bacteriana. Esto es asociado por el incremento de anticuerpos anti-tricomonas encontrados en pacientes con VIH con historial de tricomoniasis (18,19).

## **2.2. Tricomoniasis masculina**

La tricomoniasis masculina es un campo poco estudiado, del 100 % de casos de tricomoniasis solo el 3% en promedio corresponde a tricomoniasis masculina. La mayoría de los hombres con este padecimiento no lo saben debido a que es asintomática y requiere condiciones de susceptibilidad y un largo tiempo para el desarrollo y su establecimiento (8,11).

En México, del total de casos de tricomoniasis reportados anualmente, solamente el 2.6% en promedio corresponde a pacientes masculinos (11). Las altas concentraciones  $Zn^{2+}$  que se encuentran presentes en el microambiente de la próstata y en los fluidos prostáticos que van de 4.5 – 7 mM de  $Zn^{2+}$  se describe que en algunos casos resuelve la infección (20). No obstante, existen casos reportados con signos y síntomas que se pueden presentar en la fase aguda como son: uretritis purulenta, disuria, descargas mucopurulentas, prurito y sensación de ardor después del contacto sexual (21). En la fase crónica, los síntomas son: prostatitis y balanopostitis; ocasionando consecuencias como: el daño a la próstata, a la vesícula seminal, a la vejiga y al tracto urinario (22,23), así como predisposición al desarrollo de cáncer de próstata, debido a la presencia de anticuerpos anti-tricomonas (24-26).

## **3. Morfología de *T. vaginalis***

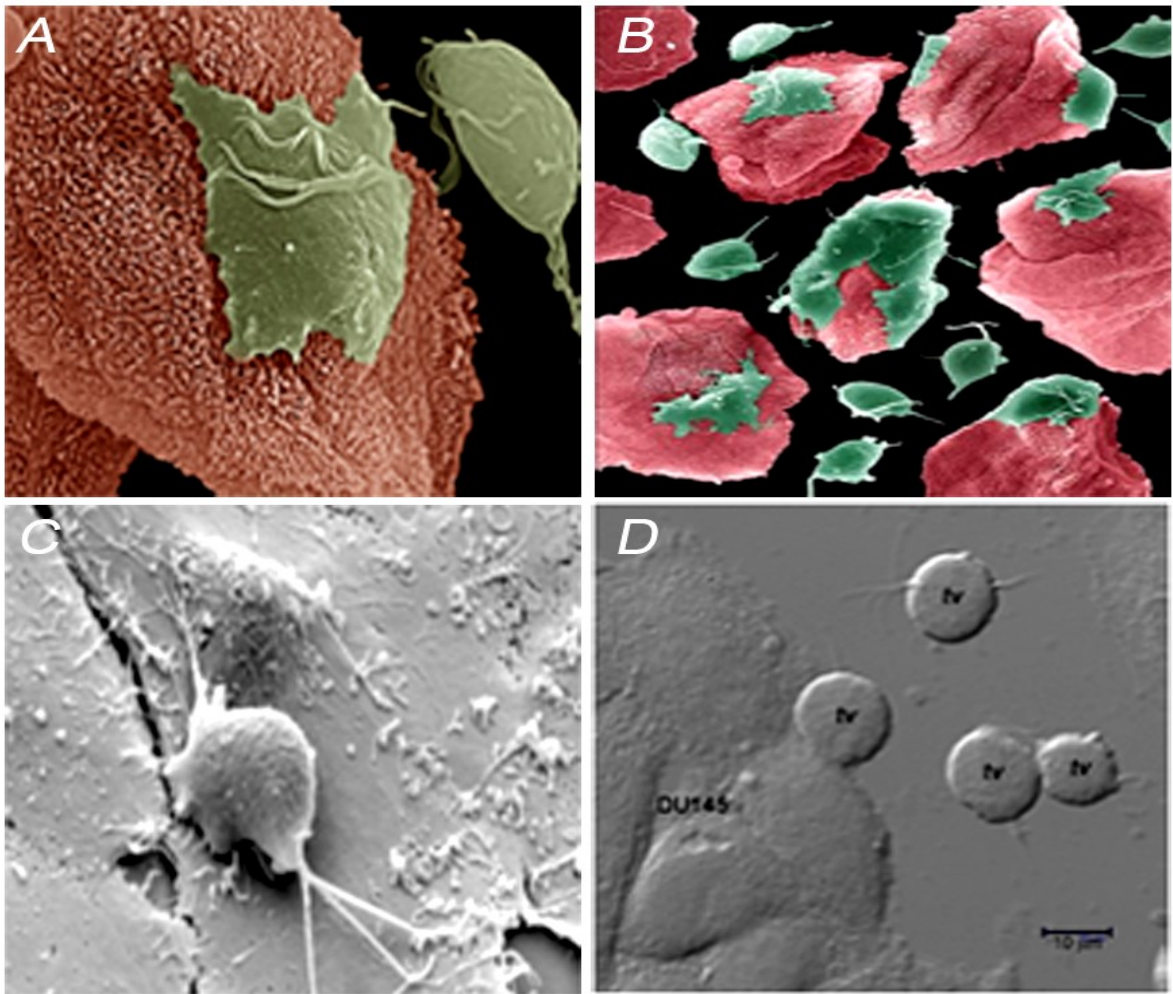
Dentro del género *Trichomonas*, *T. vaginalis* es el parásito urogenital más estudiado, el cual en cultivo axénico tiene un tamaño y forma más uniforme, presentando una longitud de 10  $\mu$ m de largo por 7  $\mu$ m de diámetro en promedio.

La forma del protozoario tiende a ser uniforme, sin embargo, puede cambiar de forma de pera a forma oval, además se describe la forma ameboides y se presenta cuando interactúa con células del epitelio vaginal (VECs) (27) (Figura 2, paneles A y B).

*T. vaginalis* posee, cuatro flagelos anteriores y el quinto adosado a la membrana ondulante, la cual es soportada por una esbelta y no contráctil costa; la característica de movilidad es otorgada por la membrana ondulante y el quinto flagelo. Este parásito en condiciones desfavorables de crecimiento, tiende a internalizar sus flagelos y llega a formar pseudoquistes (28). El axostilo es una estructura rígida, que disecciona longitudinalmente al parásito, llegando a la parte posterior final en forma de punta.

*T. vaginalis* presenta un citoesqueleto compuesto por fibras de tubulina, actina, centrina, formina y profilina. Además se describe la presencia de dineína, kinesina como las proteínas motoras más importantes, estas son capaces de moverse a lo largo de hebras de citoesqueleto. También *T. vaginalis* presenta fimbrina, una proteína de unión a actina que interviene en la formación de retículos de microfilamentos (4,29). El núcleo se ubica en la parte anterior y se encuentra cubierto por una membrana porosa. *T. vaginalis* posee gránulos denominados hidrógenosomas que producen hidrógeno molecular el cual es importante para la producción de energía y para el metabolismo del parásito (30,31).

*T. vaginalis* es capaz de unirse al plástico en condiciones de cultivo axénico, además *in vitro* es capaz de interactuar con células DU-145 (línea celular de laboratorio inmortalizada de cáncer prostático). Sin embargo, se describe el cambio morfológico de los parásitos de ovoide a pseudoquiste en ausencia (Figura 2, panel C) y presencia de  $Zn^{2+}$  (Figura 2, panel D) durante la interacción de *T. vaginalis* y células DU-145 (32,33).



**Figura 2. Morfología de *T. vaginalis*.** A) Micrografía electrónica de *T. vaginalis* como trofozoito (Verde), y en forma ameboide interaccionando con células de epitelio vaginal (VECs) (Rosa) B) Micrografía electrónica mostrando los trofozoitos en interacción con células VECs (imagenes de Antonio Pereira-Neves y Marlene Benchimol). C) *T. vaginalis* interaccionando con células DU-145 en forma de trofozoitos con pseudópodos que se propone que sirven para la comunicación con otros trofozoitos (33). D) *T. vaginalis* interaccionando con células DU-145 en presencia de  $Zn^{2+}$  se muestra los parásitos en forma oval durante la interacción (Tomado de Tesis de maestría de M. en C. Edgar Yabrán Villegas Vázquez).

#### **4. Genoma de *T. vaginalis***

El genoma completo de *T. vaginalis* fue obtenido con la metodología de shotgun, contiene “1,4 millones de lecturas en 17.290 scaffolds en  $\sim 7,2 \times$  cobertura”. El genoma tiene un tamaño aproximado de 160 Mb, distribuido en seis cromosomas; el 65% de este son secuencias repetidas. El grupo principal de secuencias que codifican para proteínas es de  $\sim 60,000$  genes, de los cuales solo en 65 fue predicha la localización de intrones, lo que fue comprobado con aproximadamente 20 genes ya documentados con intrones. Los RNA de transferencia (RNAt) fueron identificados para los 20 aminoácidos (29).

El elemento promotor Inr se encontró en la región 5' no traducida del  $\sim 75\%$  de las secuencias que codifican para proteínas (34), lo cual sugiere un rol central en el proceso de transcripción basal de este parásito, además la maquinaria de la transcripción basal aparentemente es conservada como en otros metazoarios (35-37).

Como parte de la maquinaria de RNA de interferencia fue identificado un gen que codifica para “Dicer”, dos genes Argonauta y 41 genes transcripcionalmente activos de helicasas “DEAH-box”, lo que sugiere la existencia de una vía de interferencia de RNA (RNAi). Además se identificaron 152 casos de posibles transferencias de genes de procariotas a eucariotas por transferencia lateral (LGT), los cuales afectan varias rutas metabólicas e influyen fuertemente en la evolución del metaboloma de *T. vaginalis* (29,38).

##### **4.1. Expansión del genoma de *T. vaginalis***

Dentro del genoma de *T. vaginalis* se han identificado 59 familias de secuencias de repetidos descritos como los más comunes, los cuales constituyen  $\sim 39$  Mb y se pueden clasificar como: I) Similar a virus; II) De tipo transposón, incluyendo  $\sim 1000$  copias del elemento “mariner” (39). III), Retrotransposones similares y (IV) los no clasificados. La mayoría de las 59 familias de secuencias de repetidos están presentes en cientos de copias (promedio por número de copia  $\sim 660$ ) y cada familia de repetidos es extraordinariamente homogénea, con un polimorfismo promedio de  $\sim 2,5\%$  (29).

**Tabla 1. Estructura del genoma de *T. vaginalis*.** Esta tabla resume las características del genoma de *T. vaginalis* como son: tamaño, contenido de G+C, genes codificantes predichos, evidencia de intrones, promedio del tamaño y porcentaje de G+C en la región intergénica y genes que no codifican a proteínas. Tomado de: (29).

Característica	Valor
<b>Genoma</b>	
Tamaño del ensamble (pb)	176,441,227
Contenido de G+C (%)	32.7
No de scaffolds	17,290
N50 tamaño de scaffold (pb)	68,338
<b>Genes que codifican a proteína</b>	
Número de genes predichos	59,681
Número de genes con evidencia	25,949
Número de genes con intrones	65
Media de longitud de gen	928.6
Contenido de G+C (%) en genes	35.5
Densidad génica	2956
Media de longitud de región intergénica (%)	1165.4
Porcentaje de G+C (%) en región intergénica	28.8
<b>Genes que no codifican a proteína</b>	
Genes predichos para tRNAs	479
Unidades predichas de 5.8S,18S y 28S rDNA	~250

#### **4.2. Genes del metabolismo de *T. vaginalis***

Los carbohidratos son utilizados como fuente principal de carbono por *T. vaginalis* a través del metabolismo fermentativo aerobio o anaerobio. *T. vaginalis* utiliza una gran variedad de aminoácidos como sustratos de producción de energía por la vía metabólica arginina dihidrolasa. Importantes proteínas codificadas en el genoma son las aminotransferasas y glutamato deshidrogenasas, estas participan en vías del metabolismo catabólico que pueden ser reversibles para permitir que el parásito pueda sintetizar glutamato, aspartato, alanina, glutamina, y glicina. Otros genes necesarios para la síntesis de prolina a partir de arginina y para el metabolismo de treonina han sido identificados. También se identificó una ruta de novo de biosíntesis de cisteína a través de la cisteína sintasa, un candidato de LGT y genes que codifican a enzimas implicadas en el metabolismo de la metionina (4).

En cuanto al metabolismo de lípidos se identificaron genes de la ruta de biosíntesis de lípidos de novo en *T. vaginalis* que se limita en mayor parte a fosfolípidos como: fosfatidiletanolamina (PE), sin embargo, otros lípidos como el colesterol probablemente son adquiridos de fuentes exógenas (4). En cuanto al degradoma, se reporta una expansión de genes de proteinasas identificándose ~400 genes que codifican a proteinasas de los diferentes tipos catalíticos (Aspártico, Cisteína, Glutámico, Metalo, Asparagina, Serína, Treonina y desconocidas (29,40).

De manera experimental se ha descrito mediante zimogramas en 2D nueve cisteína proteinasas con peso molecular promedio de 30 kDa (TvCP1, TvCP2, TvCP3, TvCP4, TvCP4-like, TvCP12, TvCPT, TvLEGU-1, y otra legumaina-like CP) (41) .

### **5. Metabolismo en *T. vaginalis***

*T. vaginalis* es un organismo primitivo eucarionte, sin embargo, este parásito difiere en sus rutas metabólicas comparado con organismos eucariontes superiores describiéndose que estas son más semejantes a bacterias anaerobias.

#### **5.1. Carbohidratos y metabolismo energético de *T. vaginalis*.**

El metabolismo de la glucosa de *T. vaginalis* es conservado entre organismos eucariontes, en la vía fermentativa en condiciones aerobias o anaerobias, sin embargo, la glucosa es oxidada completamente.

Los productos de este metabolismo son: acetato, lactato, malato, glicerol, CO<sub>2</sub>, y en condiciones anaerobias hidrógeno molecular (H<sub>2</sub>). Los procesos son llevados a cabo en dos compartimientos celulares, el citoplasma y el hidrógenosoma que al igual que la mitocondria es de 0.5 a 1.0 μM de diámetro con una doble membrana (30,31,42). En este último se lleva a cabo la fermentación oxidativa del piruvato produciendo ATP, y en función del nivel de fosforilación del sustrato, se produce hidrógeno molecular, esto por medio de enzimas conservadas en procariontes y eucariontes, como son: ferredoxina oxidasa reductasa, hidrogenasa acetato: succinato CoA transferasa y succinato tiokinasa, superóxido dismutasa, malato deshidrogenasa (descarboxilación), ferredoxina, adenilato quinasa y NADH: ferredoxina oxidasa reductasa localizadas en el hidrógenosoma. (4,43).

### **5.2. Metabolismo de lípidos en *T. vaginalis***

*T. vaginalis* contiene colesterol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y esfingomielinina como su mayor fuente de fosfolípidos. Este parásito muestra que es incapaz de sintetizar ácidos grasos y esteroides. A pesar de la ausencia de rutas metabólicas *T. vaginalis* hidroliza los grupos acil-grasos de los fosfolípidos, triacilgliceroles, y esteroides utilizando estos grupos en la acilación de los fosfolípidos (44). Estudios han mostrado que lipofosfoglicano-like glicoconjugado, así como otros glicoconjugados son encontrados en la superficie de *T. vaginalis* siendo importantes para la sobrevivencia del parásito en el microambiente del huésped (4,44,45).

### **5.3. Metabolismo de aminoácidos en *T. vaginalis***

Los carbohidratos son la fuente de nutrientes preferida de este parásito, sin embargo, dentro de condiciones donde la fuente de carbohidratos es limitada, los aminoácidos han mostrado permitir el crecimiento y sobrevivencia de *T. vaginalis*. Principalmente en ausencia de maltosa, *T. vaginalis* consume grandes cantidades de aminoácidos especialmente arginina, treonina y leucina utilizados para la generación de energía (46). En condiciones normales de crecimiento este parásito consume grandes cantidades de arginina y unas pocas cantidades de metionina para la producción de energía. Los aminoácidos arginina y glicina son encontrados como productos en el metabolismo de la glucosa estos aminoácidos constituyen la mayoría en la célula de *T. vaginalis* (47).

Actualmente las enzimas aminotransferasas han tomado importancia en el estudio del metabolismo de aminoácidos, esto debido a que han demostrado que la enzima 2 oxoglutarato aminotransferasa purificada de *T. vaginalis* tiene una actividad dual de aspartato/aromática aminoácido y presenta alta actividad, lo cual explica porque ese tipo de aminoácidos son encontrados en altas concentraciones en *T. vaginalis* (21,48,49).

#### **5.4. Metabolismo de nucleótidos en *T. vaginalis***

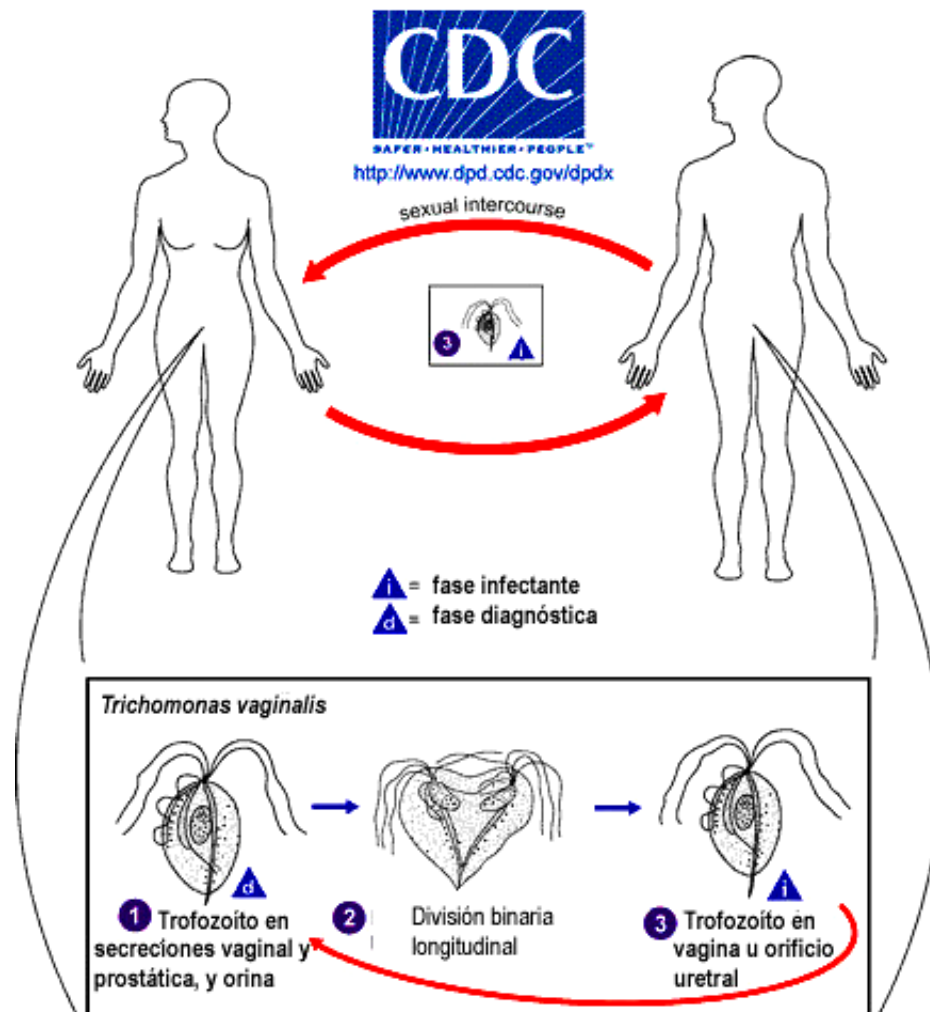
*T. vaginalis* carece de la habilidad de sintetizar purinas y pirimidinas, para subsanar esto, el parásito ha desarrollado una ruta de salvamento que genera nucleótidos. La ruta genera purinas mediante nucleósido fosforilasas y quinasas, por otro lado las fosforibosiltransferasas y las nucleósido quinasas son capaces de recobrar pirimidinas. *T. vaginalis* requiere adenina, guanina, timidina, citidina, uracilo y uridina como sus nucleosidos para su crecimiento (4,50,51).

#### **5.5. Metabolismo de poliaminas en *T. vaginalis*.**

En *T. vaginalis* el metabolismo de poliaminas comienza con la adquisición de arginina que se transforma a citrulina vía arginina deiminasa. Para la biosíntesis de poliaminas, primero se realiza la síntesis de ornitina mediante arginina hidrolasa. La putrescina es sintetizada por ornitina descarboxilasa (ODC); en el caso de espermina, esta es adquirida desde el huésped y llevada a los hidrógenosomas vía espermidina: espermina N1-acetiltransferasa (SSAT)/poliamina oxidasa. SSAT cataliza la transferencia de un grupo acetyl desde acetylCoA de la espermina o espermidina formando N1-acetyl espermina o N1 -acetyl espermidina permitiendo ser utilizados como precursores de la síntesis de putrescina mediante poliaminas oxidasas (52). El metabolismo de poliaminas alcanza un aporte aproximadamente del 10% de la energía de *T. vaginalis* requerido durante su crecimiento (52,53).

### **6. Ciclo de vida de *T. vaginalis***

La transmisión del parásito es de persona a persona mediante contacto sexual y su duplicación se da por fisión binaria longitudinal sin desaparición de la membrana nuclear (18)(Figura 3).



**Figura 3. Ciclo de vida de *T. vaginalis*.** A) El ciclo de vida de *T. vaginalis* es simple solo presenta la forma de trofozoito, no tiene intermediarios, por lo que se transmite de persona a persona a través del contacto sexual. B) Este parásito se divide por fisión binaria (Adaptado de “Center for Disease control and prevention”, Atakta Georgia, EUA).

## 7. Diagnóstico de tricomoniasis

La evolución de las pruebas de diagnóstico se han incrementado desde la década pasada (4). El método de detección convencional para *T. vaginalis* es con microscopía óptica normal. La prueba es barata, se requiere poca tecnología y el cuidado del microscopista, sin embargo, esta es insensible particularmente para hombre, esto porque la carga parasitaria es muy baja, por lo cual no se logra detectar trofozoitos desde muestras de orina o semen de hombres (4). La sensibilidad tiene un rango de 50-70% dependiendo totalmente de la experiencia del microscopista y debe ser leída no más allá de 10 min de la preparación de la muestra. El método de detección en cultivo tiene mejor sensibilidad para muestras de mujeres, sin embargo, es muy caro, requiere de mucho tiempo y se ha demostrado poca sensibilidad en muestras de hombre. La ausencia de sensibilidad del método de detección en cultivo ha sido identificado en estudios de mujeres infectadas y no infectadas con VIH encontrando que una sola dosis de metronidazol, la infección con *T. vaginalis* es indetectable por meses en cultivo y tiempo después reaparece la infección (4,54).

Las pruebas basadas en ácidos nucleicos son más sensibles y moderadas en su precio y rápidas pero requieren instrumentación especial. La prueba "APTIMA" *T. vaginalis* Assay (Hologic Gen-Probe, San Diego, CA) fue liberada en el 2011 para uso con orina, exudado endocervical y vaginal, colectados en solución "Hologic preserveCyt" (ThinPrep) desde mujeres solamente. La sensibilidad y especificidad es de 95-100% (55).

Además, existen dos pruebas aprobadas en E.U.A. por la FDA para el diagnóstico de *T. vaginalis* en mujer, "OSOM T. Rapid Test" (Genzyme Diagnostics; Cambridge,MA) (56,57), la cual consiste de una tecnología de inmuno-cromatografía de flujo capilar. La segunda prueba es la "Affirm VP III" (Becton, Dickinson & Co.;Franklin Lakes,NJ), una prueba basada en una sonda de ácido nucleico que fue probada para *T. vaginalis*, *G. vaginalis* y *C. albicans*, ambas pruebas son realizadas con secreciones vaginales y tienen una sensibilidad de más del 83% y una especificidad del 97% (58).

Actualmente existe la prueba Xpert TV por Cepheid (Sunnyvale, CA) aun no es aceptada por la FDA y mantiene la promesa de ayudar a países pobres y mejorar el diagnóstico de tricomoniasis masculina (6,54,59).

## **8. Tratamiento de la tricomoniasis**

El tratamiento normalmente utilizado contra *T. vaginalis* es el uso de metronidazol (MTZ) (58,60). El metronidazol es uno de los 5 nitroimidazoles disponibles y se reporta que tiene cerca del 95% de curación de personas infectadas con tricomoniasis junto con tinidazol (TNZ) y seconidazol. Actualmente la organización mundial de la salud (WHO) y el “United State Centers for Disease Control and Prevention” (CDC), guían el tratamiento de la tricomoniasis que incluye MTZ o TNZ, 2 g de una sola dosis como régimen recomendado y MTZ 400-500 mg por 7 días de dosis como tratamiento alternativo (4,6). Las recomendaciones son la abstinencia de alcohol y debe continuar hasta 24 hrs después de cumplir el tratamiento con MTZ o 72 hrs con TNZ. Sin embargo,, si el paciente falla al tratamiento de una sola dosis, se recomienda administrar una sola dosis más de TNZ o MTZ durante 7 días. Y si esto falla, 2 g de MTZ o TNZ por 5 días pueden ser administrados (61-63).

### **8.1. Resistencia de *T. vaginalis* a metronidazol**

*T. vaginalis* es un organismo amitocndrial anaerobio y posee hidrogenosoma, este se describe como encargado de procesos del metabolismo catabólico para la obtención de energía (64). La reacción de descarboxilación oxidativa de piruvato en el hidrógenosoma es acoplada a la síntesis de ATP aunado al transporte de electrones mediado por ferredoxina. Esta ruta es la responsable de la activación del metronidazol, fármaco utilizado en el tratamiento de la tricomoniasis (65). Actualmente se ha reportado la resistencia en aislados a este fármaco, desde el punto de vista molecular se describe que la clave en el desarrollo de la resistencia es un decremento progresivo y perdida de la actividad de piruvato:ferredoxina oxidoreductasa, lo cual se asocia a la perdida de la activación del metronidazol (66). Además se sabe que hay un decremento en la expresión de ferredoxina. *T. vaginalis* posee un sistema alternativo de activación de metronidazol que involucra a la enzima málica hidrógenosomal y NAD:ferredoxina oxidoreductasa (63).

La resistencia de *T. vaginalis* a metronidazol compensa las deficiencias de producción de energía en hidrógenosoma incrementando la glicolisis. Esta gran diversidad en moléculas muestran la gran diversidad de mecanismos participantes en la resistencia a metronidazol en *T. vaginalis* (65).

## 9. Patogenicidad

*T. vaginalis* es un parásito obligado, por lo cual debe ser capaz de establecerse, sobrevivir y adaptarse al microambiente del hospedero, esto lo logra a través del uso de factores de virulencia que le permite llevar a cabo un proceso de infección exitoso. A continuación son descritas las propiedades de virulencia de *T. vaginalis*.

### 9.1. Citoadherencia

La interacción con la células del microambiente del huésped es el proceso de citoadherencia de *T. vaginalis*, este es el pre-requisito para el establecimiento de la infección. Este es un proceso complejo que involucra la coordinación de múltiples proteínas como adhesinas, glicoconjugados localizados en la superficie, así como la participación de proteínas de citoesqueleto, receptores para proteínas de matriz extracelular (ECM) como: laminina, fibronectina y colágeno, proteína que participa en la transducción de señales y procesos de autofagia (13,27).

Principalmente hay cinco proteínas de superficie que están bien caracterizadas y son denominadas “adhesinas” (AP120, AP65, AP51, AP33 y AP23) (67-70). Entre sus actividades se describen que cuatro de ellas funcionan como enzimas metabólicas Piruvato:ferrodoxin oxidoreductasa (PFO) (70,71), enzima málica (72),  $\alpha$  y  $\beta$  succinil-CoA sintetasa respectivamente (73,74). Estas proteínas han sido localizadas en el hidrógenosoma y en la superficie de *T. vaginalis* (75). Actualmente AP23 no ha sido identificada aún, sin embargo, se encuentra anotada como triosafosfato isomerasa (69).

Recientemente, se ha identificado y caracterizado la participación en la citoadherencia a la legumina cisteín proteinasa TvLEGU-1 (76). Otras proteínas encontradas en la superficie de *T. vaginalis* son la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (TvGAPDH) y  $\alpha$ -enolasa (TvENO-1), sin embargo, sus secuencias no contienen dominio transmembranal (TMD), ni péptido señal (SP)(77,78).

Entre sus actividades descritas se encuentran la actividad de unión a ligando, jugando un importante función en la invasión, probablemente dentro de distintos microambientes. Específicamente TvGAPDH une fibronectina y TvENO-1 une plaminógeno y su síntesis es incrementada cuando *T. vaginalis* entra en contacto con células del epitelio vaginal (VECs) (77,78).

La familia de proteínas de superficie BspA-like se caracterizan por un tipo específico rico en leucinas (TpLRR), en *T. vaginalis* se han identificado 911 miembros hipotéticos, teniendo 178 proteínas BspA-like con dominios TMD, lo que corrobora su función de interacción en la superficie celular (79).

Un componente rico en la membrana celular de *T. vaginalis* es el glicocalix que es una capa exterior de la membrana celular formada por diferentes moléculas combinadas con carbohidratos, como son: lipofosfoglicanos (LPG)-like, glicoproteínas y glicolípidos (13,80). El LPG-like es un glicoconjugado ahora nombrado en *T. vaginalis* como lipoglicano (TvLG), el cual tiene ausencia de repetidos de lipopolisacáridos. Este está compuesto de poliramnosa con Xilosa ramificada y poli-N-acetillactosamina y algunos lacto-N-biosa, este último es involucrado en la interacción huésped: parásito (80).

*T. vaginalis* es un parásito rico en genes codificantes para proteinasas (29). En la superficie de *T. vaginalis* han sido identificadas las del tipo cisteín proteinasas (CPs), como son: TvCP62 y TvCP30. La cisteína proteínasa de 30 kDa participa en la citoadherencia, es inmunogénica, está presente en secreciones vaginales de pacientes con tricomoniasis diagnosticada, esta es activa a pH y a temperatura vaginal durante la infección. La TvCP30 degrada colágeno IV, fibronectina (Fn), y hemoglobina (Hb) (81-83).

Otro tipo de proteinasas que participan en la adherencia de *T. vaginalis* a células del huésped son las del tipo metalo, en especial la familia de proteinasas de membrana GP63, para *T. vaginalis* se tienen identificadas 48 miembros de esta familia y 37 son proteínas transmembranales posiblemente involucradas en la interacción célula huésped: parásito durante la infección. Sin embargo, existen datos que un miembro de la familia GP63 de *T. vaginalis* (TvGP63) está implicada en citotoxicidad y no en citoadherencia (84).

Datos recientes del grupo de investigación de la Dra Elizabeth Álvarez Sánchez muestran que la expresión de los transcritos de *enolasa* y *gapdh* se ven modulados positivamente por la interacción con células DU-145 en medio de cultivo con 1.6 mM de  $Zn^{2+}$  mientras que algunos genes como: *mp50*, *tvfim1*, *tvcp39*, *ap63* y *ap33* son modulados negativamente en dichas condiciones (publicación en proceso).

## 9.2. Citotoxicidad

En el proceso de infección de *T. vaginalis* el paso simultáneo a la citoadherencia, es la degradación de las células del huésped por medio de factores de virulencia secretados por *T. vaginalis*. Un primer factor de virulencia descrito es la proteína TvF de 250 KDa, la que promueve el redondeo y unión de *T. vaginalis* a las células blanco sin lisis celular (13). Por otra parte, el factor de división celular (CDF) es una glicoproteína (200 kDa) que juega un rol en la separación celular y es secretado al medio por el parásito en contacto con células epiteliales. Otros factores citotóxicos son las porinas (trichoporos), fosfalipasa A2 (85) y algunas CPs localizadas en la superficie como son TvCP12, TvCP39, y TvCP65. Principalmente TvCP39 y TvCP65 son inmunogénicas en pacientes con tricomoniasis, son activas en el microambiente vaginal durante la infección, además degradan colágeno IV y fibronectina (86-90).

La actividad óptima de TvCP65 es a un pH de 5.5 a 37°C siendo estas condiciones similares a la de pacientes con tricomoniasis. TvCP65 es capaz de degradar colágeno IV y fibronectina, pero no laminina 1 ni hemoglobina (90).

En el caso de TvCP39 es activa en un amplio rango de pHs (3.6-9.0) con un pH óptimo de 7.0, además TvCP39 degrada colágeno I, III, IV, hemoglobina e inmunoglobulinas humanas A y G, esta es capaz de unirse a células de epitelio vaginal (VECs) y a células de línea celular de cáncer de próstata (DU-145) (88).

Actualmente se sabe que TvCP65 tiene un dominio de unión a superficie celular en la región amino terminal demostrado usando anticuerpos específicos hacia esta región lo cual inhibió la citotoxicidad de manera concentración dependiente (91).

### 9.3. Apoptosis

Los factores principalmente involucrados en la apoptosis de células del huésped por acción de *T. vaginalis* son algunas cisteín proteinasas (CP2, CP3, CP4 y CPT), estas son secretadas al medio y se ha demostrado en ensayos *in vitro* con líneas celulares e identificación por MS que promueven la disgregación de las monocapas llevando a la destrucción celular (13,86,92).

Por otra parte, *T. vaginalis* es capaz de unirse a neutrófilos de humano e inducir su apoptosis mediante el aumento en la actividad de la caspasa-3 llevando a la reducción en la actividad de Mcl-1; que es una proteína de la familia Bcl-2, que actúa como molécula en el control de la apoptosis (92).

Recientemente las metaloproteinasas de *T. vaginalis* han sido relacionadas con la apoptosis de líneas celulares de cáncer de cérvix (SiHa) y células de epitelio vaginal (MS74), esto a través de demostrar que productos excretados, secretados (ESP) y lisados de *T. vaginalis* e incubados con las líneas celulares con y sin el inhibidor específico de metaloproteinasas (1-10 fenantrolina), y fue analizado el evento de activación de apoptosis mediante la ruta de señalización de Bcl-2. Los resultados describen que los parásitos de *T. vaginalis* vivos, lisados y ESP promovieron la liberación de citocromo c dentro del citosol, la activación de caspasa-3 y caspasa-9 y el corte de PARP, las cuales son moléculas implicadas en apoptosis. Las muestras de *T. vaginalis* vivas y los ESP mostraron altos niveles de actividad de metaloproteinasas que fueron significativamente inhibidos por el 1-10 fenantrolina, disminuyendo el corte de Bcl-xL, Mcl-1, PARP, caspasa-3, y caspasa-9 (proteínas pro-apoptóticas), así como la liberación de citocromo c al citoplasma, pero también se describe el incremento en la asociación de los complejos de Bcl-xL/Bim y Mcl-1/Bim (proteínas anti-apoptóticas), lo cual sugiere que las metaloproteinasas juegan un papel importante en la activación de la apoptosis en células del epitelio vaginal (93).

#### **9.4. Fagocitosis**

Actualmente no se ha descrito el mecanismo molecular que le permite a *T. vaginalis* fagocitar células como: lactobacillus, células vaginales y epiteliales, leucocitos, eritrocitos, levaduras, espermatozoides y células prostáticas. La propuesta de cómo se lleva a cabo este proceso es a través de dos rutas I) fagocitos profesionales que extienden pseudópodos hacia la célula blanco y la ruta II) un proceso de hundimiento sin extensión de membrana (94).

Las proteínas que participan en este proceso son dos adhesinas, que permiten la unión y fagocitosis de eritrocitos, además se sugiere que un receptor de manosa en la superficie del parásito permite la fagocitosis de levaduras, así como un rearrreglo del citoesqueleto, lo cual permite el cambio morfológico a ameboide durante la fagocitosis (95). Estudios *in silico* han identificado homólogos a la maquinaria de formación de vesícula, que incluyen GTPasas, así como SNAREs, RAb GTPasas, proteínas SM, dinamina y miembros del complejo. Esto sugiere que la fagocitosis podría ser un mecanismo de virulencia, así como un mecanismo de adquisición de hierro, lípidos, nucleótidos y otros nutrientes (13,94)

#### **9.5. Hemólisis**

*T. vaginalis* lleva a cabo la hemólisis de eritrocitos humanos, los cuales son lisados *in vivo* a través de un mecanismo dependiente de contacto para obtener lípidos y hierro. El nivel de la actividad hemolítica correlaciona principalmente con la virulencia de aislados en fresco (4,13,96) .

Los factores de virulencia que participan en la hemólisis de eritrocitos por *T. vaginalis* son CPs, proteínas formadoras de poros y fosfolipasa A-like identificados como factores citolíticos (97). Ensayos actuales describen como un posible nuevo factor hemolítico a la enzima triacilglicerol lipasa (TvLIP). La participación de la cisteín proteinasa de 30 kDa en la superficie del parásito tiene una gran afinidad por espectrina, la cual es responsable de la ruptura del citoesqueleto asociado con el mecanismo citolítico de *T. vaginalis* (86,98).

Las características microambientales son necesarias para la hemólisis como son concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  y  $\text{pH} < 6.5$ , lo cual promueve la secreción de trichoporos participantes de la segunda etapa del proceso de hemólisis que ocurre en tres pasos: 1) interacción ligando-receptor, 2) liberación de perforinas y 3) lisis celular (13,99-101).

## **9.6. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune**

Este parásito utiliza múltiples mecanismos para poder escapar al sistema inmune del huésped. Principalmente, *T. vaginalis* secreta CPs encargadas de degradar inmunoglobulinas (IgG, IgM y IgA), primero se ha descrito una CP de 60 kDa que degrada anticuerpos para que *T. vaginalis* obtenga nutrientes (102,103).

Por otra parte las CPs, TvCP39 y TvCP65 degradan inmunoglobulinas y son proteinasas secretadas al medio con actividad en las condiciones microambientales en el aparato reproductor femenino durante la infección (86,89,90). Una segunda barrera de la respuesta del hospedero es el complemento que está presente en la sangre del flujo menstrual, sin embargo, *T. vaginalis* tiene una CP en su superficie que degrada C3b disminuyendo el efecto del complemento (86).

Por otra parte, *T. vaginalis* utiliza proteínas de superficie con variabilidad inmunogénica (P270 y P230), en el caso de P270 su expresión está relacionada con la presencia de dsRNA virus, concentraciones de hierro y es dependiente de fosforilación, además de mostrar una organización estructural muy parecida a proteínas membranales de eucariontes superiores (104,105). En el caso de P230 se ha determinado que la variación fenotípica de esta proteína afecta la especificidad de anticuerpos (106). Otra estrategia que utiliza el parásito es colocar en la superficie proteínas parecidas a las del huésped como AP65, AP51 y AP33 que son homologas a enzimas metabólicas del huésped.

Este parásito secreta una gran cantidad de antígenos solubles que logran neutralizar anticuerpos y evitar el efecto lítico e incluso estas moléculas llegan a neutralizar la citotoxicidad de linfocitos T (86,107).

Por otra parte, la activación y reclutamiento de neutrófilos por la presencia de IL-8 que es un factor quimiotáctico de neutrófilos, funciona como activador de la respuesta a la infección del huésped a la presencia de *T. vaginalis*, además este parásito activa la apoptosis de neutrófilos vía ROS-dependiente, caspasa-3, así como la reducción de la expresión de Mcl-1, disminuyendo el reclutamiento de células pro inflamatorias (92). Finalmente *T. vaginalis* es capaz de inducir la apoptosis de macrófagos vía citocromo c/caspasa-3/p38 a través de la ruta MAPK provocando la disminución de la respuesta inmune específica a la infección (108).

## **10. Regulación génica en eucariontes**

Las células conforman organismos complejos que viven en un medio ambiente, donde la expresión génica es responsable de permitir la sobrevivencia y adaptación de los organismos a diferentes estímulos ambientales. La regulación de la expresión génica se puede evaluar a dos niveles: transcripcional y post transcripcional. La transcripción es el primer evento en la expresión de los genes, primero los genes deben ser transcritos a un RNA mensajero (RNAm) que llevará el mensaje que será traducido a proteína, sin embargo,, inmediatamente después de ser transcrito un gen, el RNAm se ve afectado por el microambiente celular e intracelular teniendo efecto en la vida de la molécula de RNAm, siendo afectada por mecanismos de estabilidad y degradación del RNAm (109).

La transcripción es afectada positivamente o negativamente, dependiendo del estímulo, los elementos en *CIS* necesarios se encuentran en la región promotora de los genes, en donde se encuentra un núcleo de promotor responsable de la transcripción basal además de requerir de la maquinaria de transcripción que reconoce estos elementos, estos son elementos básicos para realizar este proceso, sin embargo,, para incrementar o disminuir la tasa de transcripción de genes específicos existen factores de transcripción específicos que son encargados de transducir las señales del microambiente celular en síntesis o represión de los RNA mensajeros (110). Con ello los estímulos afectan la expresión génica a través de cascadas de señalización que finaliza en la activación de factores de transcripción responsables de iniciar la transcripción de genes que promuevan o ayuden a la sobrevivencia o muerte celular.

Algunos de estos factores de transcripción específicos son: MTF 1, ZAP 1, GATA, SP1 etc, estos reconocen elementos en *Cis* en la región corriente arriba de los genes blanco denominados “enhancers o intensificadores” estas son pequeñas secuencias de DNA que son reconocidas por factores de transcripción específicos y promueven el proceso de generación de RNAm o inhiben la síntesis RNAm como por ejemplo el elemento de respuesta a estrógenos (ERE), elemento de respuesta a tiroxina (TRE) o elemento de respuesta a ácido retinoico (RARE) entre otros (110,111). Estas secuencias son localizadas corriente arriba o abajo o incluso a gran distancia del promotor.

Por otro lado los represores o silenciadores son secuencias que inhiben la transcripción, se localizan distantes al promotor (109) y son reconocidas por proteínas represoras que se unen a las secuencias “silenciadoras” inhibiendo la síntesis de moléculas de RNA mensajero (112).

Los factores de transcripción específicos tienen tres características estructurales importantes tienen un dominio de unión a DNA con motivos de estructura supersecundaria que median la interacción con el DNA, como es el caso de los motivos hélice-vuelta-hélice, dedos de zinc (beta-beta-hélice), cierre de leucina (hélice-hélice). Además de un dominio de transactivación, el cual es responsable de unir un ligando que induce la activación debido a un cambio conformacional del dominio de unión a una secuencia de DNA específica para causar un efecto en la tasa de transcripción de los genes blanco (113,114).

En el caso de los mecanismos de post-transcripción, el pre RNAm es procesado generando una modificación en la región 5' de este denominada “capping”, lo cual es la agregación de un grupo de 7-metilguanosa ( $m^7G$ ), además en la región 3' del RNAm sufre una modificación denominada corte y poliadenilación, lo cual hace referencia a la adición de adeninas denominado tracto de poli (A), estas modificaciones afectan la estabilidad del RNAm y con ello su accesibilidad para ser traducido a proteína (115-117). Por otra parte, el RNAm maduro tiene las denominadas regiones no traducidas (UTR) en la 5' y 3', donde se localizan elementos de regulación de la expresión génica como elementos tallo burbuja o secuencias específicas que son reconocidas por proteínas de unión a RNA, por ejemplo, el sistema IRE/IRP, el cual en el RNAm de ferritina tiene en la

5' UTR un elemento IRE que es reconocido por la proteína IRP que reprime la traducción. Para el gen del receptor de transferrina en la 3' UTR tiene elementos IREs que son reconocidos por IRPs e incrementan la estabilidad del RNAm, aumentando la posibilidad de que el RNAm sea traducido. Principalmente, el papel de estos elementos en *Cis* del RNAm maduro afecta la estabilidad del RNAm a través del reconocimiento por proteínas específicas que promueven la estabilidad o la degradación del RNAm con lo cual afecta la síntesis de proteínas (118).

Las regiones codificantes de los genomas son ampliamente estudiadas, se sabe que el 1.5 % aproximadamente de la información genética codifica para proteínas, lo que significa, que la mayoría de la información genómica está implicada en la regulación de la expresión génica. En particular, las regiones no traducidas del RNAm están involucradas en muchas rutas de regulación por un mecanismo a nivel post-transcripcional, afectando la localización subcelular, estabilidad, la modulación en el transporte fuera del núcleo y la eficiencia de traducción del RNAm. La importancia de las regiones UTRs radica en que alteraciones como mutaciones en estas regiones pueden tener como consecuencia una patología (119,120). La regulación por regiones UTRs esta mediada por motivos de RNA ("RNA structural motifs") localizados en los extremos 5' o 3', donde pueden interaccionar proteínas específicas. Por ejemplo, las proteínas de tipo CUG reconocen repetidos de esta secuencia ubicados en la 5'UTR de RNAm específicos, el efecto se refleja en la eficiencia de traducción (121). Las regiones 5'UTR son de tamaño constante entre muchas clases taxonómicas en promedio tienen de 100 a 200 nucleótidos, comparado con las 3'UTR que en promedio son más variables, se componen de aproximadamente 200 nucleótidos en plantas y hongos, sin embargo, en humano y otros vertebrados se presentan hasta 800 nucleótidos (122). Una función importante descrita para estas regiones UTR es su participación en la regulación de la estabilidad del RNAm, está es evaluada para obtener la vida media del RNAm, variando en orden de magnitud desde pocos minutos hasta muchas horas y en algunos casos hasta días (123). Por otro lado otro ejemplo en el 3'UTR se pueden encontrar elementos ricos en Adenina y Uracilo ("AU-Rich Elements": AUREs/AREs) (124,125), esta nomenclatura corresponde a los mismos elementos, únicamente que fueron definidos como AUREs años anteriores y actualmente son conocidos como AREs (Tabla 2) (126).

Los AREs son reconocidos por proteínas de unión a AREs (ARPs o ARE-BP), se ha descrito que las proteínas Hur, Tristetraprolina o AUF1, las cuales pueden estabilizar o desestabilizar el RNAm (127), afectando directamente la vida media del RNAm, que se define como: el tiempo en el cual el 50% de moléculas de RNA resultan intactas. El estudio de las interacciones de proteínas con las estructuras o secuencias específicas en los extremos 5' y 3' UTR del RNAm han permitido entender la importancia directa en la regulación de la expresión génica llevando a implicaciones como el desarrollo de múltiples patologías (120,126).

**Tabla 2. Clasificación de los elementos AREs.** Clasificación de las tres clases (1, 2, 3) de elementos ricos en Adeninas (A) y Uracilos (U) (AREs o AUREs).

<b>AUREs/AREs</b>	<b>Motivos</b>
<b>Clase 1</b>	Pentámero de AUUUUA
<b>Clase 2</b>	SOBRELAPAMIENTO del motivo UUAUUUA con sustituciones (U/A)(U/A)
<b>Clase 3</b>	Ricos en Uracilo pero no contienen el motivo AUUUA

### **10.1. Interrelación entre el inicio de la transcripción vs estabilidad del RNAm**

Generalmente la estabilidad del RNAm es el mecanismo de regulación que predomina en muchos genes caracterizados y muchos otros son regulados por el rango en el inicio de la transcripción. Sin embargo,, el inicio de la transcripción y la estabilidad del RNAm deben ser considerados simultáneamente (125).

Todos los RNAm de genes expresados tienen una estabilidad intrínseca aunque los genes sean regulados a nivel de inicio de la transcripción. Esto se ha descrito más claramente en genes de respuesta temprana, de los cuales es necesaria una alta concentración de RNAm poco después de iniciar la transcripción, y de la misma manera deben ser rápidamente desregulado (como los genes de *c-fos*) (128). La vida media corta intrínseca permite que haya RNAm durante un mínimo de tiempo para que se lleve a cabo la traducción a proteínas, sin embargo, estos RNAm son rápidamente degradados después de que la transcripción cesa. En el estudio del RNAm de *c-fos* que presenta un ARE removido en el 3'UTR, llevo a mostrar un efecto de transformación celular (129). Por otra parte, se sabe que un rango de inicio de la transcripción en un RNAm de vida media larga alcanza su estado estable de abundancia hasta un largo tiempo, por lo tanto las vidas medias largas son implicadas en procesos de ubiquitinación descritos en RNAm que son tejido específicos y que no requieren rápida inducción o represión, por lo que RNAm con la vida media larga minimiza la energía necesaria para la síntesis de mensajeros (109).

Por lo tanto, la longitud de la vida media intrínsecamente corta o larga, no refleja que la regulación es necesariamente dependiente de la estabilidad del RNAm, debido que también hay un incremento en la vida media cuando la síntesis de RNAm se induce o se reprime. Incluso si un gen solamente es regulado a nivel transcripcional, la estabilidad intrínseca de RNAm contribuye a su patrón de expresión y abundancia. En el escenario donde la transcripción regula la expresión génica de un gen, se sugiere que ese gen codifica a un RNAm de vida media corta, porque este debe alcanzar su estado de abundancia en un tiempo corto (125,127).

Un escenario más complejo es cuando ambos procesos (transcripción y post transcripción) son transitorios, lo cual pondría a ambos procesos como responsables del estado de abundancia de RNAm (125). Esto se ha descrito en estudios con células T, donde diferentes RNAm de citosinas son transitoriamente inducidas por el inicio de la transcripción y la estabilización de moléculas de RNAm; las citosinas son rápidamente inducidas cuando ambos procesos son activados y son rápidamente degradadas cuando el inicio de transcripción y la estabilidad se reducen (125,127,130) .

### **11. Estudio de los metales pesados en la célula**

Los metales son sustancias con alta conductividad eléctrica, maleabilidad y brillo, estos pierden voluntariamente sus electrones para formar cationes. Los metales se encuentran de forma natural en la corteza de la tierra y sus composiciones varían entre las diferentes localidades, dando lugar a variaciones en sus concentraciones. La distribución de metal en la atmósfera se controla por las propiedades del metal y por diversos factores ambientales (131).

Desde el punto de vista biológico los cationes divalentes son principalmente utilizados por las proteínas como cofactores o elementos de estabilidad estructural. Principalmente la afinidad de las proteínas por un catión divalente es entendida por la serie Irving-Williams que se refiere a las estabilidades relativas de los complejos formados por un ión metálico con una proteína. La constante de estabilidad para la formación de un complejo sigue el orden:  $Mn(II) < Fe(II) < Co(II) < Ni(II) > Cu(II) > Zn(II)$  (111).

A partir de las estructuras de 3D de 1,371 enzimas se ha determinado por métodos bioinformáticos que el 47% requieren metales, y un 41% contienen metales en sus centros catalíticos. Las metaloenzimas se clasifican en los seis clases, de las cuales el 44% son oxidoreductasas, el 40% transferasas, 39% hidrolasas, el 36% lipasas, el 36% isomerasas y el 59% ligasas (132).

El magnesio es el metal más frecuente en las metaloenzimas, aunque a menudo está implicado en interacciones con sustratos que contienen fosfato tales como el ATP y en algunos casos es intercambiable con manganeso. Una clasificación de enzimas que utilizan metal revela que el hierro (81%), cobre (93%) y molibdeno más tungsteno (81%) son los más utilizados como portadores de electrones en oxidoreductasas (133).

En el caso de cobalto y molibdeno se encuentran casi exclusivamente en asociación con cofactores en vitamina B12 y enzimas molibdopterina-dependientes. Dentro de la proporción total de proteínas existentes, se describe que utilizando metales es menos de 47%, lo cual tiene contribuciones con relación a la función y a nivel estructural de las proteínas, tales como el catión zinc en proteínas tipo ZNFm (111,133).

Para el ser humano hay 35 metales de gran interés, de los cuales 23 son metales pesados: antimonio, arsénico, bismuto, cadmio, cerio, cromo, cobalto, cobre, galio, oro, hierro, plomo, manganeso, mercurio, níquel, platino, plata, telurio, talio, estaño, uranio, vanadio y zinc (131).

La toxicidad de metales pesados puede dañar el funcionamiento del cerebro, pulmones, riñón, hígado, la composición de la sangre y otros órganos importantes. La exposición a largo plazo puede conducir a degeneración física, muscular y neurológica llevando a procesos degenerativos que conllevan a enfermedades tales como esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, Alzheimer y la distrofia muscular. La exposición repetida a largo plazo de algunos metales y sus compuestos pueden incluso causar cáncer (131).

El mecanismo de la toxicidad se produce principalmente debido a la capacidad de sustituir otros cationes divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y cationes monovalentes como  $\text{Na}^+$ , que en última instancia perturba el metabolismo biológico de la célula (111,132).

Entre estos destaca el mecanismo iónico de toxicidad del plomo que muestran cambios significativos en diversos procesos biológicos tales como la adhesión celular, señalización intra celular, plegamiento de proteínas, la maduración, la apoptosis, el transporte iónico, la regulación de la enzima, y la liberación de neurotransmisores (131).

Aunque estos metales tienen funciones biológicas cruciales en plantas y animales, a veces sus propiedades químicas como coordinación y la oxido-reducción de estos, les ha dado un beneficio adicional para que puedan escapar a mecanismos de control tales como la homeostasis, el transporte, compartimentación y la unión a constituyentes de la célula. Estos metales se unen a los sitios de proteínas que no están hechos para ellos mediante el desplazamiento de los metales originales de sus sitios de unión naturales, causando el mal funcionamiento de las células (134).

Investigaciones han encontrado que el deterioro oxidativo de macromoléculas biológicas es principalmente debido a la unión de metales pesados con el DNA y proteínas nucleares (134,135).

### **11.1. Regulación génica en respuesta a metales pesados**

Las bacterias tienen un conjunto de factores de la transcripción que unen metales en su estructura e interaccionan con el DNA, esto promovido por el cambio en la concentración de metales en el ambiente celular, estos factores pueden ser clasificados en familias de represores de respuesta a metales (ArsR-SMTB, CSOR-RcnR ), co-represores de respuesta a metal (Piel, NikR y DtxR) y activadores (Mer)(111,132).

Los factores de transcripción denominados “sensores” detectan cambios muy sensibles en la concentración de metales externos a la membrana plasmática. Estos sensores detectan a los metales citosólicos a través de afinidades a ellos mismos en su región de transactivación. En el escenario de que los sensores se someten a intercambio de metal en depósitos de metal citosólicos, sus afinidades se convierten en los límites para mantener la homeostasis. Una característica importante en los sensores es la conversión de un estado apo a la forma holo, este cambio provoca que la proteína active la transcripción de genes y con ello se presenta un incremento de la síntesis de las proteínas para expulsar o secuestrar metales, por lo que las concentraciones a las que los sensores se vinculan con el metal no pueden ser excedidas.

Por ejemplo, se estima que dos sensores del catión zinc en *E. coli*, Zur y ZntR tienen afinidades de femtomoles de zinc, lo que sugiere que la unión del metal a la proteína es baja por volumen de células de *E. coli* (136).

En levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*), la metalo regulación esta mediada por la unión al DNA de factores de transcripción activado por la unión al metal promoviendo el cambio de localización citoplasmática a nuclear, la represión es controlada por la función del dominio de activación y la afinidad al DNA es mediada por el metal en el dominio de unión al DNA. En *S. cerevisiae*, Zap1 responde a concentraciones de zinc, Mac1 y Ace1 (también conocido como Cup2) a cobre, y Aft1, Aft2 a hierro (133,137).

Para cobre se han descrito 3 factores de transcripción: Ace1 (también conocido como Cup2), AMT1, y CRF1, que activan la expresión génica en respuesta a altas concentraciones de cobre, y otros 3 denominados Mac1, Grisea, y Cuf1 que activan la expresión génica en respuesta a la deficiencia de cobre.

Mac1 y Ace1 en *S. cerevisiae* son activados en respuesta a baja y alta concentración de cobre respectivamente. La concentración de cobre es determinante para la actividad de estos factores transcripcionales, mientras Mac1 pierde su función ACE1 es activado, sin embargo, aún no está bien dilucidado el mecanismo de activación e inactivación mediado por la unión de cobre (111,138).

Por un lado, Ace1 (CUP2), Mac1 y AMT1 contienen hacia el N-terminal (entre los residuos 1 y 40) un dominio "Copper Fist Binding Domain" y para CRF1 no se puede definir claramente la presencia de este dominio; además contienen los residuos conservados que enlazan un catión  $Zn^{2+}$  (motivo similar a C2H2-ZNFm) y el motivo conservado de secuencia (R/K)GRP, que son esenciales para la unión específica al surco menor del DNA. Adelante del "Copper Fist Binding Domain" de Ace1 (CUP2) y AMT1 se presentan 3 motivos ricos en cisteína Cys-X-Cys y un motivo rico en cisteína Cys-X2-Cys-que forma un grupo que unen 4 Cu iones (sitio poli cobre). El extremo carboxilo de Mac1 contiene dos motivos Cys-X-Cys-X4-Cys-X-Cys-X2-Cys-X2 que han sido designados como C1 y C2 (111,132,138).

La activación o represión de la expresión de genes en respuesta a  $Zn^{2+}$ , es controlada por el factor de transcripción Zap1, a través de un proceso dependiente de los C2H2-ZNFm de zinc presentes en este factor. Zap1 tiene dos dominios de transactivación, uno de los cuales se encuentra localizado en un atípico par de dedos de zinc. En los dedos de zinc atípicos se describe una débil unión a DNA comparado con el estándar dedo de zinc. Al parecer el rango intracelular de zinc para la unión del metal a los atípicos dedos de zinc de Zap1 está en el rango de nanomolar, la concentración que es más alta que en bacterias, el cual al unirse provoca el cambio conformacional y mediante los dominios de transactivación se promueve la activación o represión génica en respuesta al metal reconociendo los elementos de respuesta a  $Zn^{2+}$ (ZRE) en promotores de genes responsables de la homeostasis de  $Zn^{2+}$  en la célula (133).

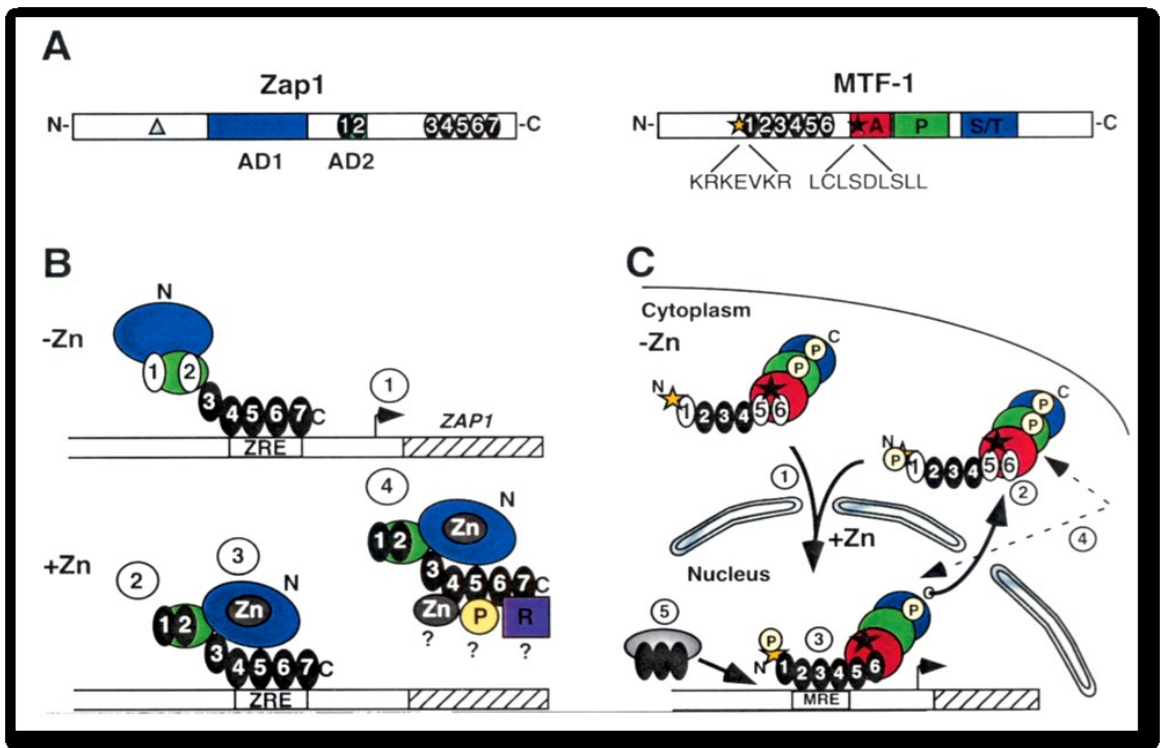
En el caso de hierro, el factor transcripcional Aft1 es activado por bajas concentraciones de hierro, este se acumula en el núcleo y se describe que es responsable de activar genes que codifican a el transporte de hierro (133).

En mamíferos, es bien conocido y caracterizado el factor de respuesta a metal 1 (MTF-1), el cual a través de sus C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-ZNFm de zinc interacciona con el DNA. EL Zn<sup>2+</sup> estabiliza un complejo entre MTF-1 y su sitio de unión a DNA. MTF-1 no es exclusivamente un activador transcripcional, actúa algunas veces con otros factores como es el caso del homólogo en Drosophila MTF-1, la participación de otros factores y la unión al metal le dan una alta especificidad. La transcripción de genes blanco de MTF-1 es inducido en respuesta al metal así como cobre, cadmio, no simplemente Zn<sup>2+</sup>. De manera interesante, el cobre y cadmio tienen un efecto contrario en un sistema libre de células, donde se observó que inhiben el efecto activador de MTF-1, esto se piensa debido a que cobre y cadmio tienen mayor afinidad por los sitios de unión en MTF-1, lo cual no promueve su transactivación. De manera interesante se describe que la inactivación de MTF-1 por cobre o cadmio puede ser reversible *in vitro* mediante la liberación de zinc desde metalotioneinas que liberan el zinc por la unión más afín del cadmio o cobre y eso deja disponible el Zn<sup>2+</sup> que se une a los dominios de transactivación y activan a MTF-1 (111,133,139) (Figura 4).

Zap1 y MTF-1 tienen una serie de características que son comunes en los activadores de la transcripción, que incluyen los dominios de transactivación y dominios de unión al DNA que contienen dedos de zinc de tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-ZNFm (Figura 4). Zap1 tiene dos dominios de activación.

El primer dominio de activación se encuentra en el extremo N-terminal en una región rica de residuos de cisteína e histidina, y el segundo dominio de activación se asigna a una región que contiene dos dominios tipo dedo de zinc C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-ZNFm (140). Cinco más los dominios dedos de zinc en el C-terminal son esenciales para Zap1 y lograr la unión al DNA (141).

MTF-1 es una proteína de 72,5 kDa que contiene seis dominios tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-ZNFm y tres dominios de transactivación, lo que le permite mediar la respuesta de homeostasis a concentraciones de Zn<sup>2+</sup> en la célula (Figura 4) (111,132,133)



**Figura 4. Zap1 y MTF-1 son factores de transcripción de respuesta a  $Zn^{2+}$ .** A) Esquema de la constitución de los siete dominios C2H2-ZNFm de zinc de Zap1 y seis C2H2-ZNFm de zinc de MTF-1, además se muestran los dominios de transactivación de Zap1 (AD1, AD2) y los de MTF-1, que contienen una región rica en prolinas (P) y un dominios rico en Serina y Tirosina donde sufre fosforilaciones importantes para llevar a cabo su actividad (S/T). B) Esquema que muestra los 4 pasos que involucran el mecanismos de Zap1, 1) Zap1 se transloca al núcleo en respuesta a bajas concentraciones de Zinc y reconoce el elemento de respuesta a Zinc (ZRE) en la región promotora de genes de respuesta a este mecanismos. 2) En función de recobrar la homeostasis de Zinc en la célula Zap1, 3) Se les une zinc en el dominio de transactivación que provoca un cambio conformacional desuniéndose al ZRE, 4) Además se describen que sufre fosforilaciones que inhiben su actividad (133).

## 12. Factores de transcripción tipo C2H2-ZNFm.

Una perspectiva que aborda y clasifica los factores de transcripción tipo C2H2-ZNFm fue realizada mediante la aproximación combinando dos métodos populares para la detección de homólogos, “Recíprocal Best Hit” (RBH) (142) y el modelo oculto de Markov (HMM)(143).

Un total de 3,890 genes fueron identificados a partir de 124 genomas eucariotas secuenciados determinando la presencia de 37 miembros de un complejo subconjunto de familias de genes que codifican a dedos de zinc del tipo C2H2-ZNFm. Estas familias de genes en eucariotas revelan una historia evolutiva mostrando las adiciones de bloques de genes, lo que concuerda bien con la relación filogenética de los organismos, así como un posible aumento de la complejidad del organismo. Del total de las 37 familias, 7 familias están presentes en todos los eucariotas. El aumento de la complejidad morfológica a partir de protistas primitivos para los vegetales o los hongos implicando dos familias, pero una familia común para hongos y plantas (144) .

La expansión final en metazoarios ha añadido 25 familias a las presentes en otros grupos (protistas, plantas y hongos) y esta expansión correlaciona con el gran aumento de la complejidad morfológica de estos organismos. La mayoría de las familias de genes resistentes a la expansión (un solo miembro de las familias de genes) están muy conservados y están representados en la mayoría de las especies eucariotas. Asumimos que estas familias están presentes en el ancestro común de los eucariotas ya que están involucrados en los procesos fundamentales tales como la reparación de daño al DNA y empalme de intrones (144).

En general, las familias de genes que codifican a C2H2-ZNFm con uno o dos motivos son más resistentes a la expansión génica, mientras que las familias que contienen múltiples motivos C2H2-ZNFm es más difícil grupos o familias de estos genes en el genoma de un organismo. Dicha expansión se produce debido a la estructura modular de los genes que contienen multi-ZNFs que proporciona una plataforma favorable para el desarrollo de nuevas funciones. La hipótesis que se ha planteado, es que las expansiones de un linaje específico son un medio principal de adaptación y una de las más importantes fuentes de la diversidad organizacional y normativa en muchos organismos durante las transiciones hacia una mayor complejidad (145) .

Los dedos de zinc contienen de dos a tres hojas  $\beta$  en su secuencia N-terminal y una hélice que forma a cada C2H2-ZNFm. La función principal de los C2H2-ZNFm es la unirse a segmentos de DNA con una afinidad específica conferida por varios residuos presentes en la hélice del dominio y con el apoyo proporcionado por residuos enlazadores conservados en los C2H2-ZNFm. Estas proteínas junto con otros factores participan en el control de la transcripción de genes blanco (146).

Algunas proteínas con C2H2-ZNFm pueden unir RNA o proteínas, además de DNA, y otros se unen a RNA solamente, en general, cuanto mayor el número de dedos de zinc, la mayoría de C2H2-ZNFm tienen afinidad específica por diferentes ligandos, por ejemplo, las proteínas con 3 dedos de zinc, pueden unir DNA, RNA o proteína, mientras que las proteínas con 6, 9, o 29 dedos de zinc pueden tener dos o tres tipos de actividades de unión mediada por diferentes C2H2-ZNFm.

Las proteínas con C2H2-ZNFm se pueden dividir en tres grupos en función de sus dominios: (I) triple dedo de zinc, (II) multi-adyacentes de dedos de zinc, y (III) separado-alineado dedos de zinc (145).

Para el tipo I el factor Zif268, también conocido como Krox-24, NGFI-A, y Egr1, es tal vez el más ampliamente estudiado de todas las proteínas tipo dedos de zinc. Contiene tres C2H2-ZNFm, cada uno de los cuales está formado por dos hojas  $\beta$  y una  $\alpha$  hélice. Todos los dedos de zinc de Zif268 pueden unirse en el surco mayor del dúplex de DNA anti-paralelamente a la hebra primaria 5'G<sup>1</sup>C<sup>2</sup>G<sup>3</sup>T<sup>4</sup>G<sup>5</sup>G<sup>6</sup>G<sup>7</sup>C<sup>8</sup>G<sup>9</sup>G<sup>10</sup>-3, la mayoría de los contactos de residuos son mediados por puentes de hidrógeno de los nucleótidos y las columnas vertebrales de fosfato envolviéndose alrededor del DNA (147).

Para las proteínas "multiple-adjacent-C2H2 zinc finger" los cuales refieren a proteínas dedos de zinc que confiere la capacidad de unir DNA, estas proteínas contienen cuatro o más dedos de zinc situados cerca uno del otro a intervalos similares, TFIIIA, contiene nueve dedos del tipo C2H2-ZNFm y es capaz de unir DNA (148). Una estructura cristalina de TFIIIA muestra que los C2H2-ZNFm del 1-6 se unen al DNA del 1-3 envuelven suavemente alrededor del surco mayor del DNA como Zif268, pero los dedos 4-6 cubren a lo largo un lado del dúplex de DNA y formar una estructura abierta extendida. Aunque se describe que los dedos de zinc del 7-9 se envuelven alrededor del surco mayor del DNA (145).

Finalmente los factores del tipo de dominios separados C2H2-ZNFm, se describe a la proteína denominada “Tramtrack” (TTK) contiene dos C2H2-ZNFm. La estructura cristalina del complejo de DNA con TTK revela que dos dedos de zinc tienen contacto con 5'-A<sup>1</sup>G<sup>2</sup>G<sup>3</sup>A<sup>4</sup>T<sup>5</sup>-3' reconociendo la superposición de un sitio G<sup>3</sup> y el contacto con DNA es similar al descrito para la proteína dedos de zinc Zif268. Otra diferencia de TTK es que no contiene la secuencia común de unión entre los dedos de zinc (KRNVKVYP) para este tipo de proteínas. Este enlazador parece ser flexible, desordenado, y no parece influir en la unión proteína-DNA. TTK tiene un péptido extra a los filamentos convencionales  $\beta$   $\beta$  hebra en el N-terminal, pero puede no tener nada que ver con la unión al DNA y en su lugar participar en el mantenimiento de la estructura de la proteína (145,149).

### **13. Metaloproteinasas**

Las metaloproteinasas (metalopeptidasas o metaloproteasas) son proteinasas que degradan múltiples sustratos, implicadas en muchos procesos como desarrollo embrionario, morfogénesis, procesamiento de péptidos hormonales, liberación de citocinas, factores de crecimiento, adhesión celular y migración, absorción intestinal de nutrientes, procesamiento de poliproteínas, biosíntesis de pared bacteriana y metabolismo de antibióticos (150).

Las metaloproteinasas son clasificadas en una base de datos actualmente llamada MEROPS (base de datos de proteasas) (<http://merops.sanger.ac.uk>) esta base de datos alberga todos los tipos de proteinasas (Tabla 3). En general son clasificadas en función de su sitio catalítico: Aspártico, Cisteína, Glutámico, Metalo, Asparagina, Serina, Treonina y proteinasas no clasificadas (151). Esta clasificación está dada en clanes y familias aunque algunas familias tienen subfamilias. Un clan es el que contiene todas las proteinasas que tienen un origen evolutivo común y pueden ser ordenadas en familias que muestran su relación evolutiva y conservación a nivel de estructura tridimensional o incluso cuando las estructuras no están disponibles, se ordenan por la conservación de los residuos de sitio catalítico (40).

**Tabla 3. Número de proteínas liberado por MEROPS (40,151).**

<b>MEROPS 9.13</b>	
<b>Secuencias</b>	523 871
<b>Proteínas identificadas</b>	4622
<b>Familias</b>	253
<b>Clanes</b>	61
<b>El número de proteínas fue liberado por MEROPS 9.13 en julio 2015.</b>	

Las metaloproteinasas representan una clase de hidrolasas que escinden enlaces peptídicos por la acción de una molécula de agua que se activa mediante la unión de iones metálicos divalentes. La mayoría de las metaloproteinasas se caracterizan por presentar un ion de zinc en su centro catalítico. Sin embargo,, en algunas de estas proteínas esta función se realiza por otros iones como el manganeso, el cobalto, el níquel o incluso los iones de cobre. En algunos casos de metaloproteinasas se describe la presencia de dos iones metálicos que actúan co-catalíticamente (40,152,153). El metal está unido por tres residuos de aminoácidos conservados que pueden ser: His, Asp, Glu o Lys, según la clasificación de las proteínas basada en la estructura proteica y homología implementada en la base de datos MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) (40,152). Las metaloproteinasas se encuentran clasificadas en 14 clanes diferentes. Las proteínas de clanes MA, MC, MD, ME, MJ, MK, MM, MO y MP, contienen solo un ion de metal catalítico en la mayoría de los casos es zinc, mientras que los clanes MF, MG, MH, MN y MQ contienen dos iones metálicos actuando co-catalíticamente sobre el sustrato, además, M-corresponde a familias de metaloproteinasas aún no asignadas a un clan. (M significa metaloproteinasas) (40).

El clan MA comprende subclases MA (E) (gluzincinas) y MA (M) (metzincinas), este es uno de los clanes más completos y contiene algunos de los más prominentes miembros e importantes de metaloproteinasas a nivel industrial. Todos los miembros de este clan se caracterizan por un elemento de zinc en el sitio activo y se presenta el motivo HEXXH que es altamente conservado y forma parte de la hélice central de este tipo de metaloproteinasas. Los dos residuos de aminoácidos de este motivo están involucrados en la interacción de zinc, mientras que Glu se considera que es el aminoácido catalíticamente más importante debido a que mutaciones en este residuo llevan a la inactivación proteolítica de la enzima (152,154,155).

Las subclases de MA (E) y MA (M) difieren en el tercer aminoácido de ligando de zinc. En el caso de las gluzincinas, este ligando es un residuo de Glu que está a 18-72 residuos de aminoácidos distantes del motivo HEXXH (152).

Otra clase de subfamilia son las metzincinas contienen un Asp o un His como residuo en su motivo HEXXHXXGXXH / D motivo como el tercer ligando de zinc, además se caracterizan por una Met conservada subyacente al sitio activo (154).

La glicina conservada en este motivo es importante para los tres ligandos de zinc que tengan la posición requerida (40). En caso del clan MC (familia M14) contiene un gran número de carboxipeptidasas P, importantes enzimas en animales, las carboxipeptidasas A, B, D y E, así como la carboxipeptidasa T de los actinomicetos contienen conservado el motivo HXXE. Para el Clan MD contiene las familias M15 y M74. La familia M15 incluye un zinc D-Ala-D-Ala carboxipeptidasa de *Streptomyces albus* que libera el D-aminoácido que contiene un péptido reticulante requerido para la biosíntesis de la pared celular bacteriana (156). La familia M74 contiene la mureína endopeptidasa (MepA) de *Escherichia coli* que hidroliza el péptido glicano en las paredes celulares bacterianas (157). Los miembros del clan ME están formados por las familias M16 que contiene la peptidasa procesadora mitocondrial (MPP). La familia M44 contiene la metaloproteínasa correspondiente a la vacuna del virus de la poliproteína procesadora de endopeptidos denominada G1L y se caracterizan por conservar el motivo HXXEH. Las MPP tienen un sitio activo similar al de la termolisina que catalizan la eliminación de señales de orientación N-terminal de proteínas mitocondriales sintetizadas en el citoplasma. El Clan MF, que comprende la familia M17 y contiene únicamente leucil de eucariontes y aminopeptidasas de bacterias, que requieren dos iones metálicos para la actividad catalítica. Un número de exopeptidasas muy diferentes pertenecen al clan MG (familia M24). La mayoría de estas enzimas requieren dos iones cobalto o manganeso. Los más importantes miembros de esta familia son la metionil aminopeptidasa bacteriana y Xaa-ProAminopeptidasa, así como el tipo I (mitocondria) y el tipo II (citoplasmático). Las metionil aminopeptidasas eucariotas que escinden la metionina inicial co-traduccionalmente a partir de proteínas recién sintetizadas (154). Los miembros del clan MH, que se dividen en familias M20, M28 (principalmente Carboxi y aminopeptidasas), M18 y M42 (principalmente aminopeptidasas), requieren iones co-catalíticos de zinc (40,154). Los miembros del clan MJ (familias M19 y M38) son dipeptidasas, una de las cuales corta sustratos bastante exóticos que tienen residuos de isoaspartilo (40,154).

La única peptidasa del clan MK (familia M22) es la O-sialoglicoproteína endopeptidasa. Los otros miembros de este clan están presentes en todos los genomas y se caracterizan por un pliegue que parece ser similar al de las no metaloproteínas, actina, Hsp70 y DNAK (40). La característica más importante de los miembros de la familia M50 del clan MM es la presencia de un motivo HEXXH similar al del clan MA (154). Estas enzimas están unidas a las membranas y contienen un ion de zinc y se ha demostrado que regulan su expresión génica por procesamiento proteolítico por factores de transcripción. Los miembros del clan MN (familia M55), representados por la D-aminopeptidasa DppA, contienen iones de zinc co-catalíticos. Los miembros del clan MO (familia M23), tales como la metalopeptidasa  $\alpha$ -lítica son endopeptidasas que lisan los peptidoglicanos de la pared celular bacteriana. El clan MP, contiene la familia M67 que presenta isopeptidasas que liberan ubiquitina de proteínas ubiquitinadas. Clan MQ, contiene la familia M29 incluye aminopeptidasas de bacterias termófilas tales como aminopeptidasa T de *Thermus aquaticus* y PepS aminopeptidasa de *Streptococcus* Termófilo (154). Clan M- contiene familias de metalopeptidasas que aún no han sido asignadas a un clan bien definido. Comprende las familias M49 (representadas por dipeptidilpeptidasa III de *Rattus norvegicus* que libera secuencialmente los dipéptidos N-terminales a partir de péptidos como las angiotensinas II y III, Leu-encefalina, prolactina y Hormona estimulante de  $\alpha$ -melanocitos). Además, M73 que comprende la camelisina, una endopeptidasa de superficie celular de *Bacillus cereus* y M75 que muestra la imelisina o proteainasa de membrana de escisión de insulina de *Pseudomonas aeruginosa* (154).

#### **14.Regulación de la expresión génica de metaloproteinasas**

Uno de los tipos más estudiados de metaloproteinasas son la de tipo de matriz extracelular (MMPs), en general la expresión de sus genes es normalmente baja en tejido, estas son reguladas principalmente a nivel transcripcional, pero existe evidencia acerca de una modulación de la estabilidad del RNAm en respuesta a factores de crecimiento o citocinas. Las regiones promotoras de los genes: MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-12, MMP-13 muestran la conservación de elementos de regulación de la expresión genica (158).

El primer grupo de promotores está compuesto por una caja TATA como núcleo transcripcional aproximadamente a -30 pb y los denominados sitios AP-1 ubicados a -70 pb, estos sitios contienen la secuencia conservada de 5'-TGAG/CTCA-3' la que es reconocida por los dímeros de los factores de transcripción de la familia de C-Fos y C-Jun. Estos sitios funcionan incrementando la tasa de transcripción de genes de MMPs. Por ejemplo se ha determinado la existencia de un sitio AP-1 ubicado a -186 pb en promotores de genes de MMP-1 de conejo y humano, el cual incrementa la transcripción en respuesta a esteroides de forbol. Además se ha determinado la presencia de otro elemento denominado PEA3, el cual puede encontrarse adyacente a los sitios AP-1 el cual coopera con el control transcripcional (159).

El segundo grupo de promotores de MMP contienen caja TATA, pero carece de sitio proximal de AP-1. La regulación de estos promotores es relativamente simple y distinta a grupo 1 de promotores. El último grupo de promotores no presenta la caja TATA y contiene múltiples sitios de inicio de la transcripción, sin embargo, la expresión de MMPs es menor y es mantenida por la familia factores transcripción SP-1 los cuales se unen a cajas ricas en GC, provocando la expresión modesta o constitutiva de MMPs (153).

La activación transcripcional para genes de MMPs es iniciada por la activación de proteínas del tipo MAP quinasas que inician la cascada de señalización mediante fosforilación en cadena, estas son activadas por citocinas, estrés o señales de apoptosis. La cascada de señalización termina con la activación de la proteína-1 que es miembro de la familia c-Jun que se dimeriza con c-Fos y con ello regulan la expresión de múltiples genes de MMPs (153).

Otra ruta denominada "translocación de NF- $\kappa$ B", se activa por medio de la unión de IL-1 (Interleucina-1) a su receptor afín, transformando el factor de crecimiento- $\beta$ , como quinasa (NIK), lo que permite realizar la sobre fosforilación del inhibidor de  $\kappa$ B y p105, estos son blanco de ser poli-ubiquitinados y degradados por el proteosoma y es posible la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo y transactivar genes de MMPs (153).

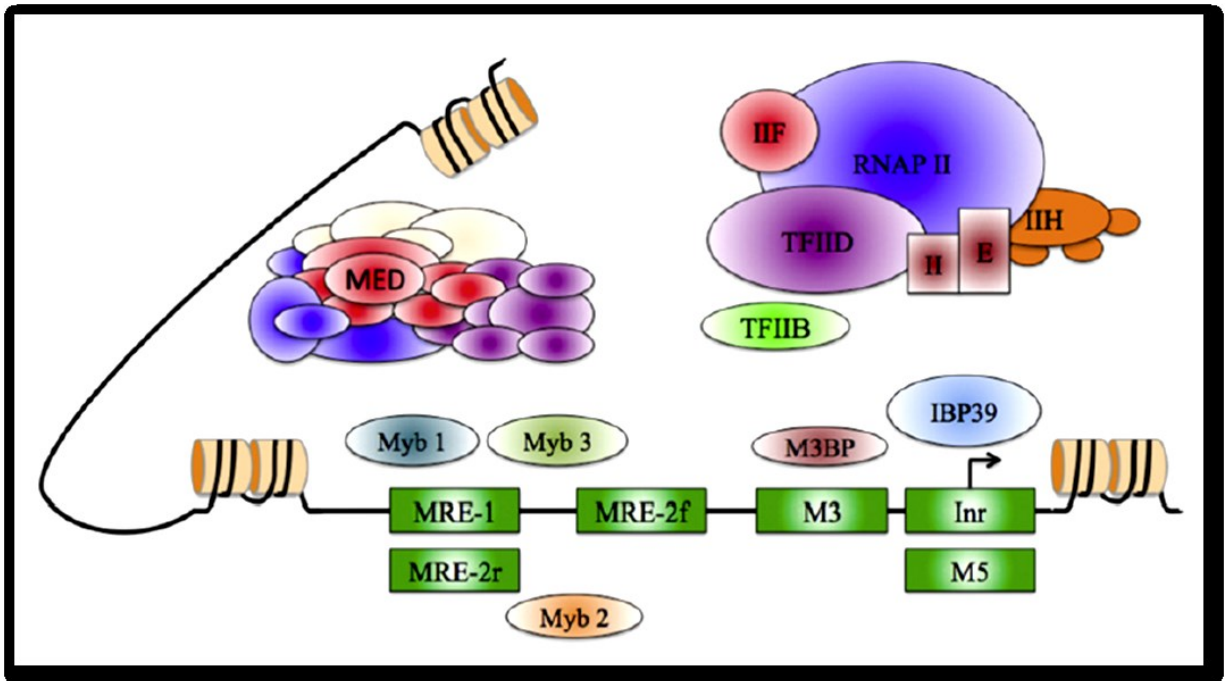
## 15. Regulación de la expresión génica en *T. vaginalis*

La expresión génica es vital para la sobrevivencia de *T. vaginalis*, ahora con la disponibilidad de la secuencia del genoma, se puede analizar los procesos biológicos y hacer predicciones globales de elementos reguladores de la expresión de genes que afectan la sobrevivencia del parásito (160). La regulación génica en los organismos es fundamental en respuesta a factores ambientales que afectan su sobrevivencia. La organización de los múltiples elementos que participan en la modulación de la expresión génica de un organismo, está determinada por la participación de la RNA polimerasa II, las proteínas que forman el complejo de inicio de la transcripción, así como elementos en *Cis* presentes en el núcleo del promotor, que determinan la expresión o silenciamiento de genes. Esto ha sido estudiado en organismos eucariontes como hongos, plantas y sistemas animales, sin embargo, en *T. vaginalis* es poco entendido (160).

La maquinaria de transcripción basal en *T. vaginalis* ha sido determinada e implicada en la expresión génica, estudios han demostrado que este parásito conserva un elemento del tipo Inr (Figura 5) conservado en metazoarios, que funciona como elemento análogo a la caja TATA en eucariontes superiores (161). El Inr en *T. vaginalis* juega un importante función en la expresión génica. Este elemento tiene la secuencia consenso T/CA(+1)Py T/A, esta se determinó por estudios en las regiones 5'UTR de genes que codifican a proteínas, mostrándose conservado como sitio de ensamble del complejo de inicio de la transcripción (37). En analogía del elemento Inr con la caja TATA en *T. vaginalis*, actualmente se ha determinado la ubicación de una caja TATA en el gen de snRNA U6, el cual es reconocido por la RNA Pol III, sin embargo, no se ha logrado demostrar su funcionalidad como elemento promotor de transcripción (37,161). Estudios *in silico* han permitido determinar la existencia de los genes que codifican a las RNA Pol I, RNA Pol II y RNA Pol III, indicando la existencia de las tres polimerasas funcionales. De esta manera se ha logrado determinar la presencia de genes que codifican a dos posibles proteínas de unión a caja TATA (TBPs), sin embargo, las cajas predichas en genes de *T. vaginalis* y su reconocimiento por estas proteínas del tipo TBPs no parece tener efecto en la transcripción de genes de este parásito (161).

El reconocimiento del Inr de *T. vaginalis* como núcleo de promotor fue determinado al demostrar el efecto a nivel de transcripción por la participación de la proteína IBP39, que fue identificada su especificidad para reconocer este elemento promoviendo la transcripción génica basal de este parásito. La IBP39 tiene dos dominios de interacción en el N-terminal que permite identificar y reconocer el Inr y el dominio C-terminal, el cual le permite la interacción con la RNA Pol II (Figura 5) (37,161).

Por medio de análisis bioinformático se ha predicho y comprobado por análisis bioquímicos que los genes de *T. vaginalis* conservan diferentes motivos implicados en la regulación transcripcional de este parásito como son: Motivo 1= (TCAT/CTTT/CT/C, Motivo 3= (A/G/TA/GCG/CGT/CTT/A/G) y el Motivo 5=(GG/A/TCCTTT/CT/C) (Figura 5); estos elementos son encontrados en múltiples promotores con gran frecuencia y se ubican a una distancia de -14 a -17 pb en relación al ATG. Análisis de mutación y ensayos de reporteros de luciferasa, demuestran que estas secuencias están implicadas en la transcripción (162). El inicio de la transcripción de genes que codifican a proteínas son direccionados por la participación de elementos del núcleo del promotor e interacción de factores de transcripción para direccionar la expresión génica en *T. vaginalis* (160-162).



**Figura 5. Maquinaria y elementos reguladores de la transcripción en *T. vaginalis*.**

El Inr es el elemento descrito como núcleo de promotor y es el elemento común regulatorio en *T. vaginalis*. Abreviaturas: RNAPII= RNA Polimerasa II; IIF= factor de transcripción F II; IIE= factor de transcripción IIE; IIE= factor de transcripción IIE; TFIID= factor de transcripción D II; TFIIB= Factor de transcripción IIB; MED= Complejo Mediador; IBP39= proteína de unión a iniciador; M3BP= proteína de unión a motivo 3; MRE= elemento de reconocimiento de Myb; M3=Motivo 3; Inr: elemento iniciador; M5=Motivo 5 (161).

### **15.1. Regulación génica mediado por hierro en *T. vaginalis***

En el tracto urogenital femenino, el hierro se presenta en altas y bajas concentraciones en relación al flujo menstrual; *T. vaginalis* fue utilizada la región 5'-UTR del gen *ap65-1* como modelo de estudio de la regulación transcripcional en presencia de hierro en este parásito, lo que demostró que la secuencia consenso: AGATAACGA, corresponde al promotor en respuesta a hierro, además de manera interesante, se identificó el sitio de unión de la proteína Myb-like (Figura 5) (163). La transcripción del gen de *ap65-1* involucra 3 factores transcripcionales tipo Myb-like (tvMyb1, tvMyb2 y tvMyb3) que se unen diferencialmente a dos sitios promotores espaciados, MRE-1/MRE-2r y MRE2f. Actualmente fue definido un fragmento de reconocimiento de tvMyb2 que comprende los residuos 40-156 (tvMyb2<sub>40-156</sub>) mostrando la secuencia 5'-A/GACGAT-3' como específica de reconocimiento, estos resultados muestran las bases moleculares del mecanismo de reconocimiento de Myb-DNA en *T. vaginalis* (Figura 5) (163-165).

### **15.2. Regulación post transcripcional mediante el sistema IRE/IRP en *T. vaginalis***

A nivel post transcripcional se han descrito mecanismos de regulación génica en *T. vaginalis*, como es el caso del "sistema IRE/IRP", que involucra los denominados elementos de respuesta a Fe<sup>2+</sup> (IREs) y las proteínas citoplasmáticas de regulación por hierro (IRP-1 y IRP-2), donde las proteínas permiten la traducción al ser inhibidas por altas concentraciones de Fe<sup>2+</sup>, sin embargo, en presencia de bajas concentraciones de Fe<sup>2+</sup>, las proteínas bloquean la traducción. Principalmente, en invertebrados dos IRPs (IRP1 y IRP2) tienen 57% de identidad y 75 % de similitud de secuencia con otras proteínas descritas (166). La IRP1 tiene una masa molecular de 98 kDa y la IRP2 105 kDa debido a que contiene 73 residuos adicionales. Principalmente estas proteínas IRPs tienen homología con la aconitasa mitocondrial, pero solo la IRP1 conserva dicha actividad, IRP2 parece ser que perdió esta función durante la evolución (166). El Fe<sup>2+</sup> se une a la cavidad de 4Fe-4S de IRP1 lo cual afecta su interacción con el IRE y recobra su actividad de aconitasa.

De manera contraria, en ausencia de Fe<sup>2+</sup>, IRP2 tiene actividad de unión a RNA, sin embargo, en presencia de Fe<sup>2+</sup> es degradado de manera dependiente afectando la interacción con el RNAm (166).

Los elementos de respuesta a hierro (IRE) están conformados de una estructura secundaria de RNAm, tallo-burbuja. Las proteínas IRP1 y 2 son capaces de reconocer la burbuja principalmente conformada de la secuencia consenso: CAGUGN (C1, G5). Estudios de mutaciones han demostrado que IRP1 reconoce la secuencia: UAGUAC e IRP2 CCGAGC o ambas proteínas reconocen los IREs (GAGUCG y CAGUGC)(166,167).

Estos mecanismos han sido descritos en genes de *T. vaginalis* como son *tvcp4* el cual contiene un IRE en la región 5'UTR y el gen de *tvcp12*, el cual contiene un IRE en la región 3'UTR, estos elementos junto con las proteínas IRP1 y 2 son responsables del mecanismo de expresión post transcripcional mediado por Fe<sup>2+</sup> en *T. vaginalis* (166,167).

### **15.3. Regulación génica mediado por poliaminas en *T. vaginalis***

En el microambiente urogenital masculino y femenino se encuentran presentes las poliaminas, que son pequeños cationes que afectan la expresión de los genes y proteínas involucrados en algunas propiedades de virulencia de este parásito, esta modulación se ha descrito para cuatro adhesinas (*ap120*, *ap65*, *ap55* y *ap33*) (168) y para el gen de *tvcp65*, *tvcp39* y *tveif5a* (169,170).

*T. vaginalis* es un parásito obligado por que carecer de la ruta de síntesis de novo de espermina, por lo cual obtiene esta molécula de su hospedero mediante un sistema antiporte acoplado a la secreción de dos moléculas de putrescina por cada molécula de espermina. En pacientes con tricomoniasis se encuentra presente en gran cantidad la enzima ornitina descarboxilasa (ODC), la cual participa en la vía de síntesis de la arginina hidrolasa que conduce a la producción de ATP.

En personas sanas la putrescina y otras diaminas no son detectadas en secreciones vaginales, sugiriendo que el parásito produce putrescina durante la infección al ser detectada en altas cantidades en personas enfermas (Yarlett y col., 2000). La espermina es convertida a espermidina dentro de los hidrógenosomas, vía espermidina N<sup>1</sup> – acetiltransferasa (SSAT)/ poliamina oxidasa. Esta enzima cataliza la transferencia de un grupo acetyl de la acetyl-CoA a un nitrógeno aminopropil terminal proveniente de la

espermina o espermidina, los cuales son metabolizados de espermidina y putrescina por la acción de una poliamina oxidasa (Yarlett y col., 2000).

La inhibición de ODC por el inhibidor reversible 1-4 diamino butano (DAB) resulta en la reducción significativa de putrescina y ODC, los cuales se incrementan al agregar putrescina exógena, reactivando el sistema antiporte (García y col. 2005).

Las poliaminas regulan la adquisición de hierro en las células de mamíferos, mediante la formación de complejo poliaminas-hierro incorporado a la vía de sistema de transporte de poliaminas. Estudios han observado que la adición de espermina y espermidina a un medio con bajo hierro y DAB, no restaura el crecimiento celular. Contrariamente, al arrestar el crecimiento con DAB en un medio con hierro incrementa la cantidad de adhesinas, sugiriendo que la transcripción y traducción de los genes de adhesinas no requieren del metabolismo de poliaminas en *T. vaginalis* (13).

Actualmente se ha descrito para el gen de *tvcp65*, que el nivel de expresión de RNAm, la cantidad de proteína y su actividad proteolítica, así como su localización, se ven disminuidas en parásitos crecidos en presencia del inhibidor DAB, lo que se asocia a la disminución de los niveles de citotoxicidad. Esto de manera interesante se revierte cuando se agrega al medio putrescina exógena reactivando la expresión y síntesis de TvCP65 (170).

Las poliaminas regulan la expresión de genes, así como la síntesis de transcrito y proteína de TveIF5A y TvCP39 (169-172). Un nuevo modelo de regulación génica mediado por poliaminas que describe la participación de la región 3'UTR del RNAm de *tvcp39* que tiene un elemento denominado ERE (Elemento de respuesta a TveIF5A), el cual es similar al encontrado en los RNAm de los genes de *cox-2* (172). Entonces se ha demostrado que el ERE presente en el RNAm de *tvcp39* es reconocido por TveIF5A sugiriendo un posible mecanismo de estabilidad de RNAm a través de estos elementos en *Cis* en el RNAm y proteínas de unión a RNAm como TveIF5A mediado por poliaminas (171).

Recientemente se reportó que TvCP39 es dependiente de putrescina exógena para la estabilidad del RNAm. Además de que durante el tratamiento con DAB de los parásitos mostraron a TvCP39 en citoplasma, sin embargo, de manera interesante cuando se cambiaron estos parásitos a medio de cultivo con putrescina exógena TvCP39 se relocalizó en el núcleo, lo cual sugiere una nueva función de TvCP39 en *T. vaginalis*, sin embargo, en otros organismos se describe que una CP en núcleo no es inusual y podría estar implicada en la disrupción de la barrera epitelial y participar en mecanismos de la respuesta inmune del huésped durante la invasión de *E. histolytica*. En mamíferos la catepsina L es localizada en el núcleo participando como regulador cromosomal en el procesamiento proteolítico del factor CDP/Cux y la histona H3 (173).

### **16. Estudio de los factores de transcripción en *T. vaginalis***

Debido a los pocos estudios hacia la caracterización de factores de transcripción (TF) en *T. vaginalis* y los orígenes poco entendidos del dominio de unión a Inr (IBD) de IBP39, se ha buscado mediante aproximaciones *in silico*, mediante homología de secuencia, definir una nueva familia de TFS específicos del linaje de *T. vaginalis* (37,174,175). Para lo cual se reporta la identificación de una familia de aproximadamente de 100 proteínas en el proteoma *T. vaginalis*, que contiene el dominio IBD y arquitecturas congruentes como IBP39. Esto sugiere que la IBD de hecho define un nuevo dominio del linaje que podría ser utilizado como una nueva familia de TFS específicos en este organismo (176). La divergencia de secuencia en la hélice de reconocimiento, así como el N-terminal con carga positiva del bucle en esta familia sugiere que hay diferentes versiones del dominio y son potencialmente especializados para ponerse en contacto con una serie de sitios de destino, que no sea únicamente el Inr en *T. vaginalis* (176).

Por otra parte, los factores de transcripción tipo Myb, son de los más estudiados en este parásito como reguladores de la transcripción (TvMyb1, TvMyb2 y TvMyb3) en genes en respuesta a hierro se ha descrito un mecanismo de expresión génica a nivel transcripcional usando como modelo el gen de *AP65-1*, estudios bioinformáticos describen la presencia de 488 genes que codifican a este tipo de TFs en el genoma de *T. vaginalis* (164).

Además, los factores de transcripción con C2H2-ZNFm de zinc son los más conservados en los organismos y están implicados en procesos de transcripción e interacción con DNA, RNA y con otras proteínas. En *T. vaginalis* únicamente se han identificado los C2H2-ZNFm en el genoma y aun no se sabe el número total de genes que codifican a este tipo de proteínas, además no existe ningún reporte de caracterización de alguna proteína tipo C2H2-ZNFm en este parásito (145,174).

### **17. Metaloproteinasas en *T. vaginalis***

Los genes presentes en el genoma de este parásito que corresponden a proteinasas son aproximadamente 446 genes de los cuales corresponden a: 6 asparto-proteinasas, 220 cisteína-proteinasas, 123 metaloproteinasas, 80 serína-proteinasas y 17 treonina-proteinasas (29).

Las primeras metaloproteinasas identificadas de *T. vaginalis* fueron 2 y se describen con pesos moleculares aproximados de entre 220 a 140 kDa, estas metaloproteinasas se identificaron e inhibieron mediante el uso de inhibidores como: Ácido etilendiaminotetraacético y ácido etilenglicoltetraacético (EDTA y EGTA); su actividad optima se encontró en un pH de entre 8-9 (177).

Otro estudio reportan el hallazgo e identificación y caracterización de una nueva metaloproteína de 47 kDa correspondiente a una metaloproteína de procesamiento de hidrógenosoma de la subunidad  $\beta$  ( $\beta$ HPP), la cual fue clonada, expresada y purificada como proteína recombinante y se evaluó la actividad comparándola con la metaloproteína nativa, además se describe que la actividad fue mediada positivamente por  $MnCl_2$  y que disminuyó drásticamente con el uso de EDTA, determinando que se trata de una metaloproteína hidrososomal en *T. vaginalis* (178).

Un grupo muy conservado de metaloproteinasas de membranas son las denominadas del grupo GP63, este tipo de proteinasas están principalmente involucradas en mecanismos de interacción parásito-célula blanco. En *T. vaginalis* se han identificado en su genoma a 48 miembros de la familia GP63 y únicamente 37 se les predice dominios transmembranales (84). Para este parásito se ha descrito a TvGP63, la cual fue localizada en la membrana con alta expresión y fue implicada en la destrucción de monocapas de células HeLa, además fue significativamente inhibida por el uso del

inhibidor 1-10 fenantrolina y no por EDTA. Este estudio sugiere que TvGP63 juega un importante rol durante el desarrollo de la tricomoniasis participando en mecanismos de interacción parásito-célula blanco (84).

Estudios de nuestro grupo de investigación han identificado y caracterizado una metaloproteinasa de 50 kDa (TvMP50) sobre expresada a nivel de RNAm y de proteína en condiciones de presencia de 1.6 mM de ZnCl<sub>2</sub> (33). Esta metaloproteinasa fue clasificada en el clan MG en la familia M24 dentro de la subfamilia B con función de prolidasa, esta fue clonada, expresada y purificada mostrando que es capaz de degradar colágeno a través de ensayos de zimogramas con gelatina, para la metaloproteinasa nativa y la recombinante, además estas fueron inhibidas por 10 mM de EDTA (179), así mismo se resolvió la estructura cristalina de TvMP50, la cual ha mostrado tener menos puentes salinos y enlaces de hidrógeno para formar un homodímero estable como otras dipeptidasas, por lo que esto explica porque funciona como monómero. Finalmente esta metaloproteinasa fue reconocida por anticuerpos de un suero de paciente masculino con tricomoniasis, lo que sugiere que es inmunogénica y para un suero de paciente femenino con tricomoniasis y para el suero de personas sanas no se detectó la metaloproteinasa, por lo cual fue propuesta como biomarcador molecular para el diagnóstico de la tricomoniasis masculina, (33,179).

Actualmente se ha identificado la participación de las metaloproteinasas secretadas en el proceso de apoptosis en donde se describe que productos secretados de *T. vaginalis* inducen la apoptosis de dos líneas celulares de laboratorios como modelos de estudio (180), esto fue demostrado por el uso del inhibidor de metaloproteinasas (1-10 fenantrolina) donde se observó el bloqueo por el inhibidor de la escisión de Bcl-xL, MCL-1, PARP, caspasa-3 y caspasa-9, así como la disminución de la liberación de citocromo c en el citosol, y se ve aumentado significativamente los niveles de asociación de los complejos de proteínas de Bcl-XL / Bim y MCL-1/ Bim devolviendo sus niveles a la normalidad, estos últimos son conocidos como proteínas anti apoptóticas (93).

Finalmente, se describió que la metaloproteinasa GP63 participa en el corte de la rapamicina de mamífero (mTOR), la cual está involucrada en el crecimiento, proliferación, motilidad, sobrevivencia, transcripción y síntesis de proteínas.

Esto fue demostrado por medio de ensayos con monocapas de células SiHa y productos secretados de *T. vaginalis* (ESP) incubados con productos secretados tratados con 1-10 fenantrolina y se describe que el corte de mTOR no se lleva a cabo en presencia del inhibidor de metaloproteinasas, pero no así en ESP no tratados donde se reporta que al parecer el corte parece ser inducido por las metaloproteinasas, esto sugiere la participación de TvGP63 en este mecanismo y podría estar implicado en la sobrevivencia del parásito (84,180).

### **18. Antecedentes directos**

Las concentraciones de  $Zn^{2+}$  se encuentran presente en el tracto urogenital en el hombre, se ha descrito que regula negativamente propiedades como adhesión y citotoxicidad. Además a nivel proteómico se ha descrito el proteoma de *T. vaginalis* de aislados proveniente de mujer (CNCD147) y proveniente de hombre (HGMMN01) en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$  (33,179).

El análisis proteómico muestra la expresión de 609 y 447 manchas en parásitos crecidos en condiciones normales, comparado con la expresión de 540 y 361 manchas en presencia de 1.6 mM de  $Zn^{2+}$  de los aislados de hombre y de mujer respectivamente. Las proteínas inmunogenicas se evaluaron a través de estudios a nivel inmunoproteómico utilizando sueros de pacientes con tricomoniasis probados en membranas transferidas con el proteoma de CNCD147 y HGMMN01 en presencia y ausencia de  $Zn^{2+}$ , los resultados reportan proteínas inmunodetectadas por el suero de paciente hombre con tricomoniasis, 52 manchas para el aislado de hombre y 29 manchas para el aislado de mujer crecidos en condiciones normales, comparado con los inmunoproteomas del aislado HGMMN01 se inmunodetectaron 32 y para CNCD147 fueron 23 manchas reconocidas. Estas manchas fueron identificadas por espectrometría de masas (MS). Los resultados revelaron que la mancha 6 para el aislado CNCD147 y la mancha 66 para el aislado HGMMN01 corresponde a una metaloproteinasa sobre expresada en condiciones de  $Zn^{2+}$  e inmunodetectada diferencialmente por el suero de paciente hombre con tricomoniasis (179). Esta mancha fue identificada como una metaloproteinasa aminopeptidasa P like correspondiente al clan MG y familia M24 (33).

Esta metaloproteinasa fue caracterizada *In silico*, sugiriendo que corresponde a la subfamilia B con una posible función en el reciclaje del colágeno, además fue amplificado su mensajero de mp50 desde parásitos crecidos en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$  mostrando que es altamente expresado en presencia del catión, este amplificado fue clonado y expresada la proteína recombinante nombrada como TvMP50r, esta fue obtenida desde la fracción soluble y fue purificada por cromatografía de afinidad a níquel mostrando una proteína con una masa molecular de aproximadamente ~50 kDa con actividad proteolítica determinada mediante ensayos de zimogramas con cama de gelatina e inhibición de la actividad por EDTA (179). Esta metaloproteinasa recombinante fue utilizada para la producción de anticuerpos policlonales, permitiendo la inmunodetección e inmunolocalización de TvMP50 nativa en los dos aislados de *T. vaginalis* CNCD147 y HGMN01 mostrando que TvMP50 se sobre expresa en condiciones de  $Zn^{2+}$  en el aislado de hombre.

Además se analizó la expresión del gen *mp50* el cual mostró un comportamiento equivalente con lo visto a nivel de proteína, confirmando que el  $Zn^{2+}$  afecta la expresión génica y la expresión proteica de TvMP50. Recientemente se ha obtenido la estructura cristalina de TvMP50 mostrando que su estructura más estable es como monómero por la falta de puentes salinos y puentes de hidrógeno para estabilizar un homodímero como otras prolidasas, lo cual explica lo encontrado en los ensayos de actividad mostrando una banda de ~50 kDa.

Recientemente, se ha evidenciado que TvMP50 es una metaloproteinasa secretada por *T. vaginalis*, esto evaluado en ensayos de Western blot, el análisis de sobrenadantes de cultivos de *T. vaginalis* permitió la detección por medio del anticuerpo específico  $\alpha$ -TvMP50r a TvMP50 nativa y como control negativo una proteína citoplasmática TvDHS, la cual no fue detectada en los sobrenadantes por el anticuerpo específico ( $\alpha$ -TvDHSr), además se observó que la citotoxicidad de los sobrenadantes era afectada positivamente por la presencia de  $Zn^{2+}$ , ensayos realizados utilizando TvMP50r mostró que la citotoxicidad fue tiempo y concentración dependiente durante los ensayos de interacción (TvMP50r-monocapas DU-145).

De manera interesante se observó que la citotoxicidad disminuía al dar tratamiento a los sobrenadantes con el anticuerpo  $\alpha$ -TvMP50r, evidenciando así su participación en la citotoxicidad de TvMP50 mediada por  $Zn^{2+}$  (Puentes-Rivera J. y cols 2017).

Con todos los antecedentes anteriores surge el interés por dilucidar la pregunta: ¿Cómo es la regulación de la expresión génica en *T. vaginalis* en presencia de  $Zn^{2+}$ ?. Para lo cual se planteó el estudio de la regulación de la expresión génica mediado por el  $Zn^{2+}$  en *T. vaginalis* utilizando como modelo el gen *mp50*. Cabe resaltar que hasta el momento no se ha descrito ningún mecanismo de regulación en *T. vaginalis* a nivel transcripcional y post transcripcional mediado por  $Zn^{2+}$ .

## 19. Justificación:

*T. vaginalis* es capaz de sobrevivir en un microambiente adverso como el tracto urogenital masculino donde se enfrenta a altas concentraciones de  $Zn^{2+}$ , este catión forma parte de la respuesta inmune innata del humano, que es la primera barrera para el establecimiento de microorganismos en el tracto genitourinario del hombre.

Actualmente se ha reportado que *T. vaginalis* responde a altas concentraciones de  $Zn^{2+}$  regulando sus propiedades de virulencia como la adhesión y la citotoxicidad, así como se ha observado diferencias en el perfil de expresión de proteínas, estos estudios han permitido la identificación del gen de *mp50*, que de manera interesante se encontró que el  $Zn^{2+}$  influye en los niveles de expresión del transcrito de *mp50* y de proteína, lo cual nos da un gen modelo para el estudio de mecanismos de regulación de la expresión génica y de expresión de proteína mediado por  $Zn^{2+}$ .

Actualmente los mecanismos de expresión génica descritos en *T. vaginalis* son a nivel transcripcional donde se ha descrito para el gen de *AP65-1*, a través del reconocimiento por proteínas tipo MYB de un elemento de respuesta a Myb (MRE) en el promotor y este mecanismo está modulado por las concentraciones de  $Fe^{2+}$ .

Por otro lado, a nivel post transcripcional está descrito para el gen de *tvcp4* un mecanismo mediado por  $Fe^{2+}$ , el cual es homólogo al sistema IRE/IRP y responde a las concentraciones de Hierro (bajas o altas). El segundo mecanismo es descrito en el gen de *tvcp39*, el cual es reconocido en su región 3'UTR en un elemento de respuesta a TveIF-5A, este mecanismo es modulado por las concentraciones de poliaminas.

Hasta el momento el estudio de la tricomoniasis masculina es un campo poco estudiado, por lo que basados en estos antecedentes proponemos el estudio de un mecanismo de regulación génica mediado por  $Zn^{2+}$  en *T. vaginalis* utilizando como modelo el gen de *mp50*, lo cual nos da un amplio panorama para entender la expresión génica de este parásito durante la tricomoniasis en el hombre.

## **20. Hipótesis:**

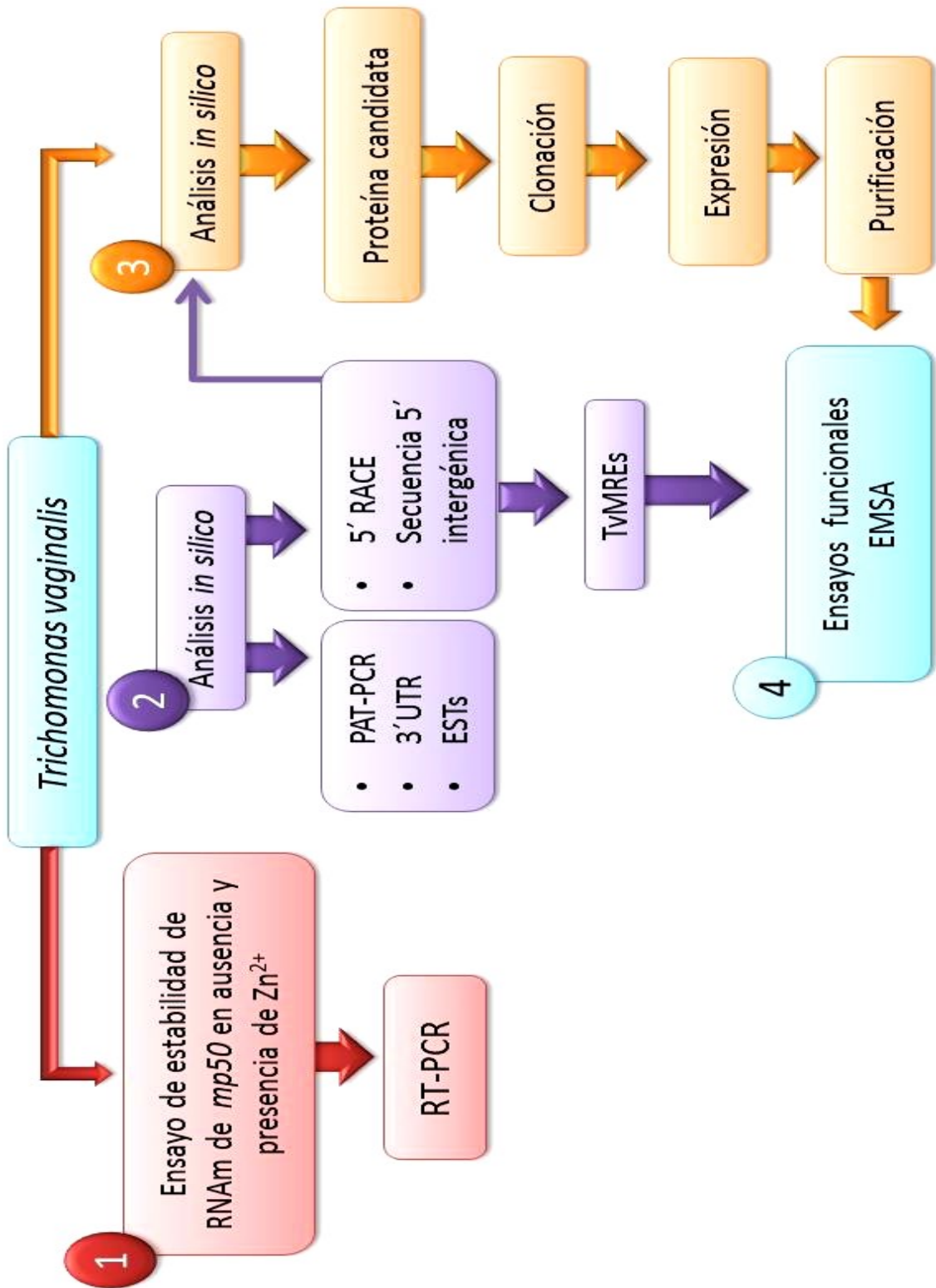
El gen de *mp50* contiene en su región reguladora elementos de respuesta a metal que podrán ser reconocidos por una proteína tipo dedos de zinc sugiriendo un mecanismo de expresión génica mediado de  $Zn^{2+}$  en *Trichomonas vaginalis*.

**21. Objetivo general:** Determinar el posible mecanismo de la expresión génica de *mp50* de *T. vaginalis* en presencia de  $Zn^{2+}$ .

### **21.1. Objetivos particulares:**

1. Determinar la vida media del transcrito de *mp50* de *T. vaginalis* en presencia de  $Zn^{2+}$ .
2. Caracterizar el RNAm de *mp50* de *T. vaginalis* en presencia de  $Zn^{2+}$
3. Obtener una proteína recombinante candidata que pudiera participar en la regulación de la expresión de *mp50* de *T. vaginalis*.
4. Determinar la interacción de la proteína candidata en la región reguladora de *mp50* de *T. vaginalis*.

## 22. Estrategia experimental



## **23. Materiales y métodos**

### **23.1. Cultivos celulares y aislados de *Trichomonas vaginalis*.**

#### **23.1.1. Cultivo de parásitos *T. vaginalis***

Los aislados de parásitos obtenidos de mujer CNCD147 y de hombre HGMN01, se cultivaron en medio TYM (tripticasa-extracto de levadura-maltosa), complementado con 10% de suero de caballo inactivado por calor (30 min a 56°C), por 24 h / 37°C en ausencia de Zn<sup>2+</sup> y para la condición en presencia de Zn<sup>2+</sup> se le adicionó 1.6 mM de ZnCl<sub>2</sub> (Sigma), hasta obtener los parásitos en fase logarítmica de crecimiento.

#### **23.1.2. Cultivos de líneas celulares**

Las líneas celulares HeLa y DU-145 fueron cultivadas para la obtención de extractos nucleares y citoplasmáticos para realizar ensayo de EMSA. Las células HeLa provienen de la línea celular del carcinoma de cérvix humano. Las células DU-145 provienen de la línea celular de adenocarcinoma de próstata humano. Las células HeLa se cultivaron en cajas desechables de 75cm<sup>2</sup>, se inocularon 3x10<sup>6</sup> células en 10 ml de medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO) con 10% de suero de caballo, adicionado con (100 µg/ml) penicilina/estreptomicina a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> para alcanzar la monocapa en 48h. Las células DU-145 se cultivaron en cajas desechables de 75 cm<sup>2</sup>, se inocularon 0.8x10<sup>6</sup> en 10ml de medio DMEM-SFB bajo en glucosa, incubado a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> para alcanzar monocapas confluentes a las 48h.

### **23.2. Caracterización de RNAm de *mp50* de *T. vaginalis***

#### **23.2.1. Diseño de oligonucleótidos**

Las secuencias templado fueron tomadas desde la base de datos TrichDB (181), cada oligonucleótido se diseñó de manera manual y se analizó (especificidad, %GC y predicción de formación de estructuras secundarias) en el software oligoanalyzer versión 3.0 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) y se verificó el amplificado en el software primer Blast (182).

**Tabla 4 de oligonucleótidos utilizados en este estudio.**

<b>OLIGONUCLEOTIDOS PUBLICADOS</b>			
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Referencia</b>	<b>Ensayo</b>
<b>BTUB9</b>	5'-CATTGATAACGAAGCTCCTTTACGAT-3'	(55)	RT-PCR
<b>BTUB2</b>	5'-GCATGTTGTGCCGGACATAACCAT-3'		
<b>5' RACE Adapter</b>	5'-GCUGAUGGCGAUGAAUGAACACUGCGUUUGCUGGCUUUGAUGAAA-3'		
<b>5' RACE Outer Primer</b>	5'-GCTGATGGCGATGAATGAACACTG-3'	FirstChoice RLM-RACE Kit	5' RLM RACE
<b>5' RACE Inner Primer</b>	5'-CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGTGGCTTTGATG-3'		
<b>oligo(dT)-anchor</b>	5'GCGAGCTCCGCGGCCGCT <sub>12</sub> -3'	(183)	PAT-PCR
<b>F-pQE80L</b>	5'-CCCGAAAAGTGCCACCTG-3'	The QIAexpressionist manual	PCR-colonia
<b>R-pQE80L</b>	5'-GTTCTGAGGTCATTACTGG-3'		
<b>MRE2s</b>	5'-CGAGACACACATGCACACGCACACAGG-3'	(184)	EMSA
<b>MRE2as</b>	5'-TCGACCTGTGTGCGTGTGCATGTGTGTCTCGAGCT-3'		
<b>OLIGONUCLEOTIDOS DISEÑADOS EN EL LABORATORIO</b>			
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Referencia</b>	<b>Ensayo</b>
<b>sentido interno-mp50</b>	5'-CGACTGGGACTGGGCTTTGAAACTCGCTGA-3'	-	PAT-PCR
<b>5'RACE outer-mp50</b>	5'- CCAAGCTTTCAAAGTACTCTTGAAGC-3'	-	5' RLM RACE
<b>5'RACE inner-mp50</b>	5'-TTTCTCAATATAAAGTGTGATTGTCCGGT-3'	-	
<b>Sentido</b>	5'-GCTCCTTAGCCTCAATAACTTTAAGC-3'	-	PCR
<b>Antisentido</b>	5'-CACTTCGATAAAGTTCTTGCGAT-3'	-	
<b>F-tvznf1-RT</b>	5'-TGTGGTGCCGAATTTGACCT-3'		
<b>R-tvznf1-RT</b>	5'-TTCCACAACCTTCCACAGGG-3'	(185)	RT-PCR
<b>F-TvZNF1</b>	5'- CCGGATCCATGGGAGACACAGAAGAG-3'		
<b>R-TvZNF1</b>	5'- CCAAGCTTTTATTTATTTTGCAAATCCTTCTG-3'		
<b>NREs</b>	5'-TCTAGAAATAAAGTTATT-3'	Dra. Elisa Azura Liceaga	
<b>NREas</b>	5'-TCTAGAAATAAAGTTATT-3'		

<b>MRE155a</b>	5'-AGCTACTTTCGATGCCGCTGGCATT-3'	-	EMSA
<b>MRE155as</b>	5'-CTCGAAATGCCAGCGGCATCGAAAGT-3'	-	
<b>MRE282s</b>	5'-AGCTGTTGATTGCACAAATGTGA-3'	-	
<b>MRE282as</b>	5'-CTCAGTCACATTTGTGCAATCAAC-3'	-	

### 23.2.2. Extracción de DNA genómico de *T. vaginalis*

120 x 10<sup>6</sup> parásitos, se centrifugaron a 1200 x g /5 min/ 4°C para coleccionar la pastilla, se lavaron tres veces con 1 ml PBS pH 7.0, se centrifugaron a 1200 x g / 5 min en cada lavado; posteriormente la pastilla fue resuspendida en 2 ml PBS pH 7.0, se agregó 300 µl del amortiguador de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, SDS 0.2%, NaCl 100mM, EDTA 10 mM), 300 µl de fenol y se mezcló por inversión suavemente. Las muestras se centrifugaron a 12,500 x g/15 min/4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml, y se le adicionó 300 µl fenol y 300 µl cloroformo en una relación 1:1 y fue centrifugado a 16,000 x g /15 min/4°C, la fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se precipitó con 500 µl de etanol y 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M, después los tubos se incubaron a -20°C/2 h y se centrifugó a 12,500 x g /15 min/4°C, se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó tres veces con etanol frío al 70% y se centrifugó a 12,500 x g /5 min/4°C, una vez finalizados los lavados la pastilla formada por la precipitación, se dejó secar a temperatura ambiente por 15 minutos y fue resuspendida en 50 µl de agua libre de nucleasas. La cuantificación se realizó por espectrofotometría a 260/280 y 260/230 nm en nanodrop. El DNAg fue utilizado como control positivo en los ensayos de PCR y para la amplificación de las regiones intergénicas 5' de *mp50*.

### 23.2.3. Extracción de RNA Total de *T. vaginalis*.

20 x 10<sup>6</sup> parásitos, se centrifugaron a 1200 x g /5 min/4°C, se retiró muy bien el sobrenadante y se agregó 1 ml de Trizol frío (Invitrogen), se mezcló muy bien y se guardó a -80°C o se procedió a extraer el RNA. La muestra congelada se colocó en hielo y se dejó descongelar, después se agregó 200 µl de cloroformo frío, se mezcló y se centrifugó a 9520 x g /15 min/4°C. El RNA presente en la fase acuosa se colocó en un tubo nuevo y se precipitó con 0.5 ml de isopropanol, después se mezcló por inversión e incubó 15 min/ 4°C y posteriormente se centrifugó a 9520 x g/15min/4°C.

El sobrenadante se decantó, la pastilla se lavó tres veces con etanol al 75% con agua DEPC, cada uno de los lavados se centrifugó a 9520 x g /5 min/ 4°C y la pastilla se secó a T. A. 10 min y se resuspendió en 60 µl agua-DEPC. El RNA total se obtuvo con valores de calidad de: 2.00 para la relación 260/280 y 260/230. El RNA se utilizó para ensayos de expresión de *tvznf1* y amplificación del gen completo de *tvznf1* de *T. vaginalis*.

#### 23.2.4. Tratamiento de RNA con DNAsaI (Promega)

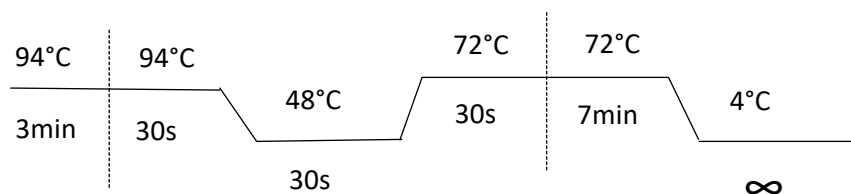
A partir de 5 µg de RNA total se agregó 1X de amortiguador de DNAsaI (Promega) y se agregó 1U/µg de RNA de DNAsaI (Promega) y c.b.p. 10 µl de agua-DEPC. La reacción se mezcló bien y se incubó a 37°C / 60 minutos, después se agregó 1 µl de solución Stop (Promega) y se incubó a 65 por 15 minutos para inactivar la DNAsaI.

#### 23.2.5. Síntesis de cDNA.

A partir de 1 µg de RNA total tratado con DNAsaI, se adicionó 1 µl de oligo dT (10 pmoles/µl) y c.b.p. 12 µl de agua-DEPC, después se incubó a 70°C/15 min y se colocó en hielo durante 5 min durante este tiempo se agregó 2µl dNTPs, 2 µl DTT, 4 µl amortiguador 5x, y se agregó 1µl transcriptasa reversa (RT+) 1µl de agua control negativo (RT-). La reacción se incubó a 42°C/ 50 min y después a 70°C / 10 min.

Como control de carga se amplificó el gen de *β-tubulina* y se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: BTUB9 y BTUB2 (Tabla 4).

El programa del termociclador utilizado por 30 ciclos:



El resultado fue visualizado por electroforesis de geles de agarosa al 2% teñidos con Red Gel. El cDNA se utilizó para ensayos de RT-PCR del gen *tvznf1* y para el ensayo de 5'RACE de *mp50* de *T. vaginalis*.

#### 23.2.6. Ensayo de 5'RACE de *mp50* de *T. vaginalis*

Para la obtención de la región 5'UTR del RNAm de *mp50* de *T. vaginalis* se realizó el ensayo de 5'RACE utilizando RNA de parásitos crecidos en ausencia y presencia de Zn<sup>2+</sup> de los aislados CNCD147 y HGMM01, y utilizando el kit de FirstChoice ® RLM-RACE (AMBION).

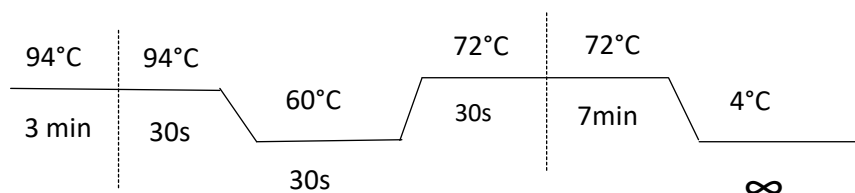
A partir de RNA total de alta calidad, se montó la reacción de CIP con 10 µg de RNA total, 2 µl amortiguador CIP 10X, 2 µl Calf intestine Alkaline phosphatase (CIP) y C.B.P. para 20 µl de agua libre de nucleasas. La reacción se mezcló, se centrifugó brevemente y se incubó a 37°C por 1 hora.

Terminada la reacción CIP se realizó una extracción fenol: cloroformo, a la reacción CIP, se agregó 15 µl de solución de acetato de amonio, 115 µl de agua libre de nucleasas y 150 µl de fenol ácido: cloroformo, se mezcló bien y se centrifugó 5 min a temperatura ambiente a > 10,000 x g. La fase acuosa se transfirió (fase de arriba) a un tubo nuevo. Después se adicionó 150 µl de cloroformo, se mezcló bien, se centrifugó por 5 minutos a temperatura ambiente a > 10,000 x g. La fase acuosa (fase de arriba) se transfirió a un tubo nuevo y se precipitó con 150 µl de isopropanol, se mezcló bien y se colocó en hielo por 10 minutos. Después se centrifugó a máxima velocidad por 20 minutos. El precipitado se lavó con 0.5 ml de etanol al 70 % frío, se centrifugó por 5 minutos a máxima velocidad, después se removió cuidadosamente el etanol cuidando de no perder el precipitado y finalmente la pastilla de RNA se secó a temperatura ambiente por 10 min.

El RNA fue resuspendido en 11 µl de agua libre de nucleasas, se utilizó 1 µl como control negativo para la reacción de TAP. La reacción de TAP se preparó poniendo 5 µl de RNA-CIP, 1 µl de TAP amortiguador 10X, 2 µl Tobacco Acid Pyrophosphatase y 2 µl de agua libre de nucleasas. La reacción se mezcló bien, se centrifugó brevemente y se incubó a 37°C por 1 hora. Terminada la reacción se procedió a realizar la reacción de ligación (5'RACE Adapter ligation), se agregó en un tubo nuevo 2 µl de RNA tratado-CIP/TAP, 1 µl de 5'RACE Adapter, 1 µl de amortiguador de RNA ligasa, 2 µl de T4 RNA Ligase (2.5 U/µl) y 4 µl de agua libre de nucleasas; se mezcló muy bien y se centrifugó brevemente y la reacción se incubó a 37 °C por 1 hora. Continuando con el protocolo se preparó la reacción de retro transcripción (RT) con 2 µl de RNA ligado (o negativo- TAP), 4 µl dNTPs mix, 2 µl Random decamers, 2 µl RT amortiguador 10X, 1 µl Inhibidor de RNase, 1 µl de M-MLV transcriptasa reversa y c.b.p. 20 µl de agua libre de nucleasas. La muestra se mezcló muy bien y se centrifugó brevemente, la reacción se incubó a 42 °C por 1 hora.

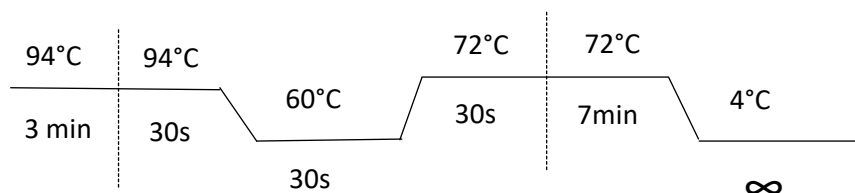
Terminada la reacción de RT se preparó la reacción de PCR externo 5'RLM-RACE PCR, en un tubo de PCR nuevo se agregó: 1 µl de reacción de RT, 5 µl de PCR amortiguador 10X, 4 µl de dNTPs mix (10mM c/u), 2 µl oligonucleótido "5'RACE outer" (10 µM) (Tabla 4 ), y c.b.p. 50 µl de agua libre de nucleasas y al final agregó 1.25 U de DNA polimerasa termoestable (0.25 µl de 5U/µl), se mezcló bien y se centrifugó para que todo el contenido este en el fondo del tubo.

El programa del termociclador utilizado por 35 ciclos:



Terminada la PCR externo 5'RLM-RACE se preparó la reacción de PCR interno 5'RLM-RACE, entonces en un tubo de PCR nuevo se agregó: 2 µl de reacción de outer 5'RLM-RACE PCR, 5 µl de PCR amortiguador 10X, 4 µl de dNTPs mix (10mM), 2 µl 5'RACE inner-*mp50* (10 µM), 2 µl "5'RACE inner primer" y c.b.p. 50 µl de agua libre de nucleasas y al final se agregó 1.25 U de DNA polimerasa termoestable (0.25 µl de 5U/µl), se mezcló bien y se centrifugó brevemente para asegurar que todo el contenido estuviera en el fondo del tubo. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se localizan en la tabla 4.

El programa del termociclador utilizado por 35 ciclos:



Las muestras se analizaron en geles de agarosa al 2% teñido con Red Gel.

### 23.2.7. PAT-PCR (183)

Para la obtención de la región 3'UTR y longitud de tracto de poli (A) del RNAm de *mp50* de *T. vaginalis* se realizó el ensayo de PAT-PCR. A partir de 0.5 µg de RNA total fresco, se adicionó 20 ng de oligo (dT<sub>12-18</sub> (fosforilado en el 5')) en un volumen final de 7 µl, después fue incubado a 65°C por 5 min y se transfirió el tubo inmediatamente a 42°C por 5 minutos, durante ese tiempo se añadió un volumen de 13 µl de la siguiente mezcla (precalentada a 42 °C):

4 µl de 5X superscript H<sup>-</sup> RT amortiguador (Superscript H<sup>-</sup> RT II invitrogen)  
2 µl de 0.1 M DTT  
1 µl de 10 mM de mezcla de dNTP  
2 µl de 50 mM ATP (Sigma)  
13 µl de T4 ligasa (Invitrogen)

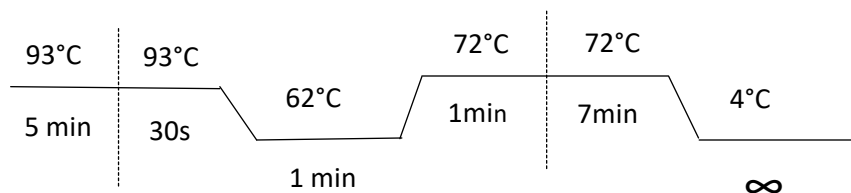
---

13 µl

Después se adicionó 2 µl de 10 pmoles/µl de oligo(dT)-anchor, este se mezcló y centrifugó brevemente y finalmente se incubó a 12°C por 2:30 minutos. Después se incubó a 42 °C por 2 min y se adicionó 1 µl de Superscript H<sup>-</sup> RT enzima y se incubó a 42 °C por 1 hora. Finalmente fue calentado a 70°C por 30 min para inactivar la ligasa.

En la reacción de RT-PCR se usaron 10 pmoles/µl de los oligonucleótidos, sentido interno-*mp50* (Tabla 4) y antisentido oligodT-Anchor (Tabla 4), 1X de master mix (Roche) y 1 µl de cDNA del PAT-PCR de los aislados CNCD147 y HGMN01 en ausencia y presencia de Zn<sup>2+</sup> de *T. vaginalis* y c.b.p. 50 µl de agua libre de nucleasas.

El programa del termociclador utilizado por 30 ciclos:



El resultado de PAT-PCR se obtuvo por electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con Red Gel.

### 23.2.8. Ensayo de estabilidad de RNAm de *mp50* de *T. vaginalis*

El ensayo de estabilidad de RNAm se realizó utilizando Actinomicina D (Sigma), un antibiótico que evita la síntesis de RNAm por la RNA polimerasa II por un impedimento estérico al unirse en la cadena de DNA deteniendo la transcripción. El ensayo de estabilidad se realizó para obtener la vida media del RNAm de *mp50* de *T. vaginalis* en condiciones de ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$ , definiendo la vida media de un RNAm como la cantidad de RNAm disponible en citoplasma durante un tiempo determinado con la transcripción detenida, lo cual podría sugerir que tipos de mecanismos de regulación de la expresión de RNAm (transcripción o la post transcripción) regulan la expresión del mensajero de *mp50*.

A un cultivo de 6 ml de medio TYM con 10% de suero inactivado de caballo con 1 semana de pases del aislado HGMN01, se preparó una caja 25 mm<sup>2</sup> con 27 ml de TYM y 3 ml de suero de caballo inactivado con  $10 \times 10^6$  parásitos, esta se incubó a 37°C O/N. Los parásitos totales se contaron y se inocularon dos cajas nuevas de 25 mm<sup>2</sup> con  $15 \times 10^6$  de parásitos para la condición control y  $20 \times 10^6$  de parásitos en presencia de 1.6 mM de  $ZnCl_2$  (Sigma), las cajas se incubaron a 37°C por 12 hrs.

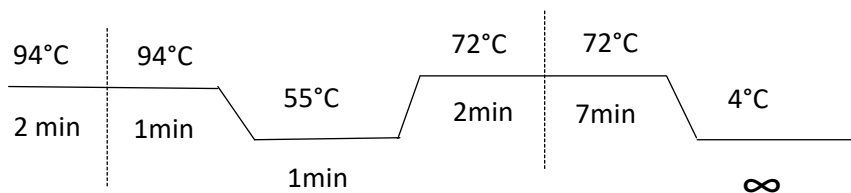
Para realizar la cinética de estabilidad del RNAm de *mp50* los parásitos fueron cuantificados en cada caja, colectados y transferidos a 4 tubos de 15 ml estériles (para los tiempos de incubación: T0, T30, T45 y T60 min), en cada tubo se colocaron  $10 \times 10^6$  parásitos de la condición control y de la condición de  $Zn^{2+}$ . Para someter los parásitos a la presencia de Actinomicina D, los tubos con  $10 \times 10^6$  parásitos fueron centrifugados a 750 x g / 5 min / 4°C, se retiró el sobrenadante y las pastillas de parásitos se resuspendieron en 6 ml de medio TYM con suero caballo inactivado y 10 µg/ml de Actinomicina D (Sigma), para la condición con  $Zn^{2+}$  el medio contenía 1.6 mM de  $ZnCl_2$  (Sigma). Cada una de las pastillas de parásitos ( $10 \times 10^6$  parásitos) fueron resuspendidas al mismo tiempo y hasta que todos los tubos se encontraban resuspendidas en medio con actinomicina D, se colocaron en la incubaron a 37°C y se consideró como tiempo cero e inicio de la cinética, el tubo de tiempo cero (T0) de ambas condiciones se tomó muestra de cultivo (10 µl) y se midió viabilidad por azul de tripano en la cámara Neubauer, y el resto de cultivo en el tubo de tiempo cero se centrifugó a 750 x g / 5 min / 4°C, se desechó el sobrenadante y se agregó 0.5 ml de Trizol (Invitrogen), este paso se repitió para cada tubo

correspondiente a los diferentes tiempos (T30, T45, T60 min) de ambas condiciones. Las muestras resuspendidas en 500 µl de Trizol se congelaron a -80°C hasta la extracción de RNA.

### 23.2.9. Amplificación por PCR de la región intergénica 5' de *mp50* de *T. vaginalis*.

Para la amplificación de la región intergénica de *mp50*, se diseñaron los oligonucleótidos sentido y antisentido (Tabla 4). Para la reacción de PCR se usaron 2.5 µl (10 pmoles/ µl) de cada oligonucleótido sentido y antisentido, 1 µl de dNTP mix [10 mM], 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> [50 mM], 5 µl de 10X amortiguador PCR, 1 µl (100 ng/µl) de DNAg de los aislados CNCD147 y HGMN01, 0.2 µl Taq DNA polimerasa (5 U/ µl) y agua libre de nucleasas c.b.p. para 50 µl de reacción.

El programa del termociclador utilizado por 35 ciclos:



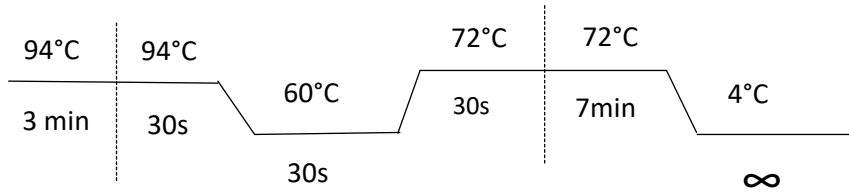
El resultado se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % teñido con Red Gel.

### 23.3. Expresión génica de *tvznf1*, clonación, Subclonación y expresión de TvZNF1r de *T. vaginalis*

#### 23.3.1. Expresión de RNAm de *tvznf1* en ausencia y presencia de Zn<sup>2+</sup> de *T. vaginalis*.

A partir de 20x10<sup>6</sup> parásitos de los aislados CNCD147 y HGMN01 crecidos en ausencia y presencia de Zn<sup>2+</sup>, se obtuvo el cDNA y se realizó la RT-PCR con los oligonucleótidos sentido: F-*tvznf1*-RT (Tabla 4) y el antisentido: R-*tvznf1*-RT (Tabla 4) 5'-TTCCACAACCTTCCACAGGG-3' con 2.5 µl (10 pmoles /µl) de cada uno respectivamente, 1X de master mix (Roche) y 1 µl de cDNA de los aislados CNCD147 y HGMN01 en ausencia y presencia de Zn<sup>2+</sup> de *T. vaginalis* y c.b.p. 50 µl de agua libre de nucleasas.

El programa del termociclador utilizado por 35 ciclos:

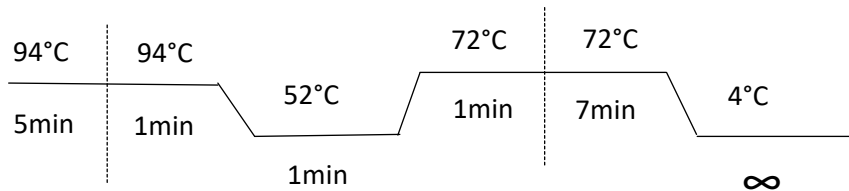


Los productos de RT-PCR se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con Red Gel.

### 23.3.2. Amplificación por RT-PCR del gen completo de *tvznf1* de *T. vaginalis*

El gen completo *tvznf1* se amplificó del cDNA del aislado CNCD147 en condición de  $Zn^{2+}$ , usando los cebadores sentido (F-TvZNF1) y antisentido (R-TvZNF1) (Tabla 4) con los sitios de restricción para BamHI y HindIII que son subrayados (Tabla 4). La condiciones de PCR fueron: 2.5  $\mu$ l de cada oligonucleótido (10 pmoles/ $\mu$ l), 1x de 2X KAPA Taq ReadyMix (Cat. KK1006), 1  $\mu$ l de cDNA de cada condición y c.b.p. 50  $\mu$ l de agua libre de nucleasas.

El programa del termociclador utilizado por 35 ciclos:



Los productos de RT-PCR fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con Red Gel.

### 23.3.3. Purificación de productos de PCR de gel de agarosa.

Los fragmentos para clonar fueron purificados utilizando el kit "QIAEX II® Gel Extraction" (Cat. 20051). El protocolo consistió en cortar la banda de interés (*tvznf1*, 5', 3' UTR y regiones intergénicas 5' de *mp50*) desde el gel de agarosa y se agregó 6 volúmenes de amortiguador QX1. Después se resuspendió la QIAEX II (resina) por vórtex por 30 seg y se adicionó 10  $\mu$ l para < 2  $\mu$ g de DNA por reacción. Entonces el tubo se incubó a 50 °C por 10 min para solubilizar la agarosa y unir el DNA mezclando cada dos minutos con vórtex para mantener a QIAEXII en suspensión. El color de la mezcla se mantuvo de color amarillo (indicativo de pH 7.5), cuando el pH se eleva a más de 7.5 vira a color púrpura por lo que se puede agregar 10  $\mu$ l de 3 M de acetato de sodio pH 5.0 y se mezcló.

Al terminar los 10 minutos se centrifugó las muestras a 12,500 x g/ 1min/T.A. y cuidadosamente se removió el sobrenadante con pipeta. Después se realizó un paso de lavado con 500 µl de amortiguador QX1, esto se resuspendió con vórtex y se centrifugó a 16,000 x g/1min/T.A. y se removió el sobrenadante con pipeta. Continuando con el proceso se realizó el lavado con amortiguador PE con 500 µl se mezcló con vórtex por 1 min y se centrifugó a 12,500 x g /1min/T.A., después se removió el sobrenadante con pipeta. La pastilla se dejó secar de 10-15 minutos. El DNA se eluyó adicionando 20 µl de agua libre de nucleasas, el tubo se mezcló por vórtex 1min y se centrifugó a 12,500 x g /1min/T.A., en el sobrenadante se encuentra el DNA purificado, el purificado se cuantificó por nanodrop.

#### **23.3.4. Preparación de *E. coli* químicamente competentes: DH5α, TOP10, BL21 y M15.**

Cada una de las cepas de *E. coli* se creció en 10 ml de medio LB por 24 h/ 37°C, este cultivo se inoculó en 100 ml medio LB a 200 rpm/ 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (OD) de 0.5 a 0.9, se incubó en hielo por 5 min, se centrifugó a 3000 rpm/10min/4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en amortiguador TFB1 frío (100 mM RbCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> 50 mM, KC<sub>2</sub>H<sub>3</sub> O<sub>2</sub> 30 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, glicerol 15%) y se incubó en hielo 15 min, se centrifugó a 3000 rpm/10 min/4°C, después fue resuspendida la pastilla en amortiguador TFB II (MOPS 10 mM, RbCl<sub>2</sub> 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM, glicerol 15%) y se incubó en hielo 15 min. Las alícuotas de realizaron de 50 µl y se almacenaron a -80°C.

#### **23.3.5. Clonación en el vector pCR 2.1 TOPO.**

El producto amplificado y purificado se clonó en el vector pCR 2.1 TOPO (Invitrogen). La clonación se realizó con 4 µl de producto purificado proveniente de una reacción de 50 µl de PCR, 1 µl del vector, 0.5 µl de H<sub>2</sub>O y 1 µl de la solución de sales del kit (Invitrogen), la mezcla se incubó 1 h a T A. Posteriormente se transformaron células DH5α por choque térmico colocando el vial de células transformantes 30 min en hielo con la reacción de clonación y después se incubó en un baño maría a 42°C/ 30 s e inmediatamente después se agregó 250 µl de medio LB, después se incubó a 200 rpm/ 37°C/ 1 h. El total del vial de células transformadas se plaqueó en alícuotas de 150 µl en placas de agar-LB- con 100 µg/ ml de ampicilina y se incubaron a 37°C O/N; se utilizó el control de vector sin el inserto.

Posteriormente se picaron las colonias y se crecieron en medio LB con 100 µg/ ml de ampicilina, para continuar con la extracción de DNA plasmídico por miniprep.

### **23.3.6. Clonación en el vector pJET 1.2/BLUNT extremos romos.**

A partir del producto amplificado y purificado se continuó el siguiente protocolo para productos clonados con extremos cohesivos (sticky-End cloning). El fragmento se purificó previo a la reacción de clonación, se adicionó 2x amortiguador de reacción, el volumen inserto correspondiente a 0.15 pmoles de producto purificado, c.b.p. 17µl de agua y 1µl de “DNA blunting enzyme” para un volumen final de 18µl, se mezcló y centrifugó brevemente, se incubó a 70<sup>0</sup> C por 5 min, después se colocó en frío y se agregó 1 µl del vector pJET1.2/blunt extremos romos (50 ng/ml) y 1 µl de T4 DNA ligasa, para tener un volumen final de 20 µl, se mezcló y se centrifugó brevemente, se incubó a 22<sup>0</sup>C por 30 min y 5 µl de la reacción de ligación se transformó por shock térmico en células competentes DH5α, se colocó las transformantes 30 min en hielo con la reacción de clonación y después se incubó en un baño maría a 42<sup>0</sup>C/ 30 s e inmediatamente después se agregó 250 µl de medio LB, después se incubó a 200 rpm/ 37<sup>0</sup>C/ 1 h. El total del vial de células transformantes se plaqueó en alícuotas de 150 µl en placas de agar-LB- con 100 µg/ ml de ampicilina y se incubaron a 37<sup>0</sup>C O/N. Posteriormente se picaron las colonias y se crecieron en medio LB con 100 µg/ ml de ampicilina, para continuar con la extracción de DNA plasmídico por miniprep.

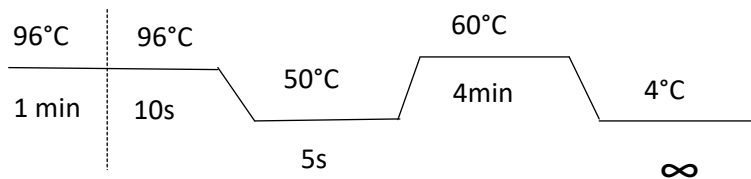
### **23.3.7. Extracción de DNA plásmidico por Miniprep.**

Las transformantes previamente crecidas en medio de cultivo LB con 100µg/ ml de ampicilina, se centrifugaron a 12,500 x g /15 min, se resuspendieron en 250 µl de amortiguador P1 (Tris-HCl 50mM pH8.0, EDTA 10 mM), se les dio vórtex unos segundos, se le adicionó 250 µl de amortiguador P2 (NaOH 200 mM, SDS 1%), se mezcló por inversión y se incubó a T.A. por 5 min, después se adicionó 350 µl del amortiguador P3 (3.0 M de Acetato Potasio), y se incubó en hielo 5 min, después se centrifugó a 12,500 x g/15 min/4<sup>0</sup>C. El sobrenadante se colectó en un tubo nuevo y se le adicionó 0.6 volumen de etanol absoluto frío, se incubó a T.A. y se centrifugó a 12,500 x g/15 min/4<sup>0</sup>C. La pastilla se lavó con 0.5 ml de etanol al 70% frío, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12,500 x g / 5 min/4<sup>0</sup>C, la pastilla se dejó secar 10 min a T.A. y se adicionó 60 µl de agua libre de DNAsas y se cuantificó por nanodrop.

### 23.3.8. Secuenciación

Los plásmidos purificados con el inserto de interés (*tvznf1*, 5', 3' UTR y regiones intergénicas 5' de *mp50*), se secuenciaron con el kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit en el equipo 3130 Applied Biosystems Genetic Analyzer. Una reacción de secuenciación se preparó de la siguiente forma: 4 µl de BigDye™ terminator 3.1 ready reaction mix, 2 µl de BigDye™ terminator v.11& v3.1 5 X sequencing buffer, oligonucleótido (sentido o antisentido) (10 pmoles/µl), se utilizó 450 ng de DNAp (se recomienda utilizar entre 350 y 500 ng) y c.b.p. 20 µl con agua libre de nucleasas.

El programa del termociclador utilizado por 40 ciclos:



Para el proceso de purificación de las reacciones de secuenciación, se utilizó el kit DyeEx 2.0 Spin Kit, la columna se agitó suavemente para resuspender la resina. La columna se colocó en un tubo colector de 2ml y se centrifugó a 750 x g/ 3 min. La columna se colocó cuidadosamente en un tubo nuevo y se agregó la reacción de secuenciación (20 µl) cuidadosamente con la punta de la pipeta recta y en medio de la resina sin tocar la resina, se centrifugó a 750 x g/ 3 min. El eluido contenía el DNA marcado y purificado. Los tubos abiertos se colocaron en Speed-vac durante 45 min a T.A. después los tubos son cerrados y cubiertos de la luz y guardados a -20 °C hasta la inyección en el equipo de secuenciación.

### 23.3.9. Subclonación del gen *tvznf1* en el vector pQE-80L

Una clona del vector pQE80L vacío y una clona positiva para la construcción pJET/BLUNT-*tvznf1* se inocularon en 5 ml de LB-ampicilina y se incubaron a 200 rpm/ 37 °C / O.N. Posteriormente cada cultivo se centrifugó a 7,500 x g/10 min/4°C, la pastilla fue resuspendida en 250 µl de amortiguador P1 (con RNAsa A [100µg/ml]), posteriormente se adicionaron 250 µl de amortiguador P2, se mezcló por inmersión de 4 a 6 veces y se incubó 5 min a T.A.

Después se adicionó 350 µl de amortiguador P3. Después se precipitó el DNAP con 0.6 ml de isopropanol al 70% y se centrifugó a 12,500 x g /10 min/4°C, después se lavó tres veces sin resuspender la pastilla con etanol frío al 70%, se centrifugó entre cada lavado a 16,000 x g/5min/4°C y la pastilla se dejó secar por 15 min a T.A. y se resuspendió en 60 µl de agua libre de nucleasas.

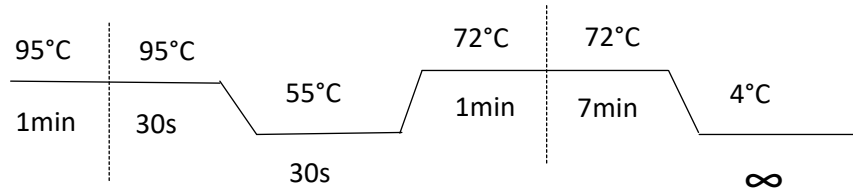
La liberación del inserto del gen *tvznf1* del vector pJET 1.2/BLUNT, junto con la restricción del vector pQE80L-vacio, se realizó con las enzimas *BamHI* y *HindIII* (1U/µg de DNAP de cada enzima) en 1x de amortiguador E (Promega) y c.b.p. 100 µl de reacción se incubó a 37°C O/N. El inserto liberado (*tvznf1*) y el vector pQE80L linealizado se purificó para la reacción de ligación, el inserto y el vector se ligaron en una relación 3:1 (27 ng de inserto (*tvznf1*)/ 50ng de pQE80L) y 1µl (1U/ µl) de T4 DNA ligasa c.b.p. 20µl, la reacción se incubó a 16°C/ por 12hrs, como controles se utilizó: 1) el vector sin inserto + ligasa, 2) el vector sin inserto sin ligasa.

Después se transformó una alícuota de 50 µl de células M15 químicamente competentes con 20 µl de la reacción de ligación, se incubó por 30 min en hielo, después se transformó por choque térmico, colocando el tubo a 42°C por 30 s y se le adicionó inmediatamente 250 µl de medio LB. Las células M15 transformadas con la reacción de ligación se incubaron a 200 rpm /60 min/37°C. Después se plaquearon en alícuotas de 150 µl en placas de agar-LB con 100 µg/ml ampicilina y se incubaron las placas a 37°C /O.N.

#### **23.4. PCR de colonia**

Las colonias estas se picaron y se sembraron en una nueva placa (placa master) y ese mismo palillo con la colonia picada se sumergió en la reacción de PCR que contenía: 10.45 µl agua libre de nucleasas, 10 pmoles/µl de cada oligonucleótido (sentido y antisentido) 0.25µl de dNTPs (10 mM), 1.25 µl de amortiguador PCR 10X (incluye 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>), 0.25 µl de Taq Polimerasa (5U/µl) (Invitrogen), las reacciones se prepararon a volumen final de 12.5 µl. El programa utilizado para el termociclador de acuerdo a los oligonucleótidos utilizados: para el vector pQE80L (Tabla 4):

El programa del termociclador utilizado por 40 ciclos:



La extensión de la PCR se determinó 1min por cada 1Kb en referencia al inserto. Las muestras fueron visualizadas por electroforesis en un gel agarosa al 1% teñido con Red Gel.

#### 23.4.1. Expresión de la proteína TvZNF1r

A partir del stock de glicerol (900  $\mu$ l de cultivo de bacterias y 100  $\mu$ l de glicerol al 80% estéril) de la clona positiva para la construcción pQE-80L-*tvznf1* en un cultivo con una OD<sub>600</sub> de 0.6 se realizó la inducción con 1 mM de IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosida) por 6 h a 37°C a 200 rpm de un volumen de 500 ml de LB con 100 $\mu$ g/ml de ampicilina (Sigma) con lo que se logró la adecuada expresión de la proteína TvZNF1r.

#### 23.4.2. Purificación de TvZNF1r

Los procedimientos cromatográficos se realizaron utilizando un sistema de cromatografía líquida AktaPrime plus de baja presión (Healthcare, GE). Las células transformadas (*E. coli* M15 pQE-80L-*tvznf1*), se lisaron por sonicación (6 x 10 s con 10 s pausas en 300W), los lisados fueron centrifugados a 8500 xg/45 min/4°C.

La fracción soluble, se filtró con membrana 0.22  $\mu$ M y se utilizó para realizar los procedimientos cromatográficos siguiendo las instrucciones del fabricante de cada columna (Healthcare, GE).

Primero la purificación de la proteína recombinante se realizó por cromatografía de afinidad a Níquel (Ni-NTA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando una columna HisTrap HP de 1 ml (Healthcare, GE) en condiciones nativas, la proteína unida se eluyó a 1 ml / min con 100% de tampón de elución (300 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250 imidazol) a pH 8,0.

Para la cromatografía de intercambio iónico (IEX), se utilizó las eluciones de la resina de Ni-NTA (5 ml), las cuales se diluyeron 3:1 en tampón de unión (50 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a pH 7,5 y se transfirió a un Super-loop (GE Healthcare), y fue pasado a 1 ml / min a través de una columna de intercambio catiónico HiTrap SP XL (GE Healthcare, GE) y la proteína se eluyó usando tampón (50 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 1 M NaCl) a pH 7,5. A continuación, se realizó la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), aplicando la elución de la columna HiTrap SP XL a una columna de HiTrap Fenil HP (Healthcare, GE), el tampón de unión (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 M (NH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>) y utilizando como tampón de elución (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) a pH 7,5.

La concentración de proteína recombinante fue determinada directamente de las eluciones de HIC con el ensayo de Bradford (Bio Rad) empleando BSA como estándar para la construcción y calibración de la curva de cuantificación y para comprobar la pureza de la proteína purificada y cuantificada de las fracciones que contienen la proteína recombinante se separaron por electroforesis en un gel de Tricina SDS-PAGE al 10% y fue teñido con azul de Coomassie.

#### **23.4.3. Ensayo de Western blot**

El seguimiento de la purificación de la proteína TvZNF1 se realizó mediante la obtención de muestras de las distintas etapas de purificación cromatografía de Ni-NTA, IEX y HIC empleando la separación por electroforesis en gel de Tricina-SDS-PAGE al 10%, y su posterior este se electrotransferencia semiseca a membrana de nitrocelulosa a 25 V durante 25min con amortiguador de transferencia (Metanol 20 %, Tris 25 mM, Glicina 192 mM). La membrana se bloqueó con leche (Svelty-Nestle) al 5% en PBS pH 7, a 4°C por toda la noche. Al terminar el proceso de bloqueo de membrana, se incubó con el anti-His (Invitrogen) en una dilución 1:3000 en PBS-Tween 20 al 0.05 % pH 7 por 24h a 4°C en agitación.

La membrana se lavó tres veces con PBS pH 7.0-Tween al 0.1%, después se incubaron con el anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado a peroxidasa a una dilución 1:3000 (Invitrogen). La reacción se detectó por quimioluminiscencia utilizando el sustrato: “Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent” (GE Healthcare).

#### **23.4.4. Protocolo de hibridación de sondas**

Para generar la doble cadena de DNA para su uso en los ensayos de EMSA, se hibridaron los oligonucleótidos de las sondas MRE 2 de *H. sapiens*, NREr de *E. histolytica*, TvMRE155 y TvMRE282 de *T. vaginalis*.

Las diferentes sondas se cuantificaron y se preparó la siguiente reacción de hibridación para cada una de las sondas: amortiguador TM 1x (100 mM Tris HCl pH 8.1, 100 mM MgCl<sub>2</sub>), oligonucleótido sentido y antisentido MRE2 (MRE2s y MRE2as) ya descrito (184) (Tabla 4) y la sonda de control negativo de *E. histolytica* NRE (NREs y NREas) (Tabla 4). Los MREs de *T. vaginalis* TvMRE155 (MRE155s y MRE155as) y TvMRE282 (MRE282s y MRE282as) (Tabla 4) 2 µg de cada uno respectivamente y c.b.p. de agua a 20 µl. Las reacciones fueron incubadas por 5 minutos en un Termoblock entre 92-95°C, después se apagó el Termoblock y se esperó hasta que se alcanzó la temperatura ambiente, las muestras fueron centrifugadas brevemente y colocadas a -20°C hasta su uso.

#### **23.4.5. Preparación de extractos citoplasmáticos y nucleares de *T. vaginalis*.**

60x10<sup>6</sup> parásitos de *T. vaginalis*, se centrifugaron a 1300 x g durante 5 min y se desechó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 1mL de PBS pH 6.8 y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL nuevo y se centrifugó a 1500 x g por 5 segundos y se desechó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 400uL de solución A fría (4°C) (apéndice III) y la pastilla se resuspendió por pipeteo suavemente hasta homogeneizar. Esta solución se incubó a 4°C por 15 minutos (para que las células se hinchen), después se adicionó 25uL de Nonidet NP-40 (solución al 10%), más 20uL de cóctel de inhibidores de proteasas (Complete 4X) y se colocó en vórtex vigoroso por 10 segundos. El homogenado se centrifugó a 13500 x g /1min/4°C, y se transfirió el sobrenadante (proteínas citoplasmáticas) a un tubo nuevo.

Para la extracción de proteínas nucleares, la pastilla fue resuspendida en 50uL de solución B fría (4°C) (apéndice III) más 10uL de Complete 4X. El tubo se agitó vigorosamente a 4 °C durante 30 min (en vórtex), el homogenado se centrifugó a 13500 x g/ 10 minutos/ 4°C y se recuperó, el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo (Extractos nucleares). Todos los extractos se guardaron a -80°C hasta su uso.

#### 23.4.6. Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA)

El ensayo de EMSA se realizó con las siguientes sondas de DNA: MREs de *H. sapiens* como control, MRE2 (MRE2s y MRE2as) (Tabla 4) ya descrito (184) y la sonda de control negativo de *E. histolytica* NREr (NRErs y (NREras) (Tabla 4). Los MREs de *T. vaginalis* TvMRE155 (MRE155s y MRE155a) (Tabla 4) y TvMRE282 (MRE282s y MRE282as) (Tabla 4).

Las sondas se prepararon mediante la hibridación de oligonucleótidos complementarios. El etiquetado final fue DNA resultante de doble cadena con gamma -32 P y PNK T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs) y las sondas marcadas se purificaron con el kit de Qiagen (cat.28306) según las instrucciones del fabricante.

La reacción de unión estuvo preparada con: amortiguador de unión 1X (12 mM Hepes-KOH (pH 7,9), 0,5 mM EDTA, 10  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM espermidina, 1 mM KCl, 1 mM DTT y 10% de glicerol), 44  $\mu$ M de la proteína TvZNF1r y 1 g de poli (dI-dC) (Invitrogen), la reacción se incubó 20 minutos a 4 °C, a continuación, se añadió 20,000 cpm (1,2 nM) de sonda marcada y se incubó 25 minutos a 4 °C.

La reacción unión para el análisis de proteínas de extractos de *T. vaginalis* se preparó con: amortiguador de unión 1X (12 mM Hepes-KOH (pH 7,9), 0,5 mM EDTA, 10 mM ZnCl<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM espermidina, 1 mM KCl, 1 mM DTT y 10% de glicerol), 1.8  $\mu$ g de extracto nuclear o citoplasmático de *T. vaginalis* en ausencia y presencia de Zn<sup>2+</sup> o 2  $\mu$ g de extracto nuclear de HeLa crecidos en presencia de 100  $\mu$ M de Zn<sup>2+</sup> y 1 g de poli (dI-dC) (Invitrogen), la reacción se incubó 20 minutos a 4 °C, a continuación, se añadió 20,000 cpm (1,2 nM) de cada sonda marcada y se incubó 25 minutos a 4 °C.

Las muestras se visualizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas al 6% a 100 V constantes durante 6 horas. Después de la electroforesis el gel se expuso a un cassette con films sensible a rayos X para documentar los resultados.

## **23.5. Herramientas computacionales.**

### **23.5.1. Análisis bioinformático del promotor del gen *mp50* de *T. vaginalis*.**

A partir de la secuencia de la región intergénica del genoma del aislado secuenciado G3 (<http://trichdb.org/trichdb/>) se diseñaron oligonucleótidos para amplificar la región 5' intergénica. En la secuencia de la región intergénica obtenida de los aislados CNC147 y HGMN01, se localizó lo que corresponde a la secuencia 5' UTR de *mp50*, el posible inicio de la transcripción (+1), así mismo basados en lo descrito en la literatura se localizó el posible *Inr* en el promotor de *mp50* (161). En la base de datos TRANSFACT (186) se buscó las posibles secuencias de reconocimiento para factores de transcripción utilizando como templatado la secuencia de la región intergénica 5' de *mp50* de *T. vaginalis* obtenida experimentalmente.

Con la finalidad de buscar secuencias de reconocimiento para TF que involucre mecanismos de respuesta a  $Zn^{2+}$ , se tomó como templatado la secuencia consenso del MRE reportado (TGCRNC) en *H. sapiens* como secuencia de reconociendo por el factor de transcripción de respuesta a  $Zn^{2+}$  MTF-1 (187), este MRE de *H. sapiens* se buscó en la secuencia intergénica 5' de *mp50* considerando como MREs candidatos las secuencias que conservaron al menos los tres primeros nucleótidos (TGC).

### **23.5.2. Análisis bioinformático de la región 3' UTR de *mp50* de *T. vaginalis***

La secuencia 3' UTR consenso se obtuvo de la secuenciación de los fragmentos de los aislados CNC147 y HGMN01 (en condiciones de ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$ ) con la técnica de PAT-PCR, fue analizado manualmente en el software Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), se definió la secuencia correspondiente a la región 3' UTR de *mp50* localizando la señal y el sitio de corte y poliadenilación para el RNAm de *mp50* basados en lo reportado para RNA mensajeros de *T. vaginalis* (188).

Las secuencias ESTs que contienen la región 3' UTR del gen *mp50* fueron localizadas con el programa BLAST en la base de datos TrichDB (181) y las secuencias obtenidas de los aislados CNC147 y HGMN01 (en condiciones de ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$ ) fueron cargadas en el software SEAVIEW (189) y fueron alineadas para su comparación con el algoritmo Muscle para la búsqueda de posible variaciones de la

secuencia que pudiera influir en la regulación de la expresión del gen *mp50* de *T. vaginalis*.

El análisis de predicción de las estructuras secundarias (estructuras de doble cadena tipo tallo-asa) del RNAm en la región 3'UTR del gen de *mp50*, se realizó con el programa Mfold versión 3.6 con los parámetros por default y disponible en la red (190). En este programa fueron cargadas todas las secuencias de ESTs localizadas en TrichDB y las secuencias obtenidas de los aislados CNCD147 y HGMN01, considerando por separado dos sitios de corte y poliadenilación (sitio de corte I y sitio de corte II) para el modelaje de la estructura secundaria de las secuencias de la región 3'UTR del RNAm de *mp50*.

## **23.6. Análisis bioinformático de la proteína TvZNF1**

### **23.6.1. Búsqueda de secuencias homologas en la bases de datos**

Con la finalidad de encontrar proteínas homologas de *T. vaginalis* asociadas a la respuesta a estímulos de metales pesados, como:  $Fe^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  se hizo la búsqueda mediante el programa BLASTp con el algoritmo psi-Blast disponible en línea en dos diferentes bases de datos de secuencias: TrichDB (<http://trichdb.org/trichdb/>) y en el NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El BLASTp fue realizado usando como templado la secuencia de aminoácidos de MTF-1 (UNIPROT: Q14872), SP1 (UNIPROT:P08047) (*H. sapiens*), Zap1 (UNIPROT:P47043) (*S. cerevisiae*), Zif268 (UNIPROT:P18146) (*Mus musculus*), se buscó utilizando un valor de expect de 0.001. Estas secuencias fueron utilizadas debido a que son proteínas implicadas en mecanismos de respuesta a metal y son proteínas tipo C2H2-ZNFm actualmente caracterizados.

### **23.6.2. Análisis de predicción de dominios en las bases de datos**

Para corroborar la predicción inicial sobre la proteína deducida de aminoácidos del gene de *tvznf1*, se consultaron las bases de datos de predicción de dominios "integrated InterPro Domains database" y en NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mediante Psi-BLAST en la base de datos Conserved Domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

### 23.6.3. Predicción de estructura secundaria de la proteína TvZNF1

La predicción de estructura secundaria de la secuencia de aminoácidos de TvZNF1 se realizó utilizando los programas de PCOILS (191) HHPRED (192), GOR4 (193), CFSSP (194) y APSSP (<http://imtech.res.in/raghava/apssp/>).

### 23.6.4. Análisis de traza evolutiva

A partir de la secuencia completa de aminoácidos de TvZNF1 se obtuvieron secuencias homólogas en el servidor de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) usando el algoritmo Psi-BLAST con 15 iteraciones, empleando la base de datos del depositario de secuencias peptídicas de estructuras del PDB “Protein data bank”). Las secuencias obtenidas se alinearon en el software Seaview con el algoritmo Muscle con parámetros de “default”. A partir de 53 secuencias obtenidas se construyó el alineamiento que se utilizó para el análisis de traza evolutiva en el servidor Evolutionary Trace server (Tracesuite II) (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~jiye/evoltrace/evoltrace.html>).

### 23.6.5. Modelaje de la estructura de TvZNF1

La predicción estructural se llevó a cabo mediante predicción por homología utilizando modelos sencillos sin unión a DNA o catión  $Zn^{2+}$ , esto con la idea de analizar la estabilidad de los diferentes C2H2-ZNFm de TvZNF1. Sin embargo, para realizar un modelo más completo se requiere el acceso a súper cómputo.

La predicción de la estructura terciaria se realizó dividiendo en tres partes la proteína completa de TvZNF1: (Bloque A (1-101 residuos) correspondiendo a C2H2-ZNFm1 al C2H2-ZNFm3 utilizando como templado el PDB: 5EGB. Para el bloque B (80-166 residuos) correspondiendo a C2H2-ZNFm3 al C2H2-ZNFm5 utilizando como templado el PDB: 2KMK. Para el bloque C (140-276 residuos) correspondiendo a ZNFm5 a ZNF8 se utilizó como templado el PDB: 1A1I. Además se modeló cada uno de los 8 dominios C2H2-ZNFm de TvZNF1 de forma individual en línea en el servidor Zhang Lab utilizando el programa I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) con los parámetros asignados automáticamente del programa. El análisis de los modelos se realizó en el software PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.) y VMD (195).

La conservación de la estructura secundaria en los modelos tridimensionales generados por I-TASSER (Bloques A, B, C y los dominios individuales C2H2-ZNFm) fueron analizados con el programa Stride (196)

#### **23.6.6. Alineamiento de motivos C2H2-ZNFm de TvZNF1 vs MTF-1.**

Para realizar los alineamientos se consideró que TvZNF1 y MTF-1 reconocen la misma secuencia núcleo de DNA 5'-TGCrCnC-3' de MRE (197) de siete nucleótidos y la misma secuencia consenso de la firma 5'-TGCrCnC[G/C][G/C]-3' de MRE ya reportado de 9 nucleótidos (184). Además se consideró una firma extendida a 10 nucleótidos para MRE con el consenso 5'-TGCrCnC[G/C][G/C]C-3' basado en el modelo de unión a DNA por triplete de dedos de zinc (triple zinc finger model of DNA binding), previamente descrito y reportado (145). En este modelo cada ZNFm puede enlazar de 3 a 4 nucleótidos lo que significa que para una firma de 10 nucleótidos (como la elegida en este trabajo) un máximo de tres ZNFm son los que pueden ser enlazados a MRE. Para MTF-1 tres de sus dominios ZNFm desde C al N-terminal unen DNA en dirección 5'-3' debido a que el segundo y un tercer dominio C2H2-ZNFm unen el núcleo de la firma consenso MRE 5'-TGCrCnC-3'. MTF-1 tiene determinado experimentalmente que une el núcleo MRE mediante C2H2-ZNFm 2, 3 y 4, mientras que los C2H2-ZNFm 1,5 y 6 no son requeridos para el enlace (198,199). TvZNF1 cuenta con ocho C2H2-ZNFm lo que destaca que únicamente tres de los ocho son los que enlazaran el MRE seleccionado (o bien dos C2H2-ZNFm a la secuencia núcleo de 7 nucleótidos).

Para el alineamiento se tomaron en cuenta los residuos determinantes para el enlace específico de DNA designados por su posición respecto a la  $\alpha$ -hélice (posiciones de residuos -1,2,3 y 6) de cada C2H2-ZNFm (145), Además, en la región de enlace de cada C2H2-ZNFm incluye 4 residuos del N-terminal de la  $\alpha$ -hélice, así como algunos residuos de la siguiente asa de cada C2H2-ZNFm. Cuando esta asa presenta tallas pequeñas (menos de 5 residuos) es denominado "linker" y suele presentar lisinas y argininas que se ha observado que enlazan la cadena principal de DNA (región del azúcar y sus fosfatos).

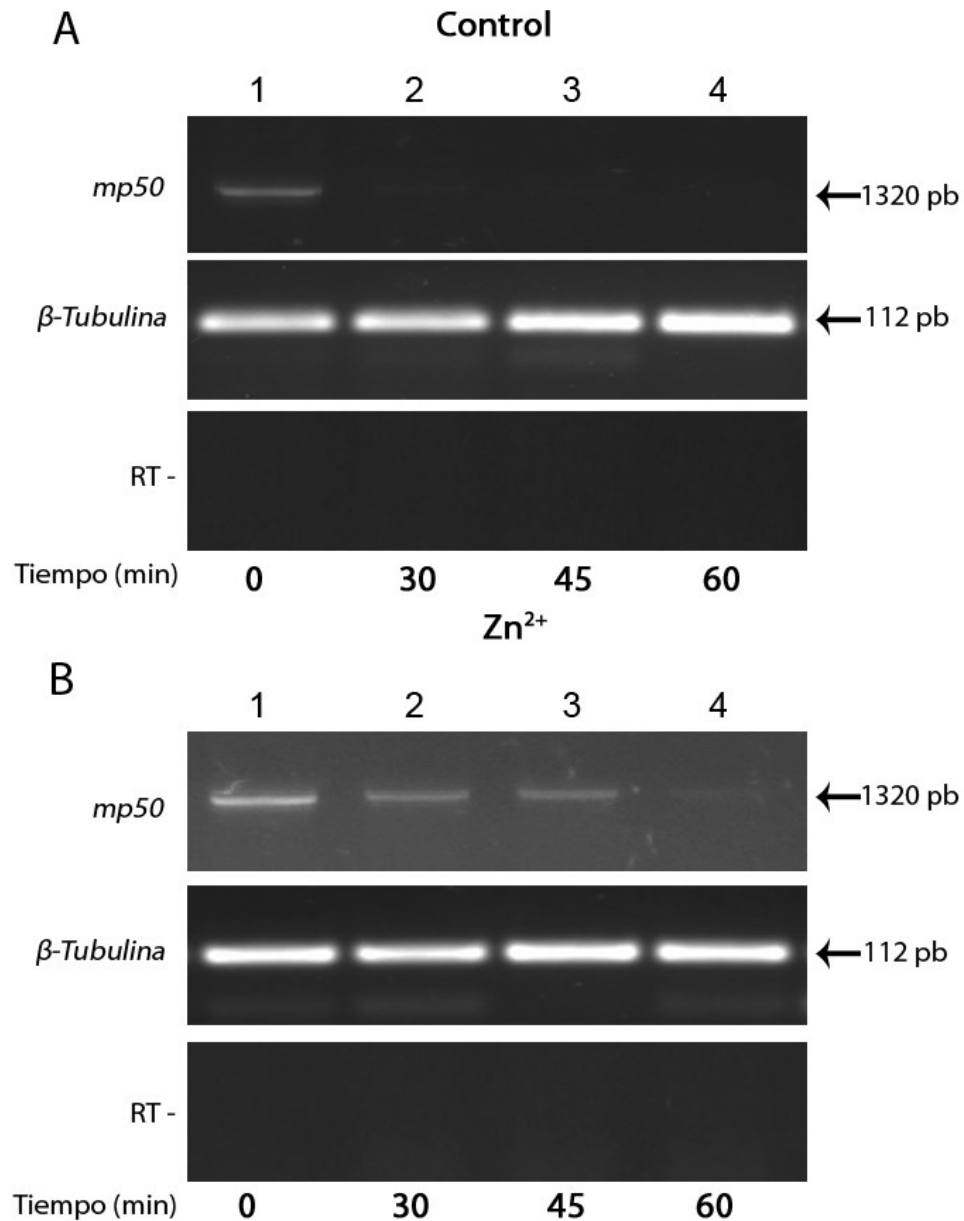
Considerando estos datos experimentales se alineó a C2H2-ZNFm 2, 3 y 4 de MTF-1 con seis combinaciones de tres C2H2-ZNFm de TvZNF1 para identificar los residuos que potencialmente podrían determinar el reconocimiento y enlace a la secuencia consenso de DNA de MRE de 10 nucleótidos y las posibles homologías, de existir con MTF-1.

## 24. Resultados

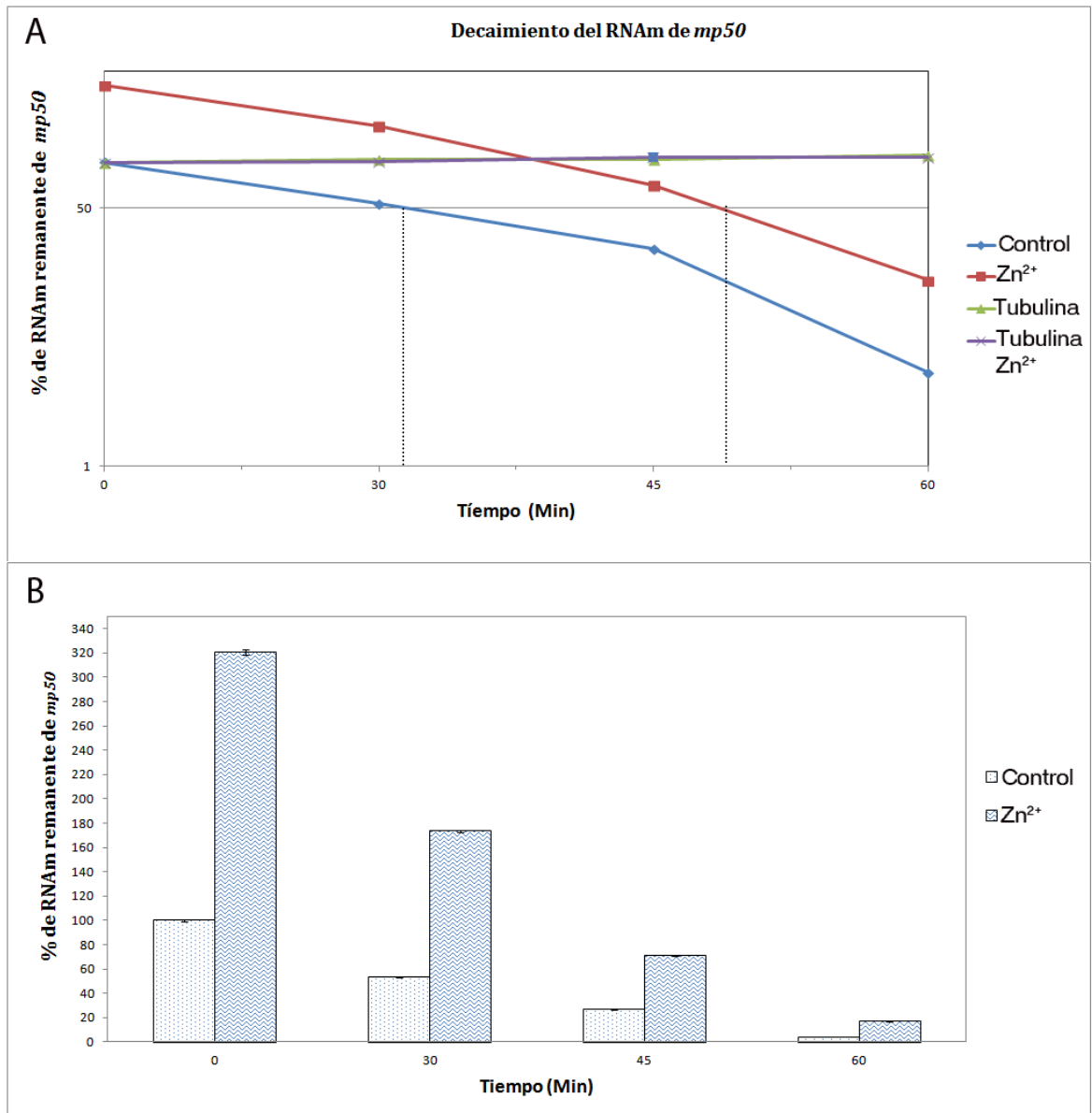
### 24.1. Análisis de la estabilidad del RNAm de *mp50* mediado por $Zn^{2+}$ en *T. vaginalis*.

El ensayo de estabilidad de RNAm de *mp50* en el aislado HGMN01 cultivados con actinomicina D, en ausencia y presencia de 1.6 mM de  $ZnCl_2$ , se obtuvo RNA total y se obtuvieron los perfiles de expresión del RNAm de *mp50* (Figura 6). En el caso de la expresión de *mp50* en condición de ausencia de  $Zn^{2+}$  (Figura 6, panel A) se muestra la amplificación de *mp50* en el tiempo 0, sin embargo, a los 30, 45 y 60 minutos no se logró detectar el amplificado de *mp50* (Figura 6, panel A). Por otro lado, el perfil de expresión de *mp50* en presencia de  $Zn^{2+}$  mostró el amplificado en los tiempos de 0, 30 y 45 min, sin embargo, a los de 60 min, no se logró detectar amplificado de este gen (Figura 6, panel B). La expresión de *mp50* se normalizó con el amplificado del gen  $\beta$ -*tubulina* como control, debido a que la transcripción del gen  $\beta$ -*tubulina* no se afecta en ambas condiciones (Control y  $Zn^{2+}$ ) (Figura 6, panel A y B). A estos perfiles de expresión se les realizó un análisis densitométrico y los datos se normalizaron con el valor del gen de  $\beta$ -*tubulina*, estos se graficaron mostrando que fue más pronunciado el decaimiento del RNAm de *mp50* en condición control comparado en la condición en presencia de  $Zn^{2+}$  (Figura 7, panel A). Esto es más evidente en la gráfica de barras (Figura 7, panel A y B), que muestra el decaimiento en porcentaje del RNAm de *mp50* en la condición de ausencia de  $Zn^{2+}$  (Figura 7). De manera interesante se observó que el RNAm de *mp50* decae más lentamente en presencia de 1.6 mM  $Zn^{2+}$  mostrando el amplificado de *mp50* hasta los 45 minutos (Figura 7). La vida media se obtuvo a través de la ecuación  $Tv_{1/2} = \ln 2 / k$  utilizando los datos densitométricos de las cantidades iniciales y finales de cada condición para calcular la vida media del RNAm de *mp50* en ambas condiciones.

La vida media fue de 13 y 14.1 minutos por estimación teórica, mientras que experimentalmente fue de 30 y 47 minutos para la condición en ausencia y en presencia de  $Zn^{2+}$  respectivamente.



**Figura 6. Estabilidad de RNAm de *mp50* en ausencia y presencia de Zn<sup>2+</sup>.** El perfil de expresión de *mp50* se obtuvo a partir de parásitos cultivados en condiciones de ausencia (Panel A) y presencia de Zn<sup>2+</sup> (Panel B) durante 12 h previamente al tratamiento con 10 µg/ml de actinomicina D durante 60 min. Las muestras 10x10<sup>6</sup> se tomaron a los 0 (carril 1), 30 (carril 2), 45 (carril 3) y 60 (Carril 4) minutos para cada condición (Panel A y B). A partir de 1 µg de RNA total se sintetizó cDNA, el amplicón de 1320 pb corresponde a *mp50* y el de 112 pb a  $\beta$  tubulina. La RT- se muestra para ambas condiciones (Panel A y B).



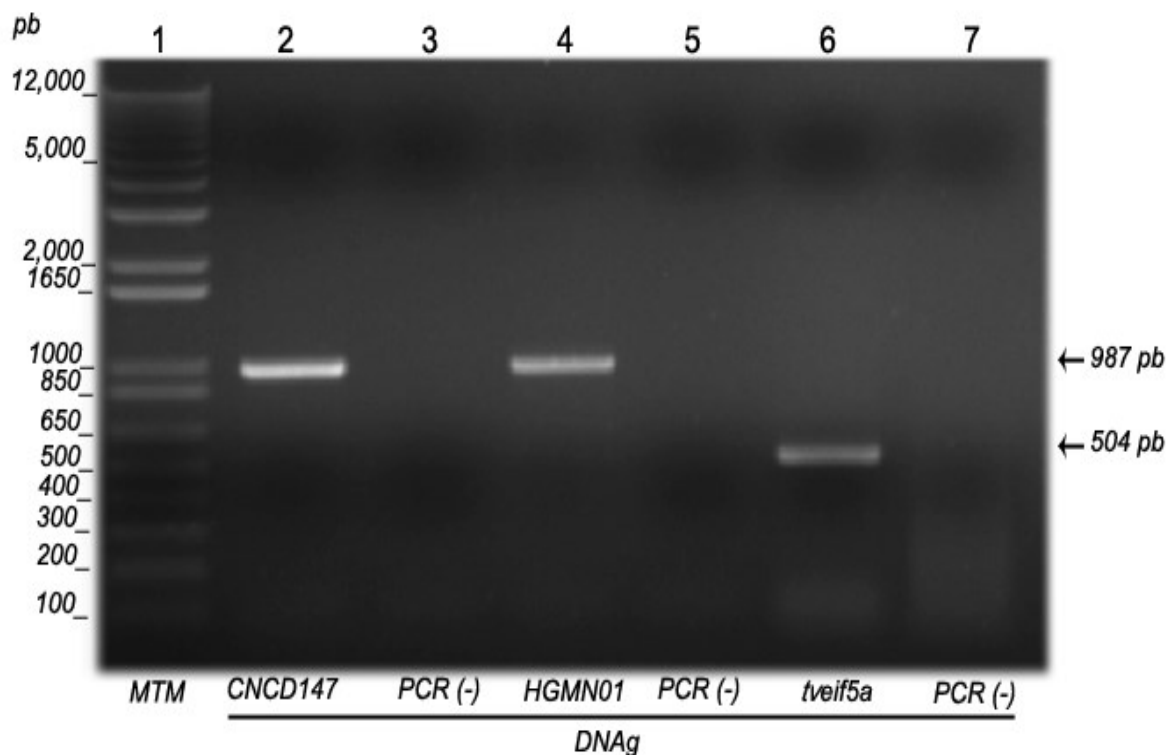
**Figura 7. Análisis densitométrico del perfil de estabilidad de *mp50* del aislado HGMN01 de *T. vaginalis* en ausencia y presencia de Zn<sup>2+</sup>.**

A) Los valores de la densitometría fueron normalizados y graficados, la línea azul refiere a: control, línea roja Zn<sup>2+</sup> también se muestran en línea verde (ausencia de Zn<sup>2+</sup>) y línea gris (presencia de Zn<sup>2+</sup>) del control  $\beta$ -*tubulina*. La grafica muestra el decaimiento de la cantidad de RNAm con respecto al tiempo de ambas condiciones. B) La densitometría de las bandas observadas en la figura 1 fue realizada utilizando el programa ImagenLab (BioRad). Los valores de intensidad relativa se calcularon dividiendo la intensidad de *mp50*/intensidad de  $\beta$ -*tubulina* para cada condición analizada, el tiempo cero de la condición control fue considerado como 100%. Los errores estándar se indican sobre las barras y representan el error estándar obtenido de tres experimentos independientes.

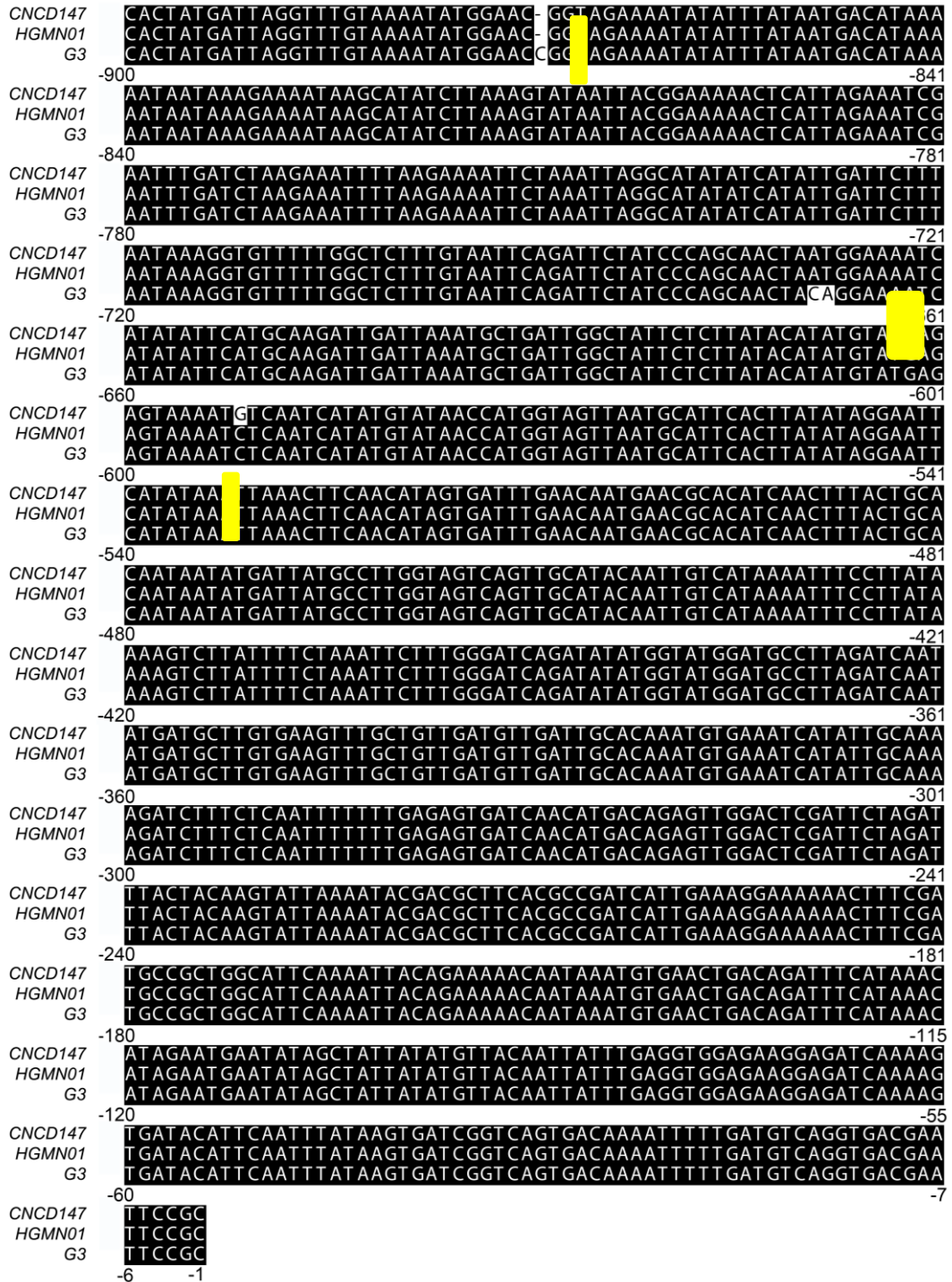
## 24.2. Secuenciación y alineamiento de la región intergénica 5' del gen *mp50* en los aislados CNCD147 y HGMN01 de *T. vaginalis*.

A partir de DNAg de los aislados CNCD147 y HGMN01, se amplificó y secuenció una región de -987 pb correspondiente a la región 5' intergénica probablemente completa del gen *mp50* para cada uno de los aislados de las cuales entre -900 a -987 pertenecen a la región codificante de un gen hipotético corriente arriba a *mp50* (Figura 8), la secuencia del amplificado fue del mismo tamaño para todas las clonas seleccionadas de ambos aislados, CNCD147 (Figura 8, carril 2) y para HGMN01 (Figura 8, carril 3), los controles negativos no amplificaron (Figura 8, carriles 3 y 5). El control (+) de PCR utilizado fue el gen de *tveif5a* con un amplificado de 504 pb previamente reportado (200) (Figura 8, carril 6) y un control negativo de PCR que no amplificó (Figura 8, carril 7). La secuencia intergénica 5' de *mp50* que se muestra fue de -900 pb. Estas secuencias se alinearon junto con la secuencia del aislado G3 (Figura 9).

El alineamiento de las secuencias de la región promotora del gen *mp50* de los aislados (CNCD147 Y HGMN01) y la secuencia homóloga reportada para el aislado de *T. vaginalis* G3 mostró una elevada conservación dada la alta identidad (99%) entre secuencias (Figura 9). Sin embargo, se observaron tres regiones con cambios en la secuencias, el primero en la posición -592 pb de las secuencias intergénicas obtenidas, donde se muestra una Guanina (G) para ambos aislados (CNCD147 y HGMN01) y en el aislado G3 se encontró una Citosina (C) (Figura 9). El segundo cambio se encontró en la posiciones consecutivas de -669 y -670 pb mostrando una Adenina (A) y una Timina (T) para los aislados CNCD147 y HGMN01, sin embargo,, se encontró una Citosina (C) y una Adenina (A) en el aislado G3 respectivamente (Figura 9). Finalmente, la posición -870 pb mostró un indel para las secuencias de los aislados CNCD147 y HGMN01 a diferencia del aislado G3 el cual tuvo una Citosina (C) en esa posición (Figura 9).



**Figura 8. Perfil de amplificación de la región 5' intergénica de *mp50* de los aislados CNCD147 y HGMN01.** Las reacciones de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2% teñido con red gel. Las muestras se cargaron en el siguiente orden: marcador de talla molecular (MTM) de 1 Kb (Carril 1), amplificado de CNCD147 (Carril 2), control negativo de PCR (PCR -)(Carril 3), amplificado de HGMN01(Carril 4), control negativo de PCR (PCR -) (Carril 5), control positivo (*tveif5a*) (Carril 6) y control negativo de PCR (PCR-) (Carril 7).



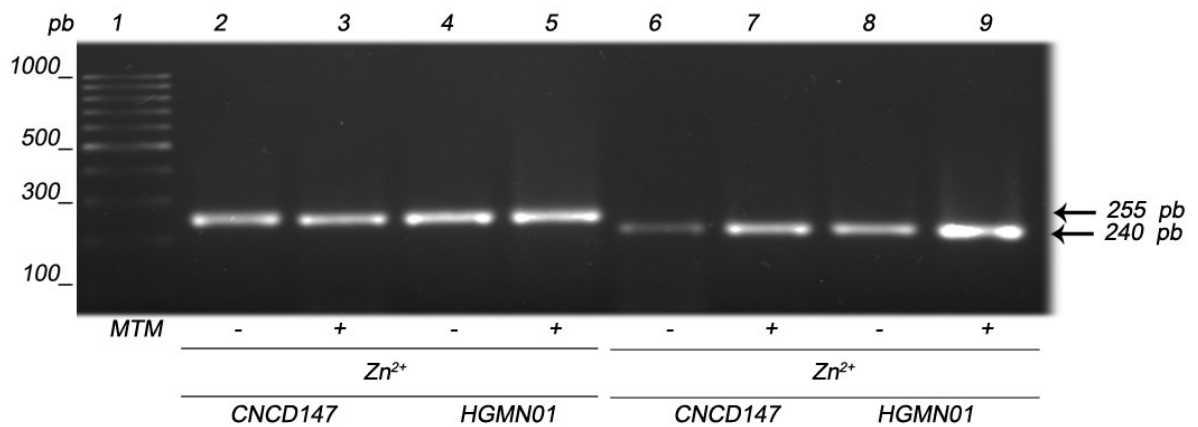
**Figura 9. Alineamiento de la región 5' intergénica que contiene el promotor de *mp50* de los aislados CNCD147, HGMN01 y G3.** Secuencias (900 pb) de la región 5' intergénica de *mp50* obtenidas de los aislados CNCD147 y HGMN01 se alinearon y se compararon con la secuencia de referencia del aislado G3 secuenciado en el loci TVAG\_403460 en la base de datos TrichDB.

### **24.3. Amplificación y secuenciación de la región 5'UTR del RNAm de *mp50* en los aislados CNCD147 y HGMN01.**

A partir de cDNA de parásitos crecidos en ausencia y presencia de 1.6 mM de Zn<sup>2+</sup> de los aislados CNCD147 y HGMN01 de *T. vaginalis* se amplificó y secuenció la región 5'UTR de *mp50* (empleando el kit AMBION 5'RACE). El perfil de amplificación mostró una banda de 255 pb que corresponde a la secuencia del oligonucleótido adaptador, secuencia 5'UTR y la región codificante (Figura 10, carriles: 2-5).

Como control se amplificó un fragmento de ~240 pb que corresponde a la región codificante, mostrando una diferencia de ~15 pb (Figura 10, carriles: 6-9) comparados con las muestras de los carriles 2-5 (Figura 10).

Las muestras de los carriles 2-5 se purificaron y se clonaron en el vector pJET 1.2/BLUNT (de extremos romos) para ser secuenciadas y con ello se obtuvo la secuencia de la región 5'UTR de las muestras de los dos aislados en condición de ausencia y presencia de Zn<sup>2+</sup> (Tabla 5). La secuencia 5'UTR para el RNAm de *mp50* tuvo un tamaño de -10 pb con respecto al ATG del RNAm de *mp50* (Tabla 5).



**Figura 10. Perfil de amplificación de la región 5'UTR del RNAm de *mp50* de los aislados CNCD147 y HGMN01.** A partir de RNA total de parásitos crecidos en ausencia y presencia de Zn<sup>2+</sup> se obtuvo un amplificado de 255 pb correspondiente al oligonucleótido adaptador, a la región 5'UTR y región codificante de los aislados CNCD147 y HGMN01. Marcador de talla molecular (MTM) 100 pb (Carril 1), CNCD147 ausencia de Zn<sup>2+</sup> (Carril 2), CNCD147 presencia de Zn<sup>2+</sup> (Carril 3), HGMN01 ausencia de Zn<sup>2+</sup> (Carril 4), HGMN01 presencia de Zn<sup>2+</sup> (Carril 5). Como control se amplificó un fragmento de ~240 pb correspondiente a la región codificante de *mp50*, para CNCD147 en ausencia de Zn<sup>2+</sup> (Carril 6), CNCD147 en presencia de Zn<sup>2+</sup> (Carril 7), HGMN01 en ausencia de Zn<sup>2+</sup> (Carril 8), HGMN01 en presencia de Zn<sup>2+</sup> (Carril 9).

**Tabla 5. Secuencias de la región 5'UTR de *mp50* de los aislado CNCD147 y HGMN01 en ausencia y presencia de Zn<sup>2+</sup>. Secuencia de 10 nt de la región 5'UTR del RNAm del gen *mp50* (subrayada), codón de inicio de la traducción (amarillo).**

Aislado	Secuencias de la región 5'UTR de <i>mp50</i>		
	Condición	Control	Zn <sup>2+</sup>
CNCD147		<u>AAAATTTTTGATG</u> TCAGGTGA	<u>AAAATTTTTGATG</u> TCAGGTGA
HGMN01		<u>AAAATTTTTGATG</u> TCAGGTGA	<u>AAAATTTTTGATG</u> TCAGGTGA

#### 24.4. Análisis *in silico* del promotor de *mp50* de *T. vaginalis*

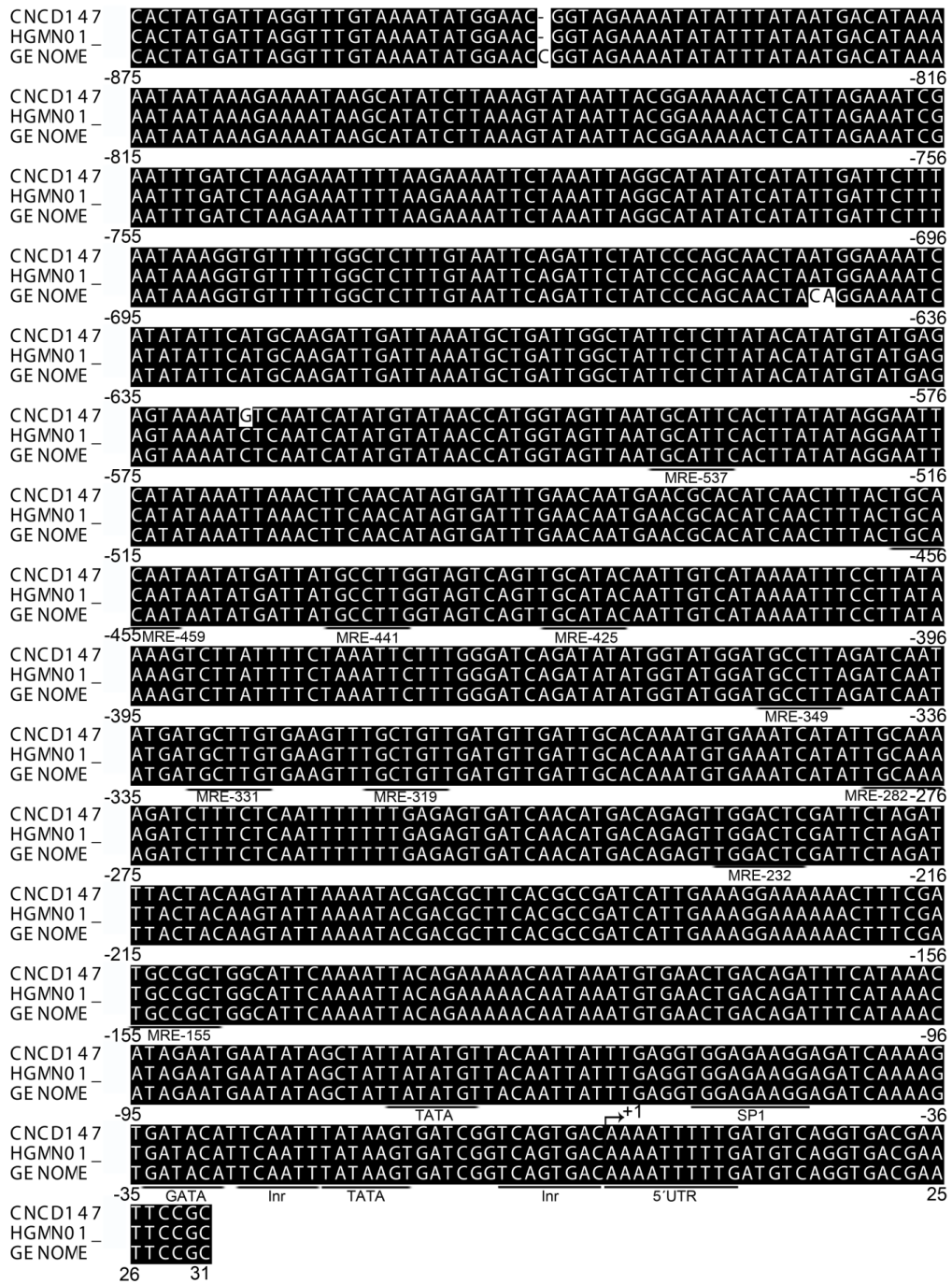
La región 5' UTR mostró ser una región rica en adeninas y timinas con un tamaño de 10 nucleótidos (Tabla 5) para los dos aislados en ambas condiciones (Figura 10). Tomando la secuencia de la región 5' intergénica de *mp50* se realizó una búsqueda *in silico* de los posibles motivos de reconocimiento de factores de transcripción en la región promotora del gen de *mp50*, a través del servidor TRANSFAC (<http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html>) (Tabla 6). Para la identificación de los motivos en la región promotora de *mp50*, se analizó -724 pb corriente arriba a la región 5'UTR de *mp50*. Los motivos descubiertos por medio del servidor TRANSFAC a través de programa Match (TM), el cual permite la búsqueda de sitios de unión para factores de transcripción en secuencias de DNA. Mediante este programa se realizó la búsqueda de los diferentes sitios de reconocimiento para factores de transcripción obteniendo que existen sitios probables para: AP-1, CREB, Nkx2-5, GATA, entre otros (Tabla 6). De manera interesante se encontraron factores con C2H2-ZNFm de zinc (Tabla 6). Los valores de corte son referidos como: El “*core similarity match*” (CSS) que muestra un valor de “*Score*” que representa la conservación de al menos 5 nucleótidos de la secuencia con la matriz y una parte de la secuencia problema; y el “*matrix similarity Score*” (MSS) que describe la calidad de la conservación de nucleótidos entre la secuencia de la matriz y una parte arbitraria de la secuencia problema. Estos *scores* son calculados por el CSS y en función de este se deduce el MSS con lo cual un valor alto muestra una predicción confiable (Tabla 6). En resumen las principales cajas dentro del núcleo de promotor (-200 pb) en la secuencia 5' intergénica de *mp50* fue localizado: el posible inicio de la transcripción (+1), se localizaron corriente arriba el posible Inr (-10 pb), dos posibles elementos TATA a -22 y otro a -72 pb, una posible caja para factores GATA a -35 pb y para factores del tipo SP1 a -55 pb (Figura 7).

De manera manual y basados en el core de MRE (TGCRNC) descrito en promotores de genes de humano se localizaron 10 posibles elementos de respuesta a metal (MREs) en las posiciones -155,-232,-282,-319,-331,-349,-425,-441,459 y -535, con respecto al inicio de la transcripción de *mp50* (Figura 11).

Los MREs predichos conservan al menos tres de los primeros nucleótidos de la caja reportada en eucariontes superiores reconocidos por MTF-1, un factor de transcripción de respuesta a  $Zn^{2+}$ . (Figura 11).

**Tabla 6. Sitios de reconocimiento de factores de transcripción predichos en la secuencia 5' intergénica de *mp50*.** En esta tabla se muestra los diferentes motivos y los posibles factores de transcripción. Los valores de confianza de “core match” y “matrix match” son mostrados, que entre más cercanos a 1 es más confiable la predicción.

<b>Factor de transcripción</b>	<b>CSS</b>	<b>MSS</b>	<b>Secuencia de reconocimiento</b>
<b>AP-1</b>	0.935	0.935	ggTGACGaatt
<b>CREB</b>	1.000	0.906	ggTGACGaattc
<b>ATF</b>	1.000	0.947	aggTGACGaattcc
<b>MyoD</b>	1.000	0.930	tgtCAGGTgacg
<b>Sn</b>	1.000	0.928	atgtCAGGTgacg
<b>AP-1</b>	0.935	0.935	agTGACAaaat
<b>Nkx2-5</b>	1.000	0.939	atAAGTG
<b>GATA-X</b>	0.953	0.915	tGATACattca
<b>Lom2 complex</b>	0.985	0.919	gTGATAcat
<b>GATA-3</b>	0.977	0.938	ggaGATCAaa
<b>GATA-1</b>	0.993	0.933	aaagTGATAcattc
<b>GATA-2</b>	0.908	0.920	ggaGATCAaa
<b>Athb-1</b>	1.000	0.959	ttacaATTATttga
<b>CF2-II</b>	1.000	0.928	tTATATggt
<b>XFD-2</b>	1.000	0.941	ttcATAAAcataga
<b>BR-C Z4</b>	1.000	0.901	ttcATAAAcatag
<b>Freac-7</b>	1.000	0.973	atttcATAAAcataga
<b>FOXJ2</b>	1.000	0.910	gatttcataAAACatagaa
<b>Sox-5</b>	1.000	0.997	aaaACAATaa
<b>SOX-9</b>	1.000	0.949	gaaaaACAATAaat
<b>dl</b>	1.000	0.935	acaGAAAaca
<b>FOXJ2</b>	1.000	0.916	ttacagaaAAACAataaa
<b>S8</b>	1.000	0.935	cattcaaAATTAcaga
<b>Brn-2</b>	1.000	0.965	ggcattcAAAATtaca
<b>Ik-1</b>	1.000	0.919	gaaaGGGAAaaac
<b>Skn-1</b>	1.000	0.930	gccgATCATtga
<b>Gfi-1</b>	1.000	0.917	aatgtgaAATCAattgcaaaag
<b>Brn-2</b>	1.000	0.912	caaatgtGAAATcata
<b>c-Myb</b>	0.989	0.912	gaagtttgctGTTGAtgt
<b>CDP</b>	0.983	0.963	taTGGATgcc
<b>TATA</b>	1.000	0.936	cttaTAAAag
<b>TGIF</b>	1.000	0.952	aatTGTCAtaa



**Figura 11. Análisis de la región promotora del gen *mp50* de *T. vaginalis*.** La región 5' intergénica completa permitió detectar las diferentes cajas posibles en el promotor de *mp50*, Inr (-8 pb), dos posibles TATA-box (-22 y -72 pb), GATA (-35 pb), SP1 (-55 pb), Elementos de Respuesta a Metal de *T. vaginalis* (TvMREs) TvMRE155 (-155 pb), TvMRE232 (-232 pb), TvMRE282 (-282 pb), TvMRE319 (-319 pb), TvMRE331 (-331 pb), TvMRE349 (-349 pb), TvMRE425 (-425 pb), TvMRE441 (-441 pb), TvMRE459 (-459 pb) y TvMRE537 (-537 pb). Localización del inicio de la transcripción (+1) y la secuencia 5'UTR (subrayada).

#### **24.5. Análisis de la región 3' del RNAm de *mp50* en ausencia y presencia de Zn<sup>2+</sup> de *T. vaginalis*.**

En relación a la caracterización de RNAm de *mp50*, a partir de cDNA se obtuvo el perfil de PAT-PCR (Figura 12), obteniendo la longitud del tracto de poli (A) y la secuencia del 3'UTR de *mp50*. Para el aislado CNCD147 crecido en condición control (ausencia de Zn<sup>2+</sup>) se obtuvo una longitud de tracto de poli(A) de ~135 nt (Figura 12, carril 1) y para la condición en presencia de Zn<sup>2+</sup> fue de ~ 235 nt (Figura 12, carril 2). En el caso del aislado HGMN01 en condición control (ausencia de Zn<sup>2+</sup>) se obtuvo un longitud de poli (A) de ~235 nt (Figura 12, carril 3) y en presencia de Zn<sup>2+</sup> fue de ~735 nt (Figura 12, carril 4). El perfil de PAT-PCR mostró un incremento en el barrido para las muestras de la condición en presencia de Zn<sup>2+</sup> para los dos aislados comparado con su respectivo control (Figura 12, carriles: 2 y 4). Además como control negativo se muestra el RT- (Figura 12).

Las bandas del perfil de PAT-PCR correspondientes a la longitud del poli (A) (Figura 12, carriles 1- 4), se clonaron en el vector pJET 1.2/BLUNT extremos romos. El DNAp fue obtenido y se secuenció para ambos aislados en ausencia y presencia de Zn<sup>2+</sup> (Tabla 6). Las secuencias correspondientes a la región 3'UTR del RNAm de *mp50* en condición de ausencia y en presencia de Zn<sup>2+</sup> para los aislados CNCD147 y HGMN01 fueron obtenidas (Tabla 7). La longitud de la región 3'UTR en condición control y Zn<sup>2+</sup> para el aislado CNCD147 fue de 55 nucleótidos para ambas condiciones (Tabla 7). Para el aislado HGMN01 en la condición control se obtuvo la longitud la región 3'UTR de 56 nucleótidos y para la condición en presencia de Zn<sup>2+</sup> se obtuvo de 55 nucleótidos (Tabla 7). Además se analizó *in silico* la localización de la señal, el sitio de corte y poliadenilación en las regiones 3'UTR del RNAm de *mp50* de los aislados CNCD147 y HGMN01 en ausencia y presencia de Zn<sup>2+</sup>, mostrando que la señal de poliadenilación se encuentra a 19 bases con respecto al codón de paro (TGA) (Figura 13, panel A). El análisis mostró que en el caso de la región 3'UTR en condición control y Zn<sup>2+</sup> de los aislados CNCD147 y HGMN01 el primer sitio de corte y poliadenilación se localiza a 21 nucleótidos corriente abajo con respecto a la señal de poliadenilación y un segundo posible sitio de corte y poliadenilación se localiza a 30 pb para ambos aislados en ambas condiciones (Figura 13, panel A).

En la base de datos de TrichDB se reportan 13 ESTs para *mp50*, los cuales son ampliaciones de la región codificante y solo 5 ESTs describen la región de 3'UTR del RNAm de *mp50*, en general presentan un tamaño de entre 1069 (CD664382) y 564 (JG710855) nucleótidos, los cuales fueron obtenidos desde parásitos con morfología de trofozoito y ameboide respectivamente (Tabla 8).

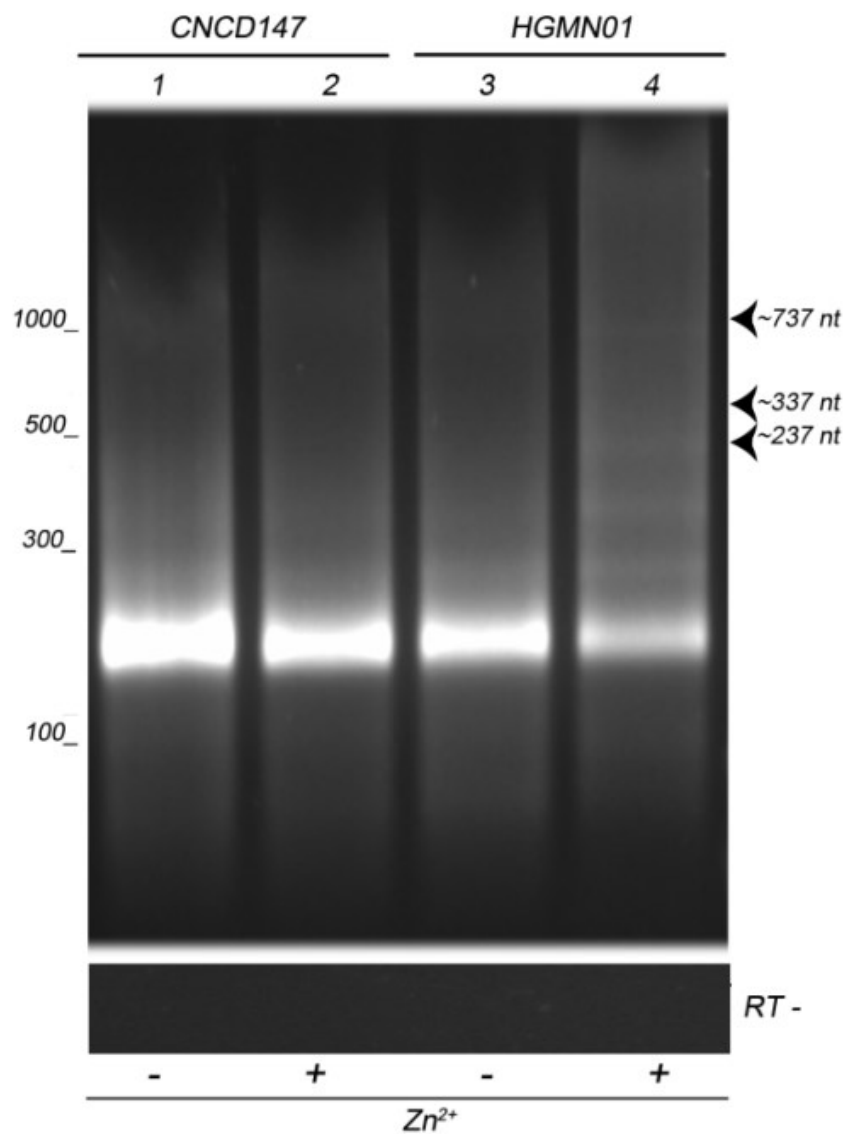
Estas 5 secuencias ESTs (Tv090A04, C0578176, C0578176, TvF029E11 y JG710855) fueron seleccionadas por que mostraron cubrir la secuencia hacia el 3'UTR de *mp50* y no repetirse. Estas secuencias fueron alineadas con las secuencias obtenidas de CNCD147 y HGMN01 en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$  (Figura 13, panel B). El alineamiento mostró la presencia de un elemento rico en timinas (T) corriente abajo al codón de paro. Además se localizó un elemento rico en adeninas (A) a 34 nt corriente abajo con respecto al codón de paro. El elemento rico en timinas mostró una diferencia en la cantidad de T entre las secuencias alineadas (Figura 13, panel B). Sin embargo, el elemento rico en (A) mostró diferencias encontrándose en la secuencia EST: CD664382 que mostró la ausencia de una adenina, en las cuatro secuencias de ESTs restantes conservaron 6 adeninas como elemento rico en adeninas (Figura 13, panel B).

En base a estos resultados se determinó la existencia de dos posibles sitios de corte y poliadenilación en la secuencias analizadas de la región 3'UTR de *mp50*, lo cual se consideró para el modelaje de la estructura secundaria de esta región (3'UTR de *mp50*) de las secuencias UTR de los aislados CNCD147, HGMN01 y las secuencias de los ESTs de *mp50*.

Una primera estructura consideró la secuencia hasta el primer sitio de corte y poliadenilación (sitio I) (Figura 14). Las secuencias de los aislados CNCD147 y HGMN01 se consideraron como una sola para el modelaje debido a que son 100% conservadas, lo que mostró una burbuja con 7 nt y un tallo de 24 nt, se observó la hibridación atípica entre U-G en la posición 20 con una  $\Delta G$  de -5.20 (Figura 14, panel A). Las secuencias de ESTs: Tv090A04 y C0578176 mostraron una burbuja de 7 nt y un tallo de 22 nt con la hibridación atípica de U-G en la posición 19 con  $\Delta G$  -5.20 (Figura 14, panel C y E). Para los modelos que corresponden al sitio de corte I, de los ESTs: TvF029E11 y JG710855

mostraron una burbuja de 7 nt y el tallo de 24 nt con hibridación atípica de U-G en posición 20 en ambas estructuras (Figura 14, panel G e I).

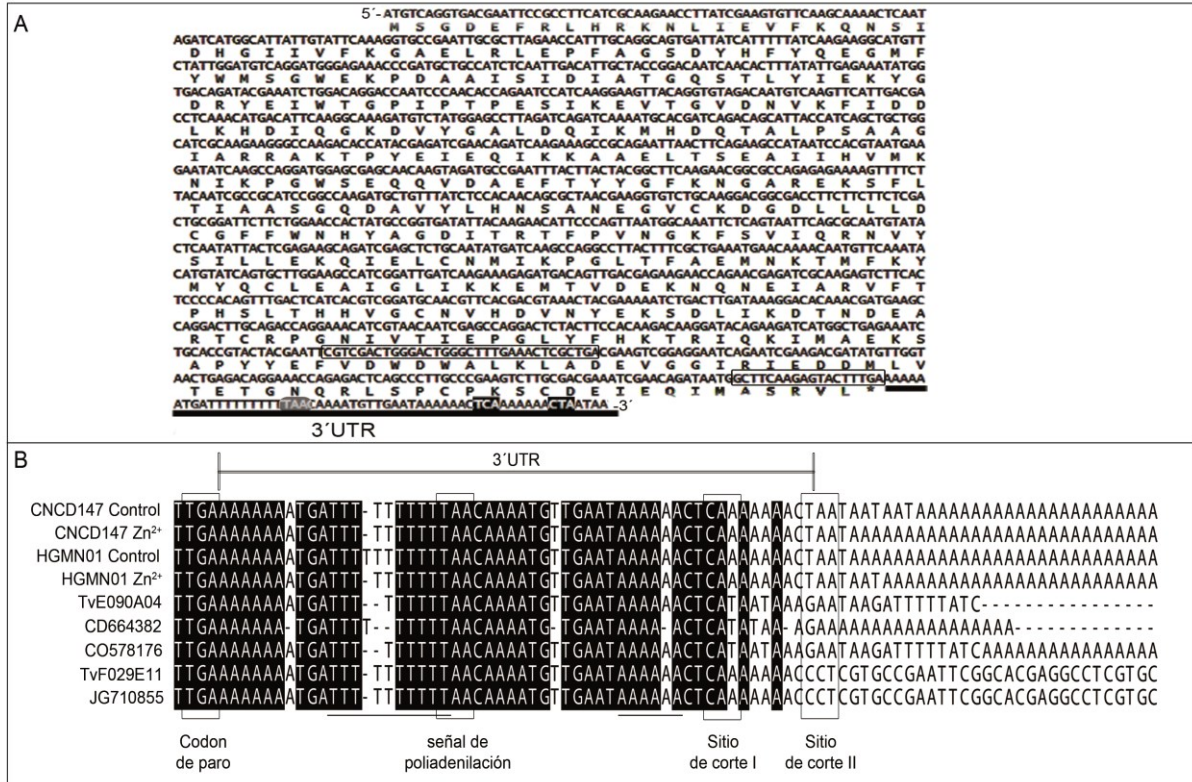
Los modelos correspondientes al sitio de corte y poliadenilación II de las secuencias CNCD147 y HGMN01 mostró una burbuja de 7 nt y un tallo de 30 nt con hibridación atípica de U-G en la posición 19, además mostró un “bucle” en la posición 41 por una C, la estructura mostró un  $\Delta G$  -7.50 (Figura 14, panel B). Los ESTs: Tv090A04 y C0578176 mostraron una burbuja de 7 nt y un tallo de 34 nt con la misma hibridación atípica en la posición 19 de U-G, además mostraron dos “bucles” en la posiciones 34 y 41 con un  $\Delta G$ : -7.50 (Figura 14, panel D y F). En el caso de las ESTs: TvF029E11 y JG710855 mostraron una burbuja de 7 nt y tallo de 34 nt con la hibridación atípica en la posición 20 por U-G, mostrando un “bucle” en posición 41, esta estructura tuvo un  $\Delta G$ : -7.90 (Figura 14, panel H y J).



**Figura 12. Perfil de la longitud del tracto de poli (A) de *mp50* en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$  de *T. vaginalis*.** A partir de muestras de RNA de parásitos crecidos en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$ , se obtuvo la longitud del tracto de poli (A). Para CNCD147 ausencia de  $Zn^{2+}$  (carril 1); para condición de  $Zn^{2+}$  (carril 2). En el caso del aislado HGMN01 en la condición de ausencia de  $Zn^{2+}$  (carril 3), para la condición en presencia de  $Zn^{2+}$  (carril 4). El control de RT- es mostrado.

**Tabla 7. Región 3'UTR de *mp50* de los aislados de *T. vaginalis* crecidos en ausencia y presencia de Zn<sup>2+</sup>.** Región 3'UTR obtenida a partir de muestras de RNA de parásitos crecidos en ausencia y presencia de Zn<sup>2+</sup> de los aislados CNCD147 y HGMN01 de *T. vaginalis*. La secuencia muestra el codón de paro (TGA), la señal de poliadenilación (TAA) y los sitios de corte y poliadenilación (CAA y TAA). Estos elementos son subrayados en las diferentes secuencias. El codón de paro es sombreado con gris.

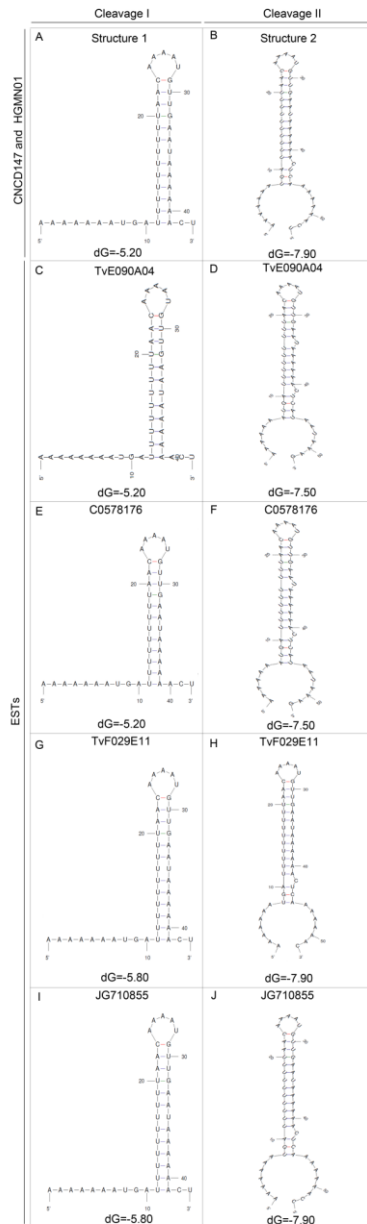
Aislado	Condición	Región 3'UTR <i>demp50</i>
CNCD147	Control	TTGAAAAAAAAATGATTTTTTTTTT <u>TAA</u> CAAAATGTTGAATAAAAAACT <u>CA</u> AAAAAACTAA
CNCD147	Zn <sup>2+</sup>	TTGAAAAAAAAATGATTTTTTTTTT <u>TAA</u> CAAAATGTTGAATAAAAAACT <u>CA</u> AAAAAACTAA
HGMN01	Control	TTGAAAAAAAAATGATTTTTTTTTT <u>TAA</u> CCCAATGTTGAATAAAAAACT <u>CA</u> AAAAAACTAA
HGMN01	Zn <sup>2+</sup>	TTGAAAAAAAAATGATTTTTTTTTT <u>TAA</u> CAAAATGTTGAATAAAAAACT <u>CA</u> AAAAAACTAA



**Figura 13. Determinación de la señal y el sitio de corte y poliadenilación en la región 3'UTR de *mp50* de *T. vaginalis*.** A) La secuencia 3'UTR del RNAm de *mp50* muestra el codón de paro señalado con \*, la región 3'UTR es subrayada, la señal de poliadenilación es señalada con un sombreado gris, los dos posibles sitios de corte y poliadenilación son sombreados con negro. Los oligonucleótidos: sentido interno son marcados con un recuadro. B) Alineamiento de las secuencias 3'UTR desde CNCD147, HGMN01 y ESTs of *mp50*. La localización del codón de paro (TGA), la señal de poliadenilación y dos posibles sitios de corte y poliadenilación (sitio de corte I y II) (marcados con el recuadro), una región rica en timinas (T) y una región rica en adeninas (A) son mostrados y señalados respectivamente (subrayados).

**Tabla 8 Análisis de ESTs de *mp50*.** Números de acceso, longitud, morfología y etapa de cultivo de 13 ESTs existentes en la base de datos TrichDB para el gen *mp50*.

ID	EST ID	Longitud	Morfología	Etapa del cultivo
TVAG_403460 ( <i>mp50</i> )	CD664382	1069	Trofozoito	Tv30236_PT cDNA biblioteca en fase semilogarítmica
	C0577989	657	Trofozoito	Tv30236_PT cDNA biblioteca en fase semilogarítmica
	C0578176	676		Tv30236_PT cDNA Library
	JG710855	564	Ameboide	<i>Trichomonas vaginalis</i> TO16 TvF cDNA biblioteca
	JG714669	587	Ameboide	<i>Trichomonas vaginalis</i> TO16 TvF cDNA Biblioteca
	JK966602	630	Trofozoitos	<i>Trichomonas vaginalis</i> en fase semilogarítmica biblioteca (TvE)
	JK966808	639	Trofozoito	<i>Trichomonas vaginalis</i> en fase semilogarítmica biblioteca (TvE)
	JK968280	854	Trofozoito	<i>Trichomonas vaginalis</i> Trofozoitos en fase semilogarítmica (TvE)
	TvE019C04	854	No sincronizado	Normal cultivo No sincronizado (TvEST)
	TvE086G06	630	No sincronizado	Normal cultivo No sincronizado (TvEST)
	TvE090A04	660	No sincronizado	Normal cultivo No sincronizado (TvEST)
	TvF029E11	564	Ameboide	Fibronectina mediando la citoadherencia (TvFN)
	TvF104D11	587	Ameboide	Fibronectina mediando la citoadherencia (TvFN)



**Figura 14. Determinación de la estructura secundaria del RNAm de *mp50* de los aislados CNCD147 y HGMN01 y secuencias de ESTs** Los modelos consideraron el sitio de corte I (panel A) y el II (panel B) referido como estructura CNCD147 y HGMN01. Para las secuencias de ESTs también se consideró los dos sitios de corte y poliadenilación (paneles C, D, E, F, G, H, I y J). Las estructuras que corresponde a la secuencia con el sitio de corte y poliadenilación I fueron: A) CNCD147 y HGMN01 (estructura 1). B) Modelaje de la secuencias de CNCD147 y HGMN01 sitio de corte y poliadenilación II (estructura 2). Para los ESTs C): TvE090A04 sitio de corte I. D) TvE090A04 sitio de corte II. E) C0578176 sitio de corte I. F) C0578176 sitio de corte II. G) TvF029E11 sitio de corte I. H) TvF029E11 sitio de corte II. I) JG710855 sitio de corte I. J) JG710855 sitio de corte II.

## 24.6. Análisis bioinformático deTvZNF1

El análisis se inició con la búsqueda de proteínas con C2H2-ZNFm en el genoma de *T. vaginalis*. A partir de la base de datos UniProtKB se obtuvieron las secuencias completas de aminoácidos y de los dominios C2H2-ZNFm conservados correspondientes a las proteínas MTF-1 (UNIPROT: Q14872) y SP1 (UNIPROT: P08047) de *H. sapiens*, Zap1 (UNIPROT:P47043) de *S. cerevisiae* y Zif268 (UNIPROT:P08046) de *Mus musculus*, estas secuencias fueron seleccionadas debido a su participación en mecanismos de regulación mediados por metales pesados. Las secuencias se utilizaron para buscar homólogos en la base de datos TrichDB y NCBI mostrando un 30 % de identidad y un valor de E significativo, para el número de acceso TVAG\_458980 correspondiente a la proteína dedos de zinc putativa in TrichDB. La secuencia del gen se nombró como *tvznf1* (Genbank: EAY11826.1.). El gen *tvznf1* tuvo un tamaño de 831 pb y codifica para una proteína de 276 aa (TvZNF1) con peso molecular teórico de 32.19866 kDa y un punto isoelectrico (PI) 8.06. El gen *tvznf1* se encuentra en el genoma de referencia G3 de *T. vaginalis* en el conting DS113312 (Figura 15. Panel A).

En el conting DS113312 se encontraron tres marcos abiertos de lectura (ORFs). El primero, TVAG\_458970 situado en la posición 95732 a 96310 corriente arriba al loci TVAG\_458980 (*tvznf1*). El segundo TVAG\_458980 se encontró en la posición 98.138 a 98.968 y el TVAG\_458990 que codifica a la proteína putativa de Golgi IMH1 situado corriente abajo de TVAG\_458980 en la posición de 101.203 a 103.920. TVAG\_458970 y TVAG\_458990 tienen el inicio de la transcripción en la cadena negativa, mientras que TVAG\_458980 lo tiene en cadena positiva (Figura 15, panel A).

A continuación, para corroborar la predicción de los motivos C2H2-ZNFm en la secuencia de aminoácidos de TvZNF1, se consultaron las bases de datos de dominios *integrated interPro Domains database (InterPro)* y *Conserved domains databases (CCD)* del NCBI. Estos análisis mostraron una predicción de ocho posibles C2H2-ZNFm en TvZNF1 identificados en los residuos de las posiciones 11–34 (ZNFm1), 40–62 (ZNFm2), 78–101 (ZNFm3), 107–130 (ZNFm4), 138–161 (ZNFm5), 165–187 (ZNFm6), 197–222 (ZNFm7) y 228–252 (ZNFm8) y el valor de score de predicción fueron: 10.492,12.237, 9.619, 11.759, 10.097, 12.196, 13.422 y 11.5311 respectivamente.

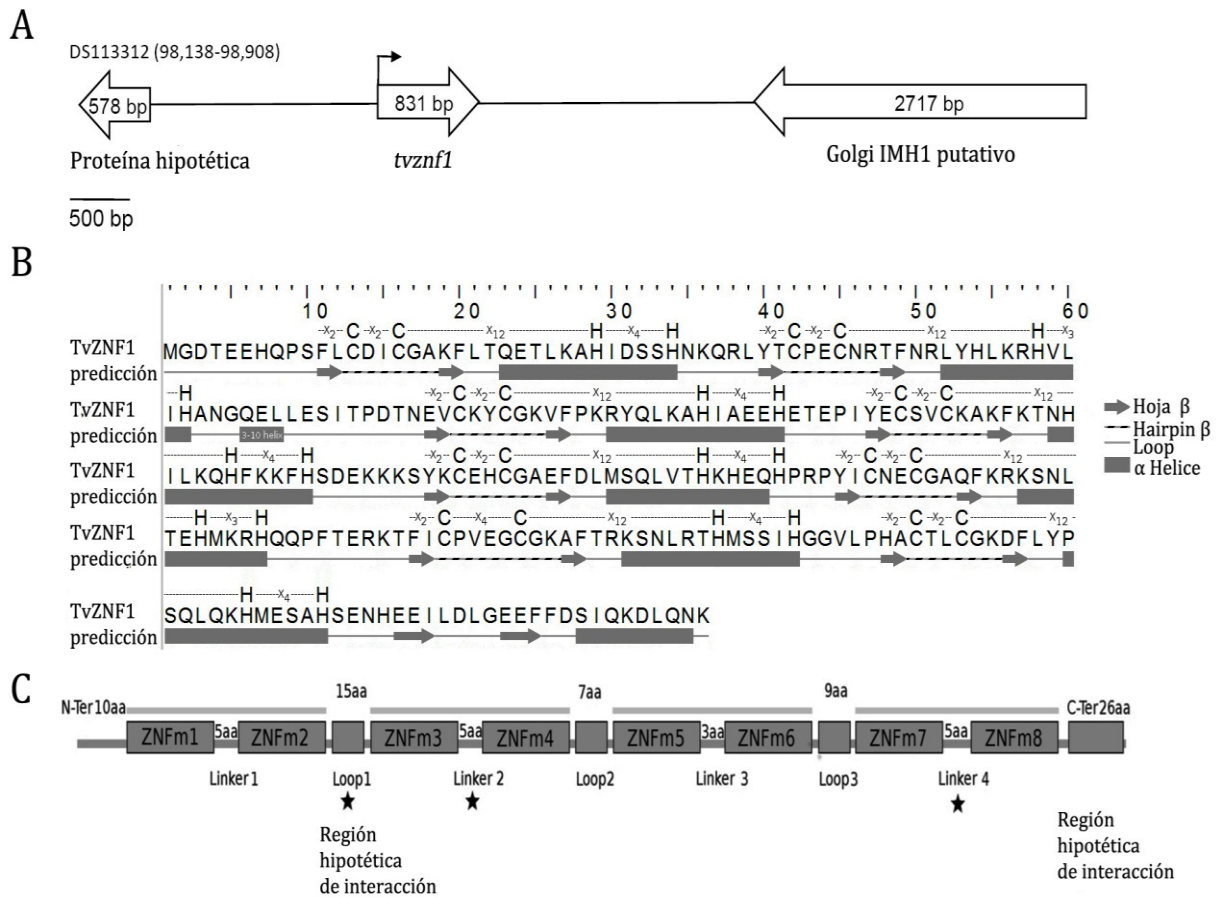
Todos los C2H2-ZNFm de la secuencia peptídica coinciden con el motivo de firma canónica  $X_2CX_{2-4}CX_{12}HX_{2-6}H$  (Figura 15, panel B). La predicción de estructura secundaria de la cadena de aminoácidos de TvZNF1 mostró una predicción no óptima para los C2H2-ZNFm, por lo cual se realizó el análisis de 11 predicciones estructurales de modelos individuales generados en tres bloques, como resultado se predijo que los C2H2-ZNFm de TvZNF1 mantienen una estructura secundaria canónica  $\beta$ - harping  $\beta$ - $\alpha$  hélix, excepto por los C2H2-ZNFm3 y 6, lo cuales mostraron pérdida estructural de las hebras  $\beta$ .

Los puentes disulfuro entre cisteínas de TvZNF1 no fueron identificados y una relajación de las Histidinas implicadas en la interacción con  $Zn^{2+}$  fue identificada en todos los motivos. Estos resultados fueron esperados debido a que la generación de los modelos fue en ausencia del catión.

En la región carboxilo terminal de TvZNF1 se identificó la predicción de un posible motivo de tipo  $\beta$ - harping  $\beta$ - $\alpha$  hélix de 25 aminoácidos que mostró las dos hebras  $\beta$  en las posiciones 256-EEI-258,263-EEF-265 y una  $\alpha$ -hélice corta de 8 residuos (SIQKDLQN) en las posiciones 268-275. Este potencial motivo estructural no cumple con las características de un C2H2-ZNFm canónico al carecer de las dos Cys iniciales de unión a  $Zn^{2+}$  las cuales están remplazadas por Asp (260) y Glu (263), lo cual posiblemente lo haga ser catalogado como un motivo específico en proteínas tipo C2H2-ZNFm de *T. vaginalis*. Sin embargo, si esta región del C-terminal de la secuencia de TvZNF1 es un motivo estructural real y funcional, es aún desconocido.

TvZNF1 presentó ocho C2H2-ZNFm conservados con 4 “asas” cortas como enlazadores (asas cortas conocidas como “Linker”) (3-5 residuos) que conectan los diferentes C2H2-ZNFm y se presentan tres “loops” de un tamaño medio (7-15 residuos) debido a que esta región es no plegada. Los residuos Lisina (Lys) y Arginina (Arg) en los enlazadores de muchos motivos C2H2-ZNFm se ponen en contacto con la cadena principal del DNA. Los enlazadores dos y cuatro de TvZNF1 carecen de Lys y Arg (Figura 15 panel C). Los “loops” dos y tres contienen Lys y Arg con la excepción del “loop” uno, este separa los dos pares de C2H2 sugiriendo un posible subdominio de interacción proteína-proteína debido a que presenta 15 residuos.

Sin embargo,, no está claro si los “loops” definidos como dos y tres son enlazadores con una extensión de residuos y continúan en contacto con el DNA manteniendo su función convencional. La aparente organización de TvZNF1 muestra un grupo de 4 pares de motivos C2H2-ZNFm (Figura 15 panel C). Los 25 residuos del C-terminales en un pequeño subdominio con función desconocida, pero probablemente se trate de un segundo sub-dominio posiblemente de interacción proteína-proteína o un posible dominio de transactivación.



**Figura 15. Análisis *in silico* de TvZNF1.** A) Localización de *tvznf1* en el genoma del aislado de referencia G3, *tvznf1* con número de acceso TVAG\_458980 con una región codificante de 831 pb. A 1828 pb corriente arriba de *tvznf1* se encuentra a TVAG\_458970, con un gen de 578 pb que codifica a una proteína hipotética y a 2253 pb corriente debajo de *tvznf1* se encuentra TVAG\_458990 con un gen de 2717 pb que codifican a una proteína putativa Golgi IMH1. B) Predicción de 8 C2H2-ZNFm de zinc tipo C2H2 desde la base de datos ScanProsite distribuidos en la secuencia de aminoácidos de TvZNF1 C) Alineamiento de las secuencias de los dominios predichos de TvZNF1 y los valores de confianza (Score), también se muestran los aminoácidos conservados con la firma general de un dedo de zinc clásico  $X_2CX_{2-4}C_{12}XHX_{2-6}H$ .

#### 24.7. Comparación de motivos C2H2- ZNFm de TvZNF1 y MTF-1.

Las proteínas TvZNF1 y MTF-1 se unen a la misma firma MRE; sin embargo, esta firma de 9-10 nucleótidos es reconocida por tres motivos C2H2-ZNFm por MTF-1. Esta proteína contiene seis C2H2-ZNFm, pero se sabe que une al MRE con los dominios ZNFm 2, 3 y 4 que constituyen el núcleo del dominio de unión al DNA de la firma de esta proteína, los otros dominios se sugiere que son parte del dominio de transactivación. Las secuencias de los motivos ZNFm 2, 3 y 4 se seleccionaron y se llevó a cabo una comparación con segmentos equivalentes de la secuencia de aminoácidos de TvZNF1. Los segmentos seleccionados de TvZNF1 para los alineamientos fueron los motivos ZNFm1 a 3, ZNFm2 a 4, ZNFm3 a 5, ZNFm4 a 6, ZNFm5 a 7 y ZNFm6 a 8. Las proteínas TvZNF1 y MTF-1 conservaron residuos en todos los motivos ZNFm correspondientes a la clase canónica C2H2-ZNFm. Además se encontraron posiciones adicionales conservadas relacionadas con una función estructural de este tipo específico del dominio clásico C2H2-ZNFm, sin embargo, se encontraron pocos residuos conservados con respecto a la unión de DNA entre TvZNF1 y MTF-1 (Figura 16). La firma de función estructural adicional para motivo C2H2-ZNFm fue [**F / Y / H**] -XC-X2-4-C-X3- [**F / Y**] -X5-L-X2-H-X2-5-H, los residuos en negrita tienen funciones estructurales implicados en el plegamiento de los dominios C2H2-ZNFm. Las posiciones de los residuos se compararon y se determinó la región específica de unión al DNA (posiciones -1, 2, 3 y 6) (Figura 16), entre cada motivo C2H2-ZNFm se encontró que no hay conservación de los residuos en las posiciones específicas que se consideran como relevantes en el reconocimiento del DNA. Una segunda estrategia para dilucidar si los triples ZNFm de TvZNF1 son responsable de la unión a MRE, fue la búsqueda del patrón de secuencia en los motivos C2H2-ZNFm2, 3 y 4 de MTF-1. Nos encontramos que el primero y el segundo motivo C2H2-ZNFm de MTF-1 comparten residuos similares para unirse al DNA y el tercer motivo muestra diferencias. En el caso de TvZNF1 tienen una situación similar para los motivos C2H2-ZNFm6, 7 y 8, pero no se observó conservación de los residuos con MTF-1. El ZNFm4 de MTF-1 y el ZNFm8 de TvZNF1 mostraron un 50% de identidad en las posiciones 2 (Ser) y 6 (Lys) de residuos del sub sitio MRE2s 5'-tgc-3'.

Los otros dos motivos ZNFm de TvZNF1 y MTF-1 no comparten identidades relacionadas con el reconocimiento del DNA. Por otra parte, se encontró que C2H2-ZNFm2 y 3 de MTF-1 tienen su propia firma de residuos así como C2H2-ZNFm6 y C2H2-

ZNFm7 de TvZNF1 y posiblemente reconocen a la región 3' de los MRE2s (5-acacgc-3) (Figura 16).

Estos resultados sugieren que TvZNF1 se une a los sub sitios de la firma del MRE mediante el uso de tres motivos de zinc, de forma equivalente como se ha descrito para MTF-1, pero con una solución funcional diferente de residuos. TvZNF1 presenta una combinación particular de residuos para unirse específicamente a la firma MRE (Figura 16).

Solamente los C2H2-ZNFm2, 6 y 7 de TvZNF1 mostraron identidad (entre 42, 42 y 48 % respectivamente) y similitud (53, 53 y 54 % respectivamente) y con secuencias de estructuras de PDB con un valores E significativos (0.001, 0.004 y 0.001 respectivamente) (Figura 17), otros C2H2-ZNFm aparecen con valor de E no significativo y regiones pequeñas fragmentadas con bajo valor de identidad y semejanza. Los análisis de los residuos determinantes de la unión específica al DNA mostraron que los residuos (-1, 2, 3 y 6) fueron conservados y fueron residuos con alta similitud (Figura 17). Principalmente los dominios C2H2-ZNFm interaccionan con DNA mediante firmas de residuos específicos, lo que permite que estos dominios sean responsables de darle la capacidad a las proteínas de involucrarse en procesos de regulación de la transcripción, como es el caso de la "proteína de dedo de Zinc 473 / Zfp-100" (PDB: 2EOX), la cual tiene evidencia de la participación de dichos procesos. Estos datos sugieren que TvZNF1 podría ser un modulador de la transcripción bajo estimulación de  $Zn^{2+}$  y podría ser parte de un complejo transcripcional en respuesta a las crecientes concentraciones de cationes. La similitud de cualquier motivo C2H2-ZNFm de TvZNF1 con respecto a otras proteínas como Zfp-100 sugieren la participación en un mecanismo diferente de control transcripcional y la participación de proteínas no homólogas al complejo transcripcional de MTF-1.

#### **24.8. Análisis de traza evolutiva (ET) de TvZNF1.**

El análisis de traza evolutiva (ET) se realizó a través de un alineamiento de 54 secuencias de aminoácidos utilizando las regiones conservadas de proteínas de dedos de zinc de *H. sapiens*, *M. musculus*, *X. laevis*, *S. cerevisiae* y *T. vaginalis*. Para la construcción del árbol filogenético se utilizaron 8 particiones se seleccionó este número considerando los 8 C2H2-ZNFm entendiendo que cada partición forma una secuencia consenso (P01 a P08), correspondientes al valor de identidad de la partición (PICs) con valores que

oscilan entre 0 a 88%, el árbol filogenético se obtuvo con raíz (Figura 18). Las particiones P01 a P03 mostraron relación con un clúster de secuencias muy diferentes, lo cual representa un grupo de secuencias con alta variabilidad correspondientes a *M. musculus*, *H. sapiens*, *X. laevis* y *T. vaginalis* (Figura 18). Para la partición P01 (0% PIC) se construyó con un solo clúster, mostrando el nodo más divergente para la secuencias de C2H2-ZNFm1, 4 y 8 de *T. vaginalis*, lo que sugiere que estas fueron las secuencias más diferentes.

Las particiones mostraron un valor de corte (“cutoff” en %) que revela la identidad entre las secuencias analizadas. La partición P02 (12% PIC) se construyó a partir de dos clusters, mostrando la relación de las secuencias de C2H2-ZNFm de organismos como: *M. musculus*, *H. sapiens* y C2H2-ZNFm2, 6 y 7 de *T. vaginalis* (Figura 18). Para la partición P03 (25% PIC) se construyó con seis clusters con ramas largas, lo cual sugiere que estas secuencias de zinc tienen alta variabilidad y baja identidad en la secuencia de aminoácidos. De forma interesante, la partición P03 mostró tres nodos importantes; el primero relacionó las secuencias de *S. cerevisiae* y *M. musculus* como un grupo lejano. Un segundo nodo mostró la divergencia de las secuencias de organismos como: *M. musculus* y *H. sapiens*. Un tercer nodo mostró divergencias de C2H2-ZNFm6 y 7 de *T. vaginalis*, lo que sugiere que los C2H2-ZNFm de *T. vaginalis* comparados con C2H2-ZNFm de otros organismos tiene baja identidad de secuencia (Figura 18). A medida que el valor de PIC aumenta y los clusters son más específicos, como se observa en la partición P04 conformada de 8 clusters, P05 y P06 cada uno con 5 clusters, P07 con 7 clusters y P08 con 4 clusters (25 a 88% PIC), mostrando ramas cortas agrupando secuencias de un solo organismo como: *M. musculus* y *H. sapiens*, lo cual muestra la divergencia de las secuencias desde un origen común (Figura 18). En las particiones P04 a P08 no se observó relación de las secuencias de ZNFm de TvZNF1 con ningún grupo de las secuencias analizadas y obtenidas desde la base de datos del PDB (Figura 18).

#### **24.9. El análisis de residuos traza en C2H2-ZNFms de TvZNF1**

El alineamiento de ET mostró la posición de residuos traza en las ocho secuencias analizadas y los C2H2-ZNFm donde los aminoácidos C8, C15, H26 y H31 se conservaron en todas las particiones en todas las secuencias analizadas, posiblemente debido a sus implicaciones a nivel de estructura y la interacción con el catión  $Zn^{2+}$ . La partición P04 conservó residuos de clase específica en la posición 2 y 28.

La partición P05 conservó los residuos 17 y 23. En la partición P07 se conservaron residuos de clase específica en las posiciones 4, 6, 10 y 15.

Solamente la partición P08 tenía residuos de clase específica en las posiciones 7, 8, 9, 11, 14, 16 y 25. Las particiones P01 a P03 presentan principalmente aminoácidos de la clase neutra en las posiciones 1 a 40 (Figura 19). Finalmente, la región del alineamiento de la posición 32 a 40 en todas las particiones mostró aminoácidos de clase neutra que sugiere que a nivel estructural o funcional no se relaciona con estos motivos. Estos resultados son importantes debido a que un mismo aminoácido podría estar localizado en diferentes posiciones espaciales como oculto o expuesto en la secuencia de proteínas, lo cual podría tener implicaciones funcionales, por ejemplo principalmente los aminoácidos expuestos podrían interaccionar con moléculas de DNA, RNA o proteína o en el caso de los residuos ocultos principalmente se asocian a sitios catalíticos o implicaciones estructurales (Tabla 9). De manera interesante, se encontró que la posición C8 fue oculta para C2H2-ZNFm1 y 8, y fue expuesto para C2H2-ZNFm2, 3, 4, 5, 6 y 7. En el caso de C15 se observó cómo oculto en C2H2-ZNFm1, 3 y 7, mientras que se encontraron como expuesto en C2H2-ZNFm2, 4, 5, 6 y 8. La posición 17 se encontró como residuo oculto en los C2H2-ZNFm1, 2, 4, 5, 6, 7 y 8, pero se encontró como residuo expuesto en C2H2-ZNFm3. El aminoácido 23 se encontró como oculto en todos los motivos C2H2-ZNFm de TvZNF1. En el caso del aminoácido 26 se encontró como oculto para C2H2-ZNFm2, 3, 4, 5, 6 y 7, mientras que se observaron cómo expuestos en C2H2-ZNFm1 y 8. Finalmente, el residuo 31 se encontro oculto para el C2H2-ZNFm2, mientras que se encontraron como expuestos en C2H2-ZNFm 1, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 (Figura 19). Estos resultados son significativos debido a que el mismo residuo podría estar situado en diferentes posiciones espaciales en los motivos C2H2-ZNFm de TvZNF1.

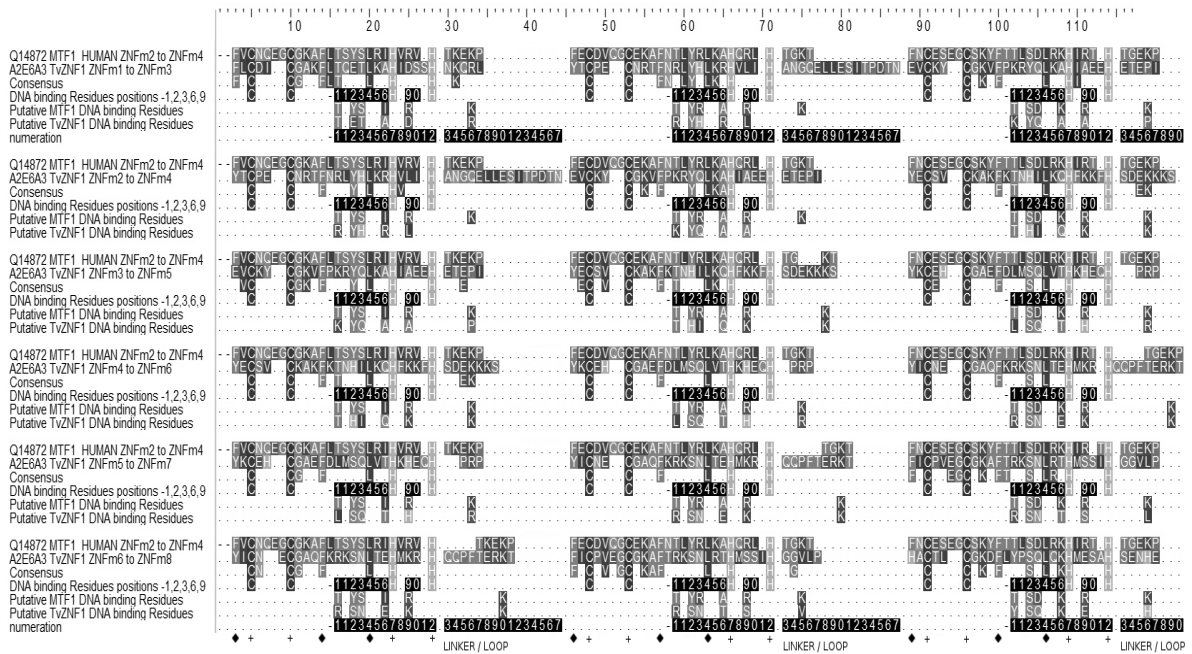
## **25. Mapeo de los aminoácidos traza en estructura de los dominios de TvZNF1**

Como parte del análisis de ET y con la disponibilidad de los modelos predichos de cada uno de los ocho dominios de TvZNF1 se permitió el mapeo de los residuos traza (2 cisteínas y 2 histidinas) fueron localizadas en uno de los dominios. Los aminoácidos traza para la partición P01 con 0% de PIC fueron encontrados para los dominios C2H2-ZNFm1, 3, 4, 5 y 8 (Figura 20, panel A, D, E, F y H), la localización de residuos traza en la partición P02 con 12% de PIC se localizaron en el dominio C2H2-ZNFm2 (Figura 20, panel B), para la partición P03 con 25% de PIC mostró los residuos en C2H2-ZNFm6

(Figura 20, panel C) y para la partición P04 mostró residuos en 38% de PIC para C2H2-ZNFm7 (Figura 20, panel G). Es interesante observar que estas particiones analizadas de los ocho dominios de TvZNF1 mostraron residuos traza a dos cisteínas (C) y dos de histidina (H), localizadas en la estructura predicha de cada uno de los dominios de TvZNF1, y se localizaron como ocultos conservados señalados en color azul (Figura 20) y como externos conservados de color verde (Figura 20), en el caso de los residuos de la clase específica no se encontraron ningún residuo en los ocho C2H2-ZNFm de TvZNF1 (Figura 20).

### **25.1. Modelaje teórico de TvZNF1**

La secuencia de aminoácidos de TvZNF1 se dividió en tres partes (Bloque: A, B, C) (Figura 21), lo cual corresponden a: Bloque A C2H2-ZNFm1-3, bloque B: C2H2-ZNFm3-5 y bloque C: C2H2-ZNFm5-8. Asimismo se modelaron individualmente a los 8 dedos de zinc predichos en TvZNF1. Los modelos obtenidos muestran valores de confianza significativos (Tabla 10),

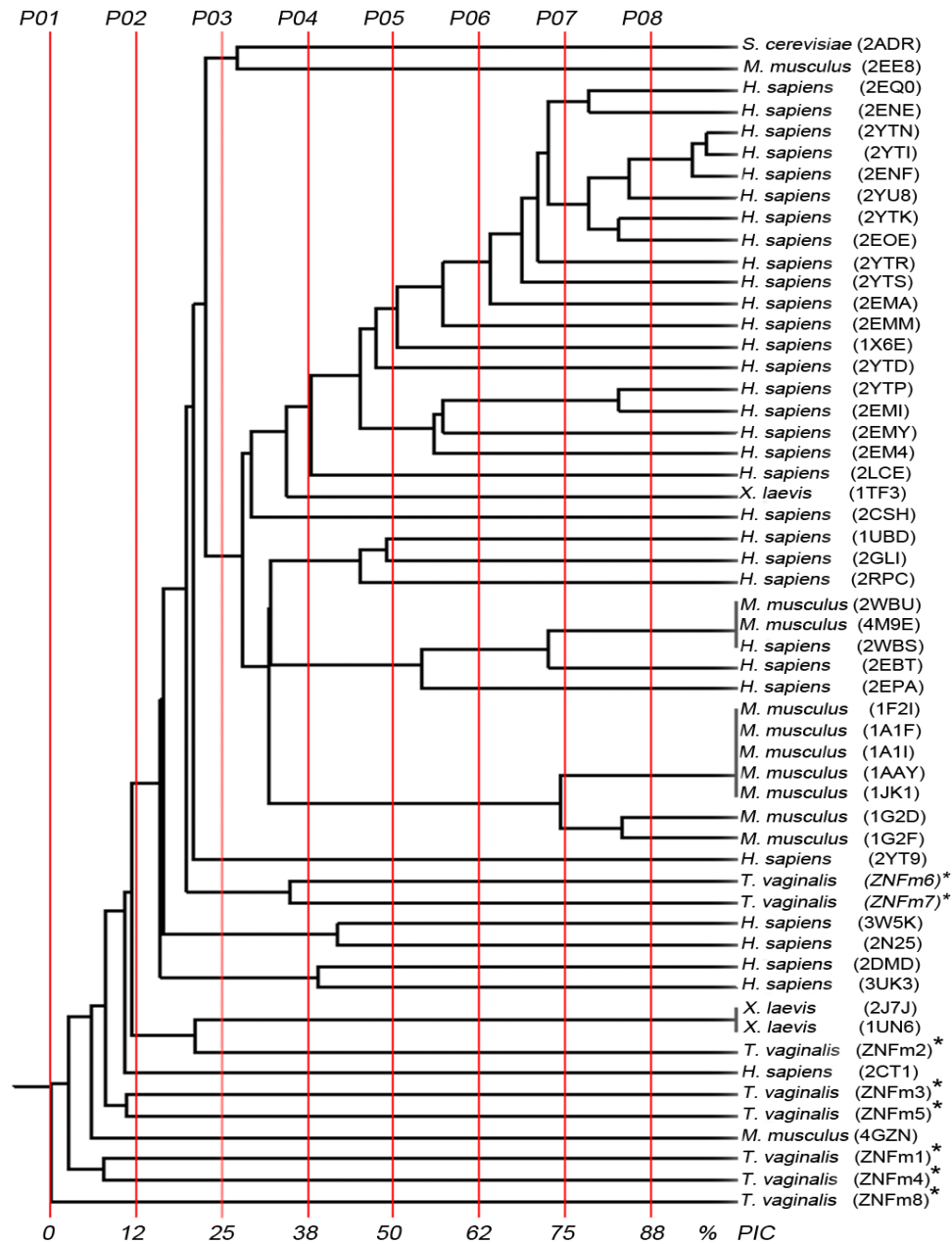


**Figura 16. C2H2-ZNFm (C2H2-ZNFm2 a C2H2-ZNFm4) como núcleo de unión a DNA de MTF-1 comparado con las combinaciones de tres C2H2-ZNFm de TvZNF1.** La numeración representa las posiciones relevantes de los residuos determinantes de la unión específica al DNA (-1, 2, 3, 6). La posición adicional (8 a 27) cubre los residuos de la primer Histidina a los enlazadores o bucles posteriores, algunas posiciones pueden tener contacto con el fosfato del DNA. Normalmente Arginina y Lisina son residuos poco conservados y están presentes ♦: como residuos estructurales conservados. +: Cisteína es un residuo que une a Zn<sup>2+</sup>.

		10	20	30	
TvZNFm2					ID: 42%
2EOX Q8WTR7 ZNFm 3	YTCPECNRTFNRLYLKRVLIHANGQE				Similitud : 53%
Consensus 1	YCNCEGKAFTRIFHLTRHQKIHTRKSG				E-value: 0.001
	Y.C.EC.+F.RhaHL.RH.IH.....				
	.....-1.23..6..9				
TvZNFm6					ID: 42%
2EMA Q96SE7 ZNFm 3	YICNECGAQFKRKSNLTEHMKRHQQPFT				Similitud : 57
Consensus 2A	YKNECGKVFSRNSQLSQHQKIHTGEKP				E-value: 0.004
	Y.CNECG..F.R.S!Lo!H.+H.....				
	.....-1.23..6..9				
TvZNFm6					ID: 50%
2EOO Q9Y2L8 ZNFm 4	YICNECGAQFKRKSNLTEHMKRHQQPFT				Similitud : 60%
Consensus 2B	YGCNECGKNFGRHSHLIEHLKRHFREKS				E-value: 8e-06
	Y.CNECG..F.R.S.L.EHh+RH....o				
	.....-1.23..6..9				
TvZNFm7					ID: 48%
2YTO Q5JVG2 ZNFm 15	FICPVEGCGKAFTRKSNLRTHMSSIHGGLVP				Similitud : 54%
Consensus 3A	YKCS.D.CGKAFTRKSLHIHQQS.HTGERH				E-value: 0.001
	a.C..+.CGKAFTRKS.L..H..S.H.G...				
	.....-1.23..6..9				
TvZNFm7					ID: 58%
2EMF Q5JVG2 ZNFm 5	FICPVEGCGKAFTRKSNLRTHMSSIHGGLVP				E-value: 0.003
Consensus 3B	FECT.E.CGKAFTRKSTLSMHQK.IHTGEKP				
	F.C..E.CGKAFTRKS.L..H...IH.G..P				
	.....-1.23..6..9				
TvZNFm7					ID: 58%
2EMG Q5JVG2 ZNFm 8	FICPVEGCGKAFTRKSNLRTHMSSIHGGLVP				Similitud : 61%
Consensus 3C	FICS.E.CGKVFTHKTNLIHQK.IHTGERP				E-value: 0.004
	FIC..E.CGKhFT.KSNL..H...IH.G..P				
	.....-1.23..6..9				

**Figura 17. Secuencias de estructuras similares a los motivos C2H2-ZNFm de TvZNF1.**

Análisis comparativo de los motivos ZNFm 2, 6 y 7 de TvZNF1. El motivo ZNFm7 mostró la más alta identidad (58%) con tres ZNFm de la "proteína de dedo de Zinc 484" (UNIPROT: Q5JVG2, PDB: 2YTO, 2EMF y 2EMG). No se observó conservación de los residuos 1,2,3 y 6 de unión a DNA. Principalmente las posiciones -1, 2, 3 y 6. La nomenclatura refiere a: + residuo positivo, - residuo negativo, *a* residuo aromático, *h* residuo hidrofóbico, *o* Ser/Thr y residuo neutral. Los valores de E, identidad y similitud de secuencia fueron obtenidos desde BLASTp son mostrados.



**Figura 18. Árbol filogenético de traza evolutiva de C2H2-ZNFm cristalizados y C2H2-ZNFm de TvZNF1.** El dendograma muestra la relación filogenética entre los diferentes motivos C2H2-ZNFm de especies como: *H. sapiens*, *M. musculus*, *S. cerevisiae*, *X. laevis* y *T. vaginalis*. Los motivos C2H2-ZNFm de TvZNF1 son marcados con un asterisco (\*) Las líneas rojas verticales representan el valor de PIC (0-88%).



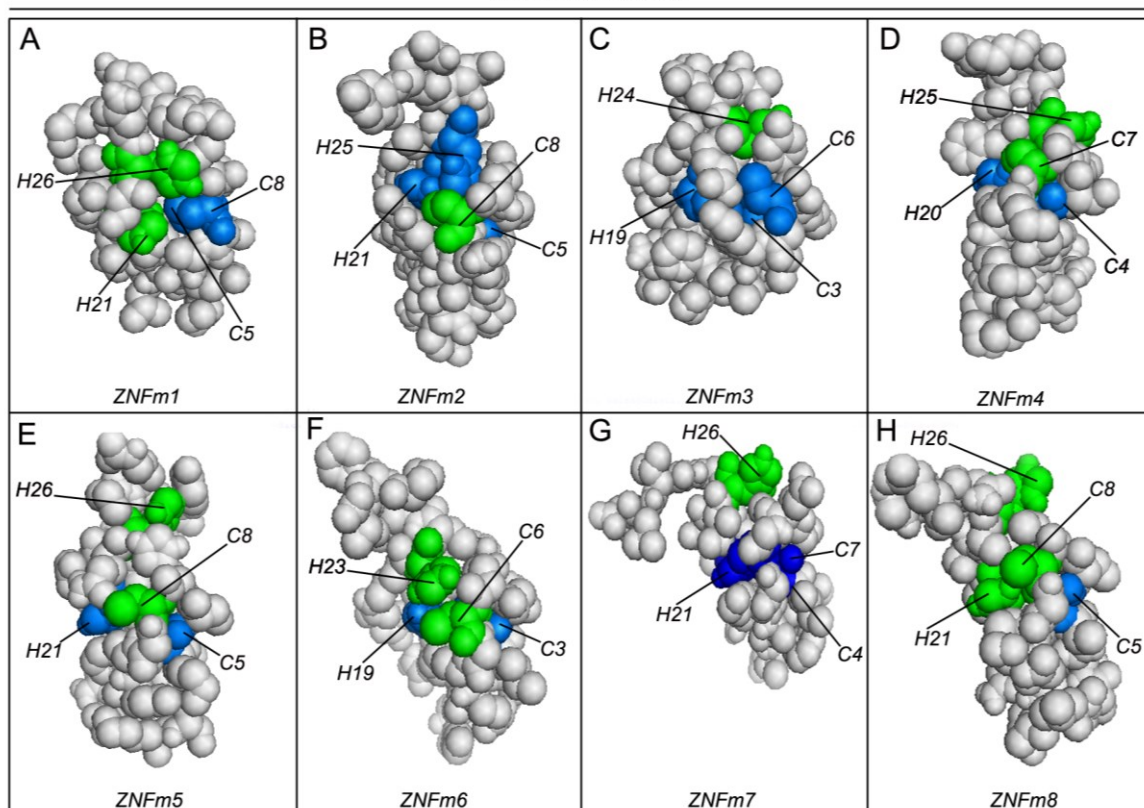
**Tabla 9. Residuos expuestos u ocultos en los motivos C2H2-ZNFm de TvZNF1.**  
 Análisis de los residuos traza (C8, C15, F17, L23, H26 y H31) localizados en cada uno de los ocho dedos de zinc de TvZNF1 en posición oculto o expuesto.

<b>Motivo</b>	<b>C8</b>	<b>C15</b>	<b>F17</b>	<b>L23</b>	<b>H26</b>	<b>H31</b>
<b>ZNFm1</b>	Oculto	Oculto	Oculto	Oculto	Expuesto	Expuesto
<b>ZNFm2</b>	Expuesto	Expuesto	Oculto	Oculto	Oculto	Oculto
<b>ZNFm3</b>	Expuesto	Oculto	Expuesto	Oculto	Oculto	Expuesto
<b>ZNFm4</b>	Expuesto	Expuesto	Oculto	Oculto	Oculto	Expuesto
<b>ZNFm5</b>	Expuesto	Expuesto	Oculto	Oculto	Oculto	Expuesto
<b>ZNFm6</b>	Expuesto	Expuesto	Oculto	Oculto	Oculto	Expuesto
<b>ZNFm7</b>	Expuesto	Oculto	Oculto	Oculto	Oculto	Expuesto
<b>ZNFm8</b>	Oculto	Expuesto	Oculto	Oculto	Expuesto	Expuesto

**Tabla 10. Valores de significativos de modelajes de los C2H2-ZNFm de TvZNF1.** Los modelos de la estructura de TvZNF1 comprenden tres bloques A, B y C, además del modelado individual de cada dominio C2H2-ZNFm de TvZNF1. La tabla resume los diferentes valores de confianza para cada uno de los modelos “C- score”, “TM-score”, “Z-score normalized” y el templado utilizado para la construcción de cada modelo son mostrados.

<b>Modelo</b>	<b>C-score</b>	<b>TM-score</b>	<b>Z-score</b>	<b>PDB Templado</b>
<b>Block A</b>	-1.35	0.55	1.92	5egbA
<b>Block B</b>	-1.55	0.52	5.03	2kmkA
<b>Block C</b>	1.27	0.89	5.86	2i13A
<b>ZNFm1</b>	-0.58	0.74	1.60	2d9hA
<b>ZNFm2</b>	0.04	0.72	5.30	1x6eA
<b>ZNFm3</b>	-0.56	0.64	3.00	1x6eA
<b>ZNFm4</b>	-0.56	0.64	5.30	5znfA
<b>ZNFm5</b>	-0.55	0.64	4.21	1x6eA
<b>ZNFm6</b>	-0.00	0.71	4.32	1x6eA
<b>ZNFm7</b>	0.06	0.70	3.91	1va1A
<b>ZNFm8</b>	-0.15	0.69	4.19	1x6eA

*Trichomonas vaginalis*



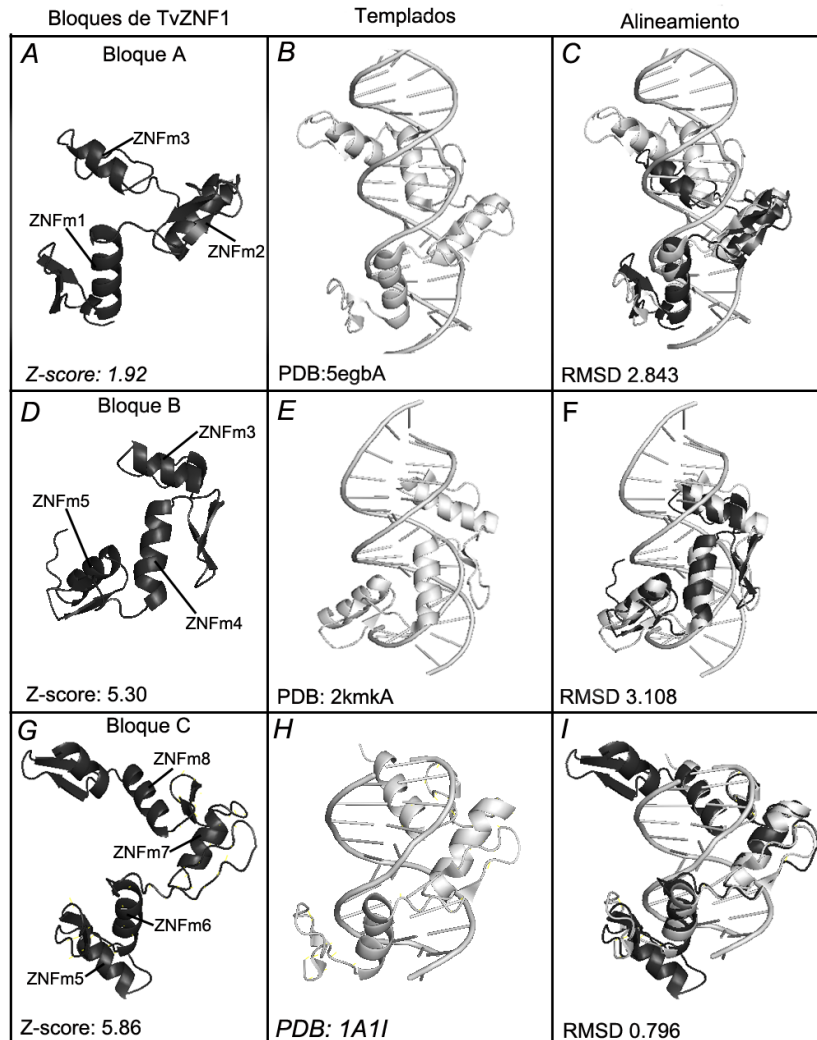
**Figura 20. Mapeo de los aminoácidos traza en los dominios C2H2-ZNFm de TvZNF1.** Análisis de la posición de los aminoácidos traza a nivel de estructura 3D, a partir del modelaje de los dominios C2H2-ZNFm de TvZNF1 localizando como aminoácidos traza son clasificadas en cada uno en los dominios modelados en posición oculto (azul) o expuesto (verde) son mostrados.

## 25.2. Análisis estructural de TvZNF1 y residuos predichos de unión a DNA.

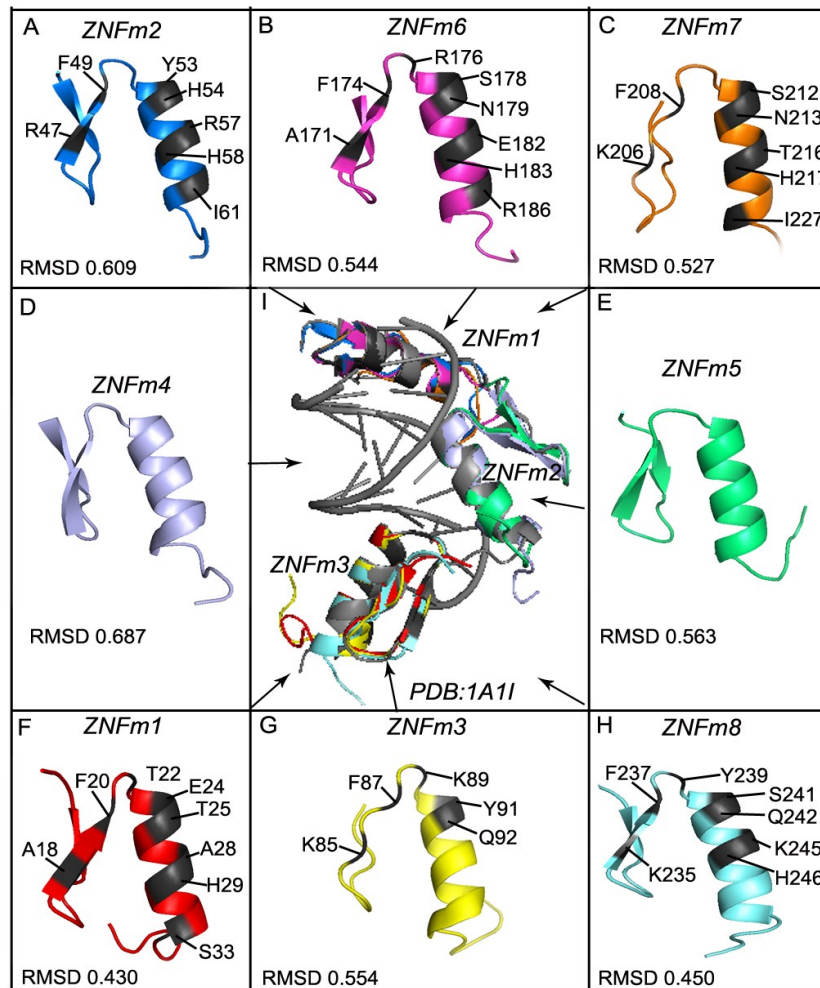
Para determinar si TvZNF1 conserva el arreglo estructural y tiene los aminoácidos involucrados para la interacción con DNA en sus dominios, se realizó el análisis utilizando los modelajes obtenidos por homología con templados C2H2-ZNFm ya cristalizados, los cuales mostraron valores significativos de calidad estructural basados en los valores de corte del servidor I-TASSER (Figura 21). Entonces, se utilizó el modelo correspondiente al bloque A que involucra a los dominios C2H2-ZNFm1, 2 and 3 de TvZNF1 (Figure 21, panel A) y se alinearon con PRD1-BF1-RIZ1 con su nombre en inglés “homologous domain-containing 9” (PRMD9) (PDB: 5EGB), el cual es una proteína multidominio dedos de zinc, que reconoce el motivo-1 en la secuencia 5'-ACCACGTGGCTAGGGAGGCCT-3' en DNA genómico de humano (Figure 21 panel B) (201). El análisis comparativo de estructuras mediante superposición mostró un RMSD of 2.843 comparando 101 residuos de TvZNF1 contra 111 residuos of PRMD9 (Figure 21 panel C). Un análisis similar se realizó con la estructura modelada correspondiente al bloque B constituido por los dominios C2H2-ZNFm3, 4 and 5 (Figure 21, panel D) alineado con Gfi-1 (PDB: 2MKM), que es una proteína dedos de zinc con función de represor transcripcional que reconoce la secuencia 5'-CATAAATCACTGCCTA-3' de *R. norvegicus* (Figure 21, panel E), el superposición estructural mostró un RMSD de 3.108 comparando 87 residuos de TvZNF1 y 81 residuos de la proteína cristalizada Gfi-1 (Figure 3F). Finalmente, se realizó el análisis con el modelo del bloque C que agrupa los dominios ZNFm5-8 (Figure 21, panel G) este fue alineado con RADR Zif-268, una variante de Zif-268 unida a la secuencia de DNA 5'-TGTGCCACGC-3' (PDB: 1A1I) (Figure 21, panel H), el superposición de las estructuras mostró un RMSD de 0.796 de 137 residuos alineados de TvZNF1 con 85 residuos de RADR Zif-268 (Figure 21, panel I). Estos resultados mostraron que TvZNF1 es estructuralmente conservado como otros multidominio dedos de zinc cristalizados interaccionando con DNA. Entonces, los modelos individuales predichos de la estructura de cada dominio C2H2-ZNFm de TvZNF1 se compararon con la estructura de la variante RADR de Zif-268, esto debido al valor significativo de RMSD (0.796) encontrado cuando se alineó el bloque C. La estructura de la variante RADR de Zif-268 está conformada por tres dominios en tándem que interaccionan con DNA.

Los motivos C2H2-ZNFm1, 3 y 8 de TvZNF1 se encontraron conservados con el dominio C2H2-ZNFm1 de la estructura de Zif-268 (Figura 22), en cuanto a los dominios C2H2-ZNFm4 y 5 de TvZNF1 se alinearon con C2H2-ZNFm2 de Zif-268 (Figura 22). Finalmente los dominios C2H2-ZNFm2, 6 y 7 se alinearon con C2H2-ZNFm3 de Zif-268 (Figura 22). Además los resultados mostraron algunas diferencias entre cada uno de los dominios de TvZNF1. La información obtenida desde la base de datos CDD (202) mostró que cada uno de los dominios de TvZNF1 tiene residuos de unión a DNA: para ZNFm1 (A18, F20, T22, E24, T25, A28, H29, S33), ZNFm2 (R47, F49, Y53, H54, R57, H58, I61), ZNFm3 (K85, F87, K89, Y91, Q92), ZNFm6 (A72, F74, R76, S78, N79, E82, H83, R86), ZNFm7 (K206, F208, S212, N213, T216, H217, I221) y ZNFm8 (K235, F237, Y239, S241, Q242, K245, H246), Para cada uno de los dominios es indicado el nombre y la posición de los aminoácidos predichos de interacción con DNA (Figura 22). De manera interesante, el dominio ZNFm4 y 5 no mostraron residuos predichos para la interacción con DNA. Los dominios ZNFm1, 2, 3, 6, 7 y 8 tiene ocho residuos predichos que posiblemente interactúan con el DNA, en cada dominio fue indicado el nombre y la posición de cada aminoácidos que posiblemente interaccione con DNA (Figure 22 paneles A-H).

El análisis comparativo de la estructura de los ocho dominios ZNFm con Zif-268, mostró la organización de los dominios de TvZNF1 alrededor de la secuencia de DNA 5'-TGTGCCACGC-3'. Además, los residuos predichos de interacción con DNA se localizaron en la región expuesta en la hélice y la hoja  $\beta$  los residuos cercanos al DNA (Figura 22). Estos datos sugieren que TvZNF1 podría funcionar como una proteína que reconoce DNA mediante motivos C2H2-ZNFm.



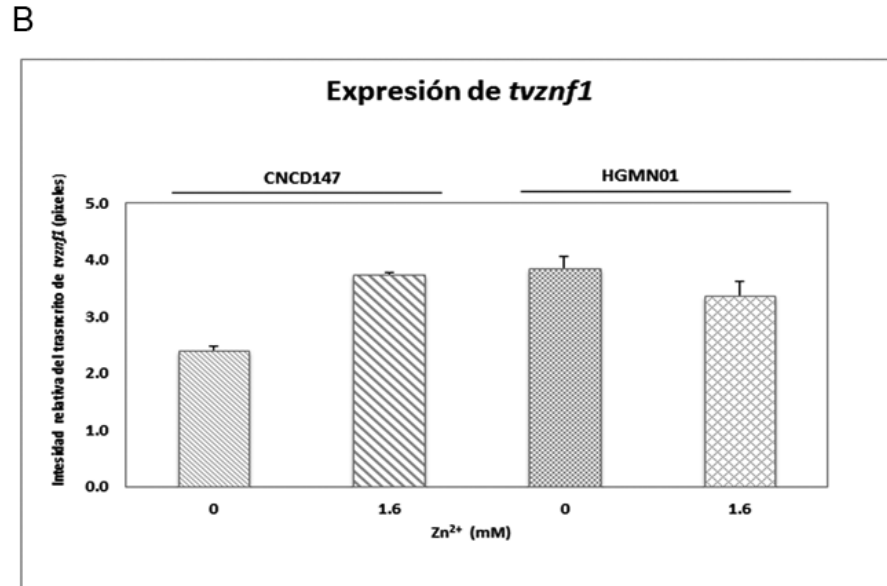
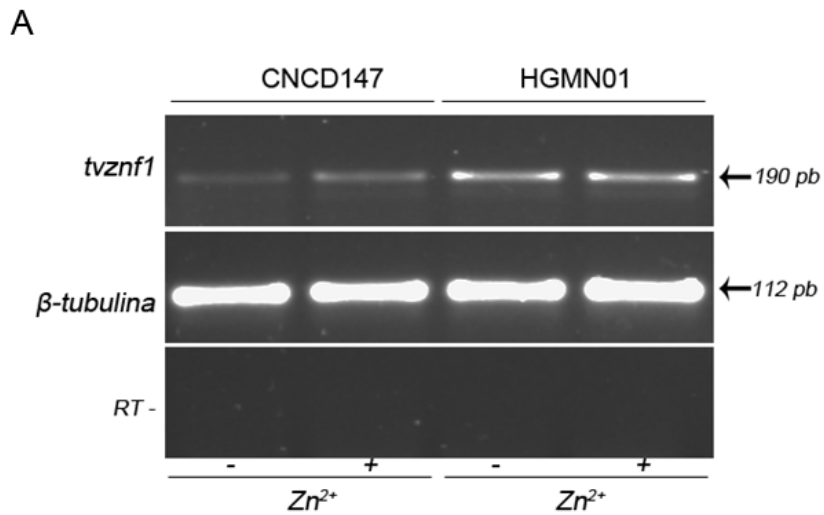
**Figura 21. Comparación del modelo de TvZNF1 con estructuras cristalizadas.** A) Bloque A que muestra el C2H2-ZNFm1 a C2H2-ZNFm3 de TvZNF1, la estructura mostró el valor de confianza de Z- score: 1,92. B) PDB: 5egbA, que mostró los múltiples dominios C2H2-ZNFm con unión al DNA (5'-ACCACGTGGCTAGGGAGGCCT-3') .C) Alineamiento entre el bloque A y PDB: 2egbA. D) El bloque B contiene el C2H2-ZNFm3 a C2H2-ZNFm5. E) PDB: 2kmkA mostró tres dominios de C2H2-ZNFs unidos a DNA (5'-CATAAATCACTGCCTA-3'). F) Alineamiento entre el bloque B y PDB: 2kmkA. G) El bloque C se muestra el C2H2-ZNFm5 a ZNFm8. H) El PDB: 1a1iA está conformado por tres C2H2-ZNFm unidos a DNA (5'-TGTGCCACGC-3') I) La alineación entre el bloque C y el PDB: 1a1iA. El valor del Z-score se refiere a la calidad del modelo > 1 sugieren una mayor calidad estructural.



**Figura 22. Residuos predichos de unión a DNA en los dominios C2H2-ZNFm de TvZNF1.** Estructura individual predicha y el análisis de C2H2-ZNFs de TvZNF1 alineado con el PDB1a1iA señalando los aminoácidos de unión a DNA en cada uno de los dominios C2H2-ZNFs. A-C) C2H2-ZNFm2, C2H2-ZNFm6 y C2H2-ZNFm7 mostraron los residuos de unión a DNA y se alinearon con C2H2-ZNFm1 de PDB: 1a1iA. B) C2H2-ZNFm4 Y C2H2-ZNFm5 no mostraron los residuos potenciales de unión a DNA y se alinearon con C2H2-ZNFm2 de PDB: 1a1iA. G-I) C2H2-ZNFm1, C2H2-ZNFm3 y C2H2-ZNFm8 mostraron los residuos predichos de DNA y se alinearon con ZNFm3 de PDB: 1a1iA. Los residuos predichos por unión a DNA se marcaron con el color negro y la señal de residuo y la posición del dominio. E) Superposición de los ocho C2H2-ZNFm de TvZNF1 alineados con PDB: 1a1iA. Los valores de la estructura comparativa (RMSD) se muestran en cada dominio modelado de TvZNF1. Las flechas señalan la localización de la superposición de cada C2H2-ZNFm de TvZNF1 con ZNFm1, 2 y 3 de PDB: 1a1iA.

### **25.3. Expresión de *tvznf1* en *T. vaginalis***

El nivel de expresión del RNA mensajero de *tvznf1* se evaluó en dos aislados (CNCD147 y HGMN01) de *T. vaginalis*. RT-PCR semicuantitativa se realizó utilizando oligonucleótidos específicos para un fragmento de 190 pb corresponden a *tvznf1* (Figura 23, panel A). El gen de  $\beta$ -*tubulina* (112 pb) se utilizó como control de carga. El análisis densitométrico se realizó para los amplificados del gen de *tvznf1* y del gen de  $\beta$ -*tubulina* se utilizó para normalizar los datos (Figura 23, panel B).



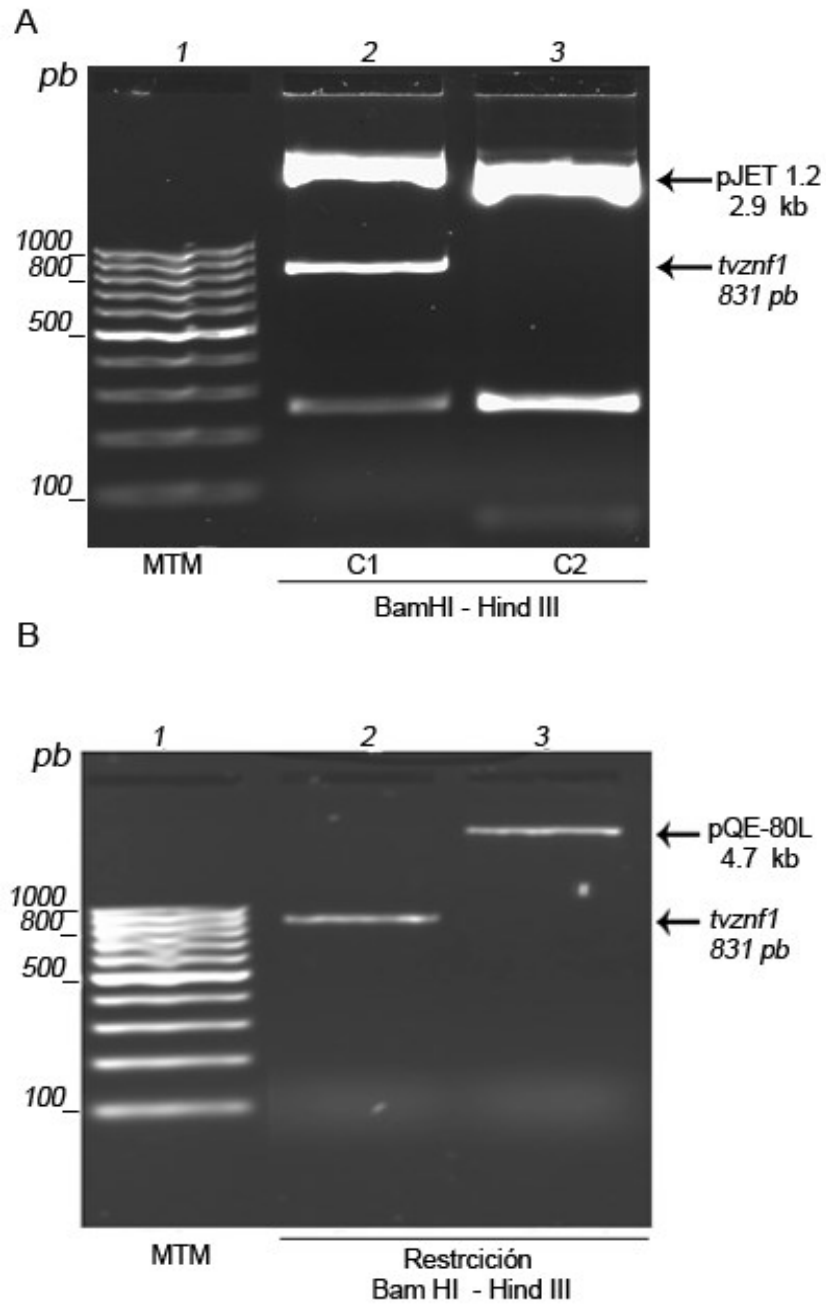
**Figura 23. Perfil de expresión de RNAm de *tvznf1* desde los aislados CNC147 y HGMN01 en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$ .** A) RT-PCR semicuantitativa del nivel de expresión de *tvznf1*, se muestra el amplificado (190 pb) para los aislados CNC147 y HGMN01 en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$  respectivamente. El amplificado de 112 pb corresponde a  $\beta$ -*tubulina* (control de carga). B) El análisis densitométrico de las bandas de los amplificadores de *tvznf1* se muestran en la gráfica.

#### 25.4. Clonación expresión y purificación de TvZNF1 recombinante (TvZNF1r)

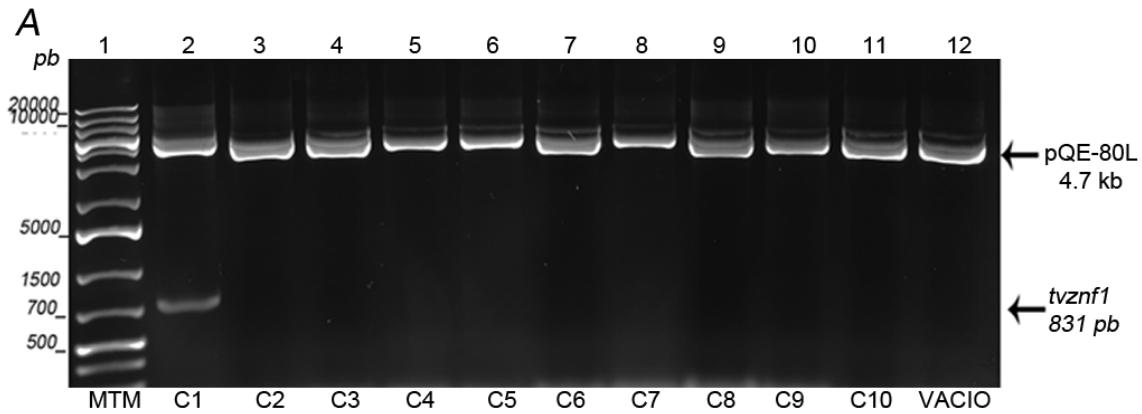
Para determinar la capacidad de unión de TvZNF1 al DNA, primero se llevó a cabo la clonación, expresión y purificación de la proteína recombinante TvZNF1 (TvZNF1r). El amplificado de 831 pb de *tvznf1* se clonó en el vector pJET.1.2 /BLUNT extremos romos y se obtuvo el DNAp para ser restringido con enzimas de restricción BamHI y HindIII mostrando la liberación del inserto (831 pb) (Figura 24, panel A).

El inserto liberado y el vector de expresión pQE-80L restringido (Figura 24, panel B), fueron purificados y se utilizaron para la reacción de sub clonación para obtener la construcción pQE-80L-*tvznf1* (Figura 24, panel A), la cual se secuenció obteniendo el gen completo de 831 pb de *tvznf1*, la secuencia de aminoácidos deducida corresponde a 276 residuos que son totalmente conservados con el genoma de referencia del aislado G3 (Figura 25, panel B).

La clona positiva (pQE-80L-*tvznf1*) se utilizó para inducir a la proteína TvZNF1r de ~33 kDa (Figura 25, carril 2). Para purificar a TvZNF1r, primero se realizó la prueba de solubilidad obteniendo la fracción soluble (Figura 25, carril 3) y la fracción insoluble (Figura 26, carril 4), después a partir de la fracción soluble se realizaron las tres purificaciones cromatográficas (Ni-NTA, IEX e HIC) (Figura 26, carriles 5, 6 y 7) con un rendimiento de ~ 0,5 mg / L con 90 % de pureza aproximadamente. Para corroborar la expresión de la proteína recombinante se realizó un Western Blot con un anticuerpo anti histidinas (Figura 26, carril 8) mostrando una banda aproximadamente de 33 kDa.



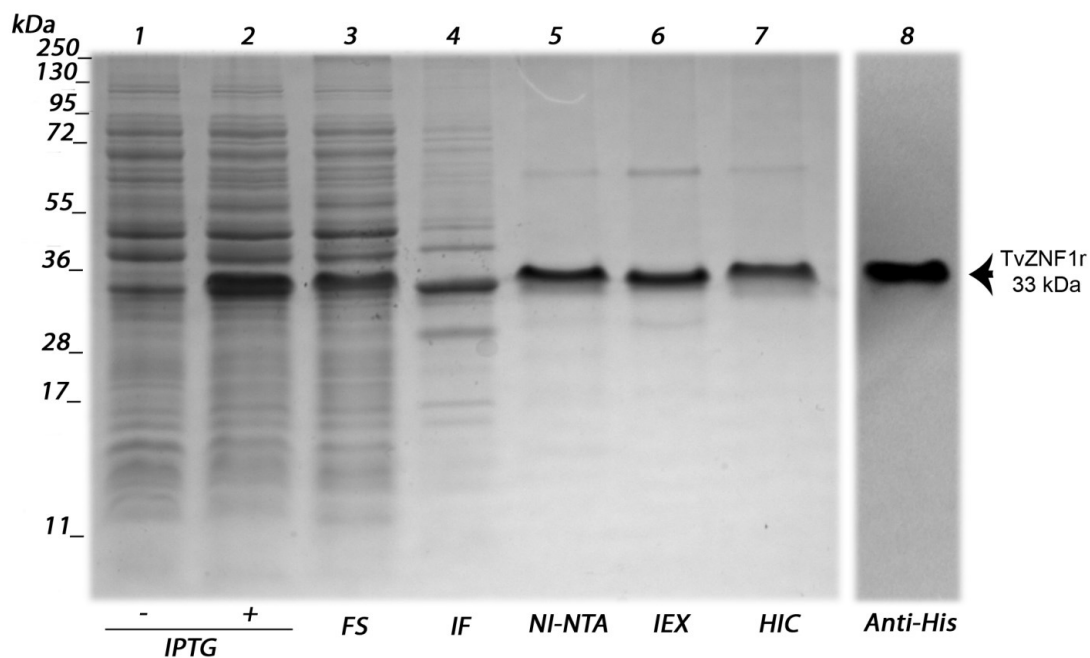
**Figura 24. Clonación de *tvznf1* completo.** A) El amplificado de 831 pb de *tvznf1* se purificó y se clonó en el vector de almacenamiento pJET 1.2/BLUNT, el fragmento se liberó con BamHI y HindIII como enzimas de restricción (Carriles 2 y 3). B) El DNAp de la clona positiva pJET1.2/BLUNT-*tvznf1* (carril 2), y el vector de expresión pQE-80L (carril 3).



**B**

rTvZNF1	HHHHHGS	DTEEHQPSFL	CDICGAKFLT	QETLKAHIDS	SHNKQRLYTC
TVAG_458980	.....MG	DTEEHQPSFL	CDICGAKFLT	QETLKAHIDS	SHNKQRLYTC
rTvZNF1	PECNRTFNRL	YHLKRHVLIH	ANGQELLES	TPDTNEVCKY	CGKVFPKRYQ
TVAG_458980	PECNRTFNRL	YHLKRHVLIH	ANGQELLES	TPDTNEVCKY	CGKVFPKRYQ
rTvZNF1	LKAHIAEEHE	TEPIYECSVC	KAKFKTNHIL	KQHFKKFHSD	EKKKSYKCEH
TVAG_458980	LKAHIAEEHE	TEPIYECSVC	KAKFKTNHIL	KQHFKKFHSD	EKKKSYKCEH
rTvZNF1	CGAEFDLMSQ	LVTHKHEQHP	RPYICNECGA	QFKRKSNLTE	HMKRHQQPFT
TVAG_458980	CGAEFDLMSQ	LVTHKHEQHP	RPYICNECGA	QFKRKSNLTE	HMKRHQQPFT
rTvZNF1	ERKTIFICPVE	GCGKAFTRKS	NLRTHMSSIH	GGVLPHACTL	CGKDFLYPSQ
TVAG_458980	ERKTIFICPVE	GCGKAFTRKS	NLRTHMSSIH	GGVLPHACTL	CGKDFLYPSQ
rTvZNF1	LQKHME	ENHEEILDG	EEFFDSIQKD	LQNK	
TVAG_458980	LQKHME	ENHEEILDG	EEFFDSIQKD	LQNK	

**Figura 25. Selección de clonas positivas para la construcción pQE-80L-*tvznf1*.** A) A partir de 10 clonas se obtuvo el DNAp y se analizaron por restricción enzimática (BamHI y HindIII), solo la clona 1 liberó el inserto en tamaño de 831 pb (Carril 2) y 4.9 Kb de pQE-80L linealizado y vacío como control (carril 12). B) la clona 1 positiva para la construcción pQE-80L-*tvznf1* fue secuenciada y se obtuvo la secuencia deducida de aminoácidos y se alineo con la secuencia de referencia del aislado secuenciado G3, se muestra la secuencia totalmente conservada la secuencia.



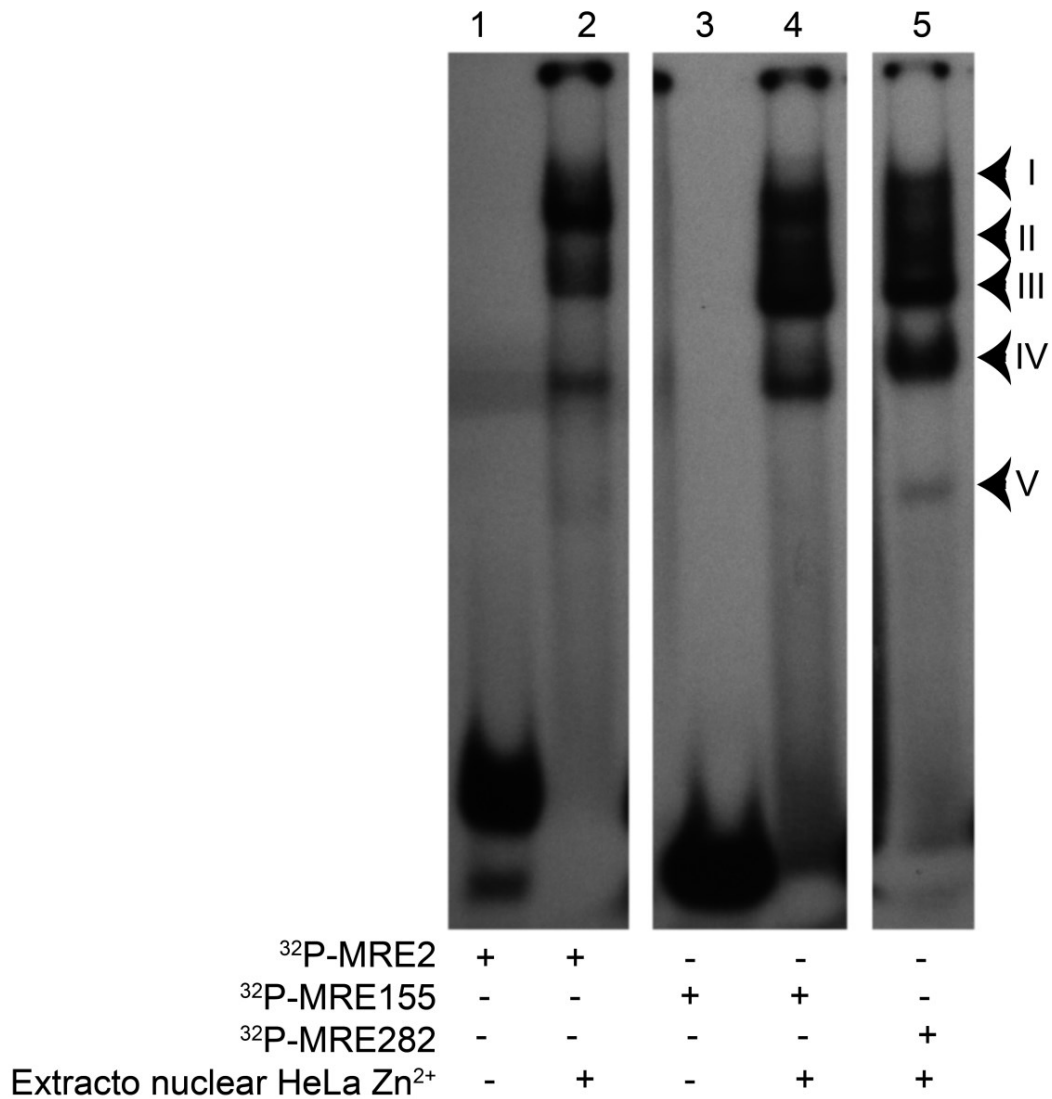
**Figura 26. Proceso de expresión y purificación de TvZNF1r.** El gel SDS-PAGE al 12% resume el proceso de obtención de TvZNF1r: la muestra de no inducido (carril 1), inducido con 1 mM de IPTG (carril 2), prueba de solubilidad fracción soluble (carril, 3), fracción insoluble (carril 4), primer paso de purificación por cromatografía de afinidad (carril 5), segundo paso de purificación por intercambio iónico (carril 6), finalmente una cromatografía hidrofóbica (carril 7), la expresión se corroboró por Western blot con anticuerpo anti-histidinas mostrando una proteína a ~33 kDa aproximadamente.

### 25.5. Reconocimiento de TvMREs localizados en la región 5' intergénica de *mp50* por proteínas de *T. vaginalis*.

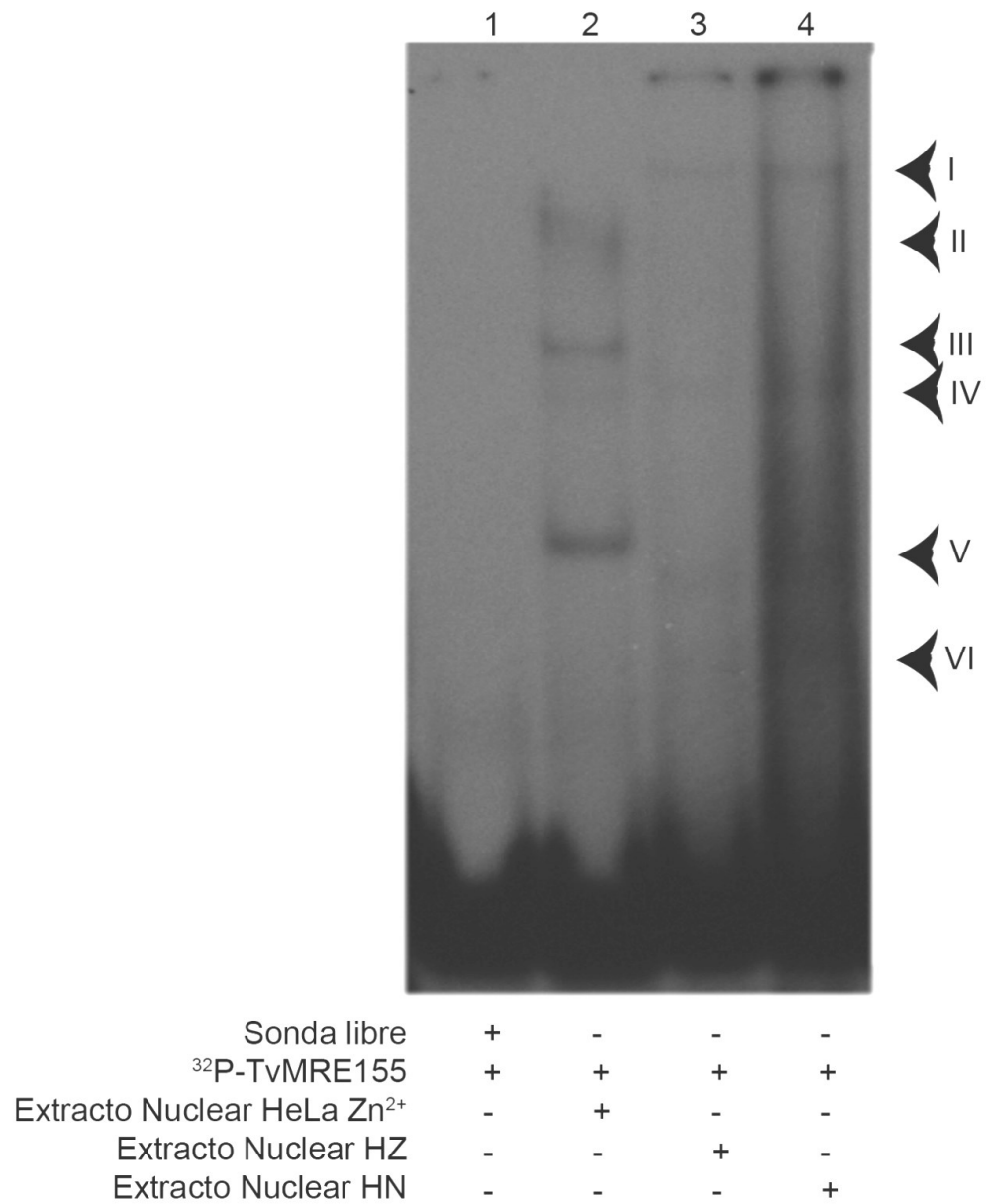
El análisis *in silico* del promotor de *mp50* determinó la existencia de elementos putativos de respuesta a metal para este gen. Para analizar esto fueron seleccionados dos TvMREs: TvMRE155 y TvMRE282, los cuales se probaron experimentalmente con extractos de proteínas de parásitos del aislado HGMN01 crecidos en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$ , como control se utilizaron extractos de células HeLa crecidas en presencia de  $Zn^{2+}$ . Por medio de experimentos de retardo de movilidad electroforética (EMSA), se mostró que la sonda TvMRE155 y 282 son reconocidas por proteínas de extractos de células HeLa crecidas en presencia de  $Zn^{2+}$  mostrando 4 complejos para TvMRE155 (Figura 27, carril 4) y 5 complejos para TvMRE282 (Figura 27, carril 5). Como control se utilizó la sonda MRE2 que es reconocida por MTF-1 un factor de transcripción tipo dedos de zinc inducido por concentraciones altas de  $Zn^{2+}$  en humano obtenido desde extractos nucleares de células HeLa crecidas en presencia de 100  $\mu M$  de  $Zn^{2+}$  (Extracto nuclear de HeLa  $Zn^{2+}$ ) (Figura 27, carril 2).

La sonda TvMRE155 de *T. vaginalis* se probó con extractos nucleares de *T. vaginalis* del aislado HGMN01 en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$  (extracto nuclear HN y extracto nuclear HZ) respectivamente (Figura 28). Como control se utilizó extracto nuclear HeLa  $Zn^{2+}$ , el cual mostró tres complejos (Figura 28, carril 2). En el caso de los EMSA de TvMRE155 con extracto nuclear de *T. vaginalis* en presencia de  $Zn^{2+}$  (extracto nuclear HZ) se muestran cuatro complejos (Figura 28, carril 3) y para extracto nuclear de *T. vaginalis* en ausencia de  $Zn^{2+}$  se mostraron ocho complejos (Figura 28, carril 4). Para el elemento TvMRE282 se realizó el ensayo de EMSA con extractos nucleares de HeLa con  $Zn^{2+}$  (Extracto Hela  $Zn^{2+}$ ) mostrando la formación de un complejo, para el caso de extractos nucleares de *T. vaginalis* en presencia de  $Zn^{2+}$  (Extracto Nuclear HZ) se observaron tres complejos (Figura 29, carril 3). En el caso de TvMRE282 con extractos nucleares de *T. vaginalis* en ausencia de  $Zn^{2+}$  (Extracto Nuclear HN) se mostraron cuatro complejos (Figura 29, carril 4).

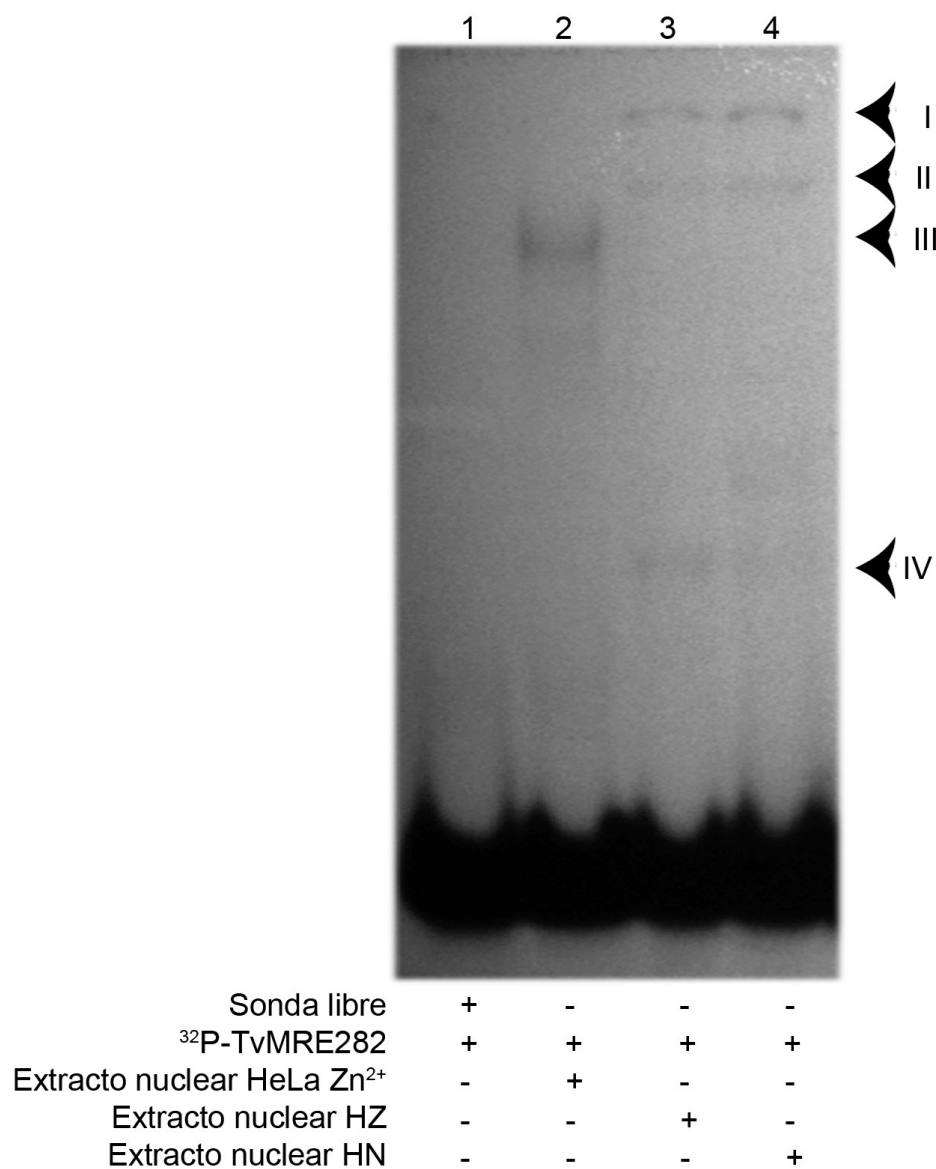
Para probar la especificidad de los complejos obtenidos con la sonda TvMRE155 se realizó un ensayo de competencia con “sonda fría” (sin marcaje) (Figura 30). Entonces el elemento TvMRE155 marcado se colocó con extracto nuclear de *T. vaginalis* en presencia de  $Zn^{2+}$  (Extracto Nuclear HZ) mostrando cuatro complejos (Figura 30, carril 2), las competencias se realizaron con 60 nM de la misma sonda (TvMRE155) donde no se observó (Figura 30, carril 3), para la competencia con TvMRE282 “fría”, se observó que los complejos disminuyeron (Figura 30, carril 4) y con la sonda MRE2 “fría” de *H. sapiens*, se mostró competencia de la sonda al mostrar disminución de la señal de los complejos (Figura 30, carril 5). Como control de unión se utilizó TvMRE155 con extractos nucleares de HeLa en presencia de  $Zn^{2+}$  (Figura 30, carril 6). La sonda libre es mostrada (Figura 30, carril 1).



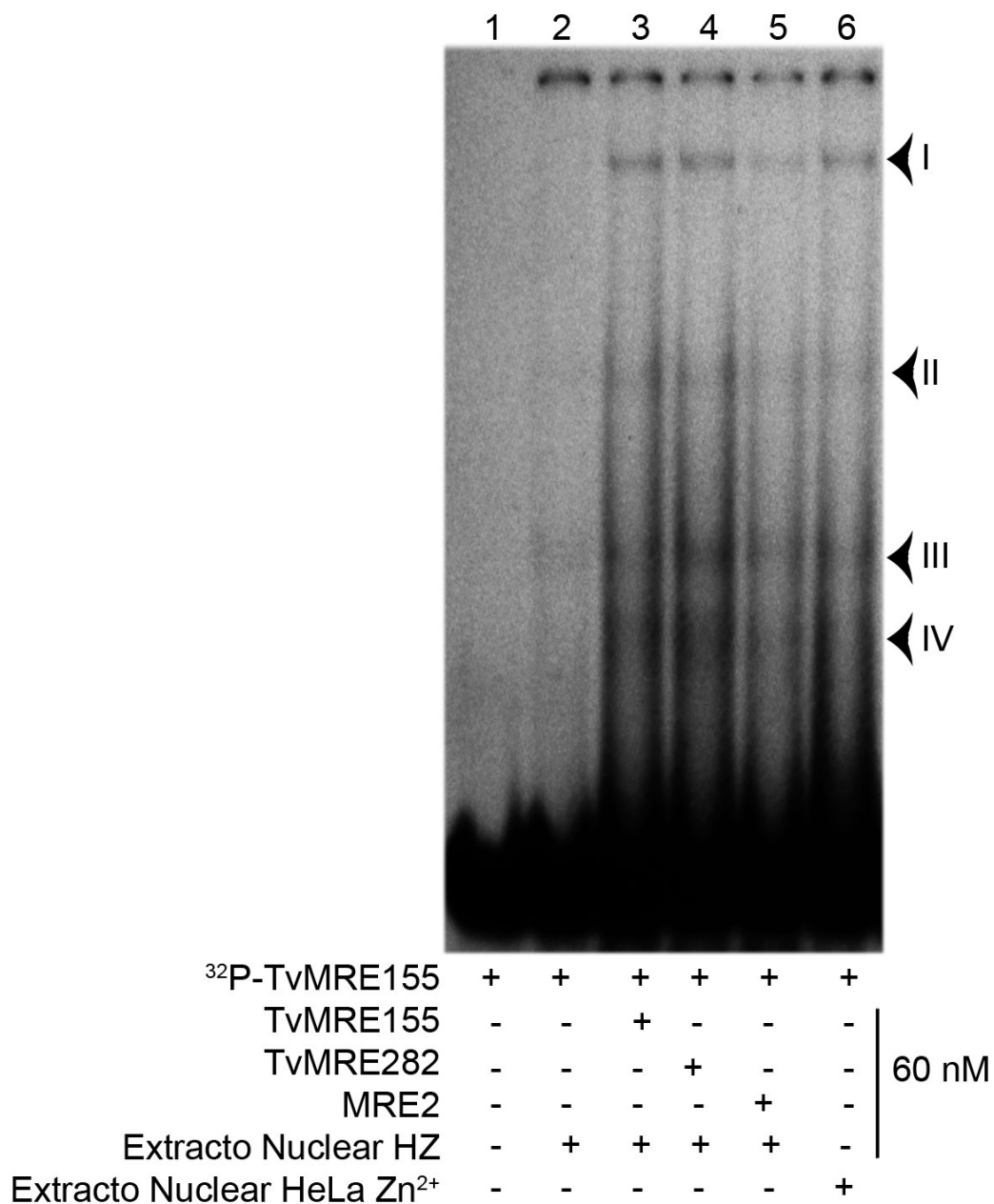
**Figura 27. Sondas TvMRE155 y TvMRE282 reconocidos por proteínas nucleares de células HeLa en presencia de Zn<sup>2+</sup>.** EMSA de extractos nucleares de HeLa crecidos en presencia de 100 μM Zn<sup>2+</sup> (E/N HeLa) con MRE2 de *H. sapiens* (carril 2), de *T. vaginalis* se utilizó TvMRE155 sonda libre (carril 3) y TvMRE155 con extractos nucleares de HeLa (carril 4) y TvMRE282 con extracto nuclear de HeLa (carril 5). Los complejos son señalados con cabeza de flecha.



**Figura 28. EMSA de TvMRE155 con extractos nucleares de *T. vaginalis* en ausencia y presencia de Zn<sup>2+</sup>.** En el ensayo de retardo se utilizó a la sonda TvMRE155 con extractos nucleares de HeLa como control (carril 2), TvMRE155 con extractos nucleares de *T. vaginalis* en presencia de Zn<sup>2+</sup> (Extracto Nuclear HZ)(carril 3) y TvMRE155 con extractos nucleares de *T. vaginalis* en ausencia del catión (Extracto Nuclear HN) (carril 4). La sonda libre es mostrada (carril 1).



**Figura 29. EMSA de TvMRE282 con extractos nucleares de *T. vaginalis* en ausencia y presencia de Zn<sup>2+</sup>.** En el ensayo de retardo se utilizó a la sonda TvMRE282 con extractos nucleares de HeLa como control (carril 2), TvMRE282 con extractos nucleares de *T. vaginalis* en presencia de Zn<sup>2+</sup> (Extracto Nuclear HZ)(carril 3) y TvMRE282 con extractos nucleares de *T. vaginalis* en ausencia del catión (Extracto Nuclear HN) (carril 4). La sonda libre es mostrada (carril 1).



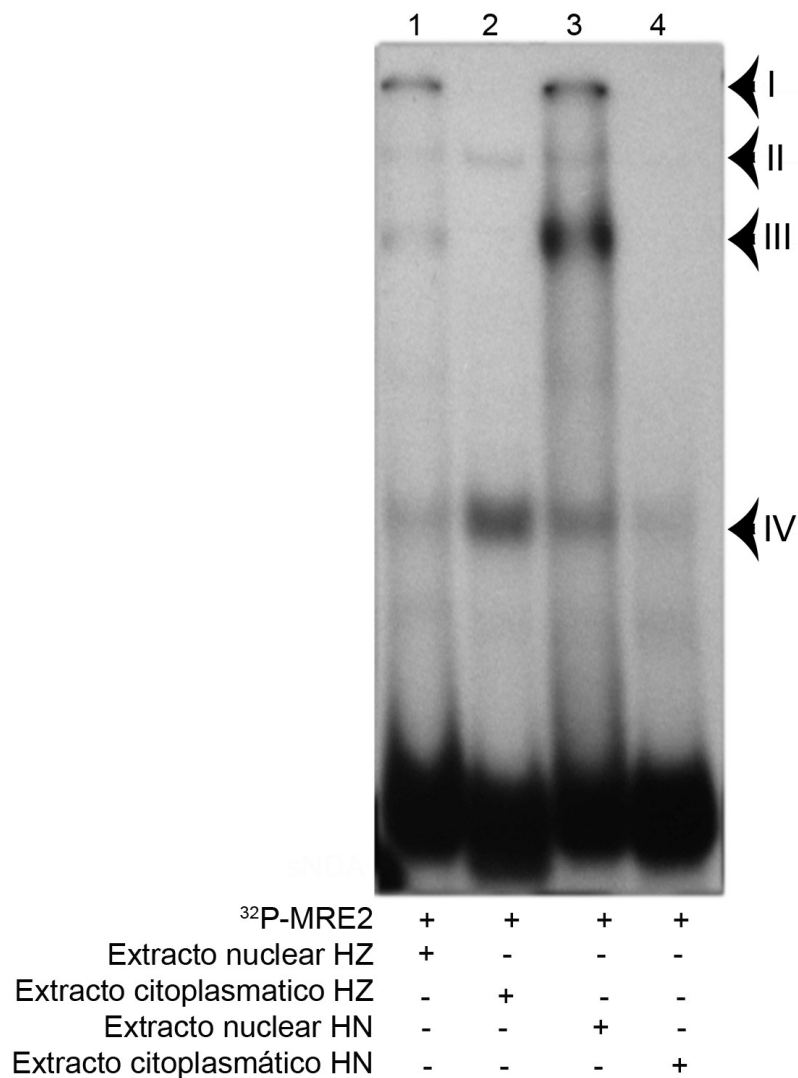
**Figura 30. Ensayo de competencias de la sonda TvMRE155.** El ensayo de EMSA se realizó con la sonda TvMRE155 y con extractos nucleares de *T. vaginalis* en presencia de Zn<sup>2+</sup> (carril 2), TvMRE155 marcada se compitió con 60 nM de sí misma como sonda “fría” (carril 3), con TvMRE282 (carril 4), con MRE2 de *H. sapiens* (carril 5); como control de unión se usó a TvMRE155 con extractos nucleares de HeLa en presencia de Zn<sup>2+</sup> (Carril 6), la sonda libre es mostrada (carril 1).

## 25.6. Análisis de la formación de complejos de proteínas nucleares y citoplasmáticas de *T. vaginalis* con TvMREs del promotor de *mp50* en presencia y ausencia de $Zn^{2+}$ .

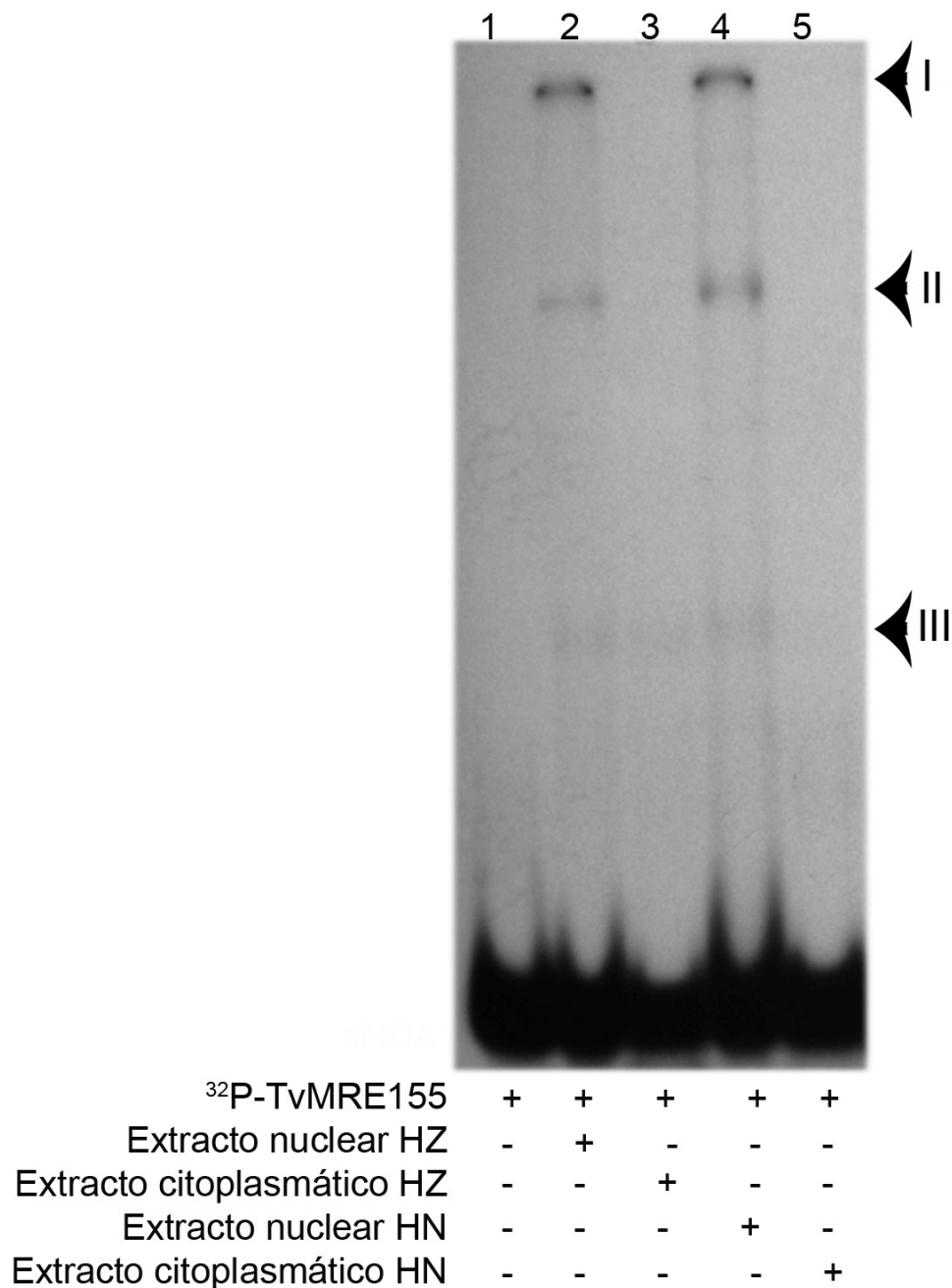
Con el objetivo de determinar si los complejos obtenidos eran específicos de proteínas nucleares o proteínas citoplasmáticas se realizó el ensayo de EMSA a partir de extractos nucleares y citoplasmáticos de *T. vaginalis* en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$  del aislado HGMN01, para comparar los complejos obtenidos con la sonda MRE2 de *H. sapiens* como control (Figura 31). Cuatro complejos se observaron con los extractos nucleares de *T. vaginalis* en ambas condiciones (Figura 31, carriles 1 y 3), en el caso de extractos citoplasmáticos de *T. vaginalis* en presencia de  $Zn^{2+}$  se observó la formación de dos complejos (Figura 31, carril 2) y en ausencia de  $Zn^{2+}$  se observó un complejo de bajo peso solamente (Figura 31, carril 4). Un ensayo similar se realizó utilizando la sonda TvMRE155 de *T. vaginalis* con extractos nucleares de *T. vaginalis* en presencia de  $Zn^{2+}$ , se observaron tres complejos (Figura 32 carril 2), en el caso de extractos nucleares en ausencia de  $Zn^{2+}$  de *T. vaginalis*, se obtuvieron tres complejos (Figura 32, carril 4), cuando se utilizaron extractos citoplasmáticos en presencia de  $Zn^{2+}$  de *T. vaginalis* se mostró un complejo de bajo peso (Figura 32, carril 3) y finalmente para extractos citoplasmático en ausencia de  $Zn^{2+}$  de *T. vaginalis* no se observó ningún complejo (Figura 32, carril 5). Para continuar con el análisis se utilizó un mismo diseño experimental con la sonda TvMRE282, esta se probó con extractos nucleares de *T. vaginalis* en presencia de  $Zn^{2+}$  y se observaron tres complejos (Figura 33, carril 2), en ausencia de  $Zn^{2+}$  de *T. vaginalis*, se mostraron tres complejos (Figura 33, carril 4). Para el caso de extractos citoplasmáticos en presencia de  $Zn^{2+}$  de *T. vaginalis* se observó un complejo de bajo peso (Figura 33, carril 3), para extractos citoplasmáticos en ausencia de  $Zn^{2+}$  de *T. vaginalis*, no se observó ningún complejo (Figura 33, carril 5).

## 25.7. Complejos de TvMRE155 con extractos nucleares de *T. vaginalis* en presencia de $Zn^{2+}$ son catión dependientes.

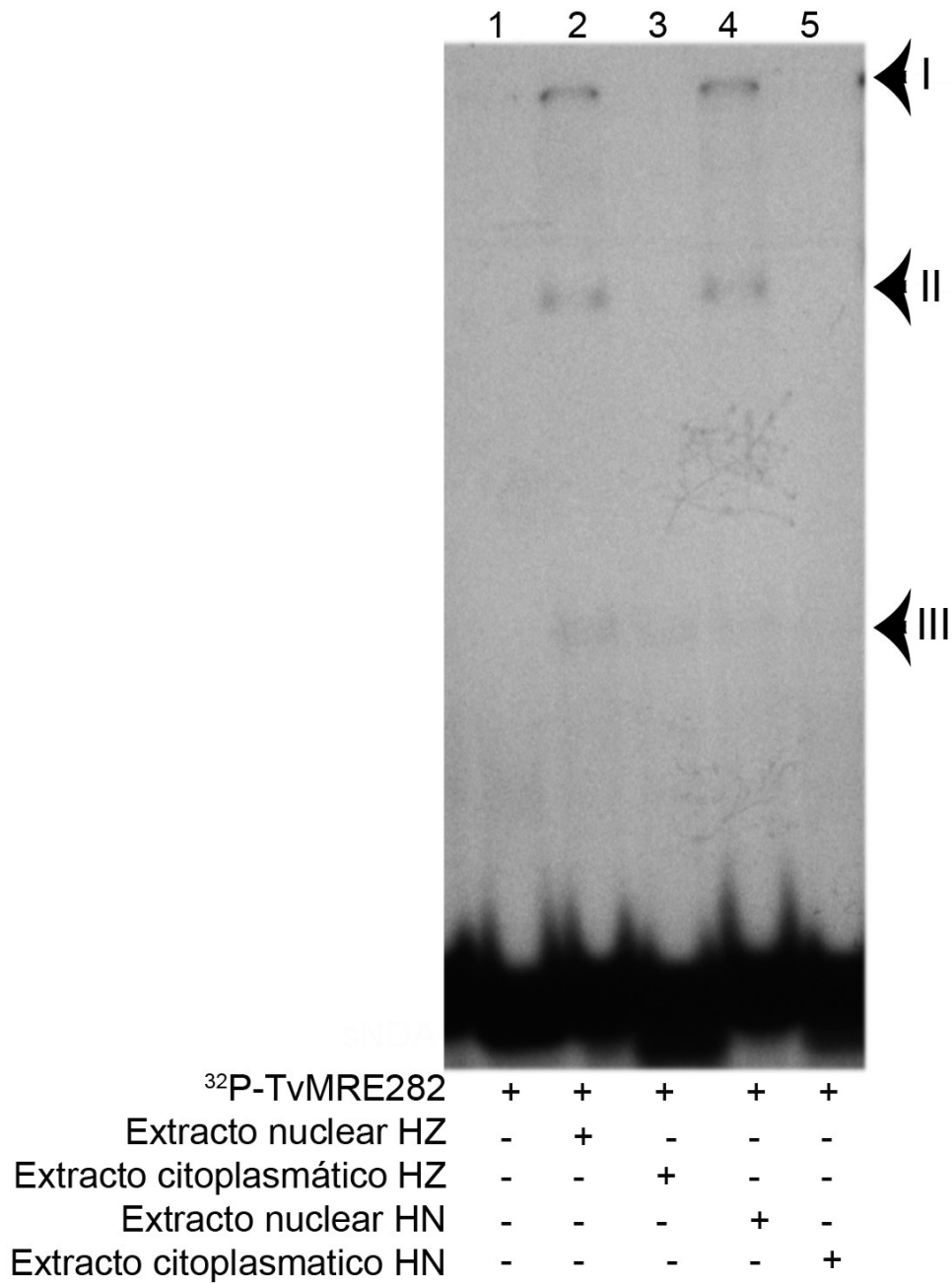
Entonces se analizó si la formación de complejos observados desde extractos nucleares de *T. vaginalis* en presencia de  $Zn^{2+}$  son zinc dependientes; por lo tanto para probar esto se realizó ensayos de EMSA con el elemento TvMRE155 conteniendo en la reacción de unión  $10 \mu M$  de  $Zn^{2+}$  y extractos nucleares de *T. vaginalis* en presencia de  $Zn^{2+}$ , y se realizó una cinética de concentración  $\mu M$  de EDTA en un rango de 0 a  $1000 \mu M$ . Para la concentración  $0 \mu M$  de EDTA se observaron tres complejos (Figura 34, carril 2), para  $5 \mu M$  EDTA se observaron tres complejos nuevamente (Figura 34, carril 3), de igual forma para la concentración  $10 \mu M$  se observaron tres complejos (Figura 32, carril 4), sin embargo, cuando se aumentó la concentración a  $100 \mu M$  de EDTA los tres complejos desaparecieron (Figura 34, carril 5) y finalmente en la concentración de  $1000 \mu M$  no se observó ningún complejo (Figura 34, carril 6).



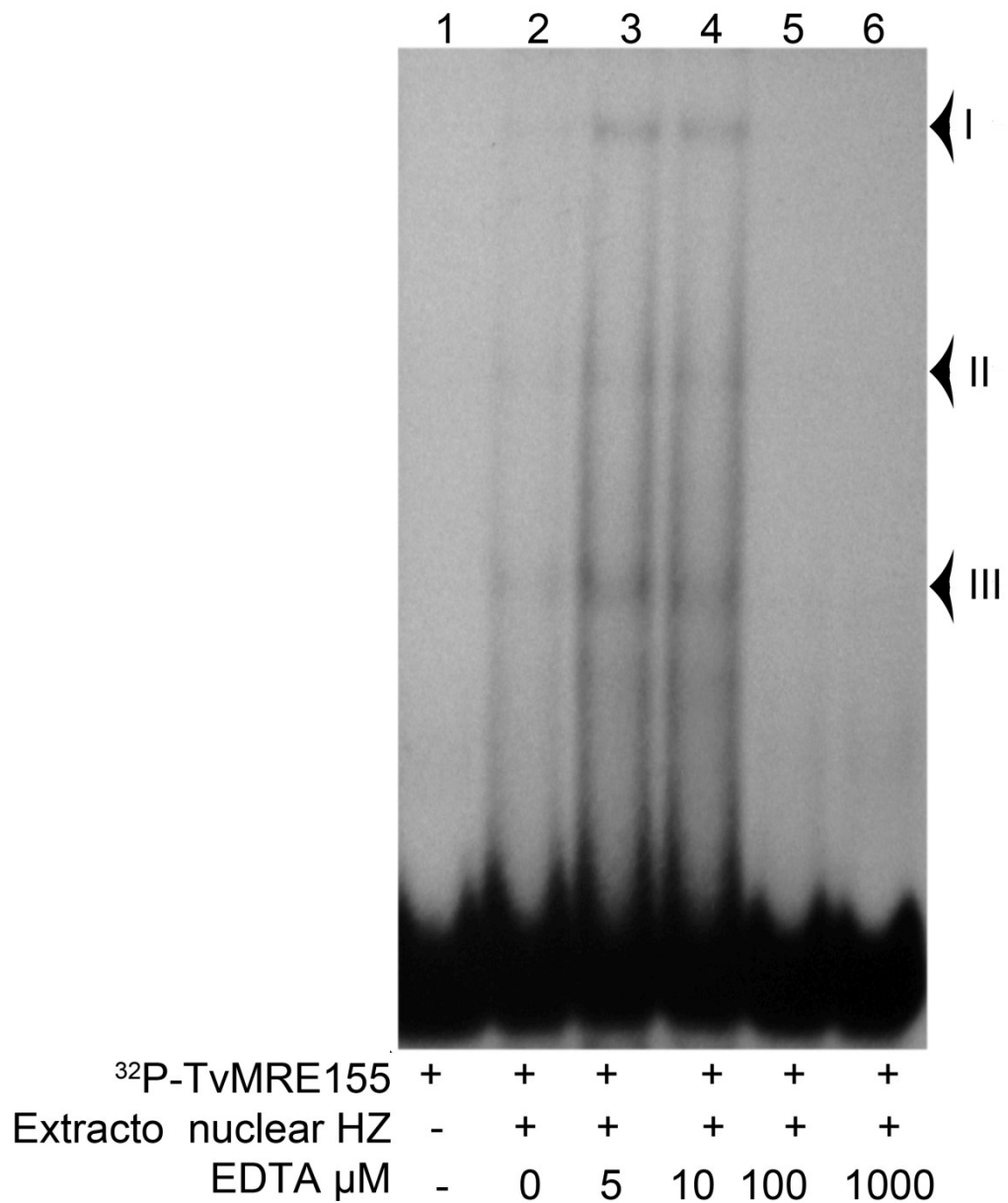
**Figura 31. Complejos de proteínas nucleares y citoplasmáticas de *T. vaginalis* con la sonda MRE2 de *H. sapiens*.** Para el EMSA se utilizó la sonda MRE2 de *H. sapiens* con extractos de proteínas nucleares en presencia de  $Zn^{2+}$  de *T. vaginalis* (extracto nuclear HZ)(carril 1). Para la reacción de la sonda MRE2 con extractos de proteínas nucleares en ausencia de  $Zn^{2+}$  de *T. vaginalis* (extracto nuclear HN) (carril 3). Para la reacción de la sonda MRE2 con extractos de proteínas citoplasmáticas en ausencia de  $Zn^{2+}$  de *T. vaginalis* (extracto citoplasmático HN) (carril 2). Para la reacción de MRE2 con extractos de proteínas citoplasmáticas en ausencia de  $Zn^{2+}$  de *T. vaginalis* (extracto citoplasmático HN) (carril 4). Los complejos son señalados con cabeza de flecha.



**Figura 32. Complejos de proteínas nucleares y citoplasmáticos de *T. vaginalis* en ausencia y presencia de Zn<sup>2+</sup> con el TvMRE155 de *T. vaginalis*.** EMSA con el elemento TvMRE155 con extractos nucleares de *T. vaginalis* en presencia de Zn<sup>2+</sup> (carril 2), y en ausencia de Zn<sup>2+</sup> (Carril 4). Para extractos citoplasmáticos en presencia de Zn<sup>2+</sup> (carril 3) y en ausencia de Zn<sup>2+</sup> (carril 5). La sonda libre es mostrada (carril 1). Los complejos son señalados con cabeza de flecha.



**Figura 33. Complejos de proteínas nucleares y citoplasmáticas de *T. vaginalis* en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$  con la sonda TvMRE282 de *T. vaginalis*.** EMSA con el elemento TvMRE282 con extractos nucleares de *T. vaginalis* en presencia de  $Zn^{2+}$  (carril 2); en ausencia de  $Zn^{2+}$  (Carril 4), para extractos citoplasmáticos en presencia de  $Zn^{2+}$  (carril 3) y para extractos citoplasmáticos en ausencia de  $Zn^{2+}$  (carril 5). La sonda libre es mostrada (carril 1). Los complejos son señalados con cabeza de flecha.

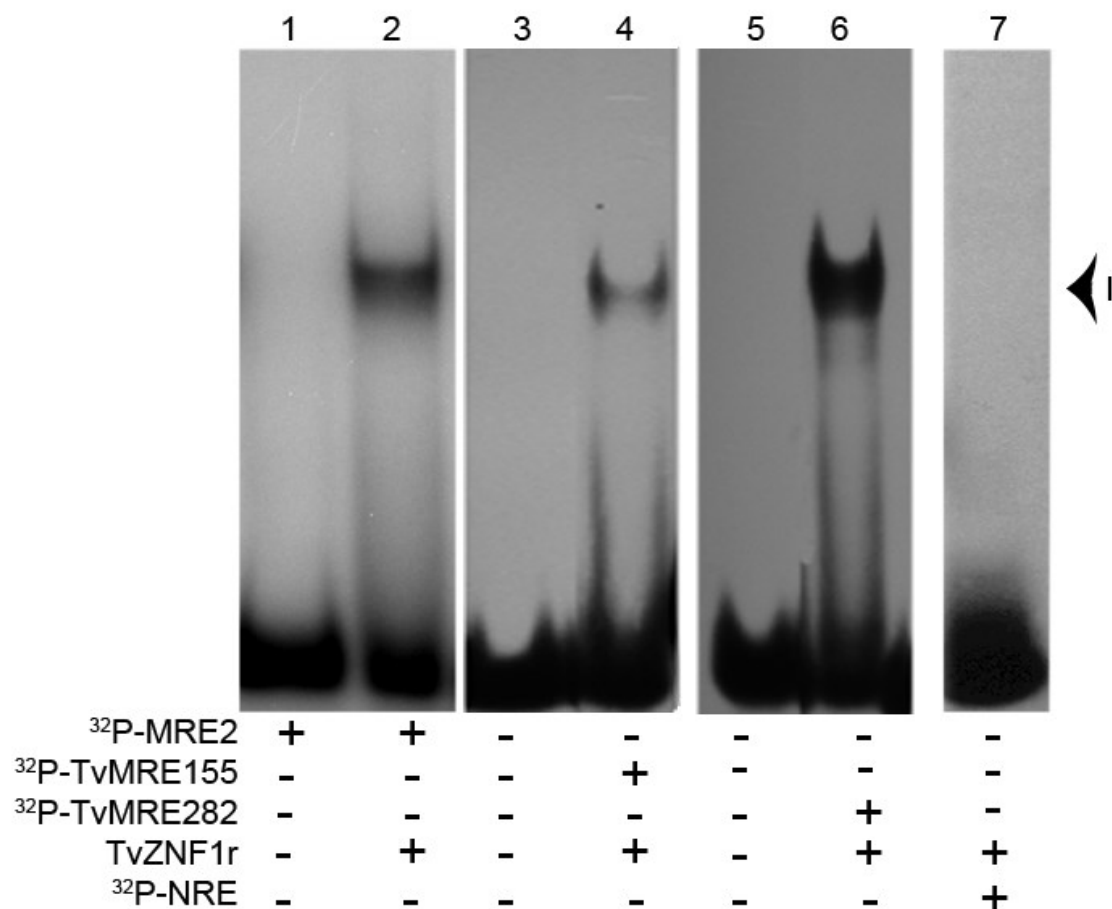


**Figura 34. Complejos dependientes de Zn<sup>2+</sup> de TvMRE155 y extractos nucleares de *T. vaginalis* en presencia de Zn<sup>2+</sup>.** EMSA con extractos nucleares de *T. vaginalis* en presencia de Zn<sup>2+</sup> con la sonda TvMRE155 que mostró la formación de tres complejos (carril 2), se analizó la estabilidad de estos complejos en 5 μM (carril 3), 10 μM (carril 4), 100 μM (carril 5) y 1000 μM (carril 6). La sonda libre es mostrada (carril 1).

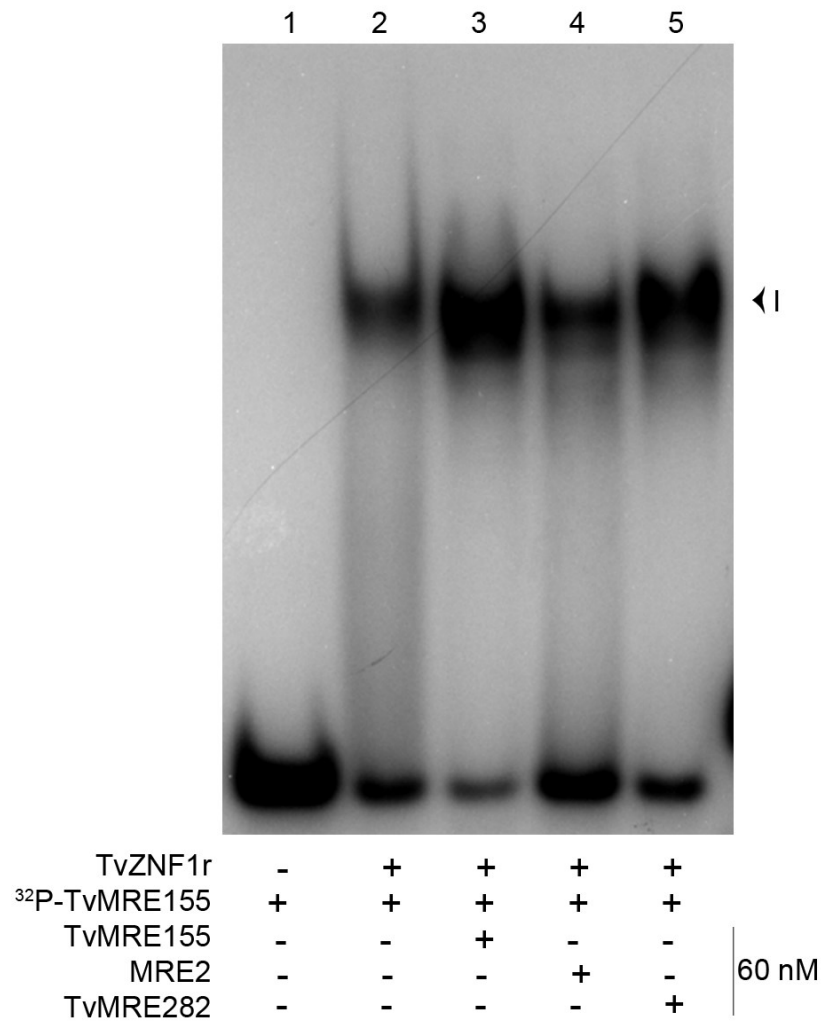
## **25.8. TvZNF1 tiene la capacidad de unión a DNA con las sondas control MRE2, TvMRE155 y TvMRE282.**

Ensayos de EMSA con TvZNF1r y las sondas control MRE2 de *H. sapiens*, TvMRE155 y TvMRE282 de *T. vaginalis* mostraron la formación de un complejo con cada una de las sondas (Figura 35 carriles 2, 4 y 6) respectivamente. Como control negativo se utilizó la sonda NRE de *E. histolytica*, esta sonda no mostró ningún complejo (Figura 35, carril 7).

La especificidad del complejo de TvZNF1r con TvMRE155 se probó por medio de un ensayo de competencias, se muestra una de las reacciones sin competidor (Figura 36, carril 2), cuando se realizó la competencia con TvMRE155 fría, no se observó una reducción del complejo (Figura 36, carril 3), el uso de sonda fría MRE2 mostró competencia (Figura 36, carril 4). Finalmente se compitió con la sonda fría TvMRE282 mostrando competencia ya que hubo enriquecimiento de la sonda al fondo del carril (Figura 36, carril 5).



**Figura 35. TvZNF1 reconoce las sondas MRE2 de *H. sapiens*, TvMRE155 y TvMRE282 de *T. vaginalis*.** La proteína TvZNF1r purificada, se utilizó para determinar su capacidad de unión a DNA probando la sonda MRE2 (Carril 2), la sonda TvMRE155 (carril 4) y TvMRE282 (carril 6); como control negativo se usó la sonda no relacionada NRE de *E. histolytica*, la cual no mostró complejos (Carril 7). Las sondas libre son mostradas MRE2 (carril 1), TvMRE155 (carril 3) y TvMRE282 (carril 5).



**Figura 36. Ensayo de EMSA de competencias de TvMRE155 con las sondas frías MRE2 y TvMRE282.** El EMSA se realizó con TvZNF1r purificado (44  $\mu$ M) con 1.2 nM de sonda TvMRE155 (carril 2) se compitió con (60 nM) las sondas frías: TvMRE155 se observó poca competencia (carril 3), con MRE2 se observó el mayor nivel de competencia (carril 4) y TvMRE282 si compitió por la unión (carril 5). Las sondas libre es mostrada (carril 1).

## 26. Discusión de resultados

Este estudio se realizó para dilucidar el posible mecanismo de regulación génica de *mp50* en *T. vaginalis* mediado por  $Zn^{2+}$ . Recientemente se ha descrito la expresión diferencial de genes (*ap65*, *ap33*, *enolasa*, *gapdh*, *tvcp39*, *mp50*, *tvfim1* y *tvcp65*) por efecto de  $Zn^{2+}$  en *T. vaginalis* (33,203). A nivel de proteoma se ha demostrado la modulación de la expresión de proteínas por efecto del  $Zn^{2+}$  (33,179). De las propiedades de virulencia se ha descrito que la adhesión y citotoxicidad son regulados negativamente por el  $Zn^{2+}$  en *T. vaginalis* (33).

Sin embargo, a nivel de regulación génica mediado por  $Zn^{2+}$  hasta el momento solo se ha reportado nuestros resultados en un artículo haciendo referencia a el efecto de  $Zn^{2+}$  en la expresión génica de *T. vaginalis*.

En primera instancia se evaluó la vida media del RNAm de *mp50* en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$ , mostrando que el  $Zn^{2+}$  es un inductor y estabilizador del mensajero de *mp50*, esto a través de obtener el tiempo de vida media en presencia de  $Zn^{2+}$  (47 min) comparado con el control (30 min) mostrando una diferencia de 17 minutos. La vida media de un transcrito permite explicar la disponibilidad de moléculas de RNAm en el citoplasma durante un tiempo determinado, lo cual afecta directamente la expresión de proteínas (125). Por otra parte, el RNAm puede ser inducido o estabilizado, sin embargo,, resulta complicado determinar el mecanismo que participa la regulación génica de un RNAm a nivel de transcripción o post transcripción. Por lo que un primer abordaje son los ensayos de estabilidad de RNAm utilizando compuestos que bloquean la transcripción. Reportes previos de estudios de estabilidad de RNAm en *T. vaginalis* describen el uso de 10  $\mu\text{g/ml}$  de Actinomicina D y recientemente para el gen de *tvcp39* se reportó 50  $\mu\text{g/ml}$  para realizar ensayos de estabilidad de RNAm en este parásito (169,171,204). Esto debido a que *T. vaginalis* es resistente a  $\alpha$ -amantidina (205).

La vida media de un RNAm permite sugerir la participación de un gen en una condición dada, relacionando su abundancia conforme al tiempo. El resultado de la vida media de *mp50* en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$  (30 y 47 min respectivamente) de *T. vaginalis* sugiere que este tipo de genes al evaluarse puede tener una rápida o lenta inducción, o puede ser altamente estable, esto se ha observado principalmente en genes con un control estricto de inducción y degradación como los genes de *c-fos* que son proto-oncogenes y sus transcritos son rápidamente inducidos y degradados mostrando una vida media de 10 a 15 minutos (125,129), o por el contrario se describe RNA mensajeros como los de la globina que son estables y alcanzan una vida media de horas en células de eucariontes (125). Un ejemplo claro es el reporte de Lioudmila V. Sharova en el 2009, quien describe una base de datos donde se describe la tasa de degradación de RNAm de 19,977 genes no redundantes por el análisis de microarreglos de muestras de RNA, a partir de las células madre embrionarias de ratón. El promedio de la vida media de 7.1 horas fue estimado en <100 genes, por otro lado, mensajeros incluyendo PRDM1, Myc, Gadd45g, Foxa2, Hes5 y Trib1 mostraron un promedio de la vida media de menos de 1 hora. En general, las especies de RNAm con vida media corta fueron asociados a genes con funciones de regulación (factores de transcripción), mientras que las especies de RNAm con vida media larga estuvieron enriquecidas y están relacionadas con genes del metabolismo y de estructura celular (206). Por lo que se sugiere que la vida media del RNAm de *mp50* posiblemente sea inducido y estabilizado por el catión  $Zn^{2+}$ .

Por lo tanto, el estudio se enfocó en el análisis de posibles elementos de regulación involucrados en la expresión de RNAm de *mp50*. En primera instancia se estudió a nivel de promotor, se determinó la conservación de la secuencia 5' intergénica de *mp50* de dos aislados (CNCD147 y HGMN01 en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$ ), previamente se ha reportado que estos aislados expresan diferencialmente el gen de *mp50* afectando positivamente su expresión por presencia de  $Zn^{2+}$  (179), sin embargo, a nivel de promotor la secuencia se encontró conservada en ambos aislados (CNCD147 y HGMN01), de igual manera que la del genoma de referencia (aislado G3), esto resulto interesante ya que se esperaba encontrar diferencias en la región promotora entre aislados que pudieran explicar la expresión diferencial del gen *mp50*.

Sin embargo, esto resultó contradictorio basados en que se describe un alto grado de heterogeneidad genética entre diferentes aislados de *T. vaginalis* utilizando múltiples técnicas de genotipificación (207).

Por lo tanto los experimentos se dirigieron a caracterizar el transcrito de *mp50*, para ello se obtuvo la región 5'UTR desde los aislados CNCD147 y HGMN01 en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$  y presentó un mismo tamaño (55 nucleótidos) en ambos aislados y ambas condiciones, lo que permitió sugerir la localización del posible inicio de la transcripción y el núcleo de promotor, que es un Inr conservado. En promedio las secuencias UTR en *T. vaginalis* son de 80 pb (29), sin embargo, para *mp50* resultó más pequeña (10 pb), lo cual sugiere que solo tiene un posible sitio de inicio de la transcripción (120).

El elemento TATA de metazoarios parece estar ausente en promotores de *T. vaginalis* y el elemento promotor Inr se encuentra en ~ 75% de los promotores de los genes de *T. vaginalis*, además las regiones no traducida 5' y 3' (UTR), en los RNAm que codifican a proteínas han mostrado su rol central en la expresión génica en *T. vaginalis* (29,161). El Inr tiene la secuencia consenso T/CA + 1PY (T / A), se encuentra dentro de los 20 nucleótidos corriente arriba del ATG y puede estar tan cerca como a 6 nucleótidos (160). Por lo tanto se realizó el análisis *in silico* en la región intergénica en busca de elementos de reconocimiento de factores de transcripción que posiblemente podrían estar involucrados en la transcripción de RNAm de *mp50*, pero no se logró determinar la presencia de otros Inr como M3 o M5 descritos recientemente para genes de *T. vaginalis* (162). Además, el servidor TRANSFAC se basa en los valores de corte que son referidos como: el *core similarity match (CSS)* que muestra un valor de *Score* que representa la conservación de al menos 5 nucleótidos de la secuencia con la matriz y una parte de la secuencia problema; y el *matrix similarity Score (MSS)* describe la calidad de la conservación de nucleótidos entre la secuencia de la matriz y una parte arbitraria de la secuencia problema. Estos *scores* son calculados por el CSS y en función de este se deduce el MSS con lo cual un valor alto (cercano a 1) muestra una predicción confiable (208).

Para la búsqueda de elementos reguladores en la región 5' intergénica de *mp50* se observó valores confiables (valores de CSS y MSS: 1.000 es significativo) a través de TRANSFAC para factores de transcripción tipo AP-1, CREB, Nkx2-5, GATA y otros TFs tipo dedos de zinc. Principalmente a nivel de regulación génica en respuesta a  $Zn^{2+}$  en eucariontes se describe a los factores de dedos de zinc como MTF-1 o Zap1 (*H. sapiens* o *S. cerevisiae*), los cuales son factores de respuesta a metal principalmente  $Zn^{2+}$  pero en algunos casos responde a  $Cu^{2+}$  o  $Cd^{2+}$ .

MTF-1 es sensible a concentraciones altas de zinc y se reporta su capacidad de modular y controlar la respuesta de genes para la homeostasis de Zinc. La Osteoartritis (OA) una patología que relaciona la participación de MTF-1 y la regulación de metaloproteinasas, donde se describe la participación de transportadores de  $Zn^{2+}$  como ZIP8 que media la entrada de  $Zn^{2+}$  en condrocitos; ZIP8 es positivamente regulado por MTF-1, lo cual describe que el  $Zn^{2+}$  introducido por ZIP8 induce la expresión de metaloproteinasas de degradación de matriz extracelular como MMP3, MMP9, MMP12, MMP13, y ADAMTS5 en condrocitos (209). Lo que sugiere que posiblemente exista la participación de más proteínas para orquestar la homeostasis de  $Zn^{2+}$  en *T. vaginalis* como transportadores metalotioneinas etc.

Dentro del grupo de proteínas de respuesta a  $Zn^{2+}$ , se encuentran los factores de transcripción de respuesta a metal tipo dedos de  $Zn^{2+}$ , descritos como activadores de la transcripción de genes implicados en la regulación de la concentración de  $Zn^{2+}$  en la célula, como es el caso de MTF-1 que reconoce los denominados elementos de respuesta a metal (MRE) que contiene la secuencia consenso TGCRNC, esta fue localizada en la región promotora de genes que codifican a metalotioneinas y transportadores de  $Zn^{2+}$  en eucariontes superiores (133). De manera interesante se encontraron 12 MREs putativos en la región 5' intergénica de *mp50* que conservan al menos los tres primeros nucleótidos TGC importantes para el reconocimiento del motivo, estos datos sugieren que posiblemente el gen de *mp50* pueda ser regulado por un factor de transcripción tipo dedos de  $Zn^{2+}$  homologa a MTF-1 en *T. vaginalis*.

Como parte de la caracterización del RNAm de *mp50*, se determinó la longitud del tracto de poli (A) de dos aislados en condiciones de ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$ , mostrando que el  $Zn^{2+}$  promueve el incremento en la longitud del poli (A) en el RNAm de *mp50* en ambos aislados CNCD1457 and HG MN01, sin embargo, el mayor tamaño de tracto de poli (A), se encontró en el aislado HG MN01 en presencia de  $Zn^{2+}$ . Esto fue interesante debido a que el tracto de poli (A) puede estar involucrado en procesos de estabilidad de RNAm o de mejoramiento de la traducción de proteínas, esto también correlaciona con nuestros resultados de vida media que demuestran que posiblemente el incremento en la estabilidad del RNAm de *mp50* este dado por la longitud de poli (A), así mismo también podría explicar datos ya reportados de sobre expresión de la proteína TvMP50 en presencia de  $Zn^{2+}$  en *T. vaginalis*, donde posiblemente el tracto de poli (A) al encontrarse más largo en presencia de  $Zn^{2+}$  estabilice el complejo de traducción ayudando a la producción de proteína (179).

En *Entamoeba histolytica* se ha descrito el papel del gen *EhPgp5* mostrando un incremento en la estabilidad del RNAm, cuando los trofozoitos son crecidos en presencia de hematina de forma dosis dependiente, entre mayor es la concentración de hematina mayor es el tiempo de estabilidad del RNAm, lo cual demuestra que el aumento en la disponibilidad de transcrito mediante mecanismos de regulación de expresión génica permite sugerir que este gen está involucrado en la sobrevivencia de este parásito (210).

Actualmente se han reportado estudios que involucran el análisis de la longitud del tracto poli (A) en *T. vaginalis*, como el caso de GAPDH de *T. vaginalis*, la hipótesis que plantea Benno H. ter Kuile y colaboradores es que cambios en tamaño de 3'UTR en el RNAm de GAPDH podrían asociarse con las diferencias reportadas en proceso de traducción para ese RNAm, sin embargo, ellos concluyeron que no existe diferencias en la longitud del tracto de poli (A), sugiriendo que no hay ningún cambio en el tamaño de la región 3'UTR ni en la longitud del tracto de poli (A) para el RNAm de GAPDH (211).

Sin embargo, para el RNAm de *mp50* encontramos cambios significativos en el tamaño en la longitud de poli (A) entre condiciones (ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$ ) y entre aislados (CNCD147 y HG MN01) y aunado a que la vida media se incrementa en presencia de  $Zn^{2+}$  nos permite sugerir que posiblemente este cambio es debido a la presencia del catión  $Zn^{2+}$ , lo cual coincide con lo reportado para mensajeros con 3'UTR y poli (A) cortos que pueden traducirse en tasas más bajas que aquellos con trectos largos,

y esto correlaciona con nuestros datos para la proteína TVMP50 que se conoce que se sobre expresa en parásitos crecidos en presencia de  $Zn^{2+}$  a nivel de RNAm y proteína, lo cual sugiere que posiblemente la estabilidad y la traducción puede ser incrementada en función a la longitud del poli (A) para *mp50* en presencia de  $Zn^{2+}$ (119,179,211).

A partir del perfil de PAT-PCR obtuvimos la secuencia de la 3'UTR del RNAm de *mp50* desde los aislados CNCD147 y HGMN01 en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$ , el cual conserva un elemento de tallo-burbuja, la burbuja se conserva en secuencia CAAAUGU, comparada con el elemento de ERE del RNAm de *COX-2* mostrando una alta correspondencia (elemento CTAAATGTCACAC ERE de *COX-2*)(172).

Principalmente en humano estos elementos tallo-burbuja se describe que son reconocidos por proteínas de unión a RNA como eIF5A que es una proteína hipusinada, esta modificación le permite realizar su función de reconociendo del elemento ERE, lo cual permite el aumento en el procesamiento del RNAm e incrementar la tasa de traducción de proteínas en cáncer (212).

Recientes investigaciones sobre la región 3'UTR de RNA mensajeros de *T. vaginalis* describen la localización de la señal y sitio de corte y poliadenilación para los RNA mensajeros de *T. vaginalis* mostrando que la señal de poliadenilación en algunos casos incluye el codón de paro (TAA o TGA) y entre 11 a 30 nt se localiza la señal de corte y poliadenilación (U/CAAA), en general estas señales son congruentes con las localizadas en la 3'UTR de *mp50*, excepto que se propone que tiene dos posibles señales de corte y poliadenilación, lo que sugiere que podrían estar implicados en la longitud del tracto de poli (A) (188). Nuestros resultados del análisis de la región 3'UTR y longitud de poli (A) permiten proponer la hipótesis de que estos elementos participan posiblemente en el control de la traducción mediado por longitud de poli(A), lo que podría explicar el aumento de la expresión de la proteína TvMP50 cuando los trofozoitos son crecidos en presencia de  $Zn^{2+}$ .

Estudios previos de estos mecanismos, muestran que en primera instancia pueden estar asociados con la agregación del Cap en el RNAm, lo cual promueve la traducción (213); otra posibilidad es la capacidad de alargamiento del poli (A) permitiendo reclutar a mas proteínas de tipo PABP que reconocen la cola de poli (A) en el RNAm y promueven la estabilidad e interacción con eIF4G / eIF4F que reconoce el Cap

del RNAm promoviendo la estabilidad del complejo del ribosoma y aumenta el proceso de traducción (214).

Evidencia experimental describe que los mecanismos post transcripcionales se presentan durante la maduración de ovocitos donde la interacción de PABP con eIF4G es importante para este proceso en *Xenopus laevis* (215). Además se han reportado resultados de confirmación que mostraron que al utilizar a eIF4G mutado en el sitio de unión a la PABP hubo un efecto negativo en el proceso de traducción (216).

En relación a la regulación a nivel transcripcional de *mp50* mediada por  $Zn^{2+}$  en *T. vaginalis*, los resultados sugieren que posiblemente exista un homologo a MTF-1 en este parásito. En nuestro trabajo mediante abordaje bioinformático logramos seleccionar y proponer una proteína candidata del genoma de *T. vaginalis*, mostrando tener características de un posible factor de transcripción tipo C2H2-ZNFm el cual fue denominado como TvZNF1.

En la literatura se describe que la secuencia del motivo C2H2-ZNFm se encuentra en tándem en diversos factores de transcripción de muchos organismos, cada secuencia del motivo C2H2-ZNFm tiene una alta variabilidad de los residuos que conforman los dominios de una misma proteína, incluso, los estudios de clasificación de los dominios dedo de zinc mediante alineamientos de secuencias de motivos C2H2-ZNFm muestran que principalmente sólo se conservan dos cisteínas y dos histidinas como características de este tipo de motivos, además de los diversos casos de C2H2-ZNFm se sabe que los motivos dedos de zinc conservan una fenilalanina y leucina, que son importantes a nivel estructural y durante la interacción con DNA (149). De manera interesante, se encontró que TvZNF1 tiene 8 dominios significativamente predichos, los dominios conservan la firma  $X_2CX_{2-6}CX_{12}HX_{3-5}H$ , además se demostró que conserva la fenilalanina y leucina entre las secuencias de los ocho dominios, nuestros resultados *in silico* demuestran que TvZNF1 conserva motivos C2H2-ZNFm como los factores de transcripción: MTF-1, Zap1 y ATSTOP1, lo cual permite sugerir su clasificación como proteína dedos de zinc (144,145).

En el caso de los parásitos protozoarios hay pocos estudios acerca de la caracterización de proteínas del tipo dedos de zinc en especial las que contienen dominios C2H2 (145).

En *T. vaginalis* la secuenciación del genoma permitió dilucidar la existencia de genes que codifican para proteínas del tipo dedos de zinc, sin embargo, hasta el momento no se ha caracterizado ninguna; además no hay ningún reporte que describa una proteína dedos de zinc para el *phylum parabasalia* (174).

En nuestro trabajo identificamos *in silico* a TvZNF1 y demostramos que *tvznf1* se expresó en condiciones basales y 2.1 veces más en presencia de  $Zn^{2+}$  a partir del aislado CNC147, en el caso de las muestras del aislado HGMN01, se observó que no aumenta la expresión mostrando que es un gen funcional en *T. vaginalis*.

En general el nivel de expresión de un gen es importante debido a que posiblemente una modulación positiva o negativa podría ser un indicio de la posible función en un proceso dado, como en el caso de ZNF1 en humano, un factor de transcripción regulador, que responde a señales como alteración de nutrientes, la expresión de ZNF1 aumenta con la presencia de etanol aproximadamente 5 veces (217). Otro ejemplo es el caso del aumento en su expresión de Zap1 es hasta 90 veces en condiciones bajas de  $Zn^{2+}$  (218), lo cual concuerda con nuestro resultado sugiriendo que *tvznf1* es modulado por su importancia y participación durante el crecimiento de *T. vaginalis* en presencia de  $Zn^{2+}$ .

Sin embargo,, surge la pregunta de ¿si los C2H2-ZNFm requieren únicamente 2 Cisteínas y 2 Histidinas para la función?, para determinar que aminoácidos funcionales podrían tener los 8 C2H2-ZNFm de *T. vaginalis* se utilizó el método de traza evolutiva (ET).

En primera instancia existe una limitante debido a que no hay secuencias de genomas del *phylum parabasilia* caracterizadas, por lo que basados en secuencias de organismos más alejados filogenéticamente se mostró una relación filogenética con secuencias de mamíferos, sin embargo, el valor tan bajo de PIC (0 a 10%) lo atribuimos a la distancia filogenética entre *T. vaginalis* y mamíferos (174).

A pesar de la variabilidad intrínseca de los motivos C2H2 de los dedos de zinc y la distancia filogenética de *T. vaginalis* con secuencias caracterizadas, se demostró que se conservaron los residuos de aminoácidos claves en los motivos de TvZNF1 durante la evolución (C8, C13, F17, L23, H26 y H31), lo que sugiere que son la base estructural de los dominios de los dedos de zinc conservados en TvZNF1, lo que podría indicar su funcionalidad como posible proteína de unión a DNA como C2H2-ZNFm ya cristalizados (219).

Además se conoce que los C2H2-ZNFm tienen residuos hidrofóbicos tales como: fenilalanina (F), Tirosina (Y) o triptófano (W), que están implicados en la estabilidad y la unión del DNA (220). Los aminoácidos traza de los C2H2-ZNFm de zinc de TvZNF1 conservaron su naturaleza química como en otros dominios C2H2-ZNFm descritos; esto podría explicar cómo estos dominios de C2H2-ZNFm de TvZNF1 conservan la estructura y su posible capacidad de unión a DNA, a pesar de la distancia evolutiva con altos eucariotas (144,147,221).

El análisis de ET se ha utilizado en otros estudios de proteínas como la familia de los receptores de hormonas nucleares que tienen dominios de unión a DNA tipo dedos de zinc, que reconocen el elemento de respuesta hormonal e iniciar el proceso de transcripción, en este estudio demostraron que el uso de ET permitió identificar los aminoácidos que forman parte del epítopo funcional e identificaron residuos importantes para el reconocimiento (222).

Con el fin de demostrar que TvZNF1 conserva aminoácidos con capacidad de unión a DNA, se realizó un análisis estructural de TvZNF1 mostrando la estructura de ocho dominios C2H2-ZNFm conservan una estructura  $\beta\beta$  hojas y  $\alpha$  hélice de un clásico dedo de zinc tipo C2H2-ZNFm ya descrito en los factores de transcripción cristalizado. Un caso muy particular es el de la proteína Zif268 donde han sido descritos los C2H2-ZNFm de zinc que se unen al DNA revelando que cada dedo de zinc tiene diferentes residuos situados en N-terminal de cada  $\alpha$ -hélice para el contacto en el surco mayor de DNA (223).

Basados en un análisis comparativo de estructuras utilizando dos dedos de zinc cristalizados de Zif268 correspondientes al PDB: 1A1l que fueron comparados con los modelos de TvZNF1 mostrando un RMSD significativo, así como la conservación de estructura y posición de los aminoácidos de unión del catión  $Zn^{2+}$ , además de los

residuos involucrados en la interacción con el DNA localizándolos cerca de la  $\alpha$ -hélice de los dedos de zinc de TvZNF1, lo cual sugiere que posiblemente podrían unir DNA como Zif268 (147).

Un resultado relevante fue que los aminoácidos conservan su naturaleza química (polares) en los dominios de TvZNF1 principalmente los residuos situados en el N-terminal en la  $\alpha$ -hélice, lo que sugiere que posiblemente TvZNF1 podría tener interacción con bases en el surco mayor de DNA como Zif268 (147). Nuestros resultados *in silico* y los análisis de expresión sugieren que TvZNF1 podría ser capaz de unir DNA a través de sus ZNFms que conservan la arquitectura de dedo de zinc encontrado en muchos factores de transcripción ya descritos como MTF-1 (149).

Con los resultados anteriores podríamos sugerir que TvZNF1 es una proteína tipo dedos de zinc con una posible capacidad de unión a DNA, para demostrar la funcionalidad de TvZNF1 experimentalmente, se obtuvo la proteína purificada recombinante TvZNF1 (TvZNF1r), utilizando tres métodos cromatográficos en tándem (Ni-NTA, IEX, HIC). Algunos dominios o proteínas dedos de zinc han sido purificadas a través de la tecnología IMAC utilizando  $Zn^{2+}$  o  $Ca^{2+}$ , obteniendo altos niveles de pureza (hasta un 95%) de la proteína recombinante y son proteínas funcionales al ser capaces de unirse a moléculas de DNA (224). Un ejemplo claro es TFIIIA recombinante que fue clonado y purificado de un sistema bacteriano, sin embargo, esta proteína se obtuvo en cuerpos de inclusión y para su purificación se realizó la cromatografía de replegamiento con presencia de  $Zn^{2+}$  (220).

Con el objetivo de demostrar que los elementos TvMREs putativos localizados en el promotor del gen *mp50*, podrían ser reconocidos por proteínas desde extractos de células HeLa, esto debido a que en cultivos de células HeLa crecidas en  $100\mu M$  de  $Zn^{2+}$  se expresa la proteína MTF-1 e interacciona con los MREs descritos como lo es el MRE2 (184). A partir de extractos nucleares de células HeLa crecidas en  $Zn^{2+}$  se demostró que los TvMREs (TvMRE155 y 282) para el gen *mp50* son reconocidos por proteínas en los extractos de HeLa con  $Zn^{2+}$ , esto sugiere que posiblemente estos MREs propuestos de *mp50* podrían ser reconocidos por alguna proteína de unión a DNA homologa a MTF-1 de *T. vaginalis*. Este factor se sabe que es sobre expresado en células HeLa cuando se crecen en condiciones de  $Zn^{2+}$ , sin embargo, es posible que existan otras proteínas que pudieran

interaccionar con MTF-1 o con el DNA o funcionar como proteínas acarreadoras que posiblemente ayuden en el ensamble de complejo de inicio de la transcripción, por ejemplo SP1 que es otro factor de transcripción del tipo C2H2-ZNFm como MTF-1 se ha reportado que estas proteínas tienen interacción durante la activación de la transcripción de genes de respuesta a  $Zn^{2+}$  (111). Lo cual podría explicar el número de bandas encontrado en los ensayos de EMSA de los TvMREs del gen *mp50* con extractos nucleares de HeLa con  $Zn^{2+}$ .

Los MREs son reconocidos por proteínas de extractos de *T. vaginalis* del aislado HGMN01 en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$ , de igual manera buscamos promover la expresión de proteínas reguladoras al crecer los parásitos en presencia de 1.6 mM de zinc que es una concentración donde se ha evaluado que la expresión de proteínas a nivel proteómico es diferencial, esto sugiere que es posible que existan proteínas en extractos nucleares que reconozcan MREs y sean responsables de la regulación de la expresión génica mediada por  $Zn^{2+}$  en *T. vaginalis* (179). También, el número de bandas observadas en los EMSAs con extractos nucleares de *T. vaginalis* demuestra que hay más de una proteína que posiblemente participan en el reconocimiento de este tipo de MREs (TvMRE155 y 282) de *T. vaginalis* como en otros eucariontes superiores como es el caso más estudiado *H. sapiens* (187).

Para demostrar la especificidad de los MREs de *mp50* se realizaron ensayos de competencia de TvMRE155 competido con sonda fría de sí misma, 282 y MRE2 de *H. sapiens*, este último mostró el mayor nivel de competencia, lo cual sugiere que las variaciones de los 5 nucleótidos después de TGC son importantes para la interacción. Esto mismo fue determinado como núcleo de la secuencia de MREs para MTF-1 (TGCRNC) mostrando que los nucleótidos TGC son importantes para el reconocimiento y las variaciones se encuentra en las posiciones R=A o G, N que equivale a cualquier nucleótido esto podría explicar la formación de diferentes los complejos (187).

Otros resultados que soportan la hipótesis del reconocimiento de TvMREs por proteínas nucleares son los obtenidos desde la comparación de los MREs MRE2, TvMRE155 y 282 que fueron reconocidos por proteínas nucleares y no por proteínas citoplasmáticas, así mismo otro dato importante fue la evaluación de la formación de

complejos de proteínas nucleares desde extractos de *T. vaginalis* con  $Zn^{2+}$  con la sonda TvMRE155, que fueron  $Zn^{2+}$  dependientes. Estos resultados demuestran que los complejos de proteínas nucleares son dependientes de  $Zn^{2+}$ , como los factores de transcripción dedos de Zinc SP1 y MTF-1. Esto correlaciona con los análisis de EMSA realizados para la proteína SP1 donde se observó que el complejo desapareció a concentración dependiente de EDTA (100 y 1000  $\mu M$ ), lo cual sugiere fuertemente que es una metaloproteína dependiente de  $Zn^{2+}$  para formar complejos con el DNA (225).

Aunado a estos resultados se utilizó a TvZNF1r en ensayos de EMSA basados en el estudio descrito por Lichtlen y colaboradores en el 2001, donde mostraron diferentes MREs como blancos de MTF-1 mostrando un complejo de MTF-1 con la sonda MRE2, la cual fue propuesta como secuencia para probar la unión de TvZNF1r, mostrando un complejo TvZNF1r-MRE2, lo cual demuestra que esta proteína es capaz de unir *in vitro* a MRE2 como MTF-1 (184). Se conoce que MTF-1 es un factor de transcripción que es responsable de la transcripción de genes que regulan la homeostasis de  $Zn^{2+}$ , este factor reconoce un núcleo de promotor (TGCRCNC), de manera interesante el análisis estructural sugieren que TvZNF1 podría unir la secuencia (TGTGCCCACGC) que conservan los nucleótidos TGC encontrados en los MREs que reconoce MTF-1 esto descrito para la proteína Zif268 PDB:1A1i, debido a que no existe un cristal de MTF-1 interaccionado con DNA (133,226)

Nuestros resultados muestran que TvZNF1 se expresa en dos aislados de *T. vaginalis* y es capaz de reconocer elementos de respuesta a metal *in vitro*, sugiriendo que TvZNF1 podría participar como un factor de transcripción tipo C2H2-ZNFm como MTF-1 en *T. vaginalis*. Además *T. vaginalis* tiene proteínas dependientes de  $Zn^{2+}$  capaces de interaccionar con TvMREs en las regiones de regulación de los genes de respuesta a  $Zn^{2+}$ .

Actualmente nuestros resultados permitieron publicar un primer reporte que narra la caracterización computacional y experimental de una proteína C2H2-ZNFm en *T. vaginalis*, capaz de reconocer al MRE de humano, caja promotora responsable de la activación de la transcripción en genes de respuesta a altas concentraciones de  $Zn^{2+}$  siendo el primer reporte que describe información acerca del mecanismo de regulación de la expresión génica de *T. vaginalis* mediado por  $Zn^{2+}$  (185). Los hallazgos de este

estudio muestran que este parásito utiliza mecanismos específicos durante su crecimiento con  $Zn^{2+}$ , esto fue realizado *in vitro*, sin embargo, este sistema montado en el laboratorio que tiene la idea de manejar distintos factores presentes en el tracto reproductor masculino. Sin embargo, este estudio muestra como posiblemente a nivel de regulación génica el parásito utiliza mecanismos transcripcionales y post transcripcionales mediados por  $Zn^{2+}$  por medio de metaloproteínas como TvMP50 o TvZNF1 que son dependientes de la unión de un catión ( $Ca^{2+}$  o  $Zn^{2+}$ ) para su función.

## 27. Conclusiones

- El gen *mp50* posiblemente es regulado a nivel de promotor por los elementos MRE conservados en su región reguladora.
- La longitud del tracto de poli (A) fue mayor en muestras de parásitos crecidos en presencia de  $Zn^{2+}$  sugiriendo la participación de un posible mecanismo de estabilidad de mensajero para *mp50*.
- La interacción de TvZNF1r y de las proteínas de extractos nucleares de parásitos crecidos en presencia de  $Zn^{2+}$  con los TvMREs sugieren que hay proteínas nativas que reconocen estos elementos junto con la recombinante lo que apunta a un posible mecanismo a nivel de transcripción semejante al de MTF-1 en humano.
- Los métodos de predicción bioinformáticos empleados sugieren con alto grado de certeza que TvZNF1 es una proteína moduladora del DNA con 8 elementos de tipo C2H2-ZNFm y de los cuales tres de ellos deben enlazar la firma de tipo MRE presente en el promotor del gen *mp50* de *T. vaginalis*.
- Sin embargo, dada la baja o nula identidad observada entre TvZNF1 Y MTF-1 en los residuos determinantes de enlace específico al DNA entre sus C2H2-ZNFm y es sugerente que TvZNF1 es una proteína que por convergencia evolutiva ha alcanzado funciones similares a las de MTF-1.
- El  $Zn^{2+}$  en *Trichomonas vaginalis* posiblemente activa un mecanismo dual de la expresión génica a nivel de transcripción que promueve la inducción del RNAm de *mp50* mediante el factor TvZNF1 a través del reconocimiento de MREs presente en el promotor de *mp50*; sin embargo, no descartamos la participación de un posible mecanismo de estabilidad de mensajero para *mp50* mediado por la longitud de tracto de poli (A) y presencia de  $Zn^{2+}$ .

## 28. Perspectivas

- Determinar el nivel de expresión de TvZNF1 y localización celular en *T. vaginalis*.
- Realizar ensayos de competencias para evidenciar la especificidad de unión de las proteínas nativas y ensayos de competencias usando a TvZNF1r en ensayos de EMSA.
- Determinar la funcionalidad de los diferentes TvMREs putativos presentes en el promotor de *mp50* de *T. vaginalis*
- Determinar *in vivo* la funcionalidad de TvZNF1 como regulador de la expresión génica de *mp50* medido por Zn<sup>2+</sup>.
- Determinar cuáles son los C2H2-ZNFm de TvZNF1 que enlazan la firma de DNA tipo MRE presentes en el promotor de *mp50* de *T. vaginalis*.

## 29. Referencias

1. Thorburn, A. L. (1974) Alfred Francois Donne, 1801-1878, discoverer of *Trichomonas vaginalis* and of leukaemia. *Br J Vener Dis* **50**, 377-380
2. WHO. (1995) An overview of selected curable sexually transmitted diseases. *In: Global program on AIDS*, 2-27
3. Bachmann, L. H., Lewis, I., Allen, R., Schwebke, J. R., Leviton, L. C., Siegal, H. A., and Hook, E. W., 3rd. (2000) Risk and prevalence of treatable sexually transmitted diseases at a Birmingham substance abuse treatment facility. *Am J Public Health* **90**, 1615-1618
4. Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., and Garber, G. (1998) Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev* **11**, 300-317
5. Krieger, J. N., and Rein, M. F. (1982) Canine prostatic secretions kill *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* **37**, 77-81
6. Edwards, T., Burke, P., Smalley, H., and Hobbs, G. (2016) *Trichomonas vaginalis*: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis. *Crit Rev Microbiol* **42**, 406-417
7. Guenther, P. C., Secor, W. E., and Dezzutti, C. S. (2005) *Trichomonas vaginalis*-induced epithelial monolayer disruption and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication: implications for the sexual transmission of HIV-1. *Infect Immun* **73**, 4155-4160
8. Leitsch, D. (2016) Recent Advances in the *Trichomonas vaginalis* Field. *F1000Res* **5**
9. Lehker, M. W., and Alderete, J. F. (2000) Biology of trichomonosis. *Curr Opin Infect Dis* **13**, 37-45
10. Gregson, S., Mason, P. R., Garnett, G. P., Zhuwau, T., Nyamukapa, C. A., Anderson, R. M., and Chandiwana, S. K. (2001) A rural HIV epidemic in Zimbabwe? Findings from a population-based survey. *Int J STD AIDS* **12**, 189-196
11. SINAVE. (2018) Boletín Epidemiológico. Dirección general de Epidemiología/ Salud, México
12. Bachmann, L. H., Hobbs, M. M., Sena, A. C., Sobel, J. D., Schwebke, J. R., Krieger, J. N., McClelland, R. S., and Workowski, K. A. (2011) *Trichomonas vaginalis* genital infections: progress and challenges. *Clin Infect Dis* **53 Suppl 3**, S160-172
13. Figueroa-Angulo, E. E., Rendon-Gandarilla, F. J., Puente-Rivera, J., Calla-Choque, J. S., Cardenas-Guerra, R. E., Ortega-Lopez, J., Quintas-Granados, L. I., Alvarez-Sanchez, M. E., and Arroyo, R. (2012) The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect* **14**, 1411-1427
14. el-Sharkawy, I. M., Hamza, S. M., and el-Sayed, M. K. (2000) Correlation between trichomoniasis vaginalis and female infertility. *J Egypt Soc Parasitol* **30**, 287-294
15. Thurman, A. R., and Doncel, G. F. (2011) Innate immunity and inflammatory response to *Trichomonas vaginalis* and bacterial vaginosis: relationship to HIV acquisition. *Am J Reprod Immunol* **65**, 89-98
16. Kharsany, A. B., Hoosen, A. A., Moodley, J., Bagaratee, J., and Gouws, E. (1993) The association between sexually transmitted pathogens and cervical intra-epithelial neoplasia in a developing community. *Genitourin Med* **69**, 357-360
17. Zhang, Z. F., and Begg, C. B. (1994) Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies. *Int J Epidemiol* **23**, 682-690
18. Swygard, H., Sena, A. C., Hobbs, M. M., and Cohen, M. S. (2004) Trichomoniasis: clinical manifestations, diagnosis and management. *Sex Transm Infect* **80**, 91-95
19. Fleming, D. T., and Wasserheit, J. N. (1999) From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. *Sex Transm Infect* **75**, 3-17
20. Krieger, J. N., and Rein, M. F. (1982) Zinc sensitivity of *Trichomonas vaginalis*: in vitro studies and clinical implications. *J Infect Dis* **146**, 341-345

21. Krieger, J. N., Jenny, C., Verdon, M., Siegel, N., Springwater, R., Critchlow, C. W., and Holmes, K. K. (1993) Clinical manifestations of trichomoniasis in men. *Ann Intern Med* **118**, 844-849
22. Tuttle, J. P., Jr., Holbrook, T. W., and Derrick, F. C. (1977) Interference of human spermatozoal motility by trichomonas vaginalis. *J Urol* **118**, 1024-1025
23. Catterall, R. D. (1972) Trichomonal infections of the genital tract. *Med Clin North Am* **56**, 1203-1209
24. Shui, I. M., Kolb, S., Hanson, C., Sutcliffe, S., Rider, J. R., and Stanford, J. L. (2016) Trichomonas vaginalis infection and risk of advanced prostate cancer. *Prostate* **76**, 620-623
25. Sutcliffe, S., Giovannucci, E., Alderete, J. F., Chang, T. H., Gaydos, C. A., Zenilman, J. M., De Marzo, A. M., Willett, W. C., and Platz, E. A. (2006) Plasma antibodies against Trichomonas vaginalis and subsequent risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**, 939-945
26. Kaydos, S. C., Swygard, H., Wise, S. L., Sena, A. C., Leone, P. A., Miller, W. C., Cohen, M. S., and Hobbs, M. M. (2002) Development and validation of a PCR-based enzyme-linked immunosorbent assay with urine for use in clinical research settings to detect Trichomonas vaginalis in women. *J Clin Microbiol* **40**, 89-95
27. Arroyo, R., Gonzalez-Robles, A., Martinez-Palomo, A., and Alderete, J. F. (1993) Signalling of Trichomonas vaginalis for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. *Mol Microbiol* **7**, 299-309
28. De Jesus, J. B., Cuervo, P., Junqueira, M., Britto, C., Silva-Filho, F. C., Soares, M. J., Cupolillo, E., Fernandes, O., and Domont, G. B. (2007) A further proteomic study on the effect of iron in the human pathogen Trichomonas vaginalis. *Proteomics* **7**, 1961-1972
29. Carlton, J. M., Hirt, R. P., Silva, J. C., Delcher, A. L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J. R., Bidwell, S. L., Alsmark, U. C., Besteiro, S., Sicheritz-Ponten, T., Noel, C. J., Dacks, J. B., Foster, P. G., Simillion, C., Van de Peer, Y., Miranda-Saavedra, D., Barton, G. J., Westrop, G. D., Muller, S., Dessi, D., Fiori, P. L., Ren, Q., Paulsen, I., Zhang, H., Bastida-Corcuera, F. D., Simoes-Barbosa, A., Brown, M. T., Hayes, R. D., Mukherjee, M., Okumura, C. Y., Schneider, R., Smith, A. J., Vanacova, S., Villalvazo, M., Haas, B. J., Perlea, M., Feldblyum, T. V., Utterback, T. R., Shu, C. L., Osoegawa, K., de Jong, P. J., Hrdy, I., Horvathova, L., Zubacova, Z., Dolezal, P., Malik, S. B., Logsdon, J. M., Jr., Henze, K., Gupta, A., Wang, C. C., Dunne, R. L., Upcroft, J. A., Upcroft, P., White, O., Salzberg, S. L., Tang, P., Chiu, C. H., Lee, Y. S., Embley, T. M., Coombs, G. H., Mottram, J. C., Tachezy, J., Fraser-Liggett, C. M., and Johnson, P. J. (2007) Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen Trichomonas vaginalis. *Science* **315**, 207-212
30. Muller, M. (1993) The hydrogenosome. *J Gen Microbiol* **139**, 2879-2889
31. Johnson, P. J., d'Oliveira, C. E., Gorrell, T. E., and Muller, M. (1990) Molecular analysis of the hydrogenosomal ferredoxin of the anaerobic protist Trichomonas vaginalis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6097-6101
32. Villegas-Vazquez, Y. E. (2015) EFECTO DEL Zn<sup>2+</sup> DURANTE LA INTERACCIÓN DE TRICHOMONAS VAGINALIS CON CÉLULAS PROSTÁTICAS. *V foro Nacional de Divulgación Científica y tecnológica*
33. Vazquez-Carrillo, L. I., Quintas-Granados, L. I., Arroyo, R., Mendoza Hernandez, G., González Robles, A., Carvajal Gamez, B. I., and Alvarez Sánchez, M. E. (2011) The effect of Zn<sup>2+</sup> on prostatic cell cytotoxicity caused by Trichomonas vaginalis. *Journal of Integrated OMICS* **1**
34. Liston, D. R., and Johnson, P. J. (1999) Analysis of a ubiquitous promoter element in a primitive eukaryote: early evolution of the initiator element. *Mol Cell Biol* **19**, 2380-2388
35. Sena, A. C., Miller, W. C., Hobbs, M. M., Schwebke, J. R., Leone, P. A., Swygard, H., Atashili, J., and Cohen, M. S. (2007) Trichomonas vaginalis infection in male sexual partners: implications for diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Infect Dis* **44**, 13-22
36. Schumacher, M. A., Lau, A. O., and Johnson, P. J. (2003) Structural basis of core promoter recognition in a primitive eukaryote. *Cell* **115**, 413-424

37. Liston, D. R., Lau, A. O., Ortiz, D., Smale, S. T., and Johnson, P. J. (2001) Initiator recognition in a primitive eukaryote: IBP39, an initiator-binding protein from *Trichomonas vaginalis*. *Mol Cell Biol* **21**, 7872-7882
38. Lin, W. C., Li, S. C., Lin, W. C., Shin, J. W., Hu, S. N., Yu, X. M., Huang, T. Y., Chen, S. C., Chen, H. C., Chen, S. J., Huang, P. J., Gan, R. R., Chiu, C. H., and Tang, P. (2009) Identification of microRNA in the protist *Trichomonas vaginalis*. *Genomics* **93**, 487-493
39. Silva, J. C., Bastida, F., Bidwell, S. L., Johnson, P. J., and Carlton, J. M. (2005) A potentially functional mariner transposable element in the protist *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biol Evol* **22**, 126-134
40. Rawlings, N. D., Barrett, A. J., and Finn, R. (2016) Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* **44**, D343-350
41. Ramon-Luing, L. A., Rendon-Gandarilla, F. J., Cardenas-Guerra, R. E., Rodriguez-Cabrera, N. A., Ortega-Lopez, J., Avila-Gonzalez, L., Angel-Ortiz, C., Herrera-Sanchez, C. N., Mendoza-Garcia, M., and Arroyo, R. (2010) Immunoproteomics of the active degradome to identify biomarkers for *Trichomonas vaginalis*. *Proteomics* **10**, 435-444
42. Declerck, P. J., and Muller, M. (1987) Hydrogenosomal ATP:AMP phosphotransferase of *Trichomonas vaginalis*. *Comp Biochem Physiol B* **88**, 575-580
43. ter Kuile, B. H. (1994) Carbohydrate metabolism and physiology of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis* studied in chemostats. *Microbiology* **140 ( Pt 9)**, 2495-2502
44. Beach, D. H., Holz, G. G., Jr., Singh, B. N., and Lindmark, D. G. (1991) Phospholipid metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Mol Biochem Parasitol* **44**, 97-108
45. Beach, D. H., Holz, G. G., Jr., Singh, B. N., and Lindmark, D. G. (1990) Fatty acid and sterol metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Mol Biochem Parasitol* **38**, 175-190
46. Zuo, X., Lockwood, B. C., and Coombs, G. H. (1995) Uptake of amino acids by the parasitic, flagellated protist *Trichomonas vaginalis*. *Microbiology* **141 ( Pt 10)**, 2637-2642
47. Linstead, D., and Cranshaw, M. A. (1983) The pathway of arginine catabolism in the parasitic flagellate *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* **8**, 241-252
48. Lowe, P. N., and Rowe, A. F. (1986) Aminotransferase activities in *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* **21**, 65-74
49. Lowe, P. N., and Rowe, A. F. (1985) Aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase from *Trichomonas vaginalis*. Identity of aspartate aminotransferase and aromatic amino acid aminotransferase. *Biochem J* **232**, 689-695
50. Wang, C. C., and Cheng, H. W. (1984) Salvage of pyrimidine nucleosides by *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* **10**, 171-184
51. Heyworth, P. G., Gutteridge, W. E., and Ginger, C. D. (1982) Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Lett* **141**, 106-110
52. Alvarez-Sanchez, M. E., Villalpando, J. L., Quintas-Granados, L. I., and Arroyo, R. (2017) Polyamine Transport and Synthesis in *Trichomonas vaginalis*: Potential Therapeutic Targets. *Curr Pharm Des* **23**, 3359-3366
53. Yarett, N., Martinez, M. P., Goldberg, B., Kramer, D. L., and Porter, C. W. (2000) Dependence of *Trichomonas vaginalis* upon polyamine backconversion. *Microbiology* **146 ( Pt 10)**, 2715-2722
54. Garber, G. E. (2005) The laboratory diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **16**, 35-38
55. Madico, G., Quinn, T. C., Rompalo, A., McKee, K. T., Jr., and Gaydos, C. A. (1998) Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swab samples. *J Clin Microbiol* **36**, 3205-3210

56. Huppert, J. S., Mortensen, J. E., Reed, J. L., Kahn, J. A., Rich, K. D., Miller, W. C., and Hobbs, M. M. (2007) Rapid antigen testing compares favorably with transcription-mediated amplification assay for the detection of *Trichomonas vaginalis* in young women. *Clin Infect Dis* **45**, 194-198
57. Campbell, L., Woods, V., Lloyd, T., Elsayed, S., and Church, D. L. (2008) Evaluation of the OSOM *Trichomonas* rapid test versus wet preparation examination for detection of *Trichomonas vaginalis* vaginitis in specimens from women with a low prevalence of infection. *J Clin Microbiol* **46**, 3467-3469
58. Brown, H. L., Fuller, D. D., Jasper, L. T., Davis, T. E., and Wright, J. D. (2004) Clinical evaluation of affirm VPIII in the detection and identification of *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, and *Candida* species in vaginitis/vaginosis. *Infect Dis Obstet Gynecol* **12**, 17-21
59. Andrea, S. B., and Chapin, K. C. (2011) Comparison of Aptima *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification assay and BD affirm VPIII for detection of *T. vaginalis* in symptomatic women: performance parameters and epidemiological implications. *J Clin Microbiol* **49**, 866-869
60. Tally, F. P., and Sullivan, C. E. (1981) Metronidazole: in vitro activity, pharmacology and efficacy in anaerobic bacterial infections. *Pharmacotherapy* **1**, 28-38
61. Paulish-Miller, T. E., Augostini, P., Schuyler, J. A., Smith, W. L., Mordechai, E., Adelson, M. E., Gygas, S. E., Secor, W. E., and Hilbert, D. W. (2014) *Trichomonas vaginalis* metronidazole resistance is associated with single nucleotide polymorphisms in the nitroreductase genes *nr4Tv* and *nr6Tv*. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 2938-2943
62. Cudmore, S. L., Delgaty, K. L., Hayward-McClelland, S. F., Petrin, D. P., and Garber, G. E. (2004) Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev* **17**, 783-793, table of contents
63. Dunne, R. L., Dunn, L. A., Upcroft, P., O'Donoghue, P. J., and Upcroft, J. A. (2003) Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Res* **13**, 239-249
64. Johnson, P. J., Lahti, C. J., and Bradley, P. J. (1993) Biogenesis of the hydrogenosome in the anaerobic protist *Trichomonas vaginalis*. *J Parasitol* **79**, 664-670
65. Rasoloson, D., Vanacova, S., Tomkova, E., Razga, J., Hrdy, I., Tachezy, J., and Kulda, J. (2002) Mechanisms of in vitro development of resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. *Microbiology* **148**, 2467-2477
66. Ertabaklar, H., Yaman Karadam, S., Malatyali, E., and Ertug, S. (2016) [Investigation of in vitro metronidazole resistance in the clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*]. *Mikrobiyol Bul* **50**, 552-558
67. Alderete, J. F., Nguyen, J., Mundodi, V., and Lehker, M. W. (2004) Heme-iron increases levels of AP65-mediated adherence by *Trichomonas vaginalis*. *Microb Pathog* **36**, 263-271
68. Garcia, A. F., Chang, T. H., Benchimol, M., Klumpp, D. J., Lehker, M. W., and Alderete, J. F. (2003) Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol* **47**, 1207-1224
69. Engbring, J. A., and Alderete, J. F. (1998) Three genes encode distinct AP33 proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Mol Microbiol* **28**, 305-313
70. Moreno-Brito, V., Yanez-Gomez, C., Meza-Cervantez, P., Avila-Gonzalez, L., Rodriguez, M. A., Ortega-Lopez, J., Gonzalez-Robles, A., and Arroyo, R. (2005) A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. *Cell Microbiol* **7**, 245-258
71. Meza-Cervantez, P., Gonzalez-Robles, A., Cardenas-Guerra, R. E., Ortega-Lopez, J., Saavedra, E., Pineda, E., and Arroyo, R. (2011) Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO) is a surface-associated cell-binding protein in *Trichomonas vaginalis* and is involved in trichomonal adherence to host cells. *Microbiology* **157**, 3469-3482

72. O'Brien, J. L., Lauriano, C. M., and Alderete, J. F. (1996) Molecular characterization of a third malic enzyme-like AP65 adhesin gene of *Trichomonas vaginalis*. *Microb Pathog* **20**, 335-349
73. Lahti, C. J., Bradley, P. J., and Johnson, P. J. (1994) Molecular characterization of the alpha-subunit of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal succinyl CoA synthetase. *Mol Biochem Parasitol* **66**, 309-318
74. Lahti, C. J., d'Oliveira, C. E., and Johnson, P. J. (1992) Beta-succinyl-coenzyme A synthetase from *Trichomonas vaginalis* is a soluble hydrogenosomal protein with an amino-terminal sequence that resembles mitochondrial presequences. *J Bacteriol* **174**, 6822-6830
75. van Grinsven, K. W., Rosnowsky, S., van Weelden, S. W., Putz, S., van der Giezen, M., Martin, W., van Hellemond, J. J., Tielens, A. G., and Henze, K. (2008) Acetate:succinate CoA-transferase in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*: identification and characterization. *J Biol Chem* **283**, 1411-1418
76. Rendon-Gandarilla, F. J., Ramon-Luing Lde, L., Ortega-Lopez, J., Rosa de Andrade, I., Benchimol, M., and Arroyo, R. (2013) The TvLEGU-1, a legumain-like cysteine proteinase, plays a key role in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Biomed Res Int* **2013**, 561979
77. Lama, A., Kucknoor, A., Mundodi, V., and Alderete, J. F. (2009) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* **77**, 2703-2711
78. Mundodi, V., Kucknoor, A. S., and Alderete, J. F. (2008) Immunogenic and plasminogen-binding surface-associated alpha-enolase of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* **76**, 523-531
79. Noel, C. J., Diaz, N., Sicheritz-Ponten, T., Safarikova, L., Tachezy, J., Tang, P., Fiori, P. L., and Hirt, R. P. (2010) *Trichomonas vaginalis* vast BspA-like gene family: evidence for functional diversity from structural organisation and transcriptomics. *BMC Genomics* **11**, 99
80. Ryan, C. M., Mehlert, A., Richardson, J. M., Ferguson, M. A., and Johnson, P. J. (2011) Chemical structure of *Trichomonas vaginalis* surface lipoglycan: a role for short galactose (beta1-4/3) N-acetylglucosamine repeats in host cell interaction. *J Biol Chem* **286**, 40494-40508
81. Mendoza-Lopez, M. R., Becerril-Garcia, C., Fattel-Facenda, L. V., Avila-Gonzalez, L., Ruiz-Tachiquin, M. E., Ortega-Lopez, J., and Arroyo, R. (2000) CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Infect Immun* **68**, 4907-4912
82. Neale, K. A., and Alderete, J. F. (1990) Analysis of the proteinases of representative *Trichomonas vaginalis* isolates. *Infect Immun* **58**, 157-162
83. Arroyo, R., and Alderete, J. F. (1989) *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infect Immun* **57**, 2991-2997
84. Ma, L., Meng, Q., Cheng, W., Sung, Y., Tang, P., Hu, S., and Yu, J. (2011) Involvement of the GP63 protease in infection of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol Res* **109**, 71-79
85. Vargas-Villarreal, J., Mata-Cardenas, B. D., Gonzalez-Salazar, F., Lozano-Garza, H. G., Cortes-Gutierrez, E. I., Palacios-Corona, R., Martinez-Rodriguez, H. G., Ramirez-Bon, E., and Said-Fernandez, S. (2003) *Trichomonas vaginalis*: identification of a phospholipase A-dependent hemolytic activity in a vesicular subcellular fraction. *J Parasitol* **89**, 105-112
86. Arroyo, R., Cardenas-Guerra, R. E., Figueroa-Angulo, E. E., Puente-Rivera, J., Zamudio-Prieto, O., and Ortega-Lopez, J. (2015) *Trichomonas vaginalis* Cysteine Proteinases: Iron Response in Gene Expression and Proteolytic Activity. *Biomed Res Int* **2015**, 946787
87. Ramon-Luing Lde, L., Rendon-Gandarilla, F. J., Puente-Rivera, J., Avila-Gonzalez, L., and Arroyo, R. (2011) Identification and characterization of the immunogenic cytotoxic TvCP39 proteinase gene of *Trichomonas vaginalis*. *Int J Biochem Cell Biol* **43**, 1500-1511
88. Hernandez-Gutierrez, R., Avila-Gonzalez, L., Ortega-Lopez, J., Cruz-Talonia, F., Gomez-Gutierrez, G., and Arroyo, R. (2004) *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Exp Parasitol* **107**, 125-135

89. Hernandez-Gutierrez, R., Ortega-Lopez, J., and Arroyo, R. (2003) A 39-kDa cysteine proteinase CP39 from *Trichomonas vaginalis*, which is negatively affected by iron may be involved in trichomonal cytotoxicity. *J Eukaryot Microbiol* **50 Suppl**, 696-698
90. Alvarez-Sanchez, M. E., Avila-Gonzalez, L., Becerril-Garcia, C., Fattel-Facenda, L. V., Ortega-Lopez, J., and Arroyo, R. (2000) A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microb Pathog* **28**, 193-202
91. Solano-Gonzalez, E., Alvarez-Sanchez, M. E., Avila-Gonzalez, L., Rodriguez-Vargas, V. H., Arroyo, R., and Ortega-Lopez, J. (2006) Location of the cell-binding domain of CP65, a 65kDa cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 2114-2127
92. Kang, J. H., Song, H. O., Ryu, J. S., Shin, M. H., Kim, J. M., Cho, Y. S., Alderete, J. F., Ahn, M. H., and Min, D. Y. (2006) *Trichomonas vaginalis* promotes apoptosis of human neutrophils by activating caspase-3 and reducing Mcl-1 expression. *Parasite Immunol* **28**, 439-446
93. Quan, J. H., Kang, B. H., Cha, G. H., Zhou, W., Koh, Y. B., Yang, J. B., Yoo, H. J., Lee, M. A., Ryu, J. S., Noh, H. T., Kwon, J., and Lee, Y. H. (2014) *Trichomonas vaginalis* metalloproteinase induces apoptosis of SiHa cells through disrupting the Mcl-1/Bim and Bcl-xL/Bim complexes. *PLoS One* **9**, e110659
94. Pereira-Neves, A., and Benchimol, M. (2007) Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biol Cell* **99**, 87-101
95. Rendon-Maldonado, J. G., Espinosa-Cantellano, M., Gonzalez-Robles, A., and Martinez-Palomo, A. (1998) *Trichomonas vaginalis*: in vitro phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes, and erythrocytes. *Exp Parasitol* **89**, 241-250
96. Krieger, J. N., Poisson, M. A., and Rein, M. F. (1983) Beta-hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* correlates with virulence. *Infect Immun* **41**, 1291-1295
97. Vargas-Villarreal, J., Mata-Cardenas, B. D., Palacios-Corona, R., Gonzalez-Salazar, F., Cortes-Gutierrez, E. I., Martinez-Rodriguez, H. G., and Said-Fernandez, S. (2005) *Trichomonas vaginalis*: identification of soluble and membrane-associated phospholipase A1 and A2 activities with direct and indirect hemolytic effects. *J Parasitol* **91**, 5-11
98. Carvalho, S. E., Freitas, D., Murad, A. M., Franco, O. L., and Simoes-Barbosa, A. (2005) *Trichomonas vaginalis*: identification of a triacylglycerol acylhydrolase. *Exp Parasitol* **111**, 260-263
99. Fiori, P. L., Rappelli, P., Addis, M. F., Sechi, A., and Cappuccinelli, P. (1996) *Trichomonas vaginalis* haemolysis: pH regulates a contact-independent mechanism based on pore-forming proteins. *Microb Pathog* **20**, 109-118
100. De Carli, G. A., Brasseur, P., da Silva, A. C., Wendorff, A., and Rott, M. (1996) Hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **91**, 107-110
101. Fiori, P. L., Rappelli, P., Rocchigiani, A. M., and Cappuccinelli, P. (1993) *Trichomonas vaginalis* haemolysis: evidence of functional pores formation on red cell membranes. *FEMS Microbiol Lett* **109**, 13-18
102. Min, D. Y., Hyun, K. H., Ryu, J. S., Ahn, M. H., and Cho, M. H. (1998) Degradations of human immunoglobulins and hemoglobin by a 60 kDa cysteine proteinase of *Trichomonas vaginalis*. *Korean J Parasitol* **36**, 261-268
103. Provenzano, D., and Alderete, J. F. (1995) Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* **63**, 3388-3395
104. Musatovova, O., and Alderete, J. F. (1999) The *Trichomonas vaginalis* phenotypically varying P270 immunogen is highly conserved except for numbers of repeated elements. *Microb Pathog* **27**, 93-104

105. Musatovova, O., and Alderete, J. F. (1998) Molecular analysis of the gene encoding the immunodominant phenotypically varying P270 protein of *Trichomonas vaginalis*. *Microb Pathog* **24**, 223-239
106. Alderete, J. F., Newton, E., Dennis, C., Engbring, J., and Neale, K. A. (1991) Vaginal antibody of patients with trichomoniasis is to a prominent surface immunogen of *Trichomonas vaginalis*. *Genitourin Med* **67**, 220-225
107. Hirt, R. P. (2013) *Trichomonas vaginalis* virulence factors: an integrative overview. *Sex Transm Infect* **89**, 439-443
108. Ahn, M. H., Song, H. O., and Ryu, J. S. (2008) *Trichomonas vaginalis*-induced neutrophil apoptosis causes anti-inflammatory cytokine production by human monocyte-derived macrophages. *Parasite Immunol* **30**, 410-416
109. Smale, M. C. a. S. T. (2000) *Transcriptional Regulation in Eukaryotes concepts, strategies and techniques*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
110. Griffiths AJF, M. J., Suzuki DT. (2000) An Introduction to Genetic Analysis. in *Transcription: an overview of gene regulation in eukaryotes* (edition, t. ed., W. H. Freeman, New York
111. Waldron, K. J., Rutherford, J. C., Ford, D., and Robinson, N. J. (2009) Metalloproteins and metal sensing. *Nature* **460**, 823-830
112. Shandilya, J., and Roberts, S. G. (2012) The transcription cycle in eukaryotes: from productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochim Biophys Acta* **1819**, 391-400
113. Yusuf, D., Butland, S. L., Swanson, M. I., Bolotin, E., Ticoll, A., Cheung, W. A., Zhang, X. Y., Dickman, C. T., Fulton, D. L., Lim, J. S., Schnabl, J. M., Ramos, O. H., Vasseur-Cognet, M., de Leeuw, C. N., Simpson, E. M., Ryffel, G. U., Lam, E. W., Kist, R., Wilson, M. S., Marco-Ferreres, R., Brosens, J. J., Beccari, L. L., Bovolenta, P., Benayoun, B. A., Monteiro, L. J., Schwenen, H. D., Grontved, L., Wederell, E., Mandrup, S., Veitia, R. A., Chakravarthy, H., Hoodless, P. A., Mancarelli, M. M., Torbett, B. E., Banham, A. H., Reddy, S. P., Cullum, R. L., Liedtke, M., Tschan, M. P., Vaz, M., Rizzino, A., Zannini, M., Fietze, S., Farnham, P. J., Eijkelenboom, A., Brown, P. J., Laperriere, D., Leprince, D., de Cristofaro, T., Prince, K. L., Putker, M., del Peso, L., Camenisch, G., Wenger, R. H., Mikula, M., Rozendaal, M., Mader, S., Ostrowski, J., Rhodes, S. J., Van Rechem, C., Boulay, G., Olechnowicz, S. W., Breslin, M. B., Lan, M. S., Nanan, K. K., Wegner, M., Hou, J., Mullen, R. D., Colvin, S. C., Noy, P. J., Webb, C. F., Witek, M. E., Ferrell, S., Daniel, J. M., Park, J., Waldman, S. A., Peet, D. J., Taggart, M., Jayaraman, P. S., Karrich, J. J., Blom, B., Vesuna, F., O'Geen, H., Sun, Y., Gronostajski, R. M., Woodcroft, M. W., Hough, M. R., Chen, E., Europe-Finner, G. N., Karolczak-Bayatti, M., Bailey, J., Hankinson, O., Raman, V., LeBrun, D. P., Biswal, S., Harvey, C. J., DeBruyne, J. P., Hogenesch, J. B., Hevner, R. F., Heligon, C., Luo, X. M., Blank, M. C., Millen, K. J., Sharlin, D. S., Forrest, D., Dahlman-Wright, K., Zhao, C., Mishima, Y., Sinha, S., Chakrabarti, R., Portales-Casamar, E., Sladek, F. M., Bradley, P. H., and Wasserman, W. W. (2012) The transcription factor encyclopedia. *Genome Biol* **13**, R24
114. Spitz, F., and Furlong, E. E. (2012) Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat Rev Genet* **13**, 613-626
115. Barrett, L. W., Fletcher, S., and Wilton, S. D. (2012) Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell Mol Life Sci* **69**, 3613-3634
116. Topisirovic, I., Svitkin, Y. V., Sonenberg, N., and Shatkin, A. J. (2011) Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**, 277-298
117. Hocine, S., Singer, R. H., and Grunwald, D. (2010) RNA processing and export. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000752
118. Pantopoulos, K. (2004) Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann N Y Acad Sci* **1012**, 1-13

119. Matoulkova, E., Michalova, E., Vojtesek, B., and Hrstka, R. (2012) The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biol* **9**, 563-576
120. Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S., and Pesole, G. (2002) Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol* **3**, REVIEWS0004
121. Dasgupta, T., and Ladd, A. N. (2012) The importance of CELF control: molecular and biological roles of the CUG-BP, Elav-like family of RNA-binding proteins. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3**, 104-121
122. Grillo, G., Turi, A., Licciulli, F., Mignone, F., Liuni, S., Banfi, S., Gennarino, V. A., Horner, D. S., Pavesi, G., Picardi, E., and Pesole, G. (2010) UTRdb and UTRsite (RELEASE 2010): a collection of sequences and regulatory motifs of the untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Nucleic acids research* **38**, D75-80
123. Day, D. A., and Tuite, M. F. (1998) Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *The Journal of endocrinology* **157**, 361-371
124. Gruber, A. R., Fallmann, J., Kratochvill, F., Kovarik, P., and Hofacker, I. L. (2011) AREsite: a database for the comprehensive investigation of AU-rich elements. *Nucleic acids research* **39**, D66-69
125. Ross, J. (1995) mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev* **59**, 423-450
126. Fallmann, J., Sedlyarov, V., Tanzer, A., Kovarik, P., and Hofacker, I. L. (2016) AREsite2: an enhanced database for the comprehensive investigation of AU/GU/U-rich elements. *Nucleic Acids Res* **44**, D90-95
127. Ross, J. (1996) Control of messenger RNA stability in higher eukaryotes. *Trends Genet* **12**, 171-175
128. Roy, N., Laflamme, G., and Raymond, V. (1992) 5' untranslated sequences modulate rapid mRNA degradation mediated by 3' AU-rich element in v-/c-fos recombinants. *Nucleic Acids Res* **20**, 5753-5762
129. Winstall, E., Gamache, M., and Raymond, V. (1995) Rapid mRNA degradation mediated by the c-fos 3' AU-rich element and that mediated by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor 3' AU-rich element occur through similar polysome-associated mechanisms. *Mol Cell Biol* **15**, 3796-3804
130. Palanisamy, V., Jakymiw, A., Van Tubergen, E. A., D'Silva, N. J., and Kirkwood, K. L. (2012) Control of cytokine mRNA expression by RNA-binding proteins and microRNAs. *J Dent Res* **91**, 651-658
131. Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., and Beeregowda, K. N. (2014) Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol* **7**, 60-72
132. Maret, W., and Li, Y. (2009) Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chem Rev* **109**, 4682-4707
133. Rutherford, J. C., and Bird, A. J. (2004) Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot Cell* **3**, 1-13
134. Flora, G., Gupta, D., and Tiwari, A. (2012) Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdiscip Toxicol* **5**, 47-58
135. Flora, S. J., Mittal, M., and Mehta, A. (2008) Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res* **128**, 501-523
136. Porcheron, G., Garenaux, A., Proulx, J., Sabri, M., and Dozois, C. M. (2013) Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Front Cell Infect Microbiol* **3**, 90
137. Zhao, H., and Eide, D. J. (1997) Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **17**, 5044-5052

138. Gralla, E. B., Thiele, D. J., Silar, P., and Valentine, J. S. (1991) ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8558-8562
139. Wang, Y., Lorenzi, I., Georgiev, O., and Schaffner, W. (2004) Metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1) selects different types of metal response elements at low vs. high zinc concentration. *Biol Chem* **385**, 623-632
140. Laity, J. H., and Feng, L. S. (2010) Preparation and zinc-binding properties of multi-fingered zinc-sensing domains. *Methods Mol Biol* **649**, 411-435
141. Wang, Z., Feng, L. S., Matskevich, V., Venkataraman, K., Parasuram, P., and Laity, J. H. (2006) Solution structure of a Zap1 zinc-responsive domain provides insights into metalloregulatory transcriptional repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **357**, 1167-1183
142. Ward, N., and Moreno-Hagelsieb, G. (2014) Quickly finding orthologs as reciprocal best hits with BLAT, LAST, and UBLAST: how much do we miss? *PLoS One* **9**, e101850
143. Karplus, K., Barrett, C., and Hughey, R. (1998) Hidden Markov models for detecting remote protein homologies. *Bioinformatics* **14**, 846-856
144. Krishna, S. S., Majumdar, I., and Grishin, N. V. (2003) Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucleic Acids Res* **31**, 532-550
145. Iuchi, S. (2001) Three classes of C2H2 zinc finger proteins. *Cell Mol Life Sci* **58**, 625-635
146. Klug, A. (2010) The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annu Rev Biochem* **79**, 213-231
147. Elrod-Erickson, M., Benson, T. E., and Pabo, C. O. (1998) High-resolution structures of variant Zif268-DNA complexes: implications for understanding zinc finger-DNA recognition. *Structure* **6**, 451-464
148. Shastry, B. S. (1996) Transcription factor IIIA (TFIIIA) in the second decade. *J Cell Sci* **109 ( Pt 3)**, 535-539
149. Laity, J. H., Lee, B. M., and Wright, P. E. (2001) Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 39-46
150. Nagase, H., and Woessner, J. F., Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. *The Journal of biological chemistry* **274**, 21491-21494
151. Rawlings, N. D., Barrett, A. J., and Bateman, A. (2012) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research* **40**, D343-350
152. Rawlings, N. D., Waller, M., Barrett, A. J., and Bateman, A. (2014) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* **42**, D503-509
153. Fanjul-Fernandez, M., Folgueras, A. R., Cabrera, S., and Lopez-Otin, C. (2010) Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta* **1803**, 3-19
154. Nagase, H. (2001) Metalloproteases. *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 21**, Unit 21 24
155. Hooper, N. M. (1994) Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett* **354**, 1-6
156. Charlier, P., Dideberg, O., Jamouille, J. C., Frere, J. M., Ghuysen, J. M., Dive, G., and Lamotte-Brasseur, J. (1984) Active-site-directed inactivators of the Zn<sup>2+</sup>-containing D-alanyl-D-alanine-cleaving carboxypeptidase of *Streptomyces albus* G. *Biochem J* **219**, 763-772
157. Keck, W., van Leeuwen, A. M., Huber, M., and Goodell, E. W. (1990) Cloning and characterization of mepA, the structural gene of the penicillin-insensitive murein endopeptidase from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **4**, 209-219
158. Yan, C., and Boyd, D. D. (2007) Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *Journal of cellular physiology* **211**, 19-26
159. Aupperle, H., Thielebein, J., Kiefer, B., Marz, I., Dinges, G., Schoon, H. A., and Schubert, A. (2009) Expression of genes encoding matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in normal and diseased canine mitral valves. *J Comp Pathol* **140**, 271-277

160. Gomez, C., Esther Ramirez, M., Calixto-Galvez, M., Medel, O., and Rodriguez, M. A. (2010) Regulation of gene expression in protozoa parasites. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 726045
161. Liston, D. R., and Johnson, P. J. (1998) Gene Transcription in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol Today* **14**, 261-265
162. Smith, A. J., Chudnovsky, L., Simoes-Barbosa, A., Delgadillo-Correa, M. G., Jonsson, Z. O., Wohlschlegel, J. A., and Johnson, P. J. (2011) Novel core promoter elements and a cognate transcription factor in the divergent unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Mol Cell Biol* **31**, 1444-1458
163. Tsai, C. D., Liu, H. W., and Tai, J. H. (2002) Characterization of an iron-responsive promoter in the protozoan pathogen *Trichomonas vaginalis*. *J Biol Chem* **277**, 5153-5162
164. Jiang, I., Tsai, C. K., Chen, S. C., Wang, S. H., Amiraslanov, I., Chang, C. F., Wu, W. J., Tai, J. H., Liaw, Y. C., and Huang, T. H. (2011) Molecular basis of the recognition of the ap65-1 gene transcription promoter elements by a Myb protein from the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Nucleic Acids Res* **39**, 8992-9008
165. Ong, S. J., Huang, S. C., Liu, H. W., and Tai, J. H. (2004) Involvement of multiple DNA elements in iron-inducible transcription of the ap65-1 gene in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol* **52**, 1721-1730
166. Torres-Romero, J. C., and Arroyo, R. (2009) Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE/IRP-like system. *Infect Genet Evol* **9**, 1065-1074
167. Figueroa-Angulo, E. E., Calla-Choque, J. S., Mancilla-Olea, M. I., and Arroyo, R. (2015) RNA-Binding Proteins in *Trichomonas vaginalis*: Atypical Multifunctional Proteins. *Biomolecules* **5**, 3354-3395
168. Garcia, A. F., Benchimol, M., and Alderete, J. F. (2005) *Trichomonas vaginalis* polyamine metabolism is linked to host cell adherence and cytotoxicity. *Infect Immun* **73**, 2602-2610
169. Carvajal-Gamez, B. I., Arroyo, R., Camacho-Nuez, M., Lira, R., Martinez-Benitez, M., and Alvarez-Sanchez, M. E. (2011) Putrescine is required for the expression of eif-5a in *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* **180**, 8-16
170. Alvarez-Sanchez, M. E., Carvajal-Gamez, B. I., Solano-Gonzalez, E., Martinez-Benitez, M., Garcia, A. F., Alderete, J. F., and Arroyo, R. (2008) Polyamine depletion down-regulates expression of the *Trichomonas vaginalis* cytotoxic CP65, a 65-kDa cysteine proteinase involved in cellular damage. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 2442-2451
171. Carvajal-Gamez, B. I., Carrillo, L. V., Torres-Romero, J. C., Camacho-Nuez, M., Ponce-Regalado, M. D., Camarillo, C. L., and Alvarez-Sanchez, M. E. (2016) Recombinant *Trichomonas vaginalis* eIF-5A protein expressed from a eukaryotic system binds specifically to mammalian and putative trichomonal eIF-5A response elements (EREs). *Parasitol Int* **65**, 625-631
172. Parker, M. T., and Gerner, E. W. (2002) Polyamine-mediated post-transcriptional regulation of COX-2. *Biochimie* **84**, 815-819
173. Carvajal-Gamez, B. I., Quintas-Granados, L. I., Arroyo, R., Vazquez-Carrillo, L. I., Ramon-Luing Lde, L., Carrillo-Tapia, E., and Alvarez-Sanchez, M. E. (2014) Putrescine-dependent re-localization of TvCP39, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity. *PLoS One* **9**, e107293
174. Iyer, L. M., Anantharaman, V., Wolf, M. Y., and Aravind, L. (2008) Comparative genomics of transcription factors and chromatin proteins in parasitic protists and other eukaryotes. *Int J Parasitol* **38**, 1-31
175. Lau, A. O., Liston, D. R., Vanacova, S., and Johnson, P. J. (2003) *Trichomonas vaginalis* initiator binding protein, IBP39, contains a novel DNA binding motif. *Mol Biochem Parasitol* **130**, 167-171

176. Lau, A. O., Smith, A. J., Brown, M. T., and Johnson, P. J. (2006) Trichomonas vaginalis initiator binding protein (IBP39) and RNA polymerase II large subunit carboxy terminal domain interaction. *Mol Biochem Parasitol* **150**, 56-62
177. Bozner, P., and Demes, P. (1991) Proteinases in Trichomonas vaginalis and Tritrichomonas mobilensis are not exclusively of cysteine type. *Parasitology* **102 Pt 1**, 113-115
178. Brown, M. T., Goldstone, H. M., Bastida-Corcuera, F., Delgadillo-Correa, M. G., McArthur, A. G., and Johnson, P. J. (2007) A functionally divergent hydrogenosomal peptidase with protomitochondrial ancestry. *Mol Microbiol* **64**, 1154-1163
179. Quintas-Granados, L. I., Villalpando, J. L., Vazquez-Carrillo, L. I., Arroyo, R., Mendoza-Hernandez, G., and Alvarez-Sanchez, M. E. (2013) TvMP50 is an immunogenic metalloproteinase during male trichomoniasis. *Mol Cell Proteomics* **12**, 1953-1964
180. Quan, J. H., Choi, I. W., Yang, J. B., Zhou, W., Cha, G. H., Zhou, Y., Ryu, J. S., and Lee, Y. H. (2014) Trichomonas vaginalis metalloproteinase induces mTOR cleavage of SiHa cells. *Korean J Parasitol* **52**, 595-603
181. Aurrecochea, C., Brestelli, J., Brunk, B. P., Carlton, J. M., Dommer, J., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., Gingle, A., Grant, G., Harb, O. S., Heiges, M., Innamorato, F., Iodice, J., Kissinger, J. C., Kraemer, E., Li, W., Miller, J. A., Morrison, H. G., Nayak, V., Pennington, C., Pinney, D. F., Roos, D. S., Ross, C., Stoeckert, C. J., Jr., Sullivan, S., Treatman, C., and Wang, H. (2009) GiardiaDB and TrichDB: integrated genomic resources for the eukaryotic protist pathogens Giardia lamblia and Trichomonas vaginalis. *Nucleic Acids Res* **37**, D526-530
182. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T. L. (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **13**, 134
183. Salles, F. J., and Strickland, S. (1995) Rapid and sensitive analysis of mRNA polyadenylation states by PCR. *PCR Methods Appl* **4**, 317-321
184. Lichtlen, P., Wang, Y., Belser, T., Georgiev, O., Certa, U., Sack, R., and Schaffner, W. (2001) Target gene search for the metal-responsive transcription factor MTF-1. *Nucleic Acids Res* **29**, 1514-1523
185. Villalpando, J. L., Arreola, R., Puente-Rivera, J., Azuara-Liceaga, E., Valdes, J., Lopez-Canovas, L., Villalobos-Osnaya, A., and Alvarez-Sanchez, M. E. (2017) TvZNF1 is a C2H2 zinc finger protein of Trichomonas vaginalis. *Biometals* **30**, 861-872
186. Matys, V., Fricke, E., Geffers, R., Gossling, E., Haubrock, M., Hehl, R., Hornischer, K., Karas, D., Kel, A. E., Kel-Margoulis, O. V., Kloos, D. U., Land, S., Lewicki-Potapov, B., Michael, H., Munch, R., Reuter, I., Rotert, S., Saxel, H., Scheer, M., Thiele, S., and Wingender, E. (2003) TRANSFAC: transcriptional regulation, from patterns to profiles. *Nucleic Acids Res* **31**, 374-378
187. Giedroc, D. P., Chen, X., and Apuy, J. L. (2001) Metal response element (MRE)-binding transcription factor-1 (MTF-1): structure, function, and regulation. *Antioxid Redox Signal* **3**, 577-596
188. Fuentes, V., Barrera, G., Sanchez, J., Hernandez, R., and Lopez-Villasenor, I. (2012) Functional analysis of sequence motifs involved in the polyadenylation of Trichomonas vaginalis mRNAs. *Eukaryot Cell* **11**, 725-734
189. Galtier, N., Gouy, M., and Gautier, C. (1996) SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* **12**, 543-548
190. Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**, 3406-3415
191. Alva, V., Nam, S. Z., Soding, J., and Lupas, A. N. (2016) The MPI bioinformatics Toolkit as an integrative platform for advanced protein sequence and structure analysis. *Nucleic Acids Res* **44**, W410-415
192. Hildebrand, A., Remmert, M., Biegert, A., and Soding, J. (2009) Fast and accurate automatic structure prediction with HHpred. *Proteins* **77 Suppl 9**, 128-132

193. Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., and Deleage, G. (2000) NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci* **25**, 147-150
194. Chou, P. Y., and Fasman, G. D. (1974) Prediction of protein conformation. *Biochemistry* **13**, 222-245
195. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **14**, 33-38, 27-38
196. Frishman, D., and Argos, P. (1995) Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins* **23**, 566-579
197. Langmade, S. J., Ravindra, R., Daniels, P. J., and Andrews, G. K. (2000) The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J Biol Chem* **275**, 34803-34809
198. Bittel, D. C., Smirnova, I. V., and Andrews, G. K. (2000) Functional heterogeneity in the zinc fingers of metalloregulatory protein metal response element-binding transcription factor-1. *J Biol Chem* **275**, 37194-37201
199. Chen, X., Chu, M., and Giedroc, D. P. (1999) MRE-Binding transcription factor-1: weak zinc-binding finger domains 5 and 6 modulate the structure, affinity, and specificity of the metal-response element complex. *Biochemistry* **38**, 12915-12925
200. Carvajal-Gamez, B., Arroyo, R., Lira, R., Lopez-Camarillo, C., and Alvarez-Sanchez, M. E. (2010) Identification of two novel *Trichomonas vaginalis* eif-5a genes. *Infect Genet Evol* **10**, 284-291
201. Patel, A., Horton, J. R., Wilson, G. G., Zhang, X., and Cheng, X. (2016) Structural basis for human PRDM9 action at recombination hot spots. *Genes Dev* **30**, 257-265
202. Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C. J., Lu, S., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Lu, F., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zheng, C., Geer, L. Y., and Bryant, S. H. (2017) CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res* **45**, D200-D203
203. E., V.-V. Y. (2015) *Evaluación del efecto del Zn<sup>2+</sup> en la adhesión y citotoxicidad de Trichomonas vaginalis durante su interacción con células DU-145*. Maestro en Ciencias Universidad Autónoma de la Ciudad de México
204. Leherker, M. W., Arroyo, R., and Alderete, J. F. (1991) The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *J Exp Med* **174**, 311-318
205. Quon, D. V., Delgadillo, M. G., and Johnson, P. J. (1996) Transcription in the early diverging eukaryote *Trichomonas vaginalis*: an unusual RNA polymerase II and alpha-amanitin-resistant transcription of protein-coding genes. *J Mol Evol* **43**, 253-262
206. Sharova, L. V., Sharov, A. A., Nedorezov, T., Piao, Y., Shaik, N., and Ko, M. S. (2009) Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Res* **16**, 45-58
207. Meade, J. C., and Carlton, J. M. (2013) Genetic diversity in *Trichomonas vaginalis*. *Sex Transm Infect* **89**, 444-448
208. Wingender, E., Chen, X., Hehl, R., Karas, H., Liebich, I., Matys, V., Meinhardt, T., Pruss, M., Reuter, I., and Schacherer, F. (2000) TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res* **28**, 316-319
209. Kim, J. H., Jeon, J., Shin, M., Won, Y., Lee, M., Kwak, J. S., Lee, G., Rhee, J., Ryu, J. H., Chun, C. H., and Chun, J. S. (2014) Regulation of the catabolic cascade in osteoarthritis by the zinc-ZIP8-MTF1 axis. *Cell* **156**, 730-743
210. Lopez-Camarillo, C., Luna-Arias, J. P., Marchat, L. A., and Orozco, E. (2003) EhPgp5 mRNA stability is a regulatory event in the *Entamoeba histolytica* multidrug resistance phenotype. *J Biol Chem* **278**, 11273-11280

211. ter Kuile, B. H., and Salles, F. J. (2000) The length of the combined 3' untranslated region and poly(A) tail does not control rates of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA translation in three species of parasitic protists. *J Bacteriol* **182**, 3587-3589
212. Mathews, M. B., and Hershey, J. W. (2015) The translation factor eIF5A and human cancer. *Biochim Biophys Acta* **1849**, 836-844
213. Kuge, H., and Richter, J. D. (1995) Cytoplasmic 3' poly(A) addition induces 5' cap ribose methylation: implications for translational control of maternal mRNA. *EMBO J* **14**, 6301-6310
214. Voeltz, G. K., Ongkasuwan, J., Standart, N., and Steitz, J. A. (2001) A novel embryonic poly(A) binding protein, ePAB, regulates mRNA deadenylation in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev* **15**, 774-788
215. Gray, N. K., Collier, J. M., Dickson, K. S., and Wickens, M. (2000) Multiple portions of poly(A)-binding protein stimulate translation in vivo. *EMBO J* **19**, 4723-4733
216. Wakiyama, M., Imataka, H., and Sonenberg, N. (2000) Interaction of eIF4G with poly(A)-binding protein stimulates translation and is critical for *Xenopus* oocyte maturation. *Curr Biol* **10**, 1147-1150
217. Tangsombatvichit, P., Semkiv, M. V., Sibirny, A. A., Jensen, L. T., Ratanakhanokchai, K., and Soontorngun, N. (2015) Zinc cluster protein Znf1, a novel transcription factor of non-fermentative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **15**
218. Bird, A. J., Zhao, H., Luo, H., Jensen, L. T., Srinivasan, C., Evans-Galea, M., Winge, D. R., and Eide, D. J. (2000) A dual role for zinc fingers in both DNA binding and zinc sensing by the Zap1 transcriptional activator. *EMBO J* **19**, 3704-3713
219. Innis, C. A., Shi, J., and Blundell, T. L. (2000) Evolutionary trace analysis of TGF-beta and related growth factors: implications for site-directed mutagenesis. *Protein Eng* **13**, 839-847
220. Pavletich, N. P., and Pabo, C. O. (1991) Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* **252**, 809-817
221. Garton, M., Najafabadi, H. S., Schmitges, F. W., Radovani, E., Hughes, T. R., and Kim, P. M. (2015) A structural approach reveals how neighbouring C2H2 zinc fingers influence DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res* **43**, 9147-9157
222. Lichtarge, O., Bourne, H. R., and Cohen, F. E. (1996) An evolutionary trace method defines binding surfaces common to protein families. *J Mol Biol* **257**, 342-358
223. Elrod-Erickson, M., Rould, M. A., Nekludova, L., and Pabo, C. O. (1996) Zif268 protein-DNA complex refined at 1.6 Å: a model system for understanding zinc finger-DNA interactions. *Structure* **4**, 1171-1180
224. Vorackova, I., Suchanova, S., Ulbrich, P., Diehl, W. E., and Ruml, T. (2011) Purification of proteins containing zinc finger domains using immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif* **79**, 88-95
225. Kothinti, R., Tabatabai, N. M., and Petering, D. H. (2011) Electrophoretic mobility shift assay of zinc finger proteins: competition for Zn(2+) bound to Sp1 in protocols including EDTA. *J Inorg Biochem* **105**, 569-576
226. Hardyman, J. E., Tyson, J., Jackson, K. A., Aldridge, C., Cockell, S. J., Wakeling, L. A., Valentine, R. A., and Ford, D. (2016) Zinc sensing by metal-responsive transcription factor 1 (MTF1) controls metallothionein and ZnT1 expression to buffer the sensitivity of the transcriptome response to zinc. *Metallomics*

### **30. Apéndices.**

#### **30.1. Apéndice I. Medios de cultivos y suplementos**

##### **Medio TYM**

Bacto triptona	20g
Extracto de levadura	10g
Maltosa	5g
Cisteína	1g
Ácido ascórbico	0.2g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.8g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.8 g

Estos componentes se disuelven en 800 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 6.2 y se afora a 1 L, se filtra y se esteriliza por autoclave.

##### **Medio DMEM alto en glucosa**

Hepes	5.96g
Bicarbonato de sodio	3.7g

Los componentes se combinan con un sobre de medio Dulbecco's Modified en 700 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 7.2 y se afora 900 ml y se esteriliza por filtración de 0.22  $\mu$ M.

##### **Medio DMEM bajo en glucosa**

Bicarbonato de sodio	1.5 g
----------------------	-------

Los componentes se combinan con un sobre de medio Dulbecco's Modified en 800 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 7.2 y se afora 1000 ml y se esteriliza por filtración de 0.22  $\mu$ M.

##### **Medio Luria Bertani (Sigma)**

LB (sigma) 20 g disolver en un 1 litro. Por último se esteriliza en autoclave

##### **Ampicilina (100 $\mu$ g/ml)**

Se filtra por 0.22  $\mu$ m, para esterilizar y se protege de la luz.

##### **Kanamicina (25 $\mu$ g/ml)**

Se filtra por 0.22  $\mu$ m, para esterilizar y se protege de la luz.

### **Stock de IPTG 100 mM**

Se filtra por 0.22  $\mu\text{m}$ , para esterilizar y se protege de la luz.

### **Placas de LB-Ampicilina**

20 g de LB agar bacteriológico, después de haberlo esterilizado por autoclave y a una temperatura de 45 °C se adiciona ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y se transfiere a cajas de petri esteriles.

### **Actinomicina D (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )**

Actinomicina D disolver 10 mg en 1 ml de DMSO (sigma), alicuotar y guardar a -20 °C por 6 meses.

### **ZnCl<sub>2</sub> al 25 mM**

Pesar 0.038g de ZnCl<sub>2</sub> (Sigma) disolverlo en 10 ml de medio TYM y esterilizar por filtración a 0.22  $\mu\text{M}$  y almacenar a 4°C máximo por 2 semanas.

## **30.2. Apéndice II. Ácidos nucleicos**

### **Gel de agarosa al % (peso/volumen)**

Agarosa (Gibco BRL)	% del gel = gramos de agarosa
TAE 1X	100 ml
Amortiguador de TAE 50X	
Trizma Base (Sigma)	242 g
Ácido Acético glacial	57.1 ml
EDTA (Sigma)	37.2 g

se ajusta el pH a 8.5 y se afora a 1 litro con H<sub>2</sub>O destilada,

### **Extracción de DNA**

#### **PBS 1X**

NaCl (MERCK)	8 g
KCl	8 g
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.65 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g

Se ajusta el pH a 7.4 con NaOH o HCl se afora a 1 litro con agua destilada y se esteriliza por autoclave.

### **Amortiguador de lisis**

SDS (Sigma)	0.2 %
NaCl	100 mM
EDTA	100 mM, pH 8.0
Tris-HCl	10 mM, pH 8.0

### **Etanol 70%**

Para 50 ml

Etanol al 100%	35 %
H <sub>2</sub> O destilada	15 %

### **Tampón de carga ácidos nucleicos**

Tris-HCl (pH 7.6)	10 mM
Azul de Bromofenol .....	0.03%,
Xilene cianol	0.03%,
glycerol	60%.
EDTA	60 mM

### **Extracción de RNA total**

### **Agua de DEPC**

1 ml de DEPC (Sigma) e un litro de agua se deja agitando toda la noche y se esteriliza por autoclave.

### **Etanol al 70 %**

Etanol absoluto	700 ml
H <sub>2</sub> O-DEPC	300 ml

### **TBE Tampón de corrida de electroforesis (10X)**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad (por 1 L)</b>	<b>Concentración final</b>
Tris base	121.1 g	1 M
Ácido Borico	61.8 g	1 M
EDTA	7.4 g	0.02 M
Preparar con H <sub>2</sub> O libre de RNAasas. Diluir 100 mL y aforar a 2L (0.5X) hacer un gel y utilizar como tampón de corrida. Almacenar a temperatura ambiente.		

### 30.3. Apéndice III. Proteínas

#### Solución stock de acrilamida/bisacrilamida (AB-3)

Para la acrilamida-bis acrilamida (AB)-3 solución stock (49.5% T, 3% C mezclar), la cual es normalmente utilizada, se disuelven 48 g de acrilamida y 1.5 g de bis acrilamida in 50 ml es disuelta y después es aforada a 100 ml.

<b>Tampones de electrodos y gel amortiguador</b>			
<b>Componente</b>	<b>Tampón ánodo (10x)</b>	<b>Tampón cátodo (10x)</b>	<b>Buffer gel (3X)</b>
Tris (M)	1.0	1.0	3.0
Triscina (M)	-	1.0	-
HCl (M)	0.225	-	1.0
SDS (%)	-	1.0	0.3
pH	8.9	~8.25	8.45

<b>Tricina SDS-PAGE</b>					
<b>Componente</b>	<b>Unidad de volumen</b>	<b>Gel para muestra 4%</b>	<b>Gel 10%</b>	<b>Gel 16%</b>	<b>Gel 16%/6M urea</b>
<b>AB-3<sup>1</sup></b>	ml	1	6	10	10
<b>Amortiguador gel (3X)</b>	ml	3	10	10	10
<b>Glicerol</b>		-	3	3	-
<b>Urea</b>	(g)	-	-	-	10.8
<b>C.B.P. volumen final</b>	ml	12	30	30	30
<b>APS 10%</b>	μL	90	150	100	100
<b>TEWED</b>	μL	9	15	10	10

---

<sup>1</sup> AB-3 Solución stock. Para la acrilamida-bis acrilamida (AB)-3 solución stock (49.5% T, 3% C mixture), la cual es normalmente utilizada, se disuelven 48 g de acrilamida y 1.5 g de bis acrilamida in 50 ml es disuelta y después es aforada a 100 ml.

<b>SDS-PAGE (sistema de Laemmli)</b>				
<b>Gel separador</b>				
<b>Componente</b>	<b>15%</b>	<b>12%</b>	<b>10%</b>	<b>7.5%</b>
30 % acrilamida/bisacrilamida	7.5 ml	6.0ml	5.0 ml	3.75 ml
4x 1.5 M Buffer pH 8.8 (SDS 10%)	3.75 ml	3.75 ml	3.75 ml	3.75 ml
Agua	3.75 ml	5.25 ml	6.25 ml	7.50 ml
10% APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEWED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Volumen final 15 ml.				
<b>Gel concentrador</b>				
Componente	Volumen			
Agua desionizada	3.05 ml			
4x buffer 1.5 M pH 6.8	1.25 ml			
30 % acrilamida/bisacrilamida	0.67 ml			
10% APS	25 µL			
TEMED	5.0 µL			
Volumen final	5.27 ml			

#### **Solución al 30% de acrilamida-bisacrilamida.**

29.2 g de acrilamida y 0.8 g de N'-bis-metilen-acrilamida

Disolver y aforar hasta 100 ml con agua desionizada. Almacenar en la oscuridad a 4 ° C.

#### **Tris-base 4x, pH 8.8 (1.5 M Tris-HCl, 0.4 % SDS)**

18.17 g de Tris base

Ajustar el pH a 8.8 con HCl .

4.0 ml 10% SDS. Aforar hasta 100 ml.

#### **Tris-base 4x, pH 6.8 (1.5 M Tris-HCl, 0.4 % SDS)**

6.06 g de Tris base

Ajustar el pH a 6.8 con HCl

4.0 ml 10% SDS. Aforar hasta 100 ml

#### **Tampón de corrida Tris-glicina (4x)**

12 g de base Tris

57.6 g de glicina

Diluir a 1000 ml. Almacenar a 4 ° C.

#### **Tampón de muestra (BX5x)**

3.9 ml de agua desionizada

1.0 ml 0,5 M Tris, pH 6,8

0.8 ml de glicerol

1.6 ml 10% SDS

0.4 ml de 2-mercaptoetanol

0.4 ml 1% de azul de bromofenol  
Guardar en el congelador

**Amortiguador de muestra 2x (BX2X)**

Tris-base pH 6.8 (sigma)                      1.52 g

SDS (Sigma)                                      2 g

Disolver en 50 ml de agua destilada y ajustar a pH 6.8, posteriormente, adicionar 20 ml de Glicerol y Agua destilada (aforar a 100 ml)

**SDS 10%**

Disolver 50 g de SDS en 450 ml de agua desionizada con agitación suave y llevar a 500 ml. Almacenar a temperatura ambiente.

**Solución de persulfato de amonio 10% (APS)**

Disolver 0.1 g de APS (grado de electroforesis) en 1 ml de agua desionizada. Prepararlo diariamente.

**Solución colorante de proteínas (AZUL BRILLANTE DE Coomassie) 0.05%**

Metanol    500 ml

Ácido acético glaciado                      100 ml

Agua destilada                                400 ml

Azul de Coomassie                          0.5 g

Disolver toda la noche. Filtrar con papal filtro "Whatman" No. 1 Almacenar a temperatura ambiente

**Solución decolorante de geles de poliacrilamida**

Metanol    165 ml

Ácido acético glaciado                      50 ml

Agua destilada                                785 ml

Almacenar a temperatura ambiente.

**Tritón X-100 al 2.5%**

Tritón X-100                                  25 ml

H<sub>2</sub>O destilada    c.b.p. 1000 ml

**Amortiguador de transferencia**

Trizma-base 25 mM                          3.03g

Glicina    190 mM                              14.25 g

Metanol    20%                                    200 ml

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

### **TBS 1x pH 7.0**

Trizma-base 20 mM      2.42 g

NaCl 500mM            29.22 g

Disolver en 500 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.5 y aforar a 1 litro con agua destilada.

### **Cromatografía de afinidad a Níquel (Ni-NTA)**

<b>Amortiguador de Lisis</b>	<b>Amortiguador de lavados</b>	<b>Amortiguador de Elución</b>
------------------------------	--------------------------------	--------------------------------

**(1 litro):**

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

300 mM de NaCl

10 mM Imidazole

5 mM CaCl<sub>2</sub>

10 mM MgCl<sub>2</sub>

Ajustar pH a 8.0 usando NaOH.

**(1 litro):**

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

300 mM de NaCl

20 mM Imidazole

**(1 litro):**

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

300 mM de NaCl

250 mM Imidazole

### **Cromatografía de intercambio catiónico (IEX)**

**Tampón unión**

50 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**Tampón elución**

50 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 1 M NaCl

Los amortiguadores se ajustaron a pH 7.5 y fueron filtrados por 0.45 µm y desgasificados.

### **Cromatografía hidrofóbica (HIC)**

**Tampón unión**

50 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 1.5 M de  
(NH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>

**Tampón elución**

50 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

## Extractos nucleares y citoplasmáticos de trofozoitos de *T. vaginalis*

### Soluciones Stock (almacenar a 4°C)

Hepes	1M
NaCl	1M
EDTA	1M
EGTA	1M
DTT	1M
PMSF	0.2M
KCl	1M

Preparar las siguientes soluciones para extractos nucleares y citoplasmáticos:

#### Solución A

10mM Hepes (pH 7.9)

10mM KCl

0.1mM EDTA

0.1mM EGTA

1mM DTT

0.5 mM PMSF

#### Solución B

20mM Hepes (pH 7.9)

0.4M NaCl

1mM EDTA

1mM EGTA

1mM DTT

1mM PMSF

### Reactivos para ensayos de EMSA

#### Amortiguador de unión 2x

Hepes-KOH (pH7.8)	24mM
EDTA	1mM
MgCl <sub>2</sub>	8mM
KCl	2mM
DTT	2mM
glicerol	20%

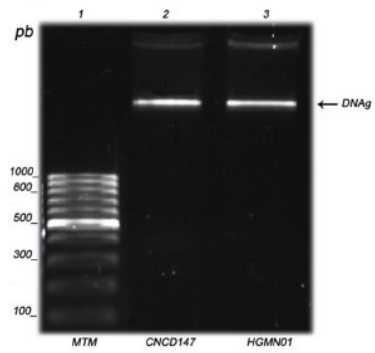
#### Tampón TM 10X                      1X

1M Tris HCl	pH 8.1	100µl
1M MgCl <sub>2</sub>		100µl
H <sub>2</sub> O		800µl
		-----
		1000µl

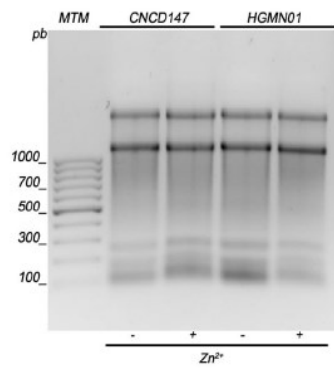
## 31. ANEXOS

### 31.1. ANEXO I. Ácidos nucleicos

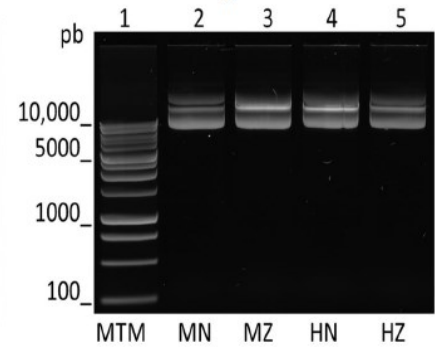
A) DNAg de aislados de *T. vaginalis*




B) RNA de aislados de *T. vaginalis*



C) DNAp de regiones 3'UTR de RNAm clonadas desde *T. vaginalis*



## TvZNF1 is a C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger protein of *Trichomonas vaginalis*

José Luis Villalpando · Rodrigo Arreola · Jonathan Puente-Rivera ·  
Elisa Azuara-Liceaga · Jesús Valdés · Lilia López-Canovas · Alma Villalobos-Osnaya ·  
Maria Elizabeth Alvarez-Sánchez 

Received: 8 September 2017 / Accepted: 19 September 2017  
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

**Abstract** The zinc fingers proteins (ZNF) are the largest family of DNA binding proteins and can act as transcriptional factors in eukaryotes. ZNF are implicated in activation in response to environmental stimulus by biometals such as Zn<sup>2+</sup>. Many of these proteins have the classical C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger motifs (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-ZNFm) of approximately 30 amino acids, where a Zn<sup>2+</sup> ion is coordinated by two cysteine and two histidine residues. *Trichomonas vaginalis* is a protozoan parasite that responds to environmental changes including Zn<sup>2+</sup>. Until now has not been

described any ZNF that could be involved in the regulation of genic expression of *T. vaginalis*. Here, we characterized in silico and experimentally an annotated ZNF (TvZNF1) from *T. vaginalis* and isolated the gene, *tvznf1* encoding it. TvZNF1 have eight C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-ZNFm with residues that maybe involved in the structural stability of DNA binding motifs. In this work we confirmed the Zn<sup>2+</sup> upregulation expression of *tvznf1* gene. Recombinant TvZNF1 was able to bind to specific DNA sequences according to EMSA assay. Additionally, we demonstrated that recombinant TvZNF1 bind to MRE signature in vitro, which strongly suggests its role in transcriptional regulation, similar to the one observed for mammalian MTF-1. This result suggested a conserved mechanism of genic regulation mediated by ZNFs in *T. vaginalis*.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10534-017-0053-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. L. Villalpando · J. Puente-Rivera ·  
E. Azuara-Liceaga · L. López-Canovas ·  
A. Villalobos-Osnaya · M. E. Alvarez-Sánchez (✉)  
Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México (UACM), San Lorenzo # 290,  
Col. Del Valle, 03100 Mexico City, Mexico  
e-mail: maria.alvarez@uacm.edu.mx

R. Arreola  
Psychiatric Genetics Department, Clinical Research  
Branch, National Institute of Psychiatry, “Ramón de la  
Fuente”, Calzada México-Xochimilco 101, Colonia San  
Lorenzo Huipulco, Tlalpan, 14370 México City, DF,  
Mexico

J. Valdés  
Department of Biochemistry, Centro de Investigación y de  
Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional,  
México City, Mexico

**Keywords** *Trichomonas vaginalis* · C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> Zinc  
finger protein · DNA binding protein · TvZNF1

### Abbreviations

ZNF	Zinc finger protein
ZNFm	Zinc finger protein domain(s)
domain	
C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -ZNFm	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> zinc finger motif(s)
TvZNF1	Zinc finger protein of <i>Trichomonas vaginalis</i> TvZNFm1-8, specific domain of TvZNF1
rTvZNF1	Recombinant TvZNF1



## *Trichomonas vaginalis* metalloproteinase TvMP50 is a monomeric Aminopeptidase P-like enzyme

Rodrigo Arreola<sup>1</sup> · José Luis Villalpando<sup>2</sup> · Jonathan Puente-Rivera<sup>2</sup> · Jorge Morales-Montor<sup>3</sup> · Enrique Rudiño-Piñera<sup>4</sup> · María Elizabeth Alvarez-Sánchez<sup>2</sup>

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

### Abstract

Previously, metalloproteinase was isolated and identified from *Trichomonas vaginalis*, belonging to the aminopeptidase P-like metalloproteinase subfamily A/B, family M24 of clan MG, named TvMP50. The native and recombinant TvMP50 showed proteolytic activity, determined by gelatin zymogram, and a 50 kDa band, suggesting that TvMP50 is a monomeric active enzyme. This was an unexpected finding since other Xaa-Pro aminopeptidases/prolidases are active as a biological unit formed by dimers/tetramers. In this study, the evolutionary history of TvMP50 and the preliminary crystal structure of the recombinant enzyme determined at 3.4 Å resolution is reported. TvMP50 was shown to be a type of putative, eukaryotic, monomeric aminopeptidase P, and the crystallographic coordinates showed a monomer on a “pseudo-homodimer” array on the asymmetric unit that resembles the quaternary structure of the M24B dimeric family and suggests a homodimeric aminopeptidase P-like enzyme as a likely ancestor. Interestingly, TvMP50 had a modified N-terminal region compared with other Xaa-Pro aminopeptidases/prolidases with three-dimensional structures; however, the formation of the standard dimer is structurally unstable in aqueous solution, and a comparably reduced number of hydrogen bridges and lack of saline bridges were found between subunits A/B, which could explain why TvMP50 portrays monomeric functionality. Additionally, we found that the *Parabasalia* group contains two protein lineages with a “pita bread” fold; the ancestral monomeric group 1 was probably derived from an ancestral dimeric aminopeptidase P-type enzyme, and group 2 has a probable dimeric kind of ancestral eukaryotic prolidase lineage. The implications of such hypotheses are also presented.

**Keywords** Metalloproteinase · Prolidases (Xaa-Pro dipeptidases, EC:3.4.13.9) and Xaa-Pro aminopeptidases (EC:3.4.11.9) · TvMP50 · Monomeric aminopeptidase P · *Trichomonas vaginalis* · M24B subfamily

✉ María Elizabeth Alvarez-Sánchez  
elizabeth2@gmail.com

Rodrigo Arreola  
lahunsotz@yahoo.com.mx

José Luis Villalpando  
nachfornez@gmail.com

Jonathan Puente-Rivera  
jo\_puenter@hotmail.com

Jorge Morales-Montor  
jmontor66@biomedicas.unam.mx

Enrique Rudiño-Piñera  
rudino@ibt.unam.mx

<sup>1</sup> Psychiatric Genetics Department, Clinical Research Branch, National Institute of Psychiatry, Ramón de la Fuente, Calzada México-Xochimilco 101, Colonia San Lorenzo Huipulco, Tlalpan, 14370 Mexico City, DF, Mexico

<sup>2</sup> Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), San Lorenzo # 290, Colonia Del Valle, CP 0310 Mexico City, Mexico

<sup>3</sup> Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap 70228 CP 04510 Mexico City, Mexico

<sup>4</sup> Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, 62210 Cuernavaca, MOR, Mexico



## Research Paper

## The 50 kDa metalloproteinase TvMP50 is a zinc-mediated *Trichomonas vaginalis* virulence factor



Jonathan Puente-Rivera<sup>a</sup>, José Luis Villalpando<sup>a</sup>, Alma Villalobos-Osnaya<sup>a</sup>,  
 Laura Isabel Vázquez-Carrillo<sup>a</sup>, Gloria León-Ávila<sup>b</sup>, María Dolores Ponce-Regalado<sup>c</sup>,  
 César López-Camarillo<sup>a</sup>, Jose Miguel Elizalde-Contreras<sup>d</sup>, Eliel Ruiz-May<sup>d</sup>, Rossana Arroyo<sup>e</sup>,  
 María Elizabeth Alvarez-Sánchez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Zoología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomás, Miguel Hidalgo, C.P. 11340 Ciudad de México, Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Clínicas, Centro Universitario de los Altos, Universidad de Guadalajara, Tepatitlán de Morelos, Jalisco, Mexico

<sup>d</sup> Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología A. C., Cluster BioMimic<sup>®</sup>, Carretera Antigua a Coatepec 351, Congregación El Haya, CP 91070 Xalapa, Veracruz, Mexico

<sup>e</sup> Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Av. IPN # 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Deleg. Gustavo A. Madero, CP 07360, Ciudad de México, Mexico

## ARTICLE INFO

## Keywords:

*Trichomonas vaginalis*

Zn<sup>2+</sup>

TvMP50

Cytotoxicity

DU145 cells

Virulence factor

## ABSTRACT

*Trichomonas vaginalis* is a protozoan parasite that can adapt to the trichomonocidal Zn<sup>2+</sup> concentrations of the male urogenital tract microenvironment. This adaptation is mediated by molecular mechanisms, including proteinase expression, that are regulated by cations such as Zn<sup>2+</sup>. Herein, we characterized the previously identified 50 kDa metalloproteinase aminopeptidase P (M24 family) member TvMP50 as a new Zn<sup>2+</sup>-mediated parasite virulence factor. Quantitative RT-PCR and indirect immunofluorescence assays corroborated the positive regulation of both *mp50* gene expression and native TvMP50 protein overexpression in the cytoplasm and secretion products of parasites grown in the presence of Zn<sup>2+</sup>. Furthermore, this active metalloproteinase was characterized as a new virulence factor by assaying cytotoxicity toward prostatic DU145 cell monolayers as well as the inhibition of parasite and secreted soluble protein proteolytic activity in the 50 kDa proteolytic region by the specific metalloproteinase inhibitor 1,10-phenanthroline and the chelating agents EDTA and EGTA. Parasite and secreted soluble protein cytotoxicity toward DU145 cells were reduced by treatment with an  $\alpha$ -rTvMP50 polyclonal antibody. Our results show that the metalloproteinase TvMP50 is a new virulence factor modulated by Zn<sup>2+</sup>, which is present during male trichomoniasis, possibly explaining *T. vaginalis* survival even within the adverse conditions of the male urogenital microenvironment.

## 1. Introduction

*Trichomonas vaginalis* is an extracellular protozoan parasite that causes an estimated 276 million annual cases of human trichomoniasis [1,2]. This parasite infects the human urogenital tract [3] and increases the predisposition to HIV infection and the development of cervical cancer [4]. As trichomoniasis is asymptomatic in the majority of cases in men [5], men are considered to be a reservoir [6,7]; however, infection is associated with a predisposition to the development of

prostate cancer [8]. *T. vaginalis* can adapt and colonize prostatic tissue even under the adverse microenvironmental conditions presented by prostatic fluid Zn<sup>2+</sup> concentrations (4–7 mM) [9–11]. The minimal trichomonocidal concentration (MTC) of Zn<sup>2+</sup> is 1.6 mM, and prostatitis with parasitic infection has been found in patients with Zn<sup>2+</sup> below the MTC [10–12]. The function of Zn<sup>2+</sup> is primarily related to the innate immune responses in the male urogenital tract, that hinder pathogen development [13]. Male trichomoniasis has been little studied, and the pathogenic mechanisms of *T. vaginalis* and factors leading to disease are

**Abbreviations:** BFS, bovine fetal serum; CDS, coding DNA sequence; CPs, cysteine proteinases; HIHS, heat inactivated horse serum; *mp50*, gene encoding the 50 kDa metalloproteinase; MS, mass spectrometry; nt, nucleotide; NMS, mouse preimmune serum; TCA, trichloroacetic acid; TvMP50, 50 kDa metalloproteinase of *Trichomonas vaginalis*; TYM, trypticase-yeast extract-maltose; WB, western blot;  $\alpha$ -rTvDHS, rabbit anti-recombinant DHS antibody;  $\alpha$ -rTvMP50, mouse anti-recombinant TvMP50 polyclonal antibody

\* Corresponding author at: Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), San Lorenzo #290, Col. Del Valle, CP 03100 Mexico City, Mexico.

E-mail addresses: [maria.alvarez@uacm.edu.mx](mailto:maria.alvarez@uacm.edu.mx), [elizabeth2@gmail.com](mailto:elizabeth2@gmail.com) (M.E. Alvarez-Sánchez).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2017.09.001>

Received 8 February 2017; Received in revised form 28 August 2017; Accepted 1 September 2017

Available online 05 September 2017

0166-6851/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Current Pharmaceutical Design



**Title:** Polyamine Transport and Synthesis in *Trichomonas vaginalis*: Potential Therapeutic Targets

**VOLUME:** 23 **ISSUE:** 23

**Author(s):** Maria Elizabeth Alvarez-Sanchez, Jose Luis Villalpando, Laura Itzel Quintas-Granados and Rossana Arroyo\*

**Affiliation:** Posgrado en Ciencias Genomicas, Universidad Autonoma de la Ciudad de Mexico (UACM), San Lorenzo # 290, Col. Del Valle, CP 03100. Mexico City, Posgrado en Ciencias Genomicas, Universidad Autonoma de la Ciudad de Mexico (UACM), San Lorenzo # 290, Col. Del Valle, CP 03100. Mexico City, Posgrado en Ciencias Genomicas, Universidad Autonoma de la Ciudad de Mexico (UACM), San Lorenzo # 290, Col. Del Valle, CP 03100. Mexico City, R.A. Av. IPN # 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Delg. Gustavo A. Madero, CP 07360, Mexico, D.F

**Keywords:** Hypusination machinery, ornithine decarboxylase (ODC), polyamines, polyamine oxidase (PAO), putrescine, spermine, spermidine, *Trichomonas vaginalis*.

**Abstract:** Polyamines are essential for many biological processes in all organisms. Here we show a current landscape of studies and strategies implemented for the study of polyamine metabolism, as well as molecular aspects that implicate the role of key enzymes, transport proteins, inhibitors, and the study of novel molecules as potential therapeutic targets. This review focused on the synthesis, interconversion and function of these molecules in *Trichomonas vaginalis*, a common sexually transmitted parasite of humans.

Close

Print this page



## Research paper

## Bifunctional activity of deoxyhypusine synthase/hydroxylase from *Trichomonas vaginalis*



Laura Itzel Quintas-Granados <sup>a,1</sup>, Bertha Isabel Carvajal Gamez <sup>a,1</sup>, Jose Luis Villalpando <sup>a</sup>, Jaime Ortega-Lopez <sup>b</sup>, Rossana Arroyo <sup>c</sup>, Elisa Azuara-Liceaga <sup>a</sup>, María Elizabeth Álvarez-Sánchez <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), San Lorenzo #290, Col. Del Valle, CP 03100, Mexico City, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN), Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco CP 07360, Mexico City, Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN), Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco CP 07360, Mexico City, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 19 May 2015

Accepted 22 September 2015

Available online 26 September 2015

## Keywords:

*Trichomonas vaginalis*

Deoxyhypusine synthase

Bifunctional activity

Eukaryotic translation initiation factor 5A

Eukaryotic-translation-initiation-factor-5A response element

## ABSTRACT

The *Trichomonas vaginalis* genome analysis suggested the presence of a putative deoxyhypusine synthase (TvDHS) that catalyzes the posttranslational modification of eIF-5A. Herein, we expressed and purified the recombinant TvDHS (rTvDHS) protein (43 kDa) and the recombinant TveIF-5A (rTveIF-5A) precursor protein (46 kDa). A 41 kDa band of the native TvDHS was recognized by western blot analysis in *T. vaginalis* total protein extract by a mouse polyclonal anti-rTvDHS antibody. The enzymatic activity of rTvDHS was determined by *in vitro* rTveIF-5A precursor modification. The modification reaction was performed by using (<sup>3</sup>H)-spermidine, and the biochemical analysis showed that rTvDHS exhibited Km value of 0.6 μM. The rTvDHS activity was inhibited by the spermidine analog, N<sup>6</sup>-guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7). Native gel electrophoresis analysis showed two bands corresponding to an rTvDHS-rTveIF-5A complex and an intermediate form of rTveIF-5A. The two forms were subsequently separated by ion exchange chromatography to identify the hypusine residue by MS/MS analysis. Moreover, mutations in TvDHS showed that the putative HE motif present in this enzyme is involved in the hydroxylation of TveIF-5A. We observed that only hypusine-containing TveIF-5A was bound to an RNA hairpin ERE structure from the *cox-2* gene, which contains the AAAUGUCACAC consensus sequence. Interestingly, 2DE-WB assays, using parasites that were grown in DAB-culture conditions and transferred to exogenous putrescine, showed the new isoform of TveIF-5A. In summary, our results indicate that *T. vaginalis* contains an active TvDHS capable of modifying the precursor TveIF-5A protein, which subsequently exhibits RNA binding activity.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

**Abbreviations:** TveIF-5A, eukaryotic translation initiation factor 5A from *Trichomonas vaginalis*; TvDHS, deoxyhypusine synthase from *T. vaginalis*; rTvDHS, recombinant deoxyhypusine synthase from *T. vaginalis*; rTveIF-5A, recombinant eukaryotic translation initiation factor 5A from *T. vaginalis*; ERE, Eukaryotic translation initiation factor 5A Response Element; *cox-2*, cyclooxygenase-2 gene; PI, pre-immune serum; DOHH, deoxyhypusine hydroxylase; *pl*, isoelectric point; Hyp, hypusine residue; DAB, 1,4-diamino-2-butanone; DFMO, α-Difluoromethylornithine.

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [elizabethalvarezsanchez@yahoo.com.mx](mailto:elizabethalvarezsanchez@yahoo.com.mx), [maria.alvarez@uacm.edu.mx](mailto:maria.alvarez@uacm.edu.mx) (M.E. Álvarez-Sánchez).

<sup>1</sup> Laura Itzel Quintas-Granados and Bertha Isabel Carvajal Gamez had equal contribution to this manuscript.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.09.027>

0300-9084/© 2015 Published by Elsevier B.V.

### 1. Introduction

*Trichomonas vaginalis* is the causative agent of trichomoniasis [1], a common worldwide infection associated with important public health problems. Notably, this protozoan has been implicated as a cofactor in the transmission of the human immunodeficiency virus [2]. Approximately 250 million people around the world are infected with *T. vaginalis*, the majority of which are women [3]. Infections in women cause vaginitis, cervicitis, urethritis, a malodorous seropurulent vaginal discharge and infertility [4,5], whereas men are considered the short term reservoir of this protozoan [6].

Polyamines are important cations involved in the regulation of

## TvMP50 is an Immunogenic Metalloproteinase during Male Trichomoniasis\*<sup>§</sup>

Laura Itzel Quintas-Granados<sup>‡</sup>, José Luis Villalpando<sup>‡</sup>, Laura Isabel Vázquez-Carrillo<sup>‡</sup>, Rossana Arroyo<sup>§</sup>, Guillermo Mendoza-Hernández<sup>¶</sup>, and María Elizabeth Álvarez-Sánchez<sup>‡</sup>

*Trichomonas vaginalis*, a human urogenital tract parasite, is capable of surviving in the male microenvironment, despite of the presence of  $Zn^{2+}$ . Concentrations  $> 1.6$  mM of  $Zn^{2+}$  have a trichomonocidal effect; however, in the presence of  $\leq 1.6$  mM  $Zn^{2+}$ , several trichomonad proteins are up- or down-regulated. Herein, we analyzed the proteome of a *T. vaginalis* male isolate (HGMN01) grown in the presence of  $Zn^{2+}$  and found 32 protein spots that were immunorecognized by male trichomoniasis patient serum. Using mass spectrometry (MS), the proteins were identified and compared with 23 spots that were immunorecognized in the proteome of a female isolate using the same serum. Interestingly, we found a 50-kDa metalloproteinase (TvMP50). Unexpectedly, this proteinase was immunodetected by the serum of male trichomoniasis patients but not by the female patient serum or sera from healthy men and women. We analyzed the *T. vaginalis* genome and localized the *mp50* gene in locus TVAG\_403460. Using an RT-PCR assay, we amplified a 1320-bp *mp50* mRNA transcript that was expressed in the presence of  $Zn^{2+}$  in the HGMN01 and CNCD147 *T. vaginalis* isolates. According to a Western blot assay, native TvMP50 was differentially expressed in the presence of  $Zn^{2+}$ . The TvMP50 proteolytic activity increased in the presence of  $Zn^{2+}$  in both isolates and was inhibited by EDTA but not by p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), E64, leupeptin, or phenylmethane sulfonyl fluoride. Furthermore, the recombinant TvMP50 had proteolytic activity that was inhibited by EDTA. These data suggested that TvMP50 is immunogenic during male trichomoniasis, and  $Zn^{2+}$  induces its expression. *Molecular & Cellular Proteomics* 12: 10.1074/mcp.M112.022012, 1953–1964, 2013.

Trichomoniasis is the most common nonviral sexually transmitted infection. The infection is caused by *Trichomonas vagi-*

From the <sup>‡</sup>Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), San Lorenzo # 290, Col. Del Valle, CP 03100, México D.F., México; <sup>§</sup>Departamento de Infección y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN), Av IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco CP 07360, México D.F., México; <sup>¶</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

Received July 10, 2012, and in revised form, March 21, 2013

Published, MCP Papers in Press, DOI 10.1074/mcp.M112.022012

*nal* with ~174 million new cases per year worldwide (1). This infection is implicated as a cofactor in the transmission of the human immunodeficiency virus (2). Infected women develop vaginitis, cervicitis, urethritis, and malodorous seropurulent vaginal discharge with serious health consequences such as infertility (3–4), preterm delivery, low-birth weight infants (5), and a predisposition to cervical neoplasia (6). In men, the infection is mainly asymptomatic (7) and self-limiting, although there are complications such as urethritis, prostatitis, and an association with prostate cancer and infertility (8–11).

The primary antimicrobial defenses of the male genitourinary tract are prostatic and seminal fluids with high levels of  $Zn^{2+}$  (4.5 to 7 mM) (12). In particular,  $Zn^{2+}$  is the major prostate defense due to its ability to prevent pathogens from establishing in the reproductive male tract (12). Indeed, it has an antimicrobial spectrum that includes bacteria, viruses, chlamydiae and fungi (13). *T. vaginalis* is sensitive to relatively low concentrations of  $Zn^{2+}$  and has a minimum trichomonocidal concentration of 1.6 mM (12). However, the  $Zn^{2+}$  concentration (~0.8 mM) found in patients with chronic bacterial prostatitis is not trichomonocidal (14) and *T. vaginalis* may persist for longer periods of time in the male genitourinary tract. Parasites may possibly progress to the prostate, where they have been observed to infect the prostatic epithelium causing chronic prostatitis and elicit an inflammatory immune response (15). Indeed, *T. vaginalis* has been observed in prostate tissue near inflammation areas and epithelial hyperplasia, suggesting that this parasite might be involved in prostate carcinogenesis (9).

Recently, we reported that the variation in trichomonal pathogenesis between the sexes might imply different host-parasite molecular interactions and changes in the parasite proteome (16). At least five trichomonad proteinases (CP70, TvCP65, CP39, CP25, and CP20) are involved in the interaction between parasites and prostatic DU-145 cells. Interestingly, the trichomonal cytotoxicity toward DU-145 cells is 80% lower than it is in HeLa cells. Furthermore, parasites display an oval form and pseudopods forming upon contact with DU-145 cells, but amoeboid trophozoites were not observed (16). Interestingly, proteolytic activity and the amount of TvCP65, a cysteine proteinase involved in trichomonal cytotoxicity toward cervical cells (17–18) and its transcript are