

Maestría en Ciencias Genómicas

**“ Identificación y Localización de la Proteína eIF-5A de
Trichomonas vaginalis.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A

Q.F.B. BERTHA ISABEL CARVAJAL GAMEZ

DIRECTOR DE TESIS

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

MÉXICO, D.F AGOSTO DE 2008

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.

DIRECTOR

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez
Profesora-Investigadora.
Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

ASESORES

Dra. Rossana Arroyo Verástegui.
Investigador Titular.
Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular.
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados.

Dra. Minerva Camacho Nuez.
Profesora-Investigadora.
Posgrado en Ciencias Genómicas.
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Dr. Mario César López Camarillo.
Profesor-Investigador.
Posgrado en Ciencias Genómicas.
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

M. en C. Máximo B. Martínez Benítez.
Estudiante de Doctorado.
Posgrado en Ciencias Genómicas.
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

M. en C. Julio Cesar Torres Romero.
Estudiante de Doctorado.
Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular.
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados.

El presente proyecto de investigación fue realizado en el laboratorio 1 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, bajo la dirección de la Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez y bajo la asesoría de la Dra. Rossana Arroyo Verástegui, Dra. Minerva Camacho Nuez, Dr. Mario César López Camarillo, M. en C. Máximo Berto Martínez Benítez y el M. en C. Julio César Torres. El proyecto fue financiado con fondos del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y del CONACYT con número de proyecto 60231.

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por su apoyo académico y económico y al CONACYT como becario número 2151356.

AGRADECIMIENTOS.

Gracias Dra. Liz, por su enseñanza, su paciencia, su confianza y dedicación.

Gracias por su amistad y apoyo.

A la Dra. Minerva, por su enseñanza, su paciencia, su tiempo.

A la Dra. Rossana, por las observaciones realizadas a este trabajo y por las facilidades brindadas para trabajar en su laboratorio.

A César por las sugerencias y observaciones al proyecto. Gracias por tu apoyo.

Gracias Max por tu paciencia, tu amistad, tu apoyo, tu enseñanza, por tu tiempo.

Gracias Julio, por tus comentarios y sugerencias, por los artículos, gracias por tu amistad.

Gracias a la Dra. Selene por su enseñanza y tiempo.

Gracias a todos los profesores del Posgrado en Ciencias Genómicas.

Gracias a todos mis compañeros del Posgrado en Ciencias Genómicas por su amistad.

A Mónica, por tu paciencia y apoyo.

A Solange por ayudarme con las imágenes y tus consejos sobre diseño.

Gracias a Israel, Eduardo Carrillo, Eduardo Solano, por su apoyo y tiempo.

Gracias mama por que sin tu apoyo no habría podido realizar este logro tan importante en mi vida que es también tuyo, gracias por los sacrificios y tu amor.

Gracias a mi esposo por apoyarme cuando más lo necesitaba, por tu tiempo y tu amor.

Gracias hijita esto esta dedicado a ti, ya que tu fuiste la inspiración y la lucha de cada día, gracias por motivarme tanto sin tú saberlo, te adoro.

Gracias a Blanquinlli por tu apoyo y consejos.

Gracias a mi papa y abuelito, en donde quiera que estén, muchas gracias por todo (q.p.d).

Gracias a todos mis amigos: Nayeli, José Antonio, Jaime Ocampo, los quiero mucho.

A ti Laurita que siempre estuviste conmigo.

Areli, Yak, Itzel muchas gracias por su amistad.

Gracias DIOS por haberme permitido vivir esto y gracias por nunca haberme soltado de tu mano.

INDICE GENERAL

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1	Trichomonosis.....	1
1.2	Epidemiología.....	2
1.3	Agente etiológico y morfología.....	3
1.3.1	Metabolismo de <i>T. vaginalis</i>	3
1.3.2	Ciclo de vida.....	6
1.3.3	Genoma de <i>T. vaginalis</i>	8
1.3.4	Patogénesis.....	10
1.3.5	Citoadherencia.....	11
1.3.6	Citotoxicidad.....	13
1.3.7	Regulación por hierro.....	14
1.3.8	Regulación por poliaminas.....	15
1.4	Antecedentes de poliaminas.....	16
1.4.1	Generalidades de poliaminas.....	17
1.4.2	Metabolismo de poliaminas.....	18
1.4.3	Regulación de poliaminas.....	19
1.4.4	Interacción de poliaminas con macromoléculas.....	21
1.4.5	Mecanismos de regulación mediado por poliaminas	
1.4.6	Poliaminas en <i>T. vaginalis</i>	24
1.5	Transcripción en <i>T. vaginalis</i>	26
1.5.1	Traducción en <i>T. vaginalis</i>	27

1.5.2	Modificaciones postraduccionales.....	28
-------	---------------------------------------	----

II. ESTADO DEL ARTE

2.1	Generalidades de la proteína eIF-5A.....	28
2.2	Antecedentes de la proteína eIF-5A.....	30

III. JUSTIFICACIÓN..... 32

IV. HIPÓTESIS..... 32

V. OBJETIVOS

1.	OBJETIVO GENERAL.....	33
2.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	33

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL..... 34

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1.	Análisis <i>in silico</i> de la proteína TveIF-5A.....	34
1.1	Contenido de G+ C	34
1.2	Análisis de las regiones reguladoras.....	34
1.3	Diseño de iniciadores.....	34
2.	Extracción de DNA.....	35

3. Ensayo de expresión del gen TveIF-5A en presencia y ausencia de poliaminas.

3.1	Ensayo de lisados.....	37
3.2	Ensayo de ligandos.....	37
3.3	Extracción de RNA total mediante la técnica Fenol-Cloroformo.....	38
3.4	Síntesis de CDNA.....	38
3.5	Amplificación por PCR de <i>tveIF-5A</i> de <i>Trichomonas vaginalis</i>	39
3.6	Ensayo de qPCR tiempo real.....	40
4.	Clonación en el vector PCR 2.1 TOPO Cloning (Invitrogen).....	42
4.1	Miniprep por lisis alcalina.....	42
4.2	Preparación de las muestras para secuenciación.....	43
4.3	Subclonación en el vector de expresión pGEX6-P-1.....	43

4.4	Linearización del vector pGEX6-P-1_y restricción del inserto.....	45
4.5	Purificación de los productos en gel de agarosa.....	46
4.6	Reacción de ligación.....	46
5.	Expresión de las proteínas recombinante.....	47
5.1	Inducción de la proteína recombinante.....	47
5.2	Solubilidad de la proteína recombinante.....	48
5.3	Western blot de la proteína recombinante.....	48
5.4	Purificación de la proteína recombinante.....	49
6.	Producción de anticuerpos policlonales con el péptido sintético eIF-5A.....	50
6.1	Western blot utilizando los anticuerpos anti TveIF-5A.....	51
7.	Localización de la proteína TveIF-5A.....	52
VIII.	RESULTADOS.....	54
8.	Análisis bioinformático.....	54
9.	Expresión de los genes <i>tveIF-5A 1</i> y <i>tveIF-5A 2</i> en presencia y ausencia de poliaminas.....	74
10.	Clonación del gen <i>tveIF-5A</i> de <i>T. vaginalis</i>	88
11.	Localización de la proteína TveIF-5A de <i>T. vaginalis</i>	101
IX.	DISCUSIÓN.....	118
X.	CONCLUSIONES.....	124
XI.	PERSPECTIVAS.....	125
XII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126
XIII.	APÉNDICE.....	139

LISTA DE ABREVIATURAS

➤ DNA	Ácido desoxirribonucleico
➤ DNAg	DNA genómico
➤ RNA	Ácido ribonucleico
➤ RNAi	Ácido ribonucleico interferente
➤ RNAr	Ácido ribonucleico ribosomal
➤ RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
➤ RNAt	Ácido ribonucleico de transferencia
➤ BSA	Albúmina de suero bovino
➤ C1	Control 1
➤ C2	Control 2
➤ cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
➤ cbp	Cuanto baste para
➤ <i>cox-2</i>	gen <i>ciclooxigenasa-2</i>
➤ CPs	Cisteín proteinasas
➤ DAB	1, 4-Diamino-2-butanona dihidroclorido
➤ DEPC	Dietilpirocarbonato
➤ DMSO	Dimetil sulfóxido
➤ dNTPs	Deoxinucléotido tri-fosfatados
➤ DTT	Dithiotreitol
➤ EDTA	Ácido etilén diaiminotetra-acético
➤ ERE	Elementos de respuesta a estrógenos
➤ g	Gramos
➤ GTP	Guanosin trifosfato
➤ GST	Glutación S-transferasa
➤ HCl	Ácido clorhídrico
➤ hr	Horas
➤ HRP	Enzima peroxidasa de rabano
➤ Inr	Elemento regulador de transcripción
➤ IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
	Piperazinaetanosulfónico
➤ IRES	Elemento de respuesta a hierro
➤ kDa	Kilodaltones
➤ LB	Medio Luria-Broth
➤ LPG	Lipofosfoglicanos
➤ Mg ²⁺	Magnesio
➤ MAPK	Proteína cinasa activadora de mitogenos
➤ Mb	Mega bases
➤ Met	Metionil
➤ mM	Milimoles
➤ min	Minutos

➤ μg	Microgramos
➤ μm	Micrometros
➤ μL	Microlitros
➤ ml	Mililitros
➤ ng	Nanogramos
➤ nm	Nanometros
➤ ODC	Ornitina descarboxilasa
➤ O.N.	Toda la noche
➤ OMS	Organización Mundial de la Salud
➤ PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
➤ PAO	Poliamina oxidasa
➤ pb	Pares de bases
➤ PBS	Fosfato buffer salino
➤ PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
➤ PFOR	Piruvato ferredoxina oxidorreductasa
➤ pH	Potencial de hidrógeno
➤ Pmol	Picomoles
➤ PSA	Persulfato de amonio
➤ rpm	revoluciones por minuto
➤ RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa retrotranscriptasa
➤ SAM	S-adenosilmetionina descarboxilasa
➤ SAMDC	Descarboxilasa de S- adenosilmetionina
➤ SC	Suero de caballo
➤ s	Segundos
➤ SDS	Dodecil sulfato de sodio
➤ T.A	Temperatura ambiente
➤ TAE	Buffer Tris-Acetato-EDTA
➤ TCA	Ácido tricloro acético
➤ TEMED	N, N, N', N'', tetrametilen-diamina
➤ TYM	Medio de cultivo tripticasa-extracto de levadura -maltosa)
➤ V	Volts
➤ VECs	Células del Epitelio Vaginal

LISTA DE FIGURAS

- FIG. 1 Morfología de *T. vaginalis* utilizando una tinción de rojo congo
- FIG. 2 Microscopia de barrido de *T. vaginalis*
- FIG. 3 Ciclo de vida de *T. vaginalis*
- FIG. 4 Morfología ovoide y ameboide de *T. vaginalis*
- FIG. 5 Estructura química de las poliaminas
- FIG. 6 Ruta de acción de la antienzima en el metabolismo de las poliaminas
- FIG. 7 Metabolismo de las poliaminas en *T. vaginalis*
- FIG. 8 Función de eIF-5A en el gen *cox 2*
- FIG. 9 Mapa del plásmido PGEX
- FIG. 10 Alineamiento de la proteína eIF-5A en diferentes organismos
- FIG. 11 Alineamiento de las proteínas eIF-5A hipotéticas de *T. vaginalis*.
- FIG. 12 Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las proteínas TveIF-5A 1 y 2 con la proteína eIF-5A en diversos organismos.
- FIG. 13 Mapa de la localización de los genes *TveIF-5A* 1 y 2 hipotéticos de *T. vaginalis*
- FIG. 14 Grafica del contenido de G + C del gen *TveIF-5A*
- FIG. 15 Sitios de unión hipotéticos de factores de transcripción
- FIG. 16 Modelo en estructura 3D de la proteína *TveIF-5A* 1 y 2
- FIG. 17 Análisis filogenético de la proteína *TveIF-5A* 1 y 2 y del gen ribosomal 18 s
- FIG. 18 Extracción de DNA genómico de *T. vaginalis*
- FIG. 19 Amplicón del gen *TveIF-5A* de *T. vaginalis*
- FIG. 20 RT PCR del gen *TveIF-5A* en presencia y ausencia de poliaminas
- FIG. 21 qPCR en Tiempo Real del gen *TveIF-5A* en presencia y ausencia de poliaminas
- FIG. 22 Alineamiento de la expresión de los genes *TveIF-5A*
- FIG. 23 Purificación, liberación del inserto y cuantificación del inserto purificado
- FIG. 24 Clonación del gen *tveIF-5A* en el vector PCR 21. TOPO.
- FIG. 25 Plásmido pGEX 6P1 linearizado con las enzimas *BamHI* y *XhoI*.
- FIG. 26 Análisis por restricción de las clonas candidatas.
- FIG. 27 Expresión de la proteína recombinante
- FIG. 28 Solubilidad de la proteína recombinante
- FIG. 29 Purificación de la proteína recombinante

- FIG. 30 Alineamiento de la proteína eIF-5A de *T. vaginalis* y ratón
- FIG. 31 Determinación de hidrofobicidad del péptido candidato
- FIG. 32 Estructura 3D de la proteína TveIF-5A de *T. vaginalis*
- FIG. 33 Análisis de inmunogenicidad en MHCII en ratón
- FIG. 34 Reconocimiento de la proteína TveIF-5A en extracto total de *T. vaginalis*.
- FIG. 35 Localización de la proteína TveIF-5A en parásitos no permeabilizados 60 X
- FIG. 36 Localización de la proteína TveIF-5A en parásitos permeabilizados 60X
- FIG. 37 Localización de la proteína TveIF-5A en parásitos permeabilizados 60X

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Sumario del genoma de *T. vaginalis*
- Tabla 2. Reacción de ligación
- Tabla 3. Esquema de inmunización utilizando el péptido sintético

Resumen.

La trichomonosis es una infección de transmisión sexual de mayor frecuencia a nivel mundial en donde se reportan 170 millones casos anualmente y en México esta infección ocupa el segundo lugar. La trichomonosis es causada por el parásito flagelado *Trichomonas vaginalis* el cual infecta el tracto urogenital en humanos. Este parásito, posee múltiples cisteín proteinasas, las cuales están involucrados en diferentes propiedades de virulencia como: citotoxicidad, adhesión, hemólisis y evasión de la respuesta inmune. Algunas de estas proteasas están reguladas por factores ambientales como: pH, niveles hormonales en la mujer, hierro y poliaminas. Recientemente se reporto que la cisteín proteinasa de 65 kDa (CP 65) involucrada en la citotoxicidad del parásito a las células del epitelio vaginal y células HeLa, se encuentra regulada de manera negativa por las poliaminas ya que bajas concentraciones de poliaminas, usando el inhibidor 1-4, diamino butano (DAB) de la ornitina descarboxilasa involucrada en el metabolismo de poliaminas, reducen la citotoxicidad, la actividad proteolítica, la expresión del transcrito del gen *tvcp65* y en su localización. Las poliaminas son compuestos que están presentes en todos los organismos y están implicadas en una gran variedad de reacciones biológicas ya que se unen a los ácidos nucleicos para influir en diversos procesos celulares importantes como: división, diferenciación, apoptosis, también participan en la regulación de la transcripción del gen *c-myc* y del gen *p21cip1*. Las poliaminas se encuentran regulando la traducción del RNAm del gen *cox 2* en cáncer de colon en humano. El RNAm del gen *cox2*, contiene una secuencia consenso localizada en el extremo 3'UTR, el cual es un elemento de respuesta a la proteína eIF-5A (EREs), al unirse la proteína eIF-5A al EREs se estabiliza la estructura del RNAm, aumentando la expresión de este gen. eIF-5A precursora, es una proteína dependiente de poliaminas, altamente conservada en los 13 aminoácidos que rodean el residuo de lisina, donde se lleva a cabo la modificación posttraduccional llamada hipusinación, necesaria para que eIF-5A madura sea capaz de unirse al extremo 3'UTR del RNAm. En este trabajo se identifico a la proteína eIF-5A de *T. vaginalis*,

encontrando dos genes *tveIF-5A 1* y *tveIF-5A 2*, los cuales codifican dos proteínas TveIF-5A 1 y TveIF-5A 2, estas son altamente conservadas en los 13 aa que rodean el residuo de lisina. Para analizar el efecto de las poliaminas en la expresión del transcrito de *tveIF-5A*, se crecieron *T. vaginalis* en presencia y ausencia de poliaminas, por ensayos de RT-PCR Y qRT PCR tiempo real. Los parásitos crecidos en un medio en presencia del inhibidor DAB, la expresión del transcrito *tveIF-5A* disminuyó, por RT-PCR en 60% y en qRT-PCR tiempo real en 90%, comparado con la condición normal. Los parásitos transferidos a un medio con putrescina exógena, recuperan la expresión del transcrito *tveIF-5A*, por RT-PCR en el 100% qRT-PCR tiempo real ~ 300%, con respecto a la condición normal. Para conocer cual de los dos genes *tveIF-5A* se expresa en la condición normal y en presencia de DAB, se secuenciaron los productos de RT-PCR de *tveIF-5A* y 20 clonas usando los productos de RT-PCR de *tveIF-5A* de la condición normal, encontrando que únicamente el gen *tveIF-5A 2*, se expresa en las dos condiciones analizadas. Por otra parte se obtuvo a la proteína TveIF-5Ar precursora de 44 kDa, para utilizarla como control negativo y para la obtención de anticuerpos anti TveIF-5Ar. Se realizó el diseño de un péptido sintético anti TveIF-5A, con el cual obtuvimos anticuerpos en ratón anti péptido TveIF-5A. Estos anticuerpos se probaron por ensayos de Western blot revelados por color y quimioluminiscencia. Estos anticuerpos reconocieron a la proteína TveIF-5Ar en un tamaño de 44 kDa y TveIF-5A en extractos totales de proteínas de *T. vaginalis* con un tamaño de 19 kDa. Con estos anticuerpos se localizó a la proteína TveIF-5A por inmunofluorescencia en parásitos permeabilizados, encontrando a TveIF-5A en citoplasma.

I. INTRODUCCION.

1. Antecedentes generales

1.1 Trichomonosis

La trichomonosis es una infección de transmisión sexual, ocasionado por el parásito *Trichomonas vaginalis*, el cual parasita el tracto genitourinario (Alderete y col., 1984). La trichomonosis puede presentarse de forma aguda o crónica. Los signos y síntomas de esta enfermedad son: vulvitis difusa con leucorrea copiosas, la cual se caracteriza por tener descargas abundantes de color verde-amarillentas, prurito en genitales externos. El signo típico de la trichomonosis son pequeños puntos hemorrágicos en el cérvix denominado "cérvix de fresa", este se observa solo en el 2% de los pacientes. Este signo clínico es específico para esta infección y es detectada mediante colposcopia. Otros síntomas pueden incluir disuria, dolor abdominal en cavidad baja y dispareunia (Spiegel y col., 1990; Lehker y Alderete., 2000). En ocasiones la trichomonosis es asintomática, motivo por el cual no es diagnosticada. Los factores que influyen la respuesta inflamatoria y la severidad de los síntomas, no han sido bien entendidos pero puede incluir los niveles hormonales, la coexistencia con la flora vaginal, la cepa de *T. vaginalis* y la relativa concentración de los parásitos presentes en la vagina (Schwebke y col., 2004). En el caso del hombre, la trichomonosis esta menos caracterizada, a pesar de que es una infección autolimitada, se puede presentar en ocasiones como una uretritis no gonocócica y no clamidial (Swygard y col., 2004; Alderete y col., 2000). Se ha reportado que altas concentraciones de zinc en secreciones prostáticas de perro (Krieger y Rein., 1982) y humano, actúan como tricomonocidas (Krieger y Rein., 1982)

La trichomonosis puede tener consecuencias adversas como son: durante el embarazo se puede presentar rompimiento de las membranas amnióticas e infantes con bajo peso al nacer (Cotch y col., 1997; Anorlu y col., 2001), también

se ha asociado como un factor de riesgo que incrementa la transmisión del virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH) (Van Der Pol y col., 2008), y como un factor para la adquisición del cáncer cervical, enfermedad pélvica inflamatoria (Zhang y col., 1996; Zhang y col., 1995), infertilidad (Zhang y col., 1996) y susceptibilidad a adquirir infecciones concomitantes causadas por otros agentes patógenos como *Neisseria gonorrhoeae* y *Clamidia trachomatis* (Scwebke y col., 2004).

1.2. Epidemiología.

La prevalencia de la trichomonosis no decrece con los años, dando una significativa morbilidad. Se ha observado que la trichomonosis es un factor de riesgo de conducta sexual, frecuentemente asociada a gonorrea y en mujeres se asocia con vaginitis bacteriana (Zhang y col., 1996; Swygard y col., 2004). La prevalencia varía entre las poblaciones estudiadas en un rango de 5 al 74% en mujeres y 5 al 29% en hombres (www.who.int/es/), varía dependiendo la población y las técnicas usadas para el diagnóstico (Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica SSA, 2006).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta una incidencia de la trichomonosis de más de 170 millones de casos al año (reporte de la OMS año 1995). En México se estima que la trichomonosis ocupa el segundo lugar en cuanto al número de casos con respecto a otras enfermedades de transmisión sexual como la infección gonocócica, sífilis y candidiasis (Arroyo y col., 2000; Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica SSA, 2006).

Esta infección se encuentra distribuida principalmente en la zona centro y sur del país, los estados de Veracruz y el Distrito Federal registran el mayor número de casos con un porcentaje de 15.1 % y 7.85 %, respectivamente. En Puebla se tiene una prevalencia del 7.4%, a diferencia de la zona norte, como en Baja California Sur que presenta solo un 0.2% (Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica SSA, 2006).

1.3. Agente etiológico y morfología.

T. vaginalis es un protozoo flagelado patógeno del humano, el cual mide de 10 a 20 μm de largo y 7 μm de ancho, presenta un flagelo posterior adosado a una membrana ondulante y cuatro flagelos anteriores libres, presenta especializaciones del citoesqueleto formado por microtúbulos que lo diferencia de otros protozoarios como son: la costa, la pelta y el axostilo, este último atraviesa longitudinalmente y termina en una espícula, como una columna vertebral (Schmidt y Roberts., 1998; Arroyo., 2000). Este parásito tiene un núcleo ovoide excéntrico, un aparato de Golgi bien diferenciado, también presenta un retículo endoplásmico liso y rugoso, ribosomas, acumulación de gránulos de glucógeno, algunas vesículas pinocíticas y vacuolas alimenticias (Fig. 1) (Schwebke y col., 2004; Arroyo., 2000). *T. vaginalis* carece de mitocondrias, pero posee hidrogenosomas, que son organelos análogos a la mitocondria (Rosenthal y col., 1997; Dyall y col., 2005); contiene numerosas enzimas fermentativas localizadas en el hidrogenosoma, en donde ocurre la descarboxilación oxidativa del piruvato para la formación de acetil coenzima A (CoA) llamado metabolismo del piruvato. Este proceso es mediado por la piruvato: ferredoxina oxidoreductasa (PFOR), con donación de electrones a una hidrogenasa que produce hidrogeno. El ATP es generado exclusivamente por niveles de fosforilación de sustrato, opuesto a la fosforilación oxidativa de las mitocondrias (Fig. 2) (Rosenthal y col., 1997). Mediante estudios de evolución se evidenció el origen bacteriano de genes que codifican enzimas fermentativas en parásitos amitocondriados, en donde se encontró que *T. vaginalis* contiene genes derivados de la endosimbiosis bacteriana (Horner y col., 1996).

1.3.1 Metabolismo de *T. vaginalis*.

T. vaginalis carece de muchas vías metabólicas *de novo*, como es la de purinas y pirimidinas (Heyworth y col., 1982; 1984), los cuales toma de las células

del epitelio vaginal (VECs). También requiere para su crecimiento de nucleótidos como guanina, timidina, citocina, uracilo y/o uridina (Linstead., 1981; Heyworth y col., 1982) que entran al parásito por difusión pasiva. *T. vaginalis* también requiere de carbohidratos, siendo la maltosa la fuente principal para su crecimiento. Los aminoácidos también son indispensables para su crecimiento en especial arginina, treonina y leucina que en ocasiones son utilizados por el parásito para la generación de energía (Yoon y col., 1991). Se han reportado genes requeridos para la síntesis de prolina, arginina, cisteína y para el metabolismo de treonina, así como genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo de metionina (Carlton y col., 2007).

Con respecto al metabolismo de lípidos, *T. vaginalis* requiere principalmente de colesterol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y esfingomiélin, ya que este parásito carece de la vía metabólica y de muchas enzimas que intervienen en la biosíntesis de fosfolípidos, por ello los obtiene de forma exógena (Beach y col., 1990; 1991).

En este parásito también se han localizado genes que codifican para superóxido dismutasas, tioredoxinas, peroxiredoxinas y rubreritinas. Sorpresivamente, se encontraron familias de enzimas transportadoras de azúcares y aminoácidos, así como muchos miembros de familias cotransportadoras de cloro (Carlton y col., 2007).

Por otra parte, *T. vaginalis* fagocita bacterias, eritrocitos y fragmentos celulares, los cuales pueden ser observados en las vacuolas fagocíticas o pinocíticas (Fig. 2) (Arroyo y col., 2000; Costmagna y col., 2001), este parásito al fagocitar los eritrocitos adquiere lípidos y hierro. Para la captura de este catión *T. vaginalis* posee moléculas receptoras y transportadoras de hierro como son: las glicoproteínas capaces de unir a eritrocitos para la adquisición de hierro y lípidos (Lehker y col., 1990). La adhesina de superficie de 120 kDa (AP120), es inducida por el hierro y se ha sugerido que actúe como un receptor para la unión a células HeLa (Moreno-Brito y col. 2005.). La lactoferrina es una molécula transportadora de hierro capaz de unirse a receptores de membrana en *T. vaginalis*, esta molécula remueve el hierro de la superficie del parásito y posteriormente es

internalizada (Peterson y Alderete., 1984). El receptor de fibronectina es indispensable para el parásito, ya que es usado para la adquisición de nutrientes y la adhesión hacia la célula blanco, el hierro modula la unión de este receptor con el dominio N-terminal de la fibronectina (Alderete y col., 2002).

Experimentalmente se demostró que en medios de cultivo carente de hierro, los parásitos no crecen o lo hacen muy lentamente (Alderete y col., 2008).

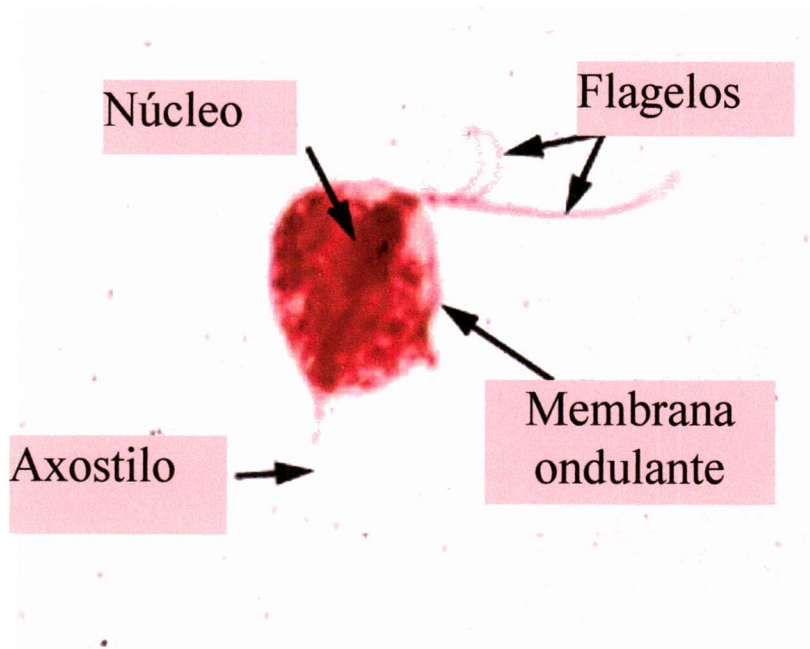


FIG. 1. Morfología de *Trichomonas vaginalis* mediante tinción con Rojo Congo se muestra; el núcleo, cuatro flagelos, el axostilo y la membrana ondulante (Medical Parasitology, 3rd. edition. Edward K. Markell &HenriettaVoge. Filmstrip II).

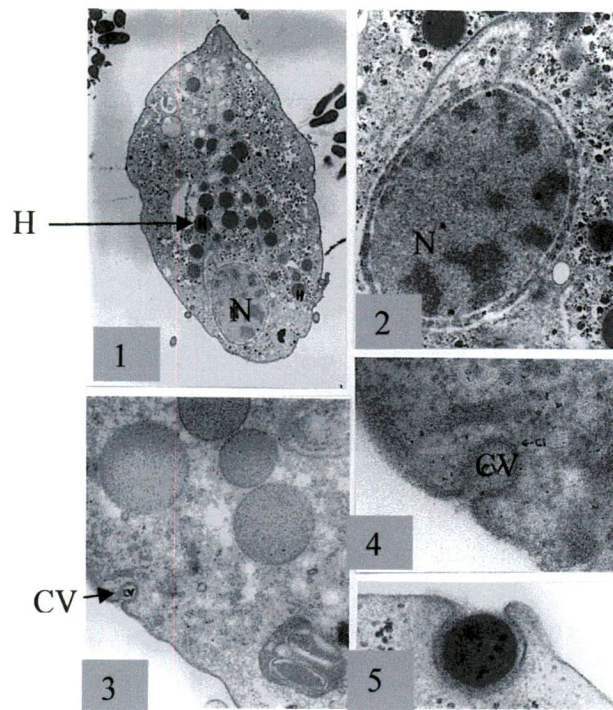


FIG. 2. Microscopia de barrido de *Trichomonas vaginalis*. 1) N núcleo, H hidrogenosomas; 2) Acercamiento del núcleo; 3) CV vacuolas fagocíticas, 4, 5) Fagocitosis de una bacteria (Costamagna y col., 2001).

1.3.2 Ciclo de Vida.

El ciclo de vida de *T. vaginalis* es simple con respecto a otros protozoarios patógenos humanos, no presenta huéspedes intermediarios ni vectores y solo se presenta en forma de trofozoito uninucleado (Arroyo., 2000; Schwebke y col., 2004).

La transmisión de este parásito es de persona a persona mediante el contacto sexual con personas infectadas con *T. vaginalis*. Los parásitos se adhieren a las mucosas de la vagina y del exocérnix donde permanecen a pesar de las condiciones adversas: 1) pH ácido, 2) cambios hormonales cíclicos, 3) descamación del epitelio, 4) escasos nutrientes, 5) presencia de anticuerpos anti-tricomonas, 6) presencia de lactobacilos, 7) flujo menstrual, entre otras (Arroyo., 2000; Schwebke y col., 2004).

T. vaginalis se multiplica por fisión binaria, esta inicia con la división nuclear, para finalmente generar dos células hijas (Fig. 3) (Gómez-Conde y col., 2000).

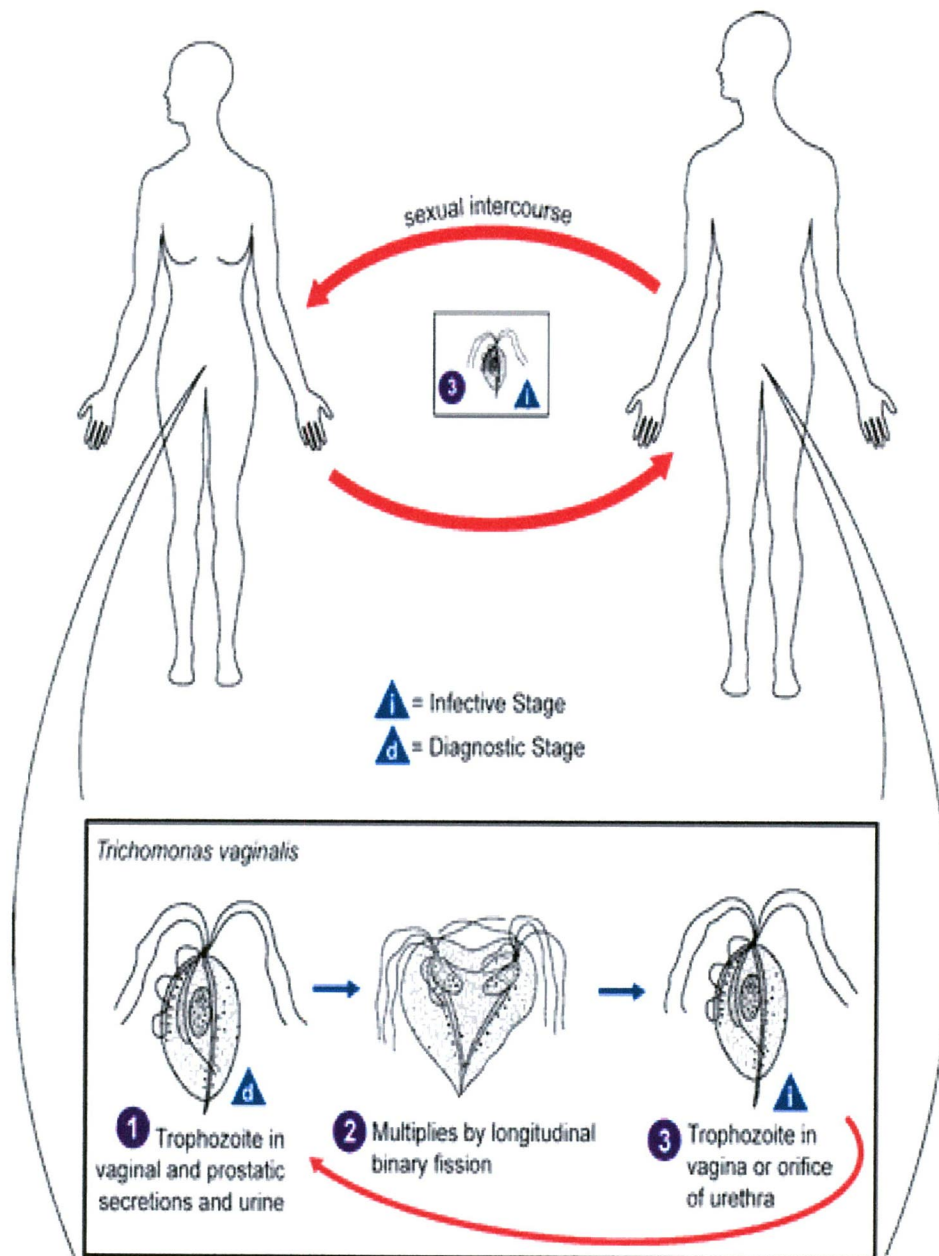


FIG. 3. Ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis*. i) estado infectivo; d) estado de diagnóstico. 1. Trofozoito en secreciones vaginales, prostáticas y orina; 2. División por fisión binaria; 3. Trofozoito en vagina y orificio uretral. (base de datos: Introduction " The *Trichomonas vaginalis* Genome Database" www.tigr.or/tdb/e2k1/tvg/intro.shtml)

1.3.3 Genoma de *T. vaginalis*.

Recientemente se describió el borrador de la secuencia del genoma de *T. vaginalis* realizado por el método de “shotgun”. En los seis cromosomas de este parásito, se ubican 60,000 genes que codifican para proteínas, de los cuales solo 65 contienen intrones. Esto demuestra que en *T. vaginales* existen genes policistrónicos y no solo genes monocistrónicos como estaban reportados (Nikos y col., 1998). *T. vaginalis* es capaz de realizar el procesamiento de corte y empalme denominado “splicing”, encontrando motivos conservados los cuales son esenciales para proteínas “spliceosomales”, como la proteína PRP8, la cual provee evidencias directas de este procesamiento (Pestota y col., 2001; Vanacova y col., 2005; Carlton y col., 2007).

T. vaginalis contiene genes que codifican para RNAt de los 20 aminoácidos y 250 genes codificantes para RNAr. En el 75 % de los genes de este parásito se localizó un elemento promotor “Inr” en el extremo 5’ de la región no traducida (UTR). Estos elementos son clave en la expresión de los genes y son esenciales en la traducción de los RNAm actuando en las secuencias de unión de los ribosomas. Los Inr son secuencias análogas a la caja TATA en eucariontes (Liston y col., 1998; Vanacova y col., 2005). También se describieron genes “Dicer”, “argonautas” y “DEAD-DEAH-box”, así como genes para helicasas, sugiriendo la existencia de una vía para la formación de RNAi, la cual no ha sido descrita en *T. vaginalis* (Carlton y col., 2007).

Alrededor del 65% del genoma de *T. vaginalis* es altamente repetido, contiene 59 familias repetidas que constituyen los 160 Mb del genoma y pueden ser clasificados como: virus, transposones y retrotransposones. La expansión de familias de genes de *T. vaginalis*, indica una adaptación a diferentes microambientes, explicando porque este parásito es capaz de adaptarse rápidamente en el microambiente cambiante de su hospedero. Una de las familias más importantes descritas es la implicada en la maquinaria de tráfico membranal, la cual es esencial para la secreción de proteínas patógenas, endocitosis y fagocitosis de bacterias y células del hospedero. Por otra parte, se ha descrito la

familia de genes que codifican para proteínas cinasas, como la proteína cinasa activadora de mitógenos (MAPK), la cual sugiere la presencia de mecanismos para la trasducción de señales (Carlton y col., 2007).

Con respecto a la estructura del citoesqueleto se encontraron genes que codifican para actina y tubulina, proteínas que permiten a *T. vaginalis* el remodelamiento a su forma ameboide durante su colonización y su forma ovoide en secreciones. Otra familia importante e indispensable para la viabilidad de este parásito es la de los genes involucrados en la respuesta al daño al DNA y su reparación, reestructuración de la cromatina y meiosis (Carlton y col., 2007).

En relación a la patogénesis de *T. vaginalis*, se localizaron genes que codifican enzimas para la síntesis de lipofosfoglicanos (LPG); de particular interés es un gen encargado de la síntesis de ramnosa el cual es un azúcar inusual ausente en las células del hospedero. Otros genes identificados son los involucrados en la biosíntesis del ácido siálico (azúcar de superficie de *T. vaginalis*). Además, se identificaron 800 proteínas que representan moléculas de superficie entre ellas las de citoadherencia y citotoxicidad, algunas ya están reportadas y descritas como son cinco adhesinas y diferentes cisteín proteinasas como la CP de 30 kDa, CP de 39 kDa y la CP de 65 kDa, además de genes para el degradosoma (Álvarez- Sánchez y col., 2000; Hernández y col., 2004; Carlton y col., 2007). Por otra parte, se localizaron 152 genes cuyo posible origen sea a través de la transferencia lateral de genes procariontes a eucariontes (Carlton y col., 2007).

Feature	Value
<i>Genome</i>	
Size of assembly (bp)	176,441,227
G+C content (%)	32.7
No. of scaffolds	17,290
N_{50} scaffold size (bp)	68,338
<i>Protein-coding genes</i>	
No. of predicted genes	59,681
No. of evidence-supported genes	25,949
No. of genes with introns	65
Mean gene length (bp)	928.6
Gene G+C content (%)	35.5
Gene density (bp)	2956
Mean length of intergenic regions (bp)	1165.4
Intergenic G+C content (%)	28.8
<i>Non-protein-coding genes</i>	
Predicted tRNA genes	479
Predicted 5.8S, 18S, and 28S rDNA units	~250

Tabla 1. Sumario del genoma de *T. vaginalis* (Carlton y col., 2007).

1.3.4 Patogénesis

T. vaginalis al entrar en contacto con su célula blanco (VECs), utiliza componentes específicos como son adhesinas y receptores, este contacto desencadena la participación de una serie de señales como son: transformación morfológica del parásito de su forma ovoide a ameboide con la formación de filopodios y pseudopodios. Esta transformación morfológica es específica hacia células de origen cervical (Fig. 4). La adhesión del parásito hacia la célula blanco, la cual juega un papel importante en la patogénesis del parásito y esta mediada por adhesinas localizadas en la superficie del parásito (Lehker y col., 1991; Arroyo y col., 1993; Moreno y col., 2005). Se requiere de la actividad de cisteín proteinasas que se localizan en la superficie del parásito (Arroyo y Alderete, 1989; 1995; Mendoza-López y col., 2000). Por otra parte se ha propuesto que este parásito puede llevar a cabo quimiotaxis, la cual también podría jugar un papel

importante en la adhesión ya que esta podría ser utilizada para el reclutamiento de parásitos hacia el sitio inicial de contacto. La interacción entre parásitos es muy estrecha (Arroyo y col., 1993).

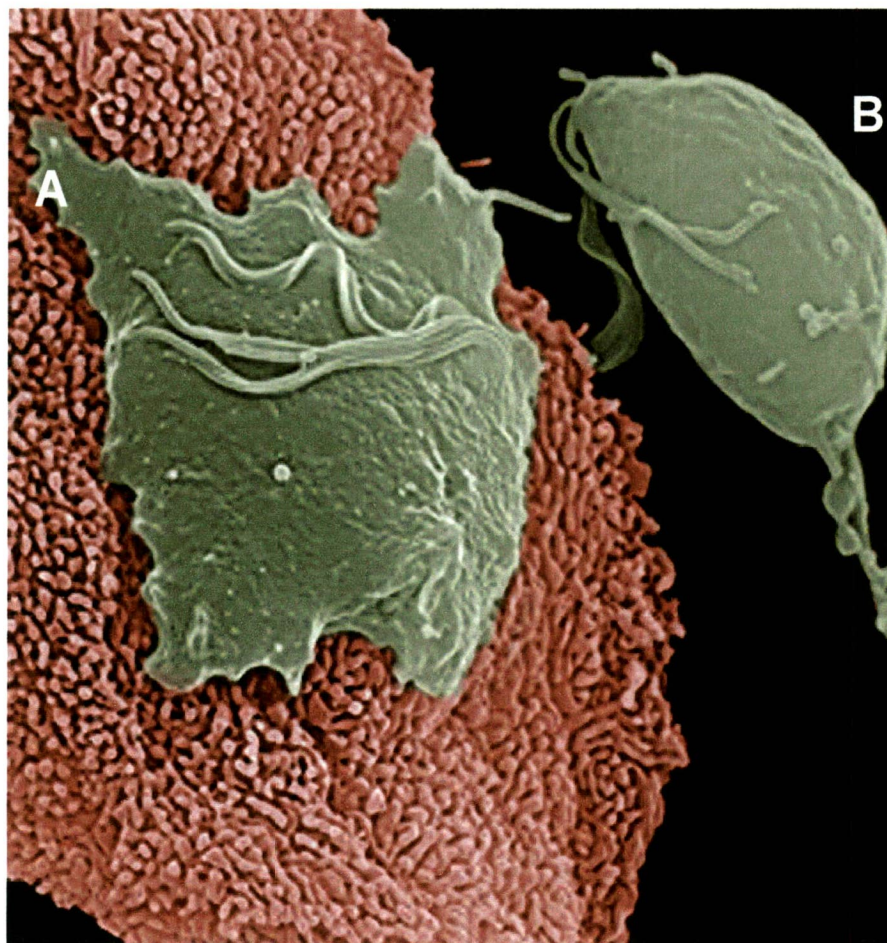


FIG. 4. Se muestra los cambios morfológicos de *Trichomonas vaginalis*., A) *T. vaginalis* adherida a la superficie del epitelio con formación de pseudopodos. B) *T. vaginales* antes de entrar en contacto con el epitelio con morfología ovoide. (http://www3.niaid.nih.gov/news/newsreleases/2007/TvaginialisParasite_photo.htm)

1.3.5. Citoadherencia.

T. vaginalis es capaz de atravesar el moco vaginal para adherirse a la mucosa vaginal mediante citoadherencia y esto es necesario para colonizar e infectar a las células blanco. Este evento desencadena una cascada de señalización que incluye adherencia específica a células epiteliales por las que tiene una alta especificidad (Lehker y col., 1991; Arroyo y col., 1993).

La adhesión juega un papel central en la patogénesis de este parásito. Hasta ahora se han descrito cinco adhesinas estas se han nombrado según su peso molecular: 65 kDa (AP65), 51 kDa (AP51), 33 kDa (AP33), 23 kDa (AP23), recientemente fue descrita la adhesina de 120 kDa (AP120). Cada una de estas adhesinas actúan sobre receptores específicos. Mediante inmunofluorescencia se sabe que se encuentran localizadas en la membrana del parásito y que son indispensables para la unión célula-célula (Lehker y col., 1991; Alderete y col., 2000; García y col., 2003; Moreno-Brito y col., 2005).

En muestras de biopsias vaginales de pacientes infectadas se encontró que el parásito al entrar en contacto con células epiteliales se transforma a su forma ameboide y forma uniones llamadas interdigitaciones entre la membrana plasmática del parásito y pequeñas proyecciones de la superficie del epitelio (Rasmussen y col., 1986; Arroyo y col., 1993; Honingber y col., 1993). Esta adherencia es llevada a cabo por las adhesinas y la regulación por hierro de estas moléculas es necesaria para la sobrevivencia del parásito, la cual provee la propiedad de adaptación a cambios durante el ciclo menstrual, en bajas concentraciones de hierro se tiene menor síntesis de adhesinas, por lo que el parásito es menos adhesivo y migra a sitios ricos de este catión, mientras que en altas concentraciones de hierro el parásito se vuelve más adhesivo (Lehker y col., 1991). Las adhesinas interactúan con las células del hospedero vía ligando-receptor, de esta manera se sabe que existe una relación entre la expresión de superficie de las adhesinas y los niveles de citoadherencia (Alderete y Garza., 1988; Arroyo y col., 1992). Estudios realizados mediante genes antisentido han confirmado la importancia de estas moléculas, en la adhesión a pesar de poseer homología a enzimas metabólicas del hidrogenosoma (Moreno-Brito, 2005), demostrando que las adhesinas AP65 y AP33 participan en la adherencia a VECs (Mundodi y col., 2004; 2007). La familia de genes de adhesinas es coordinada por una regulación de hierro ya que la síntesis de estas proteínas se ve favorecida en presencia de este catión (Lehker y col., 1991; Mundodi y col., 2006).

1.3.6 Citotoxicidad.

T. vaginalis posee altos niveles de actividad proteolítica, en la cual están involucradas las cisteín proteinasas (CPs) identificadas como factores de virulencia (Arroyo y Alderete., 1989). La síntesis y la actividad de las proteinasas de *T. vaginalis* pueden ser controladas por factores ambientales tales como: hierro, pH, capacidad de óxido-reducción y la relativa sensibilidad de su actividad a inhibidores como: N- α -p-tosil-L-lisina cloro-métíl-cetona (TLCK), leupeptina, anti papaína, etc (Coombs y North., 1983; Alderete y Garza., 1985).

Las cisteínas proteinasas (CPs) son endopeptidasas que se caracterizan por contener una cisteína en su sitio activo. Estas peptidasas son conservadas a lo largo de la escala evolutiva. Por electroforesis de doble dimensión (2D) se ha evidenciado en *T. vaginalis* la presencia de 23 diferentes CPs, algunas de las cuales están involucradas en diferentes propiedades de virulencia de este parásito como: citotoxicidad, adhesión, hemólisis y evasión de la respuesta inmune (Krieger y col., 1983; Provenzano y Alderete., 1995; Álvarez-Sánchez y col., 2000; Mendoza-López y col., 2000; Hernandez-Gutierrez y col., 2003).

La CP de 30 kDa (CP 30) involucrada en adhesión, es capaz de unirse a células del hospedero, se encuentra en la superficie del parásito participando en citoadherencia, su localización en citoplasma sugiere una variación fenotípica dependiente del crecimiento, la fase celular del parásito, regulación medioambiental y el tipo de aislado, esta proteasa actúa en un rango de pH de 5.5 a 7.0, estos rangos de pH han sido detectados en la vagina de pacientes con trichomonosis. CP30 es capaz de degradar diferentes proteínas como: hemoglobina, fibronectina y colágeno IV (Mendoza-López y col., 2000).

La CP de 39 kDa (CP39), se ha encontrado en secreciones vaginales de pacientes infectadas con trichomonosis, siendo una molécula involucrada en la citotoxicidad a VECs y células HeLa. Dicha proteasa es capaz de degradar diversos sustratos como colágeno I, III, IV y V, fibronectina, hemoglobina humana

e inmunoglobulinas A y G. Esta proteasa actúa en un amplio rango de pH, de 3.6 a 9.0 con un pH óptimo de 7.0. Mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta se le ha detectado en la superficie del parásito (Hernández y col., 2003).

La CP de 65 kDa (CP65) también participa en la citotoxicidad (Álvarez-Sánchez y col., 2000), se encuentra localizada en la superficie del parásito, degrada colágena IV y fibronectina, pero no laminina o hemoglobina, es inmunogénica en pacientes con trichomonosis y se ha demostrado mediante ensayos de citotoxicidad que CP65 es capaz de unirse a la superficie del epitelio cervical y participar en el proceso de daño a la célula blanco. Actúa en un amplio rango de pH, de 4.5 a 7.0, siendo el pH de 5.5 óptimo para su actividad, esta proteasa es termoestable (Álvarez-Sánchez y col., 2000), altas concentraciones de hierro *in vitro* (Álvarez-Sánchez y col., 2007) y bajas concentraciones de poliaminas reducen su actividad proteolítica, el transcrito, localización y la citotoxicidad de CP65 (Álvarez-Sánchez y col., 2008).

1.3.7 Regulación por hierro

T. vaginalis utiliza el hierro como un regulador de la expresión de diversas moléculas como por ejemplo, regula positivamente la síntesis de las adhesinas, la cual se incrementa en presencia de altas concentraciones de este catión. El hierro también regula la tasa de crecimiento del parásito y su multiplicación (Lehker y col., 1991; Arroyo y col., 1992).

En altas concentraciones de hierro aumenta la expresión de las enzimas hidrogenosomales como son: la ferredoxina, la succinil CoA sintetasa, de la PFOR (Yong y col., 2006). Por otra parte este catión, está involucrado en la modulación de localización de la proteína P270 del virus de doble cadena de RNA que infecta a *T. vaginalis*, esta proteína es altamente inmunogénica en pacientes infectadas con este parásito (Dailey y Alderete., 1991).

Existen otras proteínas reguladas negativamente por hierro como es la cisteín proteinasa 4 (TVCP4), su regulación es a nivel postranscripcional, el mecanismo sugerido es que proteínas tipo IRP son capaces de unirse a una

estructura tipo IRE localizada en el extremo 5' del RNAm del gen *tvcp4* a través de un sistema IRE/IRP bloqueando la traducción, mientras que en altas concentraciones de hierro, la proteína tipo IRP no interacciona con el IRE, permitiéndose la traducción del transcrito, mecanismo similar al que ocurre con el gen de la *ferritina* humana (Solano-González y col., 2007).

El elemento promotor de respuesta a hierro contiene elementos que promueven la respuesta a la presencia del hierro, los cuales se caracterizan por tener la secuencia consenso TAACGATAT y secuencias ricas en "T" como las siguientes secuencias: ATTTTT, ATTATT. Estas secuencias se encuentran en el 5' UTR del gen *ap65-1*, aunque no se ha encontrado en otros genes que están regulados por hierro (Tsai y col., 2002).

Por otra parte, se reportó que el gen *tv44* es regulado por hierro, *tv44* codifica para una proteína de superficie llamada TV44. Esta proteína es regulada positivamente en su expresión y localización, en presencia de hierro y negativamente durante el contacto con las células VECs, sugiriéndose que es regulada por al menos dos mecanismos independientes, los cuales no han sido bien establecidos (Mundodi y col., 2006).

Otra molécula regulada por hierro es la CP65, la actividad proteolítica, el transcrito, localización de esta proteinasa se encuentra disminuida en presencia de hierro, lo cual afecta negativamente los niveles de citotoxicidad del parásito y su regulación es negativa (Álvarez Sánchez y col., 2007).

1.3.8 Regulación por poliaminas.

Recientemente se ha propuesto que *T. vaginalis* presenta otro tipo de regulación la cual esta mediada por las poliaminas, esto fue descrito en las cuatro adhesinas (García y col., 2005) y recientemente en el gen *tvcp65* (Álvarez-Sánchez y col., 2008).

1.4 Antecedentes de las Poliaminas.

El descubrimiento inicial de las poliaminas fue en 1678 donde Antonie van Leeuwenhoek aisló algunos cristales provenientes de semen humano; sin embargo no fue hasta 1924 que la fórmula empírica de los cristales fue descrita en los siguientes años posteriores a la síntesis del producto; los nombres que se dieron a dos de las poliaminas fueron basado en el descubrimiento original “espermidina y espermina”. Por otra parte, la putrescina (1,4-diaminobutano) fue aislada de *Vibrio cholerae*, su nombre deriva de una gran cantidad de carne en putrefacción. Hasta hoy las poliaminas están consideradas como reguladores críticos del crecimiento celular, diferenciación y muerte celular (Tabor y col., 1985; Wallace y col., 2003).

Las poliaminas son compuestos que están presentes en todos los organismos y han estado implicados en una gran variedad de reacciones biológicas, son conocidos como abundantes cationes pequeños los cuales se unen a los ácidos nucleicos para influir en la transcripción y la traducción (Tabor y col., 1985; Pegg y col., 1988; Schuber y col., 1989). Las poliaminas más comunes son putrescina y espermidina; la espermina también está presente, pero no en todos los materiales biológicos. Hasta ahora se sabe que las poliaminas son esenciales para el crecimiento normal y tiene papeles fisiológicos importantes (Fig. 5) (Yarlet y col., 2000).

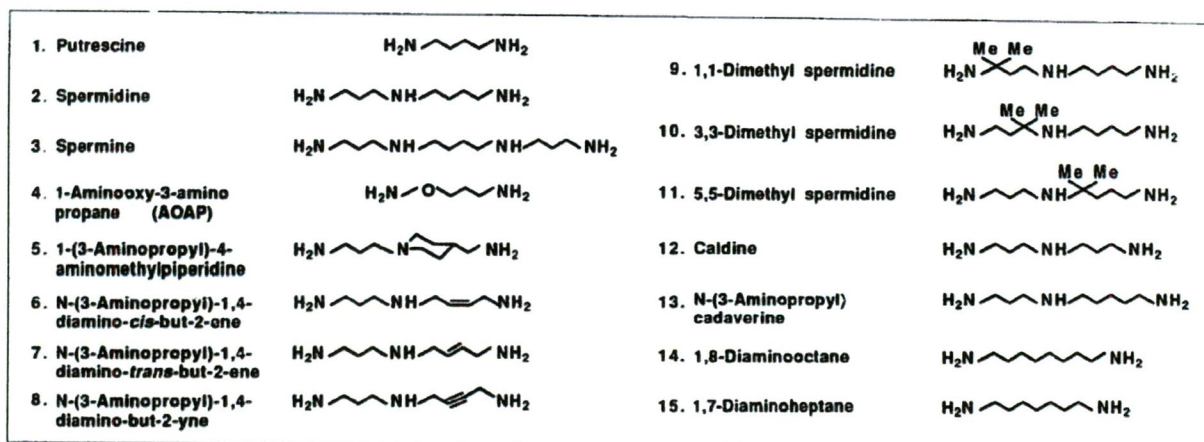


FIG. 5. Estructuras químicas de las poliaminas, mostrando a Putrescina, Espermidina y Espermina como las tres más importantes (Park y col., 1997).

1.4.1 Generalidades de poliaminas.

Estudios realizados en mutantes de *Sacharomyces cereviciae* indican que la síntesis de poliaminas se realiza durante el crecimiento o debido a estímulos de proliferación, los cuales aumentan su biosíntesis, apoyando el concepto de que las poliaminas son esenciales para procesos normales de crecimiento (Chattopadhyay y col., 2003).

A pH fisiológico, las poliaminas tienen cargas positivas sobre cada átomo de nitrógeno lo cual ha sugerido que las poliaminas son simplemente “super cationes”, equivalentes a una o dos moléculas de calcio o magnesio. Sin embargo las cargas de las poliaminas están distribuidas a lo largo de la cadena de carbonos, haciéndolos únicos y distintos ya que no tiene puntos de carga localizados. Estas cargas positivas permiten interactuar a las poliaminas electrostáticamente con macromoléculas polianiónicas dentro de la célula. A pH fisiológico, los grupos amino están protonados, la putrescina es divalente, la espermidina es trivalente y la espermina es tetravalente (Tabor y col., 1985).

Mediante ensayos de fotoafinidad se ha propuesto que la espermidina y la espermina, debido a su carga electrostática son capaces de formar un puente en el surco mayor o menor del DNA, actuando como abrazadera que une dos diferentes moléculas o dos partes distales de moléculas iguales. El estudio de sus estructuras indica que interactúan con moléculas individuales o múltiples de DNA. Selectivamente, las poliaminas se unen a estructuras secundarias de DNA, esto ha sido sugerido mediante estudios de cristalografía con poliaminas teniendo preferencia por residuos de pirimidina, particularmente timidina, pudiendo interactuar con nucleótidos vecinos y con estructuras secundarias. Análogos de poliaminas los cuales son bis (etil) homoespermina han demostrado que puede alterar la interacción DNA - matriz nuclear, sugiriendo que no solo las poliaminas pueden alterar la estructura de DNA sino también su función. En el nucleosoma, la ausencia de poliaminas resulta en un desenrollamiento parcial de DNA,

mostrando secuencias potenciales de unión para factores reguladores de la transcripción (Tabor y col., 1985).

Además de interactuar con el DNA y el RNA, las poliaminas también interactúan con los ácidos fosfolípidicos en las membranas. La espermidina y la espermina aumentan la rigidez de la membrana formando complejos con los fosfolípidos y las proteínas, mediante interacciones electrostáticas de poliaminas policatiónicas con componentes aniónicos naturales de las membranas y con los fosfolípidos cargados negativamente mediante sistemas artificiales cabeza – cola. Mediante este mecanismo se espera reducir las fuerzas repulsivas de los componentes de membranas cargados negativamente y las partículas de membranas (que conducen a la agregación) sin afectar los factores cohesivos como son las fuerzas de Van Der Waals (Schuber., 1989).

Por otra parte ha sido propuesto que las poliaminas pueden tomar parte en el mecanismo contra el daño oxidativo causado por el Fe^{2+}/Fe^{3+} (Pegg y col., 1988).

1.4.2 Metabolismo de poliaminas.

En células eucarióticas, las tres poliaminas se sintetizan a partir de L-arginina (vía L-ornitina) y L-metionina por una serie de seis reacciones enzimáticas interdependientes (Wallace y col., 2003).

La putrescina se forma a partir de Ornitina por la enzima ornitina descarboxilasa (ODC), para la formación de putrescina la cual dona los grupos aminopropil por la acción de la enzima S-adenosil metionina descarboxilasa (dcSAM) la cual es formada a partir de S-adenosil metionina (SAMDC) para la producción de espermidina vía espermidina sintasa y espermina con una segunda reacción del aminopropiltransferasa por espermina sintasa (Wallace y col., 2003).

Las sintasas son enzimas estables que se expresan constitutivamente, ambas enzimas son activadas como homodímeros: la espermidina sintasa tiene una masa molecular de 36 kDa, mientras que la espermina sintasa consiste en dos subunidades de 44 kDa. Por el contrario las descarboxilasas, se regulan por la

disponibilidad de su sustrato, el valor de K_m valora la semejanza de la concentración en tejidos para dcSAM y putrescina o espermidina (Wallace y col., 2003).

La enzima espermidina/ espermina N^1 -acetiltransferasa (SSAT) es la primer enzima que participa en el proceso de retroconversión de espermina en espermidina, formando como productos intermediarios a N-acetil espermina y N-acetilesrpermidina, los derivados de N^1 – acetil son preferidos como sustratos de poliamina oxidasa (PAO) dependientes de FAD para producir espermina y putrescina respectivamente. Los productos intermediarios del catabolismo de poliaminas, han sido encontrados raramente en células normales (Wallace y col., 2003), por el contrario estos productos han sido encontradas en altas concentraciones en células cancerosas. La oxidación de las poliaminas acetiladas da como resultado la producción de cantidades de 3 acetamidopropanol y H_2O_2 , ambos son tóxicos para las células ocasionando su muerte (Wallace y col., 2003).

1.4.3. Regulación de poliaminas.

Las poliaminas contenidas en las células son reguladas en su biosíntesis, degradación, ingestión y excreción (Yarlett y col., 2000).

La ingestión y la biosíntesis de poliaminas son estimuladas durante la respuesta celular a un estímulo proliferativo. Por otra parte cuando el contenido de poliaminas aumenta hay inducción de un sistema de degradación de poliaminas. La ingestión y síntesis son negativamente reguladas por la anti enzima, la cual acelera la degradación de la ornitina descarboxilasa (Fig. 6) (Yarlet y col., 2000; Wallace y col., 2003).

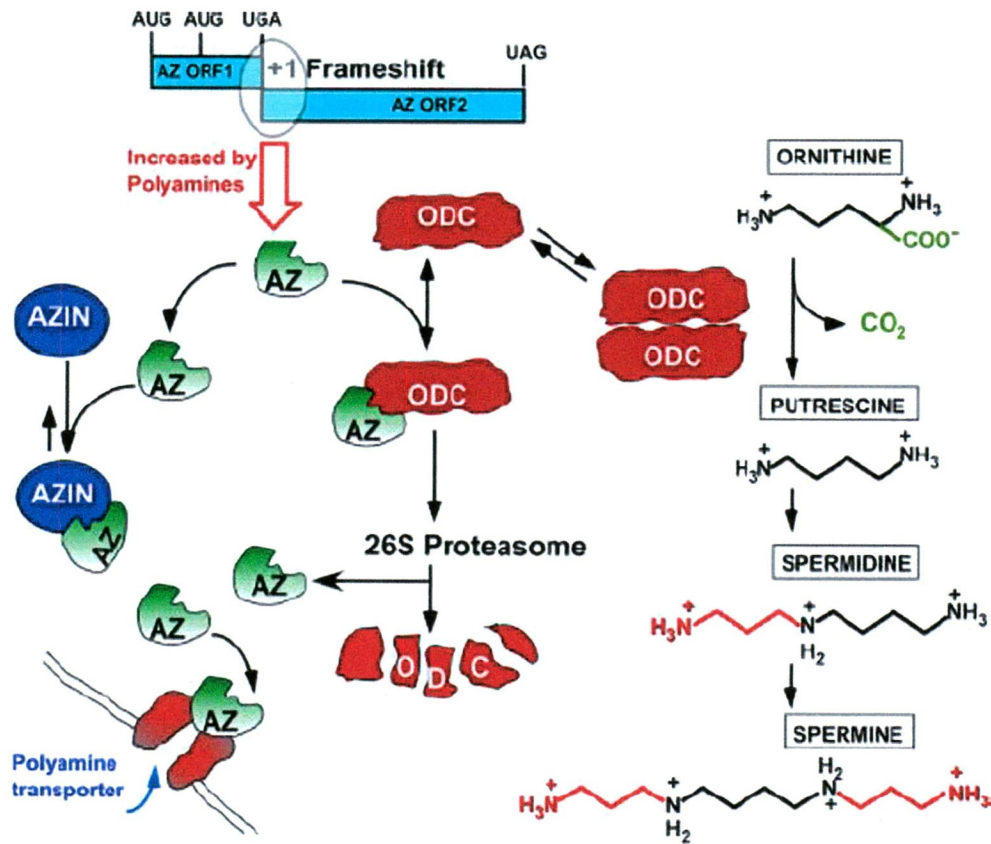


FIG. 6. El papel de la antienzima y la ODC en el metabolismo de las poliaminas. El dímero ODC cataliza la producción de putrescina, la cual es convertida en altas concentraciones de poliaminas. La antienzima es sintetizada vía traducción del mRNA fusionando ORF1 y ORF2 por la estimulación de las poliaminas. La antienzima (AZ) puede unirse a la ODC la cual es degradada por el proteosoma (Wallace y col., 2003).

1.4.4 Interacción de poliaminas con macromoléculas.

Para entender el efecto de unión de las poliaminas al RNA, DNA, nucleótido trifosfato (ATP) y otras sustancias ácidas, se llevaron a cabo estudios en sistemas celulares, usando concentraciones de poliaminas con varias condiciones iónicas. Los sistemas utilizados fueron: linfocitos bovinos, hígado de rata y *E. coli* encontrándose que las poliaminas se unen a macromoléculas (DNA, RNA, fosfolípidos) y ATP; observando que en linfocitos existe una unión mayor de poliaminas formando complejos con el RNA cuando se comparan con las células de hígado. En *E. coli* se ve una mayor unión con putrescina y no se observa unión con espermina y espermidina. Estos resultados sugieren que la mayor parte de la

función celular de las poliaminas puede ser mediante cambios estructurales del RNA (Wallace y col., 2003; Tabor y col., 2003).

Al cambiar las estructuras de RNA, el efecto de las poliaminas en la síntesis de proteínas fue analizada, encontrando que las poliaminas tienen un efecto estimulante y pueden incrementar la tasa máxima de síntesis proteica en concentraciones óptimas de Mg^{2+} . Estos datos sugieren que los cambios estructurales de RNA causados por las poliaminas son diferentes a las causadas por el Mg^{2+} además de influir en el ensamble de la subunidad ribosomal 30S (RNAr) y en la formación del tRNA de Met. De esta manera, las poliaminas pueden participar en varios estados de la síntesis de proteína a nivel de las estructuras secundarias de RNAm, RNAt y RNAr (Park y col., 1997; Tabor y col., 2003).

1.4.5 Mecanismos de regulación mediados por poliaminas.

Las poliaminas regulan procesos importantes en la célula, como son diferenciación, división y apoptosis. El papel exacto de las poliaminas en la regulación de la proliferación no ha sido bien entendido. Recientemente se ha mostrado que las poliaminas son necesarias para la expresión del gen *c-myc*, sobre su transcripción ya que en presencia de el inhibidor de la ODC el 2-difluorometil ornitina (DFMO), la expresión de este gen se ve disminuida en el 90%, aunque el mecanismo por el cual ocurre es desconocido, se ha propuesto que la presencia de las poliaminas durante el inicio de la transcripción y durante la elongación del RNAm de este gen es necesaria (Celano y col., 1989). Por otra parte la proteína p21Cip1 se ha caracterizado por ser una CDK, actuando por asociación a las ciclinas y también como un factor de transcripción, necesario para el control del ciclo celular, el gen *p21cip1* se encuentra regulado negativamente por poliaminas a través de la expresión del gen *c-myc*, a bajas concentraciones de poliaminas la expresión del gen *c-myc* disminuye y la expresión del gen *p21cip1* aumenta (Liu y col., 2006).

Por otra parte se han relacionado a las poliaminas con el crecimiento rápido de tumores, especialmente en el desarrollo de cáncer mamario. Para

entender el mecanismo de cómo los estrógenos se involucran en el cáncer mamario, es relevante conocer el mecanismo de regulación de estas moléculas, por lo que se ha sugerido que existe una interacción entre las poliaminas y los estrógenos, demostrando que la espermina facilita la unión del los estrógenos al receptor de estrógenos (ER), mediante la unión de la espermidina a secuencias en el DNA y conocidas como elementos de respuesta a estrógenos (ERE) de esta manera se incrementa las concentraciones de poliaminas, sugiriendo un posible mecanismo de alteración mediado por poliaminas en la interacción de ER con las secuencias consenso ERE (Huang y col., 2006).

Recientemente se reportó una regulación mediada por poliaminas en el gen de la ciclooxigenasa-2 (*cox-2*) en cáncer de colon de humano. En este estudio se demostró que el gen *cox-2* contiene una secuencia consenso localizada en el extremo 3'UTR del RNAm de este gen, el cual es un elemento de respuesta a la proteína eIF-5A (EREs), al unirse la proteína eIF-5A al EREs en el extremo 3'UTR es capaz de estabilizar la estructura del RNAm aumentando la expresión de este gen (Fig. 8) (Taylor y col., 2002).

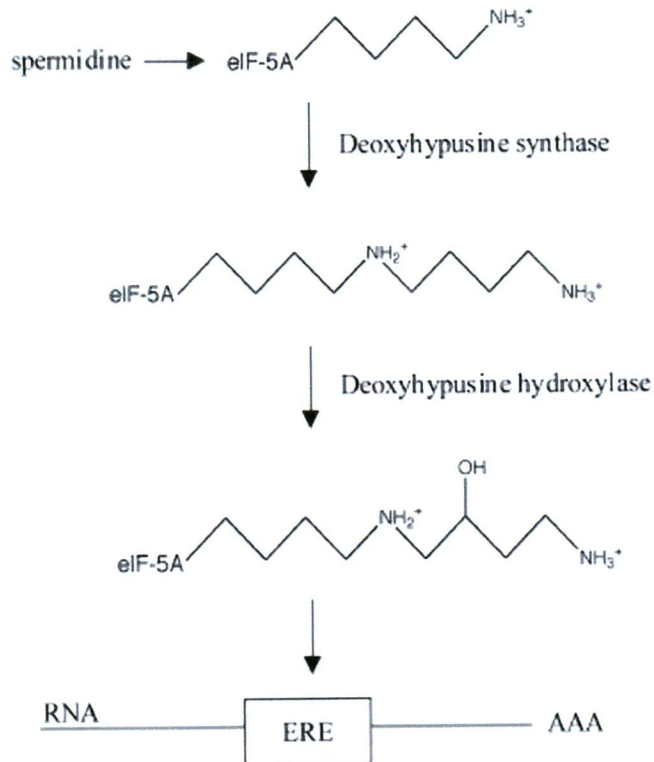


FIG. 7. eIF-5A hipusina es capaz de unirse a las secuencias EREs en el extremo 3'UTR de los RNAm del gen *cox2* (Taylor y col., 2002).

14.6 Poliaminas en *Trichomonas vaginalis*.

T. vaginalis es incapaz de sintetizar espermina de novo por lo cual obtiene esta molécula de su hospedero mediante un sistema antiporte acoplada a la secreción de dos moléculas de putrescina por cada molécula de espermina. *T. vaginalis* sintetiza ornitina por la vía de la arginina hidrolasa que conduce a la producción de ATP vía carbamato cinasa. La putrescina sintetizada por la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) se encuentra presente en gran cantidad en las secreciones de pacientes con trichomonosis. En personas sanas, la cantidad de putrescina y otras diaminas en secreciones vaginalis no fueron detectables sugiriendo que el parásito produce putrescina durante la infección (Yarlett y col., 2000).

La espermina es convertida a espermidina dentro de los hidrogenosomas, vía: espermina N¹-acetiltransferasa (SSAT)/poliamina oxidasa. La SSAT cataliza la transferencia de un grupo acetyl de la acetil-CoA a un nitrógeno aminopropil terminal de la espermina o formación de espermidina N¹-acetyl espermina o N¹-acetyl espermidina, respectivamente, los cuales son metabolizados de espermidina y putrescina por la acción de una poliamina oxidasa (Fig. 8) (Yarlett y col., 2000).

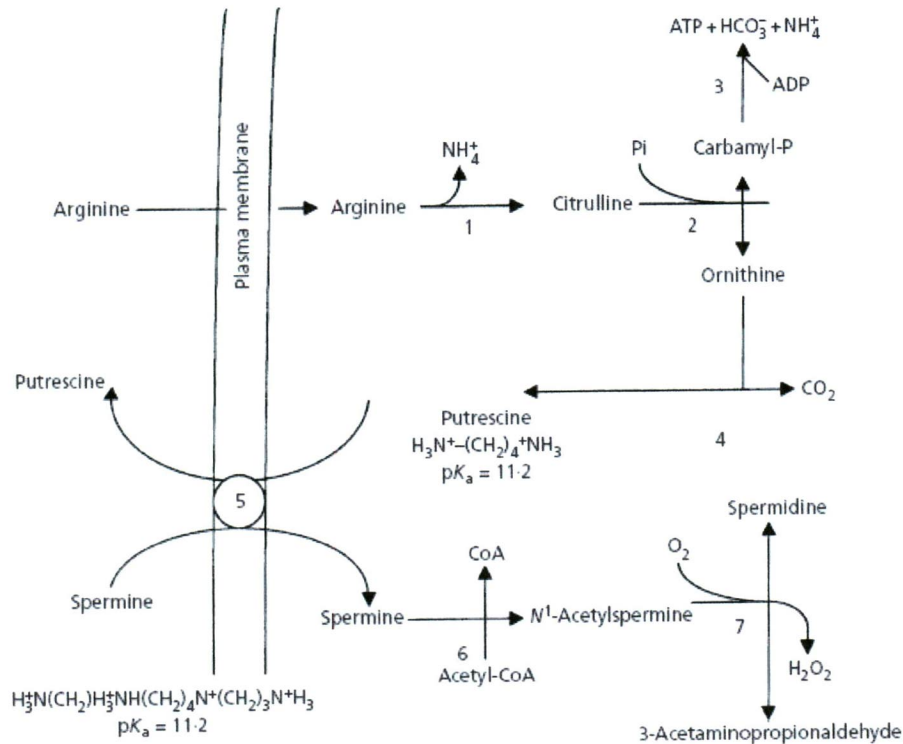


FIG. 8. Metabolismo de poliaminas en *T. vaginalis*. 1, Arginina deaminasa; 2, ornitina catabólica carbamiltransferasa, 3, carbamato cinasa; 4, ornitina descarboxilasa; 5, Putrescina:espermína antiporte; 6, SSAT; 7, poliamina oxidasa. Dos putrescinas son requeridas para el antiporte con una espermina para el balance de transferencia de cargas.

La inhibición de ODC mediante el inhibidor reversible 1-4 diamino butano (DAB) conduce a la reducción significativa de niveles de putrescina y ODC, observando un efecto citostático, el cual puede ser reversible al adicionar putrescina exógena, restaurando así el transporte antiporte, sin afectar la integridad de los hidrogenosomas (García y col., 2005).

Las poliaminas modulan la adquisición de hierro en células de mamíferos, mediante la formación de complejo poliaminas-hierro incorporado a la vía de sistema de transporte de poliaminas. Se ha observado que la adición de

espermina y espermidina a un medio depletado de hierro con 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 *per se* no requieren del metabolismo de las poliaminas para su expresión y el crecimiento de *T. vaginalis* (García y col., 2005).

Recientemente fue descrito que las poliaminas regulan la expresión del transcrito del gen *tvcp65*, esto fue sugerido usando DAB. En presencia de este inhibidor disminuyen los niveles de citotoxicidad que corresponde con la disminución en la actividad proteolítica de la CP65, la expresión del RNAm de *tvcp65*, la cantidad de proteína CP65 así como en su localización. La actividad proteolítica se recuperó con la adición de putrescina exógena así como la expresión del transcrito *tvcp65* y la localización de la CP65 (Álvarez-Sánchez y col., 2008).

1.5. Transcripción en *Trichomonas vaginalis*.

Es conocido que la transcripción en eucariontes se lleva a cabo por tres distintas polimerasas dependientes de DNA. La RNA polimerasa I responsable de la transcripción de los RNAr, la RNA polimerasa II que transcribe genes que codifican proteínas y la RNA polimerasa III que transcribe los RNAt y genes de pequeños RNAr como el 5s (Liston y Johnson., 1998; Torres y col., 2006). Las polimerasas se distinguen por su sensibilidad a alfa-amanitina (toxina fúngica), mediante la cual se ha podido sugerir que *T. vaginalis* contiene una RNA polimerasa II inusual, la cual se ha identificado por ser resistente a alfa-amanitina en un 50%, sugiriendo que solo está es responsable de la transcripción en este parásito (Quon y col., 1996; Liston y Johnson., 1998). Recientemente se ha descrito la presencia del RNAr 5s en *T. vaginalis*, el cual es transcrito por la RNA polimerasa II en el parásito, su papel en el parásito no ha sido bien esclarecido sin embargo se cree que pueda estar actuando en la fidelidad de la traducción (Torres y col., 2006).

Los RNAm de *T. vaginalis* contienen “cap” lo cual refuerza la idea de la existencia de la polimerasa II. Esta polimerasa requiere que los RNAm tengan “cap” en el extremo 5’ para iniciar la transcripción (Arroyo 2000).

1.5.1 Traducción en *Trichomonas vaginalis*.

El mecanismo de traducción es universal, ya que los RNAs ribosomales son altamente conservados en estructuras primarias y secundarias en todos los organismos. La única excepción aparece en los factores iniciales de la traducción, algunos son funcionalmente similares en todos los organismos. En eucariontes el complejo de iniciación involucra un gran número de factores proteicos, muchos de ellos tienen múltiples subunidades (Pestova y col., 2001).

La traducción de los RNAm a proteínas comienza después del ensamble del RNAt iniciador (Met- tRNA), RNAm y la subunidad 40s separada del 60S. El Met-tRNA se coloca en el sitio P del ribosoma en el codón de inicio. Este proceso conduce a la formación del ribosoma 80S, evento que consiste de varias etapas las cuales son:

- 1) Selección del tRNA iniciador de un “pool” de tRNAs de elongación por el factor de iniciación eIF2. Este factor juega un papel central en el inicio de la transcripción asociándose al Met-tRNA para formar el complejo eIF2yGTP y Met-tRNAi como un complejo tRNAr a la subunidad 40S. Finalmente eIF-3 actúa como un factor anti asociación de la subunidad y promueve la selección del Met-tRNA iniciador. Posteriormente se forma el complejo de preiniciación 43S, al unirse este complejo al RNAm, ocurre instantáneamente, el factor eIF4 escanea el RNAm para encontrar el codón de inicio, por un mecanismo que involucra el reconocimiento del “cap” sobre el mRNA por eIF4E. Finalmente, eIF5 es usado para promover la hidrólisis de GTP para el complejo de preiniciación, además de estabilizar al Met tRNA y participar en la formación del esqueleto peptídico, pero no en su elongación.

El movimiento del RNAm limita el complejo ribosomal a la región 5' no traducida del sitio inicial al codón de inicio para formar el complejo de iniciación 48S en donde el codón de inicio son pares de bases que aparean con el anticodón del tRNA (Pestova y col., 2001).

Se ha propuesto que la traducción de los RNAm en *T. vaginalis* puede estar regulado mediante elementos de respuesta a hierro (IREs), su estructura de tallo y burbuja sugieren que actúen como un mecanismo regulador postranscripcional, como ocurre en el gen de la *ferritina*, actuando como reclutadores de la maquinaria traduccional (Tsai y col. 2002; Solano-González y col., 2007).

1.5.2 Modificaciones postraduccionales.

Todas las proteínas hidrogenosomales son codificados por preproteínas con una secuencia líder de 5 a 15 aminoácidos, ausentes en las proteínas maduras. Se ha postulado que esta secuencia se utilice para la translocación de las proteínas del citoplasma a los hidrogenosomas, posiblemente ayudados por las proteínas de choque térmico Hsp10, Hsp60 y Hsp70, responsables del plegamiento correcto de las proteínas localizadas en los hidrogenosomas (Lahti y col., 1992).

Las principales modificaciones postraduccionales en *T. vaginalis* son: 1) acetilación y 2) glutaminación pero no glicosilación, llevándose acabo después del ensamblaje de las estructuras proteicas (Arroyo, 2000).

2. eIF-5A

2.1 Generalidades de la proteína eIF-5A.

eIF-5A es una proteína de 140 aminoácidos altamente conservada a través de los eucariontes desde arqueobacterias hasta mamíferos pero no en eubacterias (Kemper y col., 1976; Park y col., 2006). La proteína eIF-5A fue aislada

inicialmente de una fracción ribosomal de reticulocitos de conejo mostrando un estímulo para la síntesis de metionil-puromicina, indicando un papel en la formación del primer esqueleto peptídico, por lo que se sugirió y se ha considerado como un factor de inicio de la traducción (Kemper y col., 1976).

En todos los eucariontes eIF-5A consta de 12 aminoácidos conservados, rodeando la hipusina, estos aminoácidos son Ser-Thr-Ser-Lys-Thr-Gly-Hpu-His-Gly-His-Ala-Lys, no observados en otras proteínas, sugiriendo un origen temprano en la evolución de los eucariontes (Kemper y col., 1976; Park y col., 2006; Zaneli; 2005). El aminoácido llamado hipusina ($[N^2-(4\text{-amino-2-hydroxybutyl})\text{lysine}]$), fue llamado "hipusina" basado en su estructura, que consiste de dos, hidroxiputrescina y lisina (Kemper y col., 1976; Park y col., 2006). La modificación postraducciona llamada hipusina consta de dos reacciones enzimáticas las cuales convierten al eIF-5A precursor para la actividad biológica de la proteína madura (Kemper y col., 1976; Zaneli., 2005).

La conservación en la secuencia es específica a través del residuo de hipusina, lo cual revela la importancia de esta modificación en la proteína a través de la evolución de los eucariontes. Esta observación lleva a correlacionar la síntesis de hipusina y el crecimiento celular sugiriendo un papel importante de la hipusina en la proliferación celular (Kemper y col., 1976; Park y col., 2006). Por otra parte se han realizado modificaciones en un número de especies eucariontes usando espermidina marcada, sugiriendo que la hipusina es producida sólo en la proteína eIF-5A. Se ha observado gran relación de la hipusina con el crecimiento celular, sugiriendo que la hipusina juega un papel importante en la regulación del crecimiento celular y una posible participación en el control de la síntesis de proteínas (Taylor y col., 2002; Park y col., 2006).

Evidencias directas de la naturaleza esencial de eIF-5A y de su modificación, deriva de estudios de la inactivación del gen en *Saccharomyces cerevisiae*. Esta interrupción del gen *eIF-5A* (*TIF5A* y *TIF51B*) o del gen de la deoxihipusina sintasa *dhs*, produce un fenotipo mortal, indicando la importancia de la modificación deoxihipusina en la viabilidad celular de los eucariontes (Schiner y col., 1991). La inhibición de la actividad de la enzima deoxihipusina

sintasa en células mamíferas causa arresto del ciclo celular, muerte celular o diferenciación tumoral (Schiner y col., 1991).

2.2 Antecedentes de la proteína eIF-5A.

Un mecanismo por el cual las poliaminas pueden participar en la expresión de los RNAm es mediante un gen dependiente de poliamina *eIF-5A*. Este codifica para una proteína única que tiene al aminoácido hipusina. Dicha proteína también es conocida como dependiente de poliaminas (Schiner y col., 1991; Molitor y col., 2004). Se ha comprobado que eIF-5A maduro es capaz de unirse al RNA específicamente a las secuencias AAAUGU o UAACCA de los RNAm. La localización subcelular y la función de eIF-5A ha ocasionado discusiones controversiales en los pasados años. Inicialmente se caracterizó a eIF-5A como un factor iniciador de la traducción en levaduras, pero su decaimiento sólo ocasiona una disminución del 30% en la síntesis de proteína en su papel como factor general de la iniciación de la traducción. Por lo que se propone que solo participe en la traducción de RNAm especiales (Schiner y col., 1991; Taylor y col., 2002). Esta proteína eIF-5A ha sido implicada en el transporte de RNAm y es capaz de unirse a elementos de respuesta putativos llamados EREs en el extremo 3' UTR no traducido de los RNA, como se ha demostrado en el gen *cox-2* (Taylor y col., 2002). También se ha propuesto que eIF-5A funciona como un exportador de proteínas de un subconjunto de RNAm relacionados con la transición del ciclo celular G1/S abriendo. Estos datos sugieren que eIF-5A puede ser operacional en el procesamiento posttraduccional de un subconjunto específico de RNAm involucrados con el ciclo celular (Chan y col., 2001) como transcritos que codifican factores que son requeridos para la viabilidad celular y proliferación. Esta noción fue soportada aun más por el descubrimiento que eIF-5A actúa como un cofactor del Virus de Inmunodeficiencia Adquirida tipo 1 (VIH-1) como factor transportador de RNAm en humano (Schatz y col., 1998). Sin embargo, resultados recientes en levaduras sugieren un papel de este factor de elongación en la traducción más que un factor de iniciación de la misma (Kemper y col., 1976).

Experimentos de localización de la proteína eIF-5A han sugerido que este factor está presente en el núcleo y citoplasma, se ha propuesto que entra al núcleo mediante difusión pasiva (Jao y Chen., 2002), sin embargo esto se ha puesto en duda ya que no en todos los organismos presenta la localización en núcleo, pero si se le ha localizado en citoplasma en células mamíferas de ovocitos de *Xenopus* (Shi., 1996).

III. Justificación.

Las poliaminas regulan propiedades de virulencia en *T. vaginalis* como son la adhesión y la citotoxicidad. La depleción de poliaminas influye sobre la actividad proteolítica y transcritos de la proteína CP65. eIF-5A al ser un factor dependiente de poliaminas, es capaz de unirse a secuencias consenso putativas llamadas EREs sobre los RNAm. Se propone que la proteína TveIF-5A en *T. vaginalis* podría actuar estabilizando al RNAm de CP65 estabilizando al RNAm, mediante un mecanismo de regulación a nivel postranscripcional.

IV. Hipótesis.

La identificación y localización de la proteína TveIF-5A de *T. vaginalis* ayudará a dilucidar el posible mecanismo de regulación de las poliaminas sobre la citotoxicidad de *T. vaginalis*.

V. OBJETIVOS.

Objetivo General.

Identificación y localización de la proteína TveIF-5A de *Trichomonas vaginalis*.

Objetivos particulares.

- 1.- Analizar *in silico* al gen *TveIF-5A* y la proteína TveIF-5A de *T. vaginalis*.
- 2.- Analizar la expresión del gen *TveIF-5A* en presencia y ausencia de poliaminas.
- 3.- Clonar y expresar al gen *TveIF-5A* de *T. vaginalis*.
- 4.- Inmunodetección e inmunolocalización TveIF-5A de *T. vaginalis*.

VI. Estrategia experimental

VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Análisis *in silico* de la proteína TveIF-5A.

Mediante el uso de herramientas bioinformáticas, se realizó una búsqueda del gen *eIF-5A* en diferentes organismos, usando la base de datos Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las secuencias de nucleótidos fueron traducidos a aminoácidos y se realizó un BLAST (<http://www.expasy.ch/tools/blast/>) con parámetros estándar y secuencias no redundantes, obteniendo un amplio grupo de organismos como parásitos (*Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major*, *Giardia lamblia*), levaduras y hongos (*Schizosaccharomyces pombe*, *Gibberella zeae*, *Sacharomyces cerevisiae*), mamíferos (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Bos taurus*). Con las secuencias de aminoácidos se realizó un alineamiento múltiple con el programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>) y se editó con el programa Boxshade (<http://www.ch.embnet.org/software/>). Se obtuvieron dominios conservados de las proteínas de los diversos organismos analizados, se tomó una secuencia consenso la cual se utilizó como sonda, para hacer la búsqueda del gen *tveIF-5A* en la base de datos TIGR (<http://www.tigr.org/>) dentro del genoma de *T. vaginalis*, mediante un BLAST. Esta secuencia fue analizada en el NCBI BLAST, para la búsqueda de TveIF-5A hipotética en *T. vaginalis*.

Con la secuencia de aminoácidos de la proteína hipotética TveIF-5A de *T. vaginalis* se hizo nuevamente un BLAST para corroborar la identidad de la proteína y un alineamiento entre los grupos de organismos arriba mencionados con el programa CLUSTALW y se editó con Boxshade. Con las secuencias de aminoácidos de la proteína eIF-5A, se realizó un análisis filogenético con el programa MEGA 4.0 tomando como grupo externo a la proteína EFP de *Escherichia coli* y *Marimona sp.* El árbol filogenético fue construido usando el método de neighbor-joining (NJ), con 1,000 replicas. Para el árbol filogenético del

gen ribosomal 18s, se usó el programa GENE IUS, usando el método de kimura con 100 replicas.

La secuencia de nucleótidos, fue analizada con un alineamiento usando el programa CLUSTAL W y se editó con boxshade. Así mismo, se buscó el ensamblado en la base de datos TIGR del genoma de *T. vaginalis* donde están localizados los genes *tveIF-5A*.

1.1 Contenido de G +C.

Para determinar el contenido de G+C de este gen, se realizó un análisis con el programa de DNAsis. En este programa se introdujo la secuencia del gen *tveIF-5A* reportado en la base de datos TIGR y fue analizada por el programa.

1.2 Regiones Reguladoras.

Con la secuencia del ensamblado obtenido de ambos genes, se analizó posibles sitios Inr (Liston y Johnson., 1999). Se buscaron río arriba del codón de inicio de la traducción (ATG). También se buscaron los probables sitios de corte y poliadenilación (AUU) hipotéticos en el extremo 3'UTR (Espinosa y col., 2002).

Mediante el programa (Binding factors translate) fueron localizados probables sitios de unión de factores de traducción en el extremo 5' río arriba del codón de inicio de la traducción.

1.3 Diseño de iniciadores para la amplificación del gen *tveIF-5A*.

Para el diseño de los iniciadores se tomo la secuencia del gen *tveIF-5A* sentido y antisentido para los sitios de corte con las enzimas *BamHI* y *XhoI*, los cuales fueron analizados con el programa nebcutter (www.net/international/detailspanish).

La temperatura melting fueron analizadas con el programa "Melting Temperature" (tm) Calculation (http://www.biophp.org/melting_temperature/.php) y

para la predicción de formación de dímeros se usó el programa "Sequence Detection Software" (versión 1.3) (Applied Biosystem).

2. Extracción de DNA

Parásitos del aislado CNCD 147 de *T. vaginalis* se cultivaron en medio TYM (trypticase-yeast extract-maltose) con 10% de suero de caballo (SC) inactivado por calor (30 min / 56 °C) por 24 h / 37 °C para obtener parásitos en fase logarítmica de crecimiento con un inóculo de 2×10^6 , en botellas de cultivo de 25 cm² con 30 ml de TYM-SC. Para cultivos masivos se inocularon 8×10^6 o 35×10^6 tricomonas en botellas de cultivos de 75 cm² conteniendo 100 ml de TYM-SC, considerando que su duplicación es cada 6 horas se colocó el inóculo inicial.

Para la extracción de DNAg se lavaron los parásitos 3 veces con PBS pH 7, centrifugando a 1800 rpm / 5 min. Los parásitos se contaron en una cámara de Neubauer para obtener la cantidad de 20×10^6 de parásitos, para la extracción de DNA se utilizó el Kit WIZARD GENOMIC (Quiagen): se adicionaron 600 µl de solución de lisis y se resuspendieron los parásitos, posteriormente se adicionaron 3 µl de solución RNAsa, se mezcló por inversión de 3 a 5 veces y se incubó la mezcla 30 min / 37 °C, pasado el tiempo se dejó enfriar a TA / 5 min, transcurrido el tiempo se adicionaron 200µl de solución de precipitación de proteínas, se vortexearon 20s e inmediatamente se colocaron las muestras en hielo por 5 min y centrifugaron por 4 min / 14,000 rpm, se removió el sobrenadante que contenía el DNA y se transfirió en un tubo de 1.5 ml limpio, posteriormente se agregó isopropanol a temperatura ambiente y se invirtió el tubo hasta la formación de DNA. Posteriormente, se centrifugó 5 min / 14,000 rpm, se decantó y agregó etanol al 70%, se invirtió por gravedad para lavar el DNA, se centrifugó por 1 min / 14,000 rpm/ T. A. El etanol se aspiró con una pipeta pasteur, el tubo fue invertido en papel absorbente limpio por 15 min. Luego se adicionaron 100 µl de solución rehidratante (agua libre de nucleasas) y se incubó a 65 °C / 1 h. La integridad del DNA se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio.

3.1 Lisados

20 x 10⁶ parásitos se lavaron 5 veces con PBS pH 7.0, se centrifugó a 1800 rpm / 5 min / 4 °C. Después se decantó el sobrenadante y a la pastilla se le adicionaron 500 µl de PBS pH 8.0 y 50 µl DOC (deoxicolato de sodio) al 10%. Se incubaron a 4 °C / 20 min. Posteriormente, se adicionó 450 µl de PBS pH 8.0 y 100 µl de colchón de sacarosa al 10%, en el fondo del tubo. Se centrifugaron a 14,000 rpm / 30 min / 4 °C. Se tomó 100 µl de lisado y se adicionaron 100 µl de amortiguador de muestra 2X e incubaron por 30 min / 37 °C. Las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida copolimerizado con gelatina al 2%. La electroforesis se corrió a 100 V / 1 h. El gel de sustrato se lavó con Tritón X-100 al 2.5% por 10 min y se activo con el amortiguador de acetatos 3 M pH 4.5, se incubó a 37 °C / 18 h. El gel se tiñó con azul de Coomassie por 10 min. Se observó la actividad proteolítica como bandas claras con un fondo oscuro.

3.2 Ligandos

20 x 10⁶ parásitos se lavaron 5 veces con PBS pH 7.0, se centrifugó a 1800 rpm / 5 min / 4 °C, posteriormente se decantó el sobrenadante y a la pastilla se le adicionaron 450 µl de PBS pH 8.0 y DOC (deoxicolato) al 10% (recién preparado). Se incubó a 4 °C / 20 min. Posteriormente se adicionó 450 µl de PBS pH 8.0 y se adicionó 100 µl de colchón de sacarosa al 10%, hasta el fondo del tubo y se centrifugó a 14,000 rpm / 30 min / 4 °C.

Se tomaron aproximadamente 600 µl de cada lisado, el cual se puso a interaccionar con 1 x 10⁶ de células HeLa previamente fijadas, en agitación lenta por 18 h / 4 °C, pasado el tiempo de interacción los ligandos fueron centrifugados a 14,000 rpm / 5 min / 4 °C, las pastillas se lavaron 5 veces con PBS pH 8.0 / DOC 1%, centrifugando a 14,000 rpm / 5 min / 4 °C, se adicionaron 30 µl de amortiguador de carga 1X en cada ligando y se incubaron 20 min / 37 °C, pasado el tiempo de incubación se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm / 5 min / 4 °C, se corrió un gel de poliacrilamida copolimerizado con gelatina al 2%. La

electroforesis se corrió a 100 V / 1 h. El gel de sustrato se lavó con Tritón 2.5 % por 10 min y se activó con en el amortiguador de acetatos 3 M pH 4.5 en incubación a 37 °C / 18 h. Se tiñó con azul de Coomassie por 10 min. Se observó la actividad proteolítica como bandas claras con fondo oscuro.

3.3 Extracción de RNA total mediante la técnica Trizol.

A 20×10^6 parásitos se les adicionó 1 ml de trizol, los tubos fueron mezclados por inversión e incubados a TA / 10 min y 30 min / 4°C. Se adicionaron 200 μ l de cloroformo, se mezcló por 15 s / T.A y se centrifugaron a 10,000 rpm / 4°C / 15 min. La fase acuosa fue recuperada y se le adicionaron 0.5 ml de isopropanol por cada 1ml de trizol, se mezclaron e incubaron por 15 min / T.A y se centrifugaron a 10,000 rpm / 4°C / 15 min, posteriormente se descartó el sobrenadante y se lavaron las pastillas 2 veces con etanol al 75% en agua DEPC, se centrifugaron a 10,000 rpm / 5 min / 4 °C, se dejaron secar las pastillas a temperatura ambiente. Al final la pastilla se resuspendió en 50 μ l de agua DEPC. La cuantificación se realizó por espectrofotometría.

3.4 Síntesis de cDNA.

A 1 μ g de RNA, se le adicionó 1 μ l de oligo dT y agua DEPC cbp 12 μ l, se incubó a 70 °C / 15 min. Después se colocó en hielo por 5 min y se adicionaron 4 μ l de amortiguador 5X, 2 μ l de dNTPs y 2 μ l de DTT, se incubaron a 42 °C / 2 min. Se colocó rápidamente en hielo y se adicionó la retrotranscriptasa reversa (Superscrip II Invitrogen), se incubó a 42 °C / 50 min, pasado el tiempo se inactivó la enzima retrotranscriptasa reversa a 70 °C / 10 min. Se cuantificó el cDNA por espectrofotometría.

3.5 Amplificación por PCR de *tvelf-5A* de *Trichomonas vaginalis*.

Para la amplificación del gen *eIF-5A* se diseñaron los oligonucleótidos basados en la secuencia de nucleótidos del gen *eIF-5A* reportado en la base de datos TIGR. Se les adicionó en los extremos 3' y 5' los sitios de corte para las enzimas *BamHI* y *XhoI*. Los iniciadores sentido y antisentido son los siguientes: 5'-CC GGA TCC ATG TCT TCA GCT GAA GAA GA - 3' y 5'- CC AAG CTT TTA GTT TGT GGA CTT CTT GC - 3'. Para llevar a cabo la reacción de PCR, se utilizó 10 pmol de los iniciadores sentido y antisentido, amortiguador PCR 1X, dNTP [0.2 µM], MgCl₂ [1.5 µM], 50 ng de DNAg, Taq polimerasa [1Unidad] (Invitrogen), cbp 50 µl de agua inyectable.

Se siguió el siguiente programa

94 °C 2 min	1 ciclo
94 °C 1 min	} 25 ciclos
46 °C 1 min	
72 °C 30 seg	
72 °C 7 min	1 ciclo

Para la amplificación del gen de *β-tubulina*, utilizado como control de carga en las diferentes condiciones en presencia y ausencia de las poliaminas, se utilizaron los siguientes iniciadores:

BTUB9 (5'-CATTGATAACGAAGCTCCTTTACGAT-3')

BTUB2 (5'-GCATGTTGTGCCGGACATAACCAT-3') (León-Sicairos y col., 2004).

Para la realización de la reacción de PCR, se utilizó 10 pmol de los iniciadores sentido y antisentido, Amortiguador PCR 1X, dNTP [0.2 µM], MgCl₂ [1.5 µM], 50 ng de DNAg, Taq polimerasa [1Unidad] (Invitrogen), cbp 50 µl de agua inyectable.

El programa de ciclaje que se siguió fue:

94 °C 2 min 1 ciclo
94 °C 1 min }
48 °C 1 min } 30 ciclos
72 °C 30 seg }
72 °C 7 min 1 ciclo

Cada una de las reacciones de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio. Se realizó una densitometría utilizando el programa Quantity one (Bio Rad).

3.6 qPCR cuantitativo por Tiempo Real

Para la realización de PCR cuantitativo por tiempo real, se analizó la intensidad de las bandas de los productos de RT-PCR por densitometría del gen control *β-tubulina* y *tveIF-5A* utilizando el programa Quantity one (Bio Rad), se obtuvo el número de copias / μl , con este se realizaron diluciones de 1×10^{10} hasta 1×10^2 para la curva estándar. Posteriormente, se cargo 1 μl de cada una de las diluciones por triplicado así como 1 μl del cDNA también por triplicado, en las placas de 80 pozos. Analizado por el Software Detection Sequences (versión 1.3) (Applied Biosystem).

Para el control de *β-tubulina* se realizó la siguiente reacción:

12.5 μl de SYBER green (Invitrogen)
1 μL de oligonucleótido BTUB 9
1 μl de oligonucleótido BTUB2
9.5 μl de agua DEPC

El programa de ciclaje que se siguió fue:

90°C	15 min	1 ciclo
95°C	30 s	40 ciclos
48°C	30 s	
72°C	30 s	

Para realizar PCR tiempo real del gen *tveIF-5A* se diseñaron los iniciadores, utilizando el programa Sequence Detection Software (version 1.3) (Applied Biosystem), los cuales se muestran a continuación:

Sentido

5' TTTGTTGACCGTTCCGATTATG 3' tm 58

Antisentido

5' TTGCCCTCTGGTGGGAAGATC 3' tm 59

Para el gen *tveIF-5A* se utilizó la siguiente reacción:

12.5 µl de SYBER green (Invitrogen)

1 µl de oligonucleótido TRSeIF-5A

1 µl de oligonucleótido TRASeIF-5A

9.5 µl de agua DEPC

Programa de ciclaje que se siguió fue:

90°C	15 min	1 ciclo
95°C	30 s	40 ciclos
58°C	30 s	
72°C	30 s	

Se realizó el análisis de los datos en programa Excel. Los valores obtenidos del gen *tveIF-5A* fueron normalizados con los valores del gen de *β-tubulina*.

4. Clonación en PCR 2.1 TOPO Cloning (Invitrogen).

Para la clonación en el vector PCR 2.1 TOPO Cloning (Invitrogen), se tomaron 4 µl de la reacción de PCR, 1 µl del vector, 0.5 µl de H₂O, 1 µl de sales (que contiene Mg²⁺) contenidas en el kit del vector y la mezcla se incubó por 5 min / T.A. Posteriormente se transformaron células DH5α (*E. coli* TOP 10) con 4 µl de la mezcla de ligación, se incubó por 30 min en hielo, posteriormente se les dio un choque térmico (42°C / 30 s), inmediatamente se pasaron a hielo, después se agregaron 250 µl de medio SOC y se incubaron en agitación a 200 rpm / 37 °C / 1 h. Enseguida 100 µl de células transformadas se plaquearon en cajas con medio LB + ampicilina (100 mg / ml), se incubaron a 37°C / 18 h. Como control se realizó la transformación sin el producto de PCR.

4.1 Miniprep por lisis alcalina.

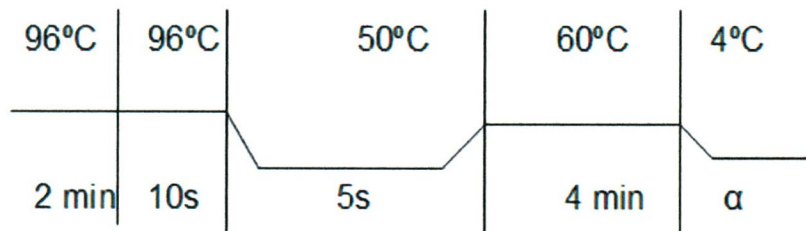
Se crecieron colonias en 5 ml de medio LB-ampicilina posteriormente se incubaron a 37 °C / 200 rpm / O.N. Brevemente, la extracción del DNA plasmídico del cultivo de bacterias (miniprep):

Se realizó el empastillado por centrifugación a 15,000 rpm / 2 min, posteriormente se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 µl de la solución I fría, se agitó hasta resuspender la pastilla. Enseguida, se agregaron 200 µl de la solución II recién preparada y se mezcló suavemente por inversión, después se agregó 150 µl de solución III fría, se invirtió y se incubó en hielo durante 5 min, pasado el tiempo se centrifugó a 15,000 rpm / 5 min / 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se agregó un volumen 1:1 de fenol: cloroformo, se agitó y centrifugó como el paso anterior. La fracción soluble se transfirió a un tubo limpio, se agregaron 2 volúmenes de etanol al 100% frío se precipitó por 2 h / 20 °C, se centrifugó a 15,000 rpm / 20 min / 4 °C. La pastilla obtenida se lavó 3 veces con etanol al 70% frío, se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µl de agua inyectable, se verificó en un gel de agarosa al

1%. Posteriormente con el DNA plasmídico purificado se realizó una doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I para la liberación del inserto. Se utilizó 1 Unidad de enzima por cada 1 µg de DNA plasmídico.

4.2 Preparación de las muestras para secuenciación.

Para la reacción de secuenciación se utilizaron 350 ng de DNA plasmídico, 10 pmol de primer sentido eIF-5AS, 10 pmol de primer antisentido eIF-5A-AS, 2µl de BIGDYE, 3 µl de Amortiguador 5X, 20 µl de agua inyectable estéril (cbp). Se utilizó el siguiente programa:



La reacción fue secada por 30 min en el concentrador 5301 (Eppendorf) a temperatura ambiente. La pastilla se resuspendió en agua estéril y se purificó por columna utilizando el kit DyeEX™ 2.0 Spin Kit (Quiagen).

4.3 Subclonación en el vector de expresión pGEX6-P-1 (GE Life Sciences).

pGEX6-P-1 (GE Life Sciences) (Fig. 9) fue purificado con el kit comercial QIAfilter Midi, con el siguiente protocolo:

Se realizó un cultivo de 50 ml de medio LB-ampicilina, con una clona con el plásmido pGEX6-P-1 se incubó a 37 °C / 200 rpm / O.N, se centrifugó el cultivo a 8000 rpm / 20 min / 4 °C. La pastilla se resuspendió en 4 ml de amortiguador P1 (con RNAsa A [100 µg/ml]), posteriormente se vortexeo hasta resuspender la

pastilla, después se adicionó 4 ml de amortiguador P2, se mezcló por inversión de 4-6 veces, se incubó 5 min / T.A, esta mezcla fue pasada a la jeringa sin introducir el embolo se dejó reposar por 10 min. Para la preparación de la columna QIAFilter, se pasaron 5 ml del amortiguador QI, pasado el tiempo de reposo se introdujo el embolo en la jeringa, la mezcla fue pasada a la columna QIAFilter. Se dejó pasar todo el contenido de la columna y posteriormente se sacudió un poco la punta de la columna para evitar contaminación al momento de eluir el plásmido, inmediatamente se eluyó con agua libre de nucleasas. Posteriormente se precipitó con isopropanol al 70% y centrifugó por 10 min / 13,000 rpm, después se decantó el sobrenadante y se lavó dos veces sin resuspender la pastilla con etanol frío al 70 %, se centrifugó en cada lavado 5 min / 13,000 rpm. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se secó al aire libre. La pastilla se resuspendió en 50 μ l de agua inyectable. La cuantificación se realizó por espectrofotometría.

pGEX-6P-1 (27-4597-01)

PreScission™ Protease

Leu Glu Val Leu Phe Gln↓Gly Pro Leu Gly Ser Pro Glu Phe Pro Gly Arg Leu Glu Arg Pro His
CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC CTG GGA TCC CCG GAA TTC CCG GGT CGA CTC GAG CGG CCG CAT
BamH I EcoR I Sma I Sal I Xho I Not I

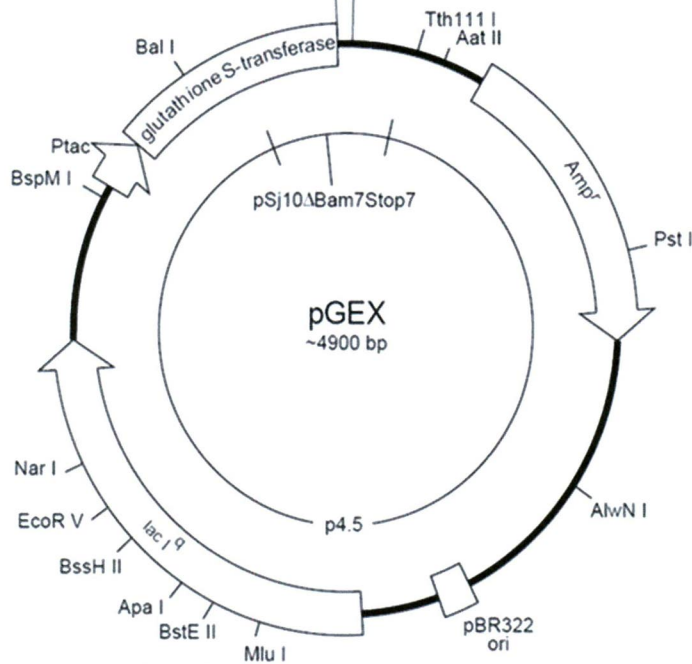


Fig. 9. Mapa del plásmido *pGEX* con un tamaño de 4900 pb, indicando el sitio de corte en donde están incluidas las enzimas *BamHI* y *XhoI*.

4.4. Linearización del vector *pGEX6P1* y restricción del inserto.

Se realizó una restricción secuencial con las enzimas *BamHI* (Invitrogen) y *XhoI* (Invitrogen), siguiendo las especificaciones para cada enzima, la enzima *XhoI* se incubó por 3 h / 37°C y se inactivó a 65°C / 20min, posteriormente verificó la restricción en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Después se continuó con la segunda reacción de restricción con la enzima *BamHI* (Invitrogen) la cual se incubó por 3 h / 37 °C, se verificó la restricción en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. El inserto restringido con ambas enzimas se corrió en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

Para evitar la religación del plásmido se adicionaron 0.5 µl de fosfatasa alcalina (PSA New England) y se incubó 30 min / 37°C, la reacción se corrió en un gel de agarosa al 1% con TAE 1x a 70 V, la banda se purificó siguiendo el protocolo del kit QIAEXII.

4.5 Purificación de productos en gel QIAEXII (QIAGEN).

Para purificar los productos obtenidos en un gel de agarosa se cortó la banda deseada y se pesó un tubo Eppendorf estéril y nuevo, se adicionó el amortiguador QXI en proporción al peso de la banda cortada por ejemplo 1200 µL fueron utilizados para 0.090 g, posteriormente se adicionó 10 µl de la resina y se incubó la mezcla a 55 °C / 10 min, la mezcla se vortexeó cada 5 min hasta que la agarosa se disolvió. Ya disuelta la agarosa la mezcla fue vortexeado vigorosamente y centrifugada a 13,000 rpm / 1 min, el sobrenadante fue decantado y se adicionó 500 µl del amortiguador QXI para lavar la pastilla, la pastilla se resuspendió y se centrifugó a 13000 rpm / 1 min, el sobrenadante se decantó y se adicionaron 500 µL del amortiguador PE (adicionado con etanol), la pastilla se resuspendió y se centrifugó a 13,000 rpm / 1 min, el sobrenadante se decantó y la pastilla se dejó secar al aire, después se resuspendió en 20 µl de agua inyectable y se incubó a 60 °C / 5 min, este paso fue repetido 3 veces.

4.6. Reacción de ligación.

Para la reacción de ligación se utilizó una relación 1:20 (plásmido-inserto) con t4 ligasa, amortiguador de la T4 ligasa y agua estéril, el control de la reacción de ligación se realizó con DNA plasmídico, T4 ligasa, Amortiguador de la T4 ligasa y agua estéril, descrita en la tabla 1 (C1), para el control 2 (C2) se adicionó a la reacción DNA plasmídico, amortiguador de la T4 ligasa y agua, como se indica en la tabla 2. Las reacciones se incubaron a 16 °C / O.N.

	Ligación	C1	C2
DNA plasmídico	+	+	+
Inserto	+	-	-
T4 ligasa	+	+	-
Amortiguador T4 ligasa	+	+	+

Tabla 2. Reacción de ligación del plásmido pGEX 6P1 linearizado con el inserto purificado, utilizando la enzima T4 ligasa con el amortiguador T4 ligasa.

La reacción de ligación se utilizó para transformar las células competentes DH5 α (*E. coli*), se incubó 30 min en hielo, posteriormente se les dio un choque térmico (42°C / 90 s), inmediatamente se pasaron al hielo y se incubaron por 5 min posteriormente se adicionaron 500 μ l de medio LB, se incubó en agitación a 200 rpm / 37 °C / 1 h. Enseguida 200 y 100 μ l de cultivo se plaquearon en cajas con medio LB + Ampicilina (50 mg / ml) se incubaron a 37 °C / 18 h.

5. Expresión de la proteína recombinante

5.1. Inducción de la proteína recombinante

Un cultivo de células BL21 con una densidad óptica de 0.6, se uso como inculó para la inducción de la proteína recombinante TvelF-5Ar con IPTG 1 Mm / 3 h / 220 rpm, el cultivo se empastillo a 14,000 rpm / 10 min / 4 °C, se decantó el sobrenadante y se adicionó amortiguador de carga 1x, el análisis de la expresión de la proteína recombinante se realizó por electroforesis en SDS-PAGE al 12% utilizando la siguiente reacción: Poliacrilamida/Bisacrilamida (30%), 0.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 10% persulfato de amonio, 0.1% TEMED. El gel se tiñó con azul de Coomassie.

5.2 Solubilidad de la proteína recombinante

Para el análisis de solubilidad, la pastilla de bacterias del cultivo de 5 ml se resuspendió en PBS pH 7.0, posteriormente, se sonicaron en frío con un sonicador de punta (Ultrasonic processor) por 3 ciclos de 20s con una amplitud de 70%, se centrifugó a 14,000 rpm / 10 min. Se analizó el sobrenadante y la pastilla por separado, se adicionó amortiguador de muestra 1X, se mezcló por agitación y fueron hervidas por 3 min, estas muestras fueron analizadas en un gel de poliacrilamida al 12%, preparado con las siguientes soluciones: Poliacrilamida/Bisacrilamida (30%), 0.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 10% persulfato de amonio, 0.1% TEMED. El gel se tiñó con azul de Coomassie.

5.3 Western blot de la proteína recombinante

La proteína recombinante se corrió en un gel de poliacrilamida al 12%, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa utilizando amortiguador de transferencia (Tris-base 25 mM, glicina 40 mM, SDS 0.05 %, metanol 20 %). La transferencia se realizó a 100 V / 1 h. La membrana de nitrocelulosa se tiñó con rojo de Ponceau para verificar la transferencia. Después la membrana se lavó 3 veces con PBS pH 7.0 y se bloqueo con PBS-Tween 0.1% con leche al 5 % / 4 °C / O.N, al día siguiente se incubó con el anticuerpo primario chivo anti GST, utilizando una dilución 1:3000 en agitación por 2 h, pasado el tiempo se lavó la membrana 5 veces por 10 min con PBS pH 7.0-Tween 20 al 0.1%. Posteriormente, se incubó con el segundo anticuerpo cabra anti chivo conjugado a HRP utilizando una dilución 1:10,000 por 3 h y finalmente se realizaron 10 lavados por 10 min con PBS pH 7.0-Tween 20 al 0.1%, se realizó el revelado por quimioluminiscencia utilizando placas autoradiograficas (KODAK).

5.4. Purificación de la proteína recombinante.

5.4. Purificación de la proteína recombinante.

La proteína de la fracción soluble (500 μ l) se incubó 12 h / 4 °C en agitación suave con 1.33 ml de una matriz de Glutación-Sefarosa (Amersham Biosciences). Posteriormente, se realizaron seis lavados, cada uno con 6.65 ml con PBS pH 7.0 frío, y 4 eluciones con el amortiguador de glutación reducido (HEPES 75 mM, NaCl 150 mM, Glutación reducido 15 mM, 0.1% de Tritón X-100 y DTT 0.5 mM). De cada unos de los lavados, así como de las eluciones, se tomó una alícuota de 20 μ l para analizar las proteínas en gel SDS-PAGE y teñirlo con azul de Coomasie, por otra parte un gel idéntico se transfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ m (Bio Rad). La cual fue bloqueada con PBS-Tween 20 al 0.1% y leche al 5 % / 4 °C / O.N; se lavó e incubó con el anticuerpo primario cabra anti GST en una dilución 1:3000, se lavó 5 veces por 10 min y se incubó con el segundo anticuerpo cabra anti IgG conjugado a HRP en una dilución 1:10,000. Se lavó la membrana 10 veces por 10 min y se reveló por quimioluminiscencia con el kit ECL (Amersham Bioscience).

6. Producción de anticuerpos policlonales contra el péptido sintético eIF-5A.

Se inmunizaron 5 ratones Bal/c, machos de 3 semanas, obteniendo suero preinmune antes de la inmunización. Se inmunizó vía intraperitoneal, con un sistema de inmunización estándar (tabla 3).

Tabla 3. Esquema de inmunización utilizando el péptido sintético.

Semana	Cantidad de antígeno $\mu\text{g}/\text{ratón}$	Adyuvante completo de Freud	Adyuvante incompleto de Freud	Sangrado
1	300	+	-	-
2	300	-	+	-
3	150	-	+	-
4	150	-	-	+
5	75	-	-	-
6	-	-	-	+
7	75	-	-	-
8	-	-	-	+
9	50	-	-	-
10	-	-	-	+
11	50	-	-	-
12	-	-	-	+
13	25	-	-	-
14	-	-	-	+

6.1 Western blot utilizando los anticuerpos anti TvelF-5A

Los parásitos cultivados en medio TYM-SC se centrifugaron a 1800 rpm / 5 min / 4 °C, la pastilla se lavó 5 veces con PBS pH 7.0, centrifugando a 1800 rpm / 5 min. Posteriormente a la pastilla se le adicionaron 900 µl de PBS pH 7.0 y 100 µl de ácido tricloroacético al 100% (TCA), se dejó O.N. / 4°C, al día siguiente se lavó la pastilla con PBS pH 7.0, 5 veces y se centrifugó a 1800 rpm / 4 °C, se decantó el sobrenadante y se limpió con algodón las paredes del tubo sin tocar la pastilla, posteriormente se adicionaron 400 µl de amortiguador de carga 1X, la pastilla fue resuspendida y se hirvieron por 3 min, la muestra fue corrida en un gel de poliacrilamida al 15% a 100 V / 1 h / T.A, transcurrido este tiempo el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa para la realización del Western blot. La membrana se tiñó con rojo de Ponceau para verificar la transferencia de las proteínas, posteriormente se lavó 3 veces con PBS pH 7.0 y se bloqueó con PBS-Tween 20 al 0.1% con leche al 5 % / 4 °C / O.N. Al día siguiente se lavaron las membranas con PBS pH 7.0-Tween 20 al 0.1% y se incubó con el suero preinmune como control (C1) utilizando una dilución 1:1000. Como control positivo se utilizó un anticuerpo anti proteínas totales de *T. vaginalis* a una dilución 1:3000 y se incubaron los suero inmunes en una dilución 1:50,000, en agitación O.N. / 4 °C. Al día siguiente se lavó la membrana 5 veces por 10 min con PBS pH 7.0-Tween 20 al 0.1%. Posteriormente se incubó con el segundo anticuerpo cabra anti-ratón conjugado a HRP en una dilución 1:3000, se incubó por 1 h en agitación, el control positivo fue incubado 1h en agitación con cabra anti-conejo conjugado HRP, pasado el tiempo se realizaron 10 lavados por 10 min con PBS pH 7.0-Tween 20 al 0.1%, posteriormente se realizó el revelado por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL (Amersham Bioscience).

Por otra parte el extracto bacteriano con la proteína recombinante inducida, fue sonicada y centrifugada a 14 000 rpm / 10 min, la fracción soluble se transfirió a un tubo limpio y se adicionó amortiguador 1X, la muestra fue hervida 3 min y se corrió en un gel de poliacrilamida al 12% a 100 V / 1 h. Posteriormente se transfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm a 100 V / 1 h, transcurrido el tiempo

la membrana se tiñó con rojo de Ponceau para verificar la transferencia de las proteínas. Posteriormente se lavó 3 veces con PBS pH 7.0 y se bloqueó con PBS-Tween 20 al 0.1% con leche al 5 % / 4 °C / O.N, al día siguiente la membrana se lavó con PBS pH 7.0-Tween 20 al 0.1% y posteriormente se incubó con el suero preinmune como control (C1) utilizando una dilución 1:1000. Como control positivo se utilizó un anticuerpo cabra anti GST a una dilución 1:3000 y se incubaron los suero inmunes en una dilución 1:100 y 1:500 en agitación O.N. / 4 °C, al día siguiente se lavó la membrana con PBS pH 7.0-Tween 20 al 0.1% y se incubó 1h con el segundo anticuerpo cabra anti-ratón conjugado a HRP en una dilución 1:3000, el control positivo fue incubado 1 h con cabra anti IgG conjugado a HRP en una dilución 1: 10,000, pasado el tiempo se realizaron 10 lavados por 10 min con PBS pH 7.0-Tween 20 al 0.1%, posteriormente se realizó el revelado por colorimetría.

7. Localización de la proteína TveIF-5A

Se cultivaron *T. vaginalis* en medio TYM adicionado con suero de caballo inactivado así como parásitos crecidos en presencia del inhibidor DAB, transferidos a medio con putrescina exógena y parásitos crecidos en DAB, transferidos a medio normal, sobre cubreobjetos. Las laminillas son pasadas a pozos de 60 mm y fijadas con paraformaldehído 4% 1 h / 37 °C.

Para parásitos no permeabilizados las laminillas se lavaron 3 veces con PBS pH 7.0, se bloquearon las laminillas con glicina 50 mM en PBS pH 7.0 frío y posteriormente se bloquearon con suero fetal bovino al 1% / T.A, después se bloqueo nuevamente con glicina 50 mM en PBS pH 7.0 frío por 1h / T.A, transcurrido el tiempo se bloquearon con suero fetal bovino al 1%, pasado el tiempo de incubación se bloqueó con suero fetal bovino al 0.2%, se lavaron tres veces con PBS pH 7.0 y se colocó el primer anticuerpo utilizando una dilución 1:20 incubando O.N / 4 °C. Al día siguiente se lavó con PBS pH 7.0-BSA 1% por 3 veces, se adicionó el anticuerpo secundario en una dilución 1:100 por 1 h / 4 °C,

se lavó con PBS pH 7.0-BSA 1% por 3 veces, posteriormente se colocaron 8 µl de la resina Vectashield en el porta objetos y se montó la laminilla sellando las orillas con barniz transparente, por último las laminillas fueron guardadas a 4°C protegiéndolas de la luz.

Para permeabilizar los parásitos, las laminillas se lavaron 3 veces con PBS pH 7.0, para eliminar el RNA se utilizó una solución de HCl 1M, se hidrató con PBS pH 7.0 por 10 min, se neutralizó con NH₄Cl 50 mM en PBS pH 7.0 por 10 min y se hicieron 2 lavados con PBS pH 7.0 por 10 min, se colocaron las laminillas en HCl 1M / 2 h / T.A. Pasado el tiempo se lavaron con PBS pH 7.0 por 5 min y se bloquearon las laminillas con glicina 50 mM en PBS pH 7.0 frío y después se bloqueo con suero fetal bovino al 1% / T.A, después se bloqueo nuevamente con glicina 50 mM en PBS pH 7.0 por 1 h / T.A, transcurrido el tiempo se bloquearon con suero fetal bovino al 1% y se permeabilizó con Tritón X 100 al 0.2% por 10 min, pasado el tiempo de incubación se bloquearon las laminillas tres veces con suero fetal bovino al 1% en PBS pH 7.0 frío, y posteriormente se bloqueó con suero fetal bovino al 0.2%, se lavaron tres veces con PBS pH 7.0 y se colocó el primer anticuerpo utilizando una dilución 1:20 incubando O.N / 4 °C. Al día siguiente se lavó con PBS pH 7.0-BSA 1% por 3 veces, se adicionó el anticuerpo secundario en una dilución 1:100 por 1 h / 4 °C, se lavó con PBS pH 7.0-BSA 1% por 3 veces, la contra tinción se realizó con yoduro de propidio por 10 segundos, transcurrido el tiempo se lavó la laminilla sumergiéndola con cuidado en agua destilada, posteriormente se colocaron 8 µl de la resina Vectashield en el porta objetos y se montó la laminilla sellando las orillas con barniz transparente, por último las laminillas fueron guardadas a 4°C protegiéndolas de la luz.

VIII. Resultados.

8. Análisis bioinformático

Primero realizamos la búsqueda y el análisis *in silico* del gen *eIF-5A* y de la proteína eIF-5A. Para esto se realizó una búsqueda bibliográfica encontrando que la proteína eIF-5A esta reportada en el humano, *Sacharomyces cereviciae*, *Plasmodium falciparum*, *Bombix mori* entre otros. La secuencia de aminoácidos de la proteína eIF-5A de *Plasmodium falciparum* fue utilizada como sonda para realizar un BLAST para localizar la proteína eIF-5A en otros organismos como parásitos (*Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania infantum*) levaduras y hongos (*Schizosaccharomyces pombe*, *Candida glabrata*, *Gibberella zeae*, *Sacharomyces cerevisiae*), mamíferos (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Xenopus laevis*), invertebrados (*Bombix mori*), plantas (*Oriza sativa*, *Arabidopsis thaliana*, *Carica papaya*) y la proteína EFP de las bacterias *Escherichea coli* y *Marimona sp.* A partir de las secuencias de aminoácidos de la proteína eIF-5A de los diferentes organismos se realizó un alineamiento con el programa Clustal W en el cual localizamos una región bien conservada de 13 aminoácidos los cuales ya se encuentran reportados y son característicos de esta proteína incluyendo el residuo de lisina que sufre la modificación postraducional hipusinacion (Fig. 10).

La región conservada de los 13 aminoácidos fue utilizada como sonda para realizar la búsqueda de la proteína eIF-5A en la base de datos TIGR dentro del genoma de *T. vaginalis*. Se obtuvieron dos contiguos con número 92815.m00006 y 89692.m0048. Estos dos contiguos fueron analizados mediante un alineamiento utilizando el programa Clustal W, encontrando únicamente dos cambios de aminoácidos en los residuos 103 y 147, estas dos proteínas tienen una similitud del 99% (Fig. 11). Por otra parte se realizó el alineamiento de las proteínas TveIF-5A de *T. vaginalis* con las proteínas eIF-5A de los organismos anteriormente mencionados, en donde encontramos la región conservada de los 13 aa, el residuo de lisina fue encontrado en el residuo 53 en las proteínas TveIF-5A.

FIG. 10. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de la proteína eIF-5A en diversos organismos homólogos. Alineamiento entre las secuencia de aminoácidos de la proteína eIF-5A de *Sacharomyces cerevisiae* (Sc)., *Candida glabrata* (Cg)., (Gr)., *Schizosaccharomyces pombe* (Sp)., *Mus musculus* (Mm)., *Homo sapiens* (Hs)., *Xenopus laevis* (Xl)., *Bombix mori* (Bm)., *Toxoplasma gondii* (Tg)., *Carica papaya* (Cp)., *Oriza sativa* (Os)., *Arabidopsis thaliana* (At)., *Leishmania infantum* (Li)., *Entamoeba histolytica* (Eh)., *Escherichia coli* (Ec)., *Marimona sp* (Ms)., *Plasmodium falciparum* (Pf)., *Gibberella zeae* (Gz), utilizando el programa Clustal W. Los cuadros negros indican la identidad entre las secuencias, las regiones grises muestran la similitud entre las secuencias, el recuadro rojo denota la región más conservada la cual se utilizó como sonda para hacer la búsqueda y el análisis de la proteína TveIF-5A en la base de datos del genoma de *T. vaginalis* TIGR.

```

eIF5A3c 1 -----MS-----DEEHTFEN-----ADAGASATVPM
eIF5ACg 1 -----MA-----EEEHTFEL-----ADAGASSTVPM
eIF5AGz 1 -----MSAPNDNEHEMTFDS-----ADAGASLTVPM
eIF5ASp 1 -----MA-----EEEHVDFEG-----GEAGASLTVPM
eIF5AMm 1 -----MAD-----DLDPEL-----GDAGASATVPM
eIF5AHs 1 -----MAD-----DLDPEL-----GDAGASATVPM
eIF5AX1 1 -----MAD-----DLDPEL-----GDAGASATVPM
eIF5ABm 1 -----MGDI-----EDTHFEL-----GDSGASATVPM
eIF5ADd 1 -----MSDN-----PALDVEDYACAGSGASLTVPT
eIF5ABb 1 -----M-----IDETFES-----TDAGASHTVPM
eIF5ATg 1 -----MSDA-----EDVTFEL-----ADAGASHTVPM
eIF5ACp 1 -----MSD-----EEHHFESK-----ADAGASHTVPM
eIF5AOs 1 -----MSDS-----EEHHFESK-----ADAGASHTVPM
eIF5AAt 1 -----MSD-----DEHHFES-----SDAGASHTVPM
eIF5ALi 61 60LYPFCILQKYHNADYVLDALLRIALFSSFNTMSD-----EDHDFSHQG-GEDMASKT
eIF5AEh 1 -----MSS-----SINEFEL-----GNLEHSGVNEFC
eIF5AMsp 1 -----MANN
EFPEc 1 -----MFDRDEGAFREKLSFSSIAHELRTFVSNLMMQ

```

```

eIF5A3c 22 21QCSALREN-----GFVVVIRGRPCRIVDMSTSKTGKHGHAFVHLVVIDIPT
eIF5ACg 22 21QCSALREN-----GFVVVIRGRPCRIVDMSTSKTGKHGHAFVHLVVIDIPT
eIF5AGz 27 26QCSALREN-----GFVVVIRGRPCRIVDMSTSKTGKHGHAFVHLVVIDIPT
eIF5ASp 23 22QCSALREN-----GHVVVIRGRPCRIVDMSTSKTGKHGHAFVHLVVIDIPT
eIF5AMm 21 20QCSALREN-----GFVVVIRGRPCRIVDMSTSKTGKHGHAFVHLVVIDIPT
eIF5AHs 21 20QCSALREN-----GFVVVIRGRPCRIVDMSTSKTGKHGHAFVHLVVIDIPT
eIF5AX1 21 20QCSALREN-----GFVVVIRGRPCRIVDMSTSKTGKHGHAFVHLVVIDIPT
eIF5ABm 23 22QCSALREN-----GFVVVIRGRPCRIVDMSTSKTGKHGHAFVHLVVIDIPT
eIF5ADd 26 25QCSALREN-----GFVVVIRGRPCRIVDMSTSKTGKHGHAFVHLVVIDIPT
eIF5ABb 20 19ARSGIKMN-----GFVVVIRGRPCRIVDMSTSKTGKHGHAFVHLVVIDIPT
eIF5ATg 23 22CAGAIKEN-----GFVVVIRGRPCRIVDMSTSKTGKHGHAFVHLVVIDIPT
eIF5ACp 23 22CAGTIRKN-----GYIVVIRGRPCRIVDMSTSKTGKHGHAFVHLVVIDIPT
eIF5AOs 24 23CAGTIRKN-----GYIVVIRGRPCRIVDMSTSKTGKHGHAFVHLVVIDIPT
eIF5AAt 22 21CAGNIRRG-----GHVVVIRGRPCRIVDMSTSKTGKHGHAFVHLVVIDIPT
eIF5ALi 112 YPL_114PAGALKKG-----GYVCINGRPCRIVIDLQVSKTGKHGHAFVHLVVIDIPT
eIF5AEh 22 21QCSALREG-----GFVVVIRGRPCRIVDMSTSKTGKHGHAFVHLVVIDIPT
eIF5AMsp 5 43TSEMRSR-----SKVVDGDPALIDNEHVKPKR-GQAFNRIRNRLKRG
EFPEc 34 33TQFALAKERDVSHYREILFANLEDRRLSRMTSOMLFLARSEHGLLRDRHVDVAA

```

FIG. 11. Alineamiento de las proteínas TveIF-5A de *T. vaginalis*. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas TveIF-5A encontradas en la base de datos TIGR. Los aminoácidos idénticos se señalan en las cajas negras, las diferencias se encuentran señas en blanco, denotados con un asterisco.

92815.tveIF5A2 1 MSSAEEVVHHDLEIQEVDAGSQEKATIPVNKLKGGYVLEGRPCRVVDITKSKTGKHGH
89692.tveIF5A1 1 MSSAEEVVHHDLEIQEVDAGSQEKATIPVNKLKGGYVLEGRPCRVVDITKSKTGKHGH

92815.tveIF5A2 61 AKAGIAGTDLFTGRRYETHLPTSHEIEVPFVDRSDYGLINIDDHTQLLLDGTREDVD
89692.tveIF5A1 61 AKAGIAGTDLFTGRRYETHLPTSHEIEVPFVDRSDYGLINIDDHTQLLLDGTREDVD

*

92815.tveIF5A2 121 LPPEGNEMRQRVIDLFNCVNTNDQVVTVLSSNGENLIVDCKKSTN
89692.tveIF5A1 121 LPPEGNEMRQRVIDLFNECVNTNDQVVTVLSSNGENLIVDCKKSTN

*

FIG 12. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las proteínas TveIF-5A 1 y 2 con la proteína eIF-5A en diversos organismos.

A) Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de la proteína eIF-5A de *Trichomonas vaginalis* (Tv), *Sacharomyces cerevisiae* (Sc), *Candida glabrata* (Cg), *Schizosaccharomyces pombe* (Sp), *Mus musculus* (Mm), *Homo sapiens* (Hs), *Xenopus laevis* (Xl), *Bombix mori* (Bm), *Toxoplasma gondii* (Tg), *Carica papaya* (Cp), *Oriza sativa* (Os), *Arabidopsis thaliana* (At), *Leishmania infantum* (Li), *Entamoeba histolytica* (Eh), *Escherichia coli* (Ec), *Marimona sp* (Ms), utilizando el programa Clustal W. Los cuadros negros indican la identidad entre las secuencias, las regiones grises muestran la similitud entre las secuencias, el recuadro rojo denota la región más conservada. B) Tabla en donde se muestra los porcentajes de homología e identidad de los organismos analizados en el alineamiento.

A.

```

eIF5A2Tv 34 RGGVLIIEGRPCRVDITFSKTG-----KHGHAKAGAGCTDIFTGR-----RY
eIF5A1Tv 34 RGGVLIIEGRPCRVDITFSKTG-----KHGHAKAGAGCTDIFTGR-----RY
eIF5A3Sp 29 RNGHVVIFGRPCRIVDMSTSKTG-----KHGHAKVHIVGIDIFNGR-----RY
eIF5AMm 27 RNGFVVIFGRPCKIVEMSTSKTG-----KHGHAKVHIVGIDIFTGR-----RY
eIF5ALi 121 RGGVLIIEGRPCRVIDLSFSKTG-----KHGHAKVHIVGIDIFTGR-----RL
eIF5ASc 28 RNGFVVIFGRPCKIVDMSTSKTG-----KHGHAKVHIVGIDIFTGR-----RL
eIF5ATg 29 RNGFVVIFGRPCKIVDMSTSKTG-----KHGHAKVHIVGIDIFTGR-----RY
eIF5AEh 28 RGGVVIIEGRPCKIVEMSTSKTG-----KHGHAKVHIVGIDIFTGR-----RL
eIF5ABm 29 RNGFVVIFGRPCKIVEMSTSKTG-----KHGHAKVHIVGIDIFNGR-----RY
eIF5AHs 27 RNGFVVIFGRPCKIVEMSTSKTG-----KHGHAKVHIVGIDIFTGR-----RY
EFPEc 45 SHYREIIEINLEDKRISRMISDMLFLARSDHGLLRDQKHDVDAEELNE RELFEPL
eIF5ACg 28 RNGFVVIFGRPCKIVDMSTSKTG-----KHGHAKVHIVGIDIFTGR-----RL
eIF5ACp 29 RNGFVVIFGRPCKIVEMSTSKTG-----KHGHAKVHIVGIDIFTGR-----RL
eIF5AAc 28 RGGVVIIEGRPCKIVEMSTSKTG-----KHGHAKVHIVGIDIFTGR-----RL
eIF5AOs 1 -----KHGHAKVHIVGIDIFTGR-----RL
eIF5AMsp 37 AFNRKLIENLKTGRVNERIPKSGOTLETADVMDTDMEYIYTDGEFVHF-----MA
eIF5ADd 32 RNGFVVIFGRPCKIVDMSTSKTG-----KHGHAKVHIVGIDIFTGR-----RY
  
```

B.

Organismo	% Identidad	E	Homología
<i>Trichomonas vaginalis</i> TvelF-5A 1	100%	1e-50	100
<i>Trichomonas vaginalis</i> TvelF-5A 2	99%	5e-12	98
<i>Sacharomyces cereviciae</i>	35%	1e-10	65
<i>Candida glabrata</i>	30%	6e-07	56
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	37%	5e-11	65
<i>Mus musculus</i>	34%	1e-08	55
<i>Homo sapiens</i>	34%	5e-08	56
<i>Xenopus laevis</i>	35%	1e-08	60
<i>Bombix mori</i>	35%	3e-07	57
<i>Toxoplasma gondii</i>	40%	4e-08	59
<i>Carica papaya</i>	39%	3e-07	59
<i>Oriza sativa</i>	40%	2e-24	60
<i>Arabidopsis thaliana</i>	38%	1e-23	63
<i>Leishmania infantum</i>	37%	5e-26	54
<i>Entamoeba histolytica</i>	34%	6e-08	59

Se realizó la conversión de las secuencias de aminoácidos de las proteínas TveIF-5A 1 y 2 a nucleótidos las cuales fueron denominadas como *tveIF-5A 1* y *tveIF-5A 2*, las dos secuencias fueron analizadas mediante un alineamiento usando el programa Clustal W en donde encontramos 38 cambios de nucleótidos de los cuales 36 corresponden a cambios que no alteran el uso de codón y 2 cambios traducidos a cambio de codón. Los genes *tveIF-5A 1* y *2* de *T. vaginalis* tienen un tamaño de 504 pb y codifican dos proteínas hipotéticas a las cuales llamamos TveIF-5A 1 y 2 de 167 aminoácidos cada una con un tamaño hipotético de 18 kDa.

Por otra parte se analizaron los ensamblados de los dos genes *tveIF-5A*, encontrando que ambos genes se localizan en dos diferentes *loci* dentro del genoma de *T. vaginalis*. En la figura 13 se muestra los mapas de los genes *tveIF-5A 1* y *2*. El gen *tveIF-5A 1*, río arriba del sitio de inicio de traducción tiene una región intergénica y un gen que codifica para una proteína hipotética la cual no se ha reportada su función. Río abajo del codón de paro de la traducción se localiza un gen que codifica para una proteína con un dominio SH3 cuya función no se ha reportado. Para el gen *TveIF-5A 2*, río arriba del sitio de inicio de traducción se localiza una región intergénica y un gen que codifica para una proteína hipotética TLK, río abajo del codón de paro de la traducción se encuentra un gen que codifica para un antígeno de superficie. Estos resultados sugieren que los genes *tveIF-5A 1* y *2* son diferentes y se encuentran en dos *loci* diferentes dentro del genoma de *T. vaginalis*.

Para llevar a cabo la caracterización del gen *tveIF-5A* se realizó el análisis de contenido de G+C con el programa DNAsis, el cual mostró que el gen *tveIF-5A 2* presenta un contenido de 49.2%. En *T. vaginalis* ha sido reportado que los genes codificantes presentan un alto contenido de G + C (Liston y Johnson; 1999) (Fig. 14). Por otra parte se analizaron las regiones reguladoras de ambos genes y se encontró que contienen secuencias consenso del tipo Inr. Esta secuencia es un elemento de regulación de la transcripción el cual es una secuencia homóloga a la caja TATA en eucariontes. En *T. vaginalis* la mayoría de los genes codificantes contienen un sitio Inr, *tveIF-5A 1* contiene un Inr hipotético en -28 nucleótidos río

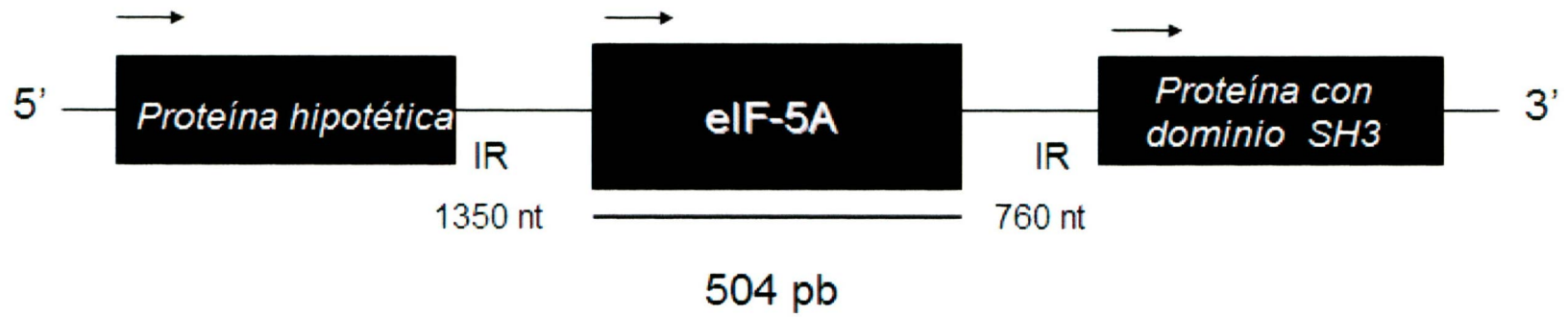
arriba del ATG y el gen *tveIF-5A 2* tiene una Inr hipotético -23 nucleótidos río arriba del ATG. También se realizó la búsqueda de factores de transcripción que se unieran hipotéticamente en el extremo 5' UTR. Para ambos genes se encontraron motivos conservados para la unión de diversos factores de transcripción, de los cuales algunos ya están reportados en *T. vaginalis* como los factores de iniciación de la transcripción c-Myc, Myb 1 y Myb 2, IBP39 (Fig. 15).

Por otra parte, se comparó la estructura terciaria de las proteínas TveIF-5A 1 y 2, realizando modelajes en 3D con el programa Pymol (<http://pymol.sourceforge.net/>) y Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/html/index.html>), ambas proteínas presentan el residuo de lisina expuesto en el carboxilo terminal en donde se lleva a cabo la hipusinación, 11 cadenas β plegadas y una α hélice en el amino terminal, esta última se ha caracterizado por estar relacionada en el transporte de RNAm y proteínas (Fig. 16).

Para conocer el origen evolutivo de las proteínas TveIF-5A 1 y 2 se realizó un árbol filogenético, utilizando diferentes organismos en donde se ha reportado a la proteína eIF-5A, usando el programa Mega 2.1 con el método de neighbor-joining (NJ) distancia JTT con 1,000 replicas (fig. 17 A). Los diferentes organismos analizados se encuentran agrupados en protozoarios, invertebrados, plantas, mamíferos, levaduras, hongos y como grupo externo se usó a la proteína EF-P de las bacterias *Escherichia coli* y *Marimonas sp.* Los resultados mostraron que *Marimona sp.* se agrupó en la misma rama que las proteínas TveIF-5A 1 y 2 de *T. vaginalis*, lo que sugiere que la proteína TveIF-5A es parecida a la proteína EF-P de *Marimona sp.*, descrita para bacterias o que esta proteína tenga un origen bacteriano y fue adquirida por el parásito a través de transferencia de genes. Para analizar esta posibilidad se realizó un árbol filogenético con las secuencias de los genes ribosomales 18s de los organismos analizados para las proteínas TveIF-5A 1 y 2 usando el programa GENE IUS, este árbol filogenético agrupó al gen 18s de *T. vaginalis* en la misma rama del gen 18s de *Entamoeba histolytica*, las bacterias se encontraron en una misma rama a diferencia del árbol filogenético de la proteína eIF-5A, sugiriendo que la proteína TveIF-5A de *T. vaginalis* proviene de una transferencia de genes (Fig. 17 B).

FIG. 13. Mapas genómicos de los genes *TveIF-5A 1* y *2* de *T. vaginalis*. El mapa de los genes *TveIF-5A 1* y *2* muestra la localización de los dos genes en diferentes *loci* dentro del genoma de *T. vaginalis*. A) mapa del gen *TveIF-5A 1*, en el extremo 5' río arriba del codón de inicio de la traducción se encuentra un gen que codifica una proteína hipotética, en el extremo 3' río abajo del codón de paro de la traducción se localiza un gen que codifica para una proteína con dominio SH3. B) mapa del gen *TveIF-5A 1* en el extremo 5' río arriba del codón de inicio de la traducción se encuentra un gen que codifica una proteína hipotética TLK en el extremo 3' río abajo del codón de paro de la traducción se localiza un gen que codifica para un antígeno de superficie. Las flechas indican el sentido de la transcripción.

A)



B)

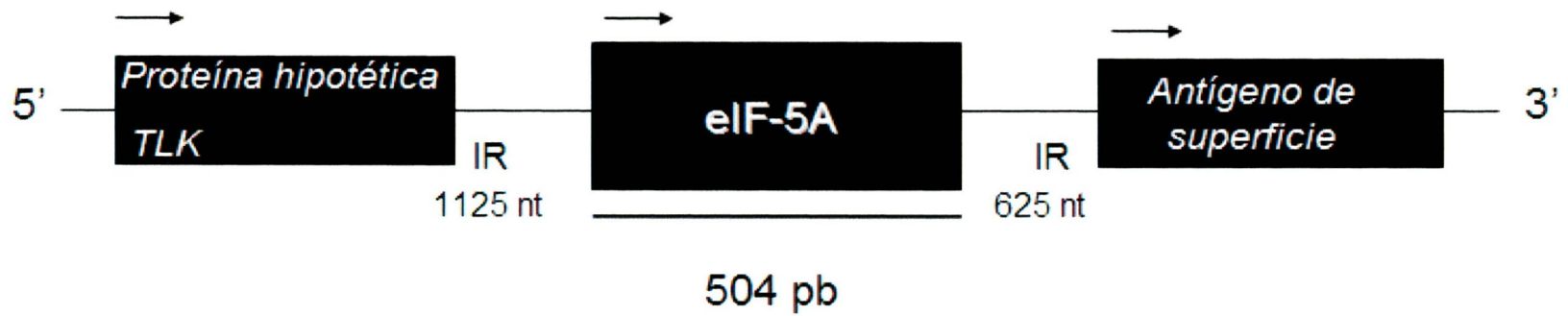


FIG. 14. Análisis del contenido de G + C con el programa DNAsis. La figura muestra la región codificante en el recuadro rojo, también se muestran los extremos 3'UTR y 5'UTR de las regiones intergénicas las cuales son mostradas en el recuadro amarillo.

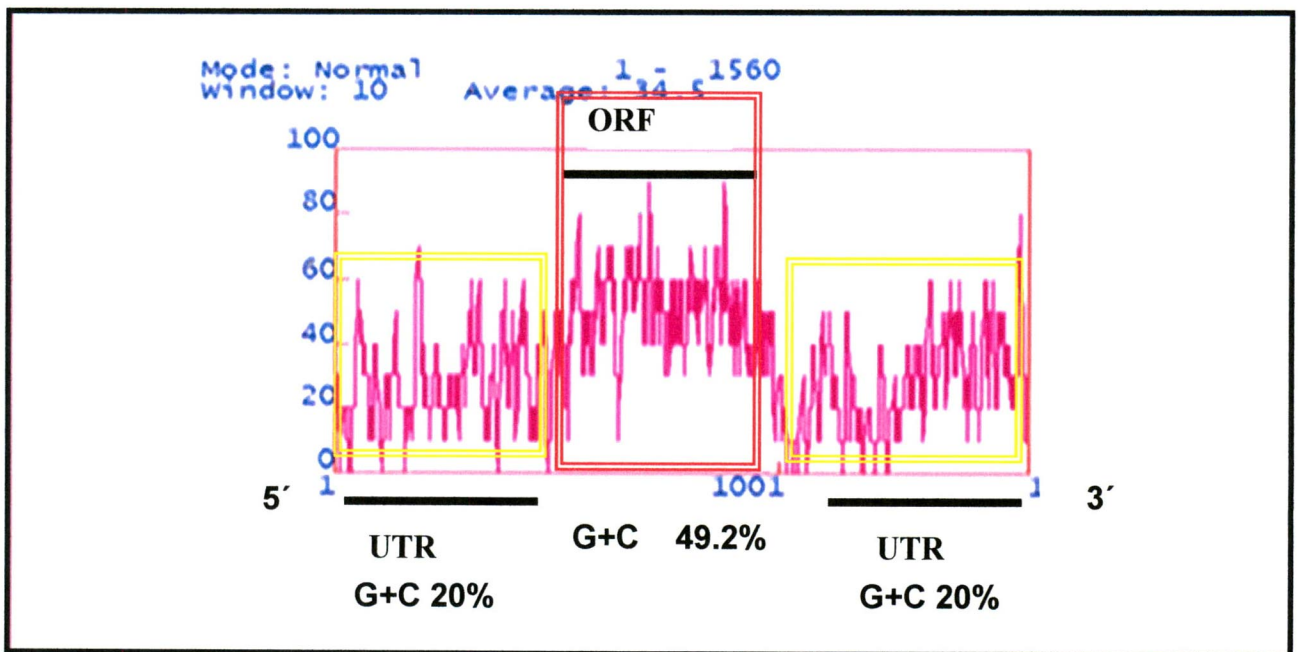
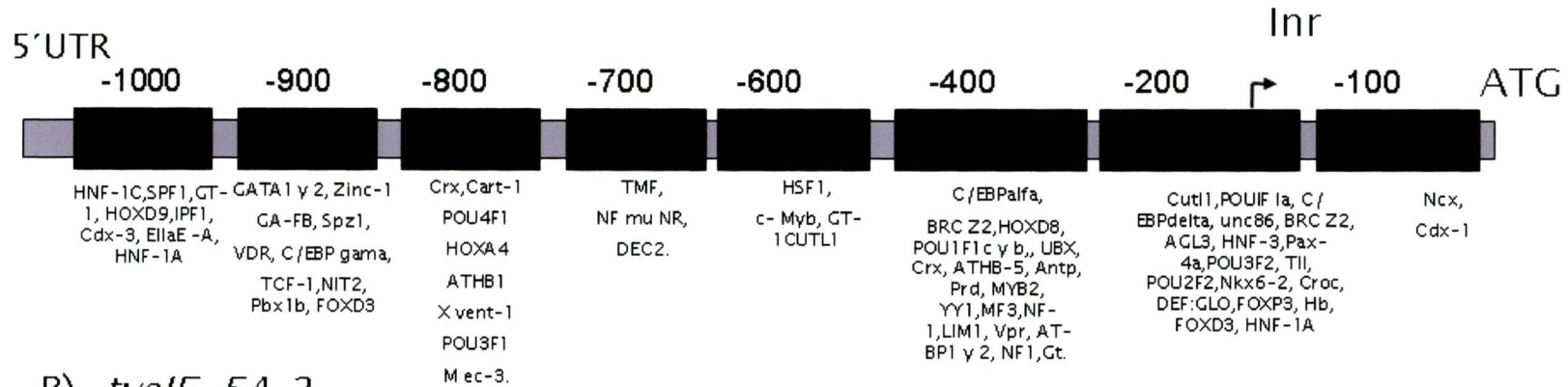


FIG. 15. Sitios de unión hipotéticos de factores de transcripción. La figura muestra los diferentes factores de transcripción con sitios de unión hipotéticos a la región promotora río arriba del sitio de inicio de la traducción de los genes *tveIF-5A 1* y *2*. A) gen *tveIF-5A 1*, muestra los diferentes factores de inicio de la transcripción con sitios hipotéticos de unión en el extremo 5'UTR. B) gen *tveIF-5A 2*, muestra los posibles factores de inicio de la transcripción con sitios hipotéticos de unión en el extremo 5'UTR.

A) *tveIF-5A 1*



97 B) *tveIF-5A 2*

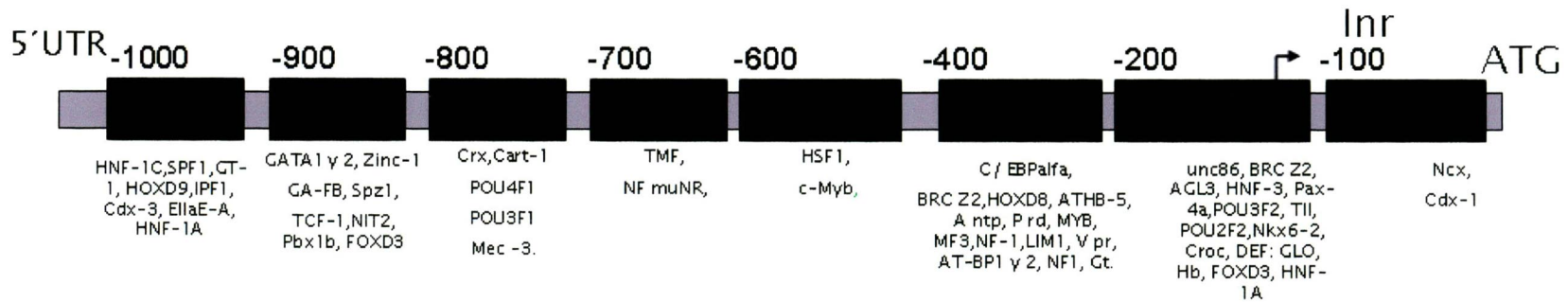
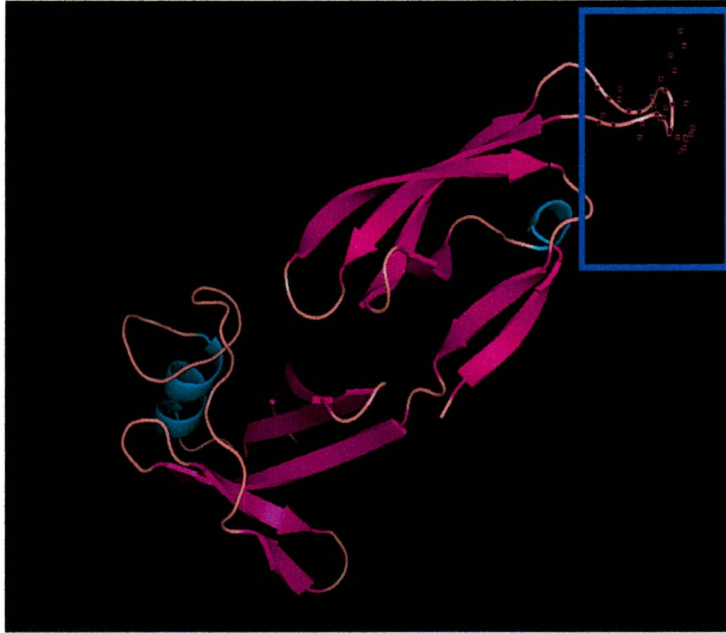


FIG. 16. Modelo 3D teórico de las proteínas TveIF-5A 1 y 2. A) Estructura 3D de la proteína TveIF-5A 1 de *T. vaginalis* realizada con el programa Phyre, muestra una estructura β plegada y el residuo de lisina expuesta en el loop enmarcado en el recuadro azul. B) Estructura 3D de la proteína TveIF-5A 2 de *T. vaginalis* realizada con el programa Phyre, muestra una estructura β plegada el residuo de lisina expuesta en el loop enmarcado en el recuadro azul.

A)



B)

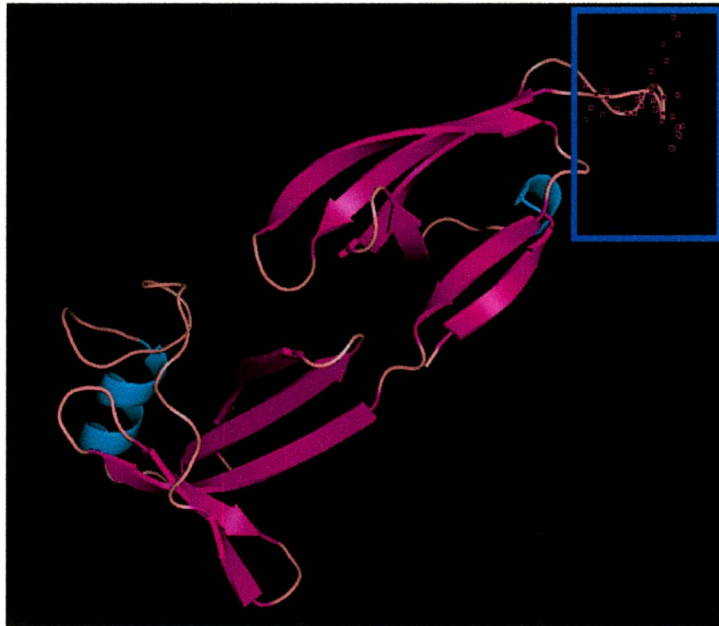
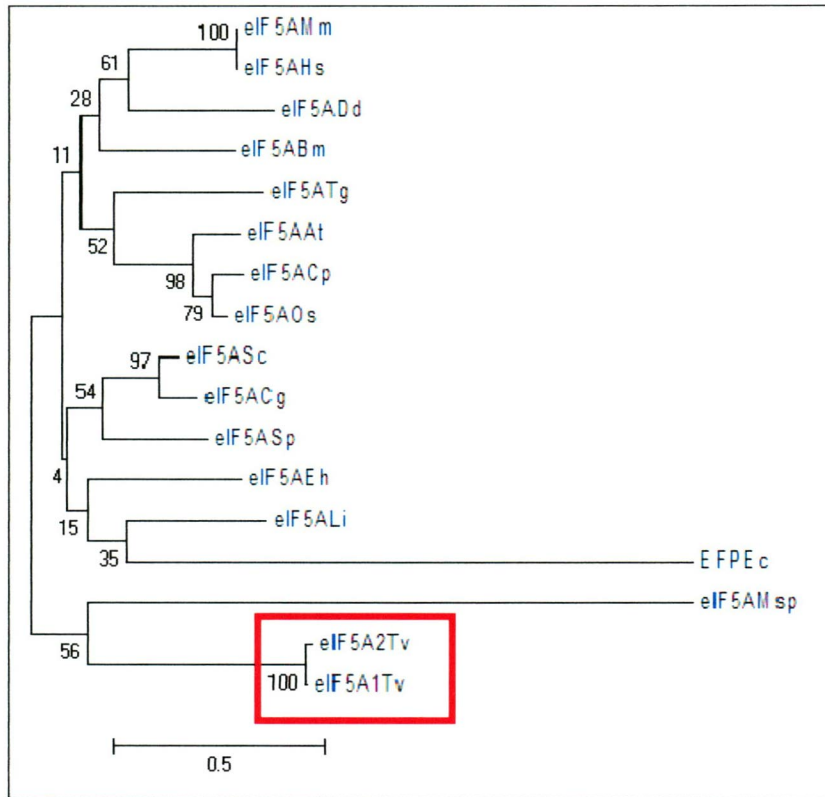
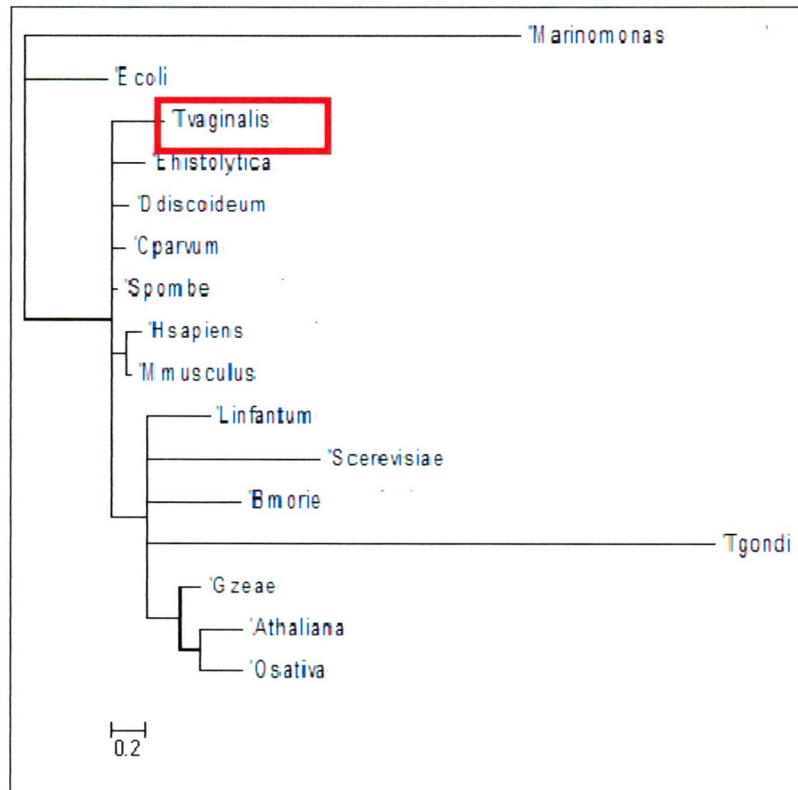


FIG. 17. Análisis filogenético de las proteínas TveIF-5A 1 y 2 y del gen *ribosomal 18s* con diferentes organismos. A) El árbol filogenético de las proteínas TveIF-5A 1 y 2 de *T. vaginalis* se realizó en el programa Mega 4.0, tomando los siguientes organismos: *Sacharomyces cerevisiae* (Sc)., *Candida glabrata* (Cg)., (Gr)., *Schizosaccharomyces pombe* (Sp)., *Mus musculus* (Mm)., *Homo sapiens* (Hs)., *Xenopus laevis* (Xl)., *Bombix mori* (Bm)., *Toxoplasma gondii* (Tg)., *Carica papaya* (Cp)., *Oriza sativa* (Os)., *Arabidopsis thaliana* (At)., *Leishmania infantum* (Li)., *Entamoeba histolytica* (Eh)., *Escherichia coli* (Ec)., *Marimona sp* (Ms)., *Plasmodium falciparum* (Pf)., *Gibberella zeae* (Gz). La rama donde se encuentran agrupadas ambas proteínas de *T. vaginalis* se encuentra enmarcadas en el cuadro rojo. B) El árbol filogenético del gen *ribosomal 18s* se realizó con el programa Gene ius tomando los mismos organismos del análisis filogenético de la proteína TveIF-5A, en el recuadro rojo se muestra el gen *ribosomal 18s* de *T. vaginalis*.

A)



B)



9. Expresión de los genes *tvelf-5A 1* y *2* en presencia y ausencia de poliaminas.

Se extrajo el DNA genómico (DNAg) de *T. vaginalis* y se analizó en un gel de agarosa donde se observa el DNAg integro (Fig. 18). Posteriormente se realizó la amplificación del gen *tvelf-5A* con el DNAg y los iniciadores específicos. Mediante PCR se obtuvo un amplicón de 504 pb, similar al tamaño previamente reportado en otros parásitos (Fig. 19).

Por otra parte *T. vaginalis* se cultivó en presencia y ausencia de poliaminas, para analizar la expresión de los genes *tvelf-5A*, como control de carga del experimento se amplificó el gen β -*tubulina* el cual es constitutivo en este parásito.

El análisis de la expresión del gen *tvelf-5A* por RT-PCR mostró que la expresión de dicho gen disminuyó ~ 9 veces en presencia de DAB comparado con la expresión en la condición normal, mientras que los parásitos tratados con DAB y transferidos a un medio con putrescina exógena a los 30 min recuperan la expresión de *tvelf-5A* tres veces más con respecto a la condición normal, a diferencia de los organismos con DAB transferidos a un medio normal que no recuperan su expresión (Fig. 20 A).

Mediante análisis densitométrico por medio de la intensidad de las bandas usando el programa Quantity one (Bio Rad) considerando la expresión de *tvelf-5A* en condición normal en el 100%, la expresión de *tvelf-5A* en los parásitos en presencia del inhibidor disminuye en el 70% comparando a la condición normal, la expresión es recuperada en 60% en presencia de DAB y transferidos a un medio con putrescina exógena. Sin embargo cuando se realizó la transferencia de los parásitos del medio con DAB al medio normal no hubo diferencia en la expresión de *tvelf-5A*. Los parásitos crecidos en condiciones normales y transferidos al putrescina exógena la expresión se encuentra en el 75 % con respecto a la condición normal (Fig. 20 C). Las diferentes condiciones de poliaminas no afectaron la expresión del gen β *tubulina*, el cual fue utilizado como control de carga.

La expresión diferencial del gen *tvelf-5A* fue cuantificada por qPCR en Tiempo Real. Mediante esta cuantificación se estimó que la condición normal tiene un 100% de expresión, los parásito en presencia de DAB tienen una disminución en la expresión del 90% comparado a la condición normal, por otra parte la transferencia del medio con DAB a putrescina exógena se recupera ~ 300% más con respecto a la condición normal, por el contrario en presencia del inhibidor y transferidos al medio normal no presenta cambios en la expresión ya que se mantiene en ~10%. La condición del medio normal recuperada con putrescina exógena presentó el 300% de la expresión comparado con la condición normal. El gen *β-tubulina* se uso como control interno ya que no tuvo cambios de expresión en las diferentes condiciones de poliaminas (Fig. 21).

Por otra parte para determinar cual de los dos genes se expresan en cada una de las condiciones de poliaminas, se secuenciaron los producto de la RT-PCR de la condición normal y en presencia del inhibidor DAB, estas secuencia fueron analizadas mediante un alineamiento múltiple con los genes *tvelf-5A 1* y 2 hipotéticos reportados en el genoma de *T. vaginalis*, en donde se encontró que el gen *tvelf-5A 2* se expresa en ambas condiciones (Fig. 22). Para determinar cual de los dos genes *tvelf-5A* se expresaba en condiciones normales, se realizó una clonación en el vector PCR 2.1 TOPO (Invitrogen) con el producto de RT-PCR de la condición normal, de la cual fueron secuenciadas y analizadas 20 clonas positivas por un alineamiento múltiple. Este alineamiento mostró que solo el gen *tvelf-5A 2* se expresa en estas condiciones (Fig. 23). Sin embargo, no sabemos si en las diferentes condiciones no analizadas el gen *tvelf-5A 1* se expresa al igual que el gen *tvelf-5A 2*.

FIG. 18. Extracción del DNA genómico de *T. vaginalis*. Extracción del DNA genómico de *T. vaginalis*. El DNA fue analizado en un gel de agarosa al 0.8% en TAE 1x teñido con bromuro de etidio, 1): marcador DNA ladder, 2) DNAG de *T. vaginalis* integro.

kb

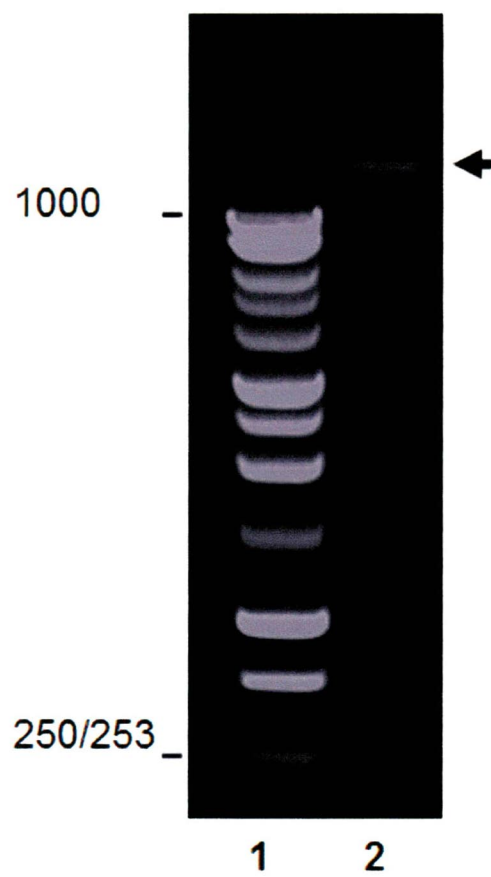
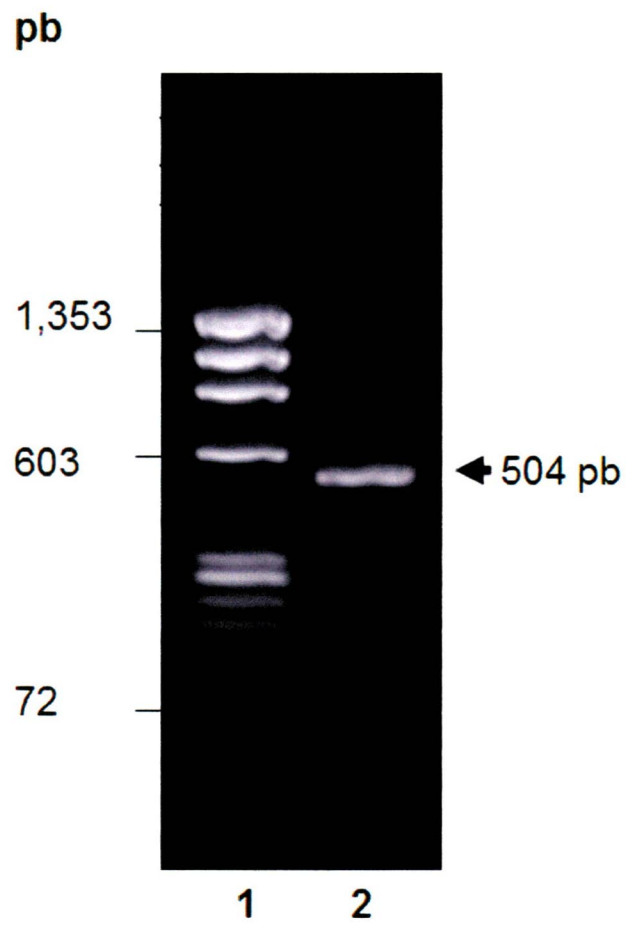


FIG. 19 PCR de los genes *tvelf-5A 1 y 2*. A) Amplificación del gen *tvelf-5A* por PCR a partir de DNAg de *T. vaginalis*, 1) marcador *Hae III Digest*, 2) amplicón obtenido del tamaño esperado de 504 pb. B) Diagrama esquemático que muestra la posición donde se alinean los iniciadores eIF-5A-S y eIF-5A-AS.

A)



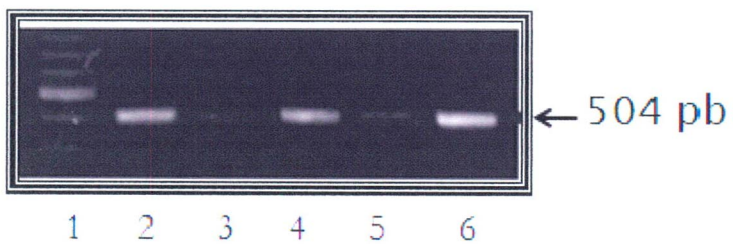
B)



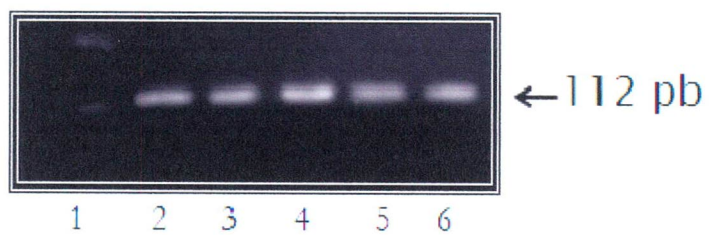
FIG. 20. Expresión del gen *TveIF-5A* en presencia y ausencia de poliaminas.

Panel A. Expresión del gen *TveIF-5A* en diferentes condiciones. Carril: 1) marcador de 100 pb, 2) condición normal, 3) tricomonas en presencia del inhibidor DAB, 4) parásitos crecidos en DAB transferido a putrescina exógena, 5) parásitos crecidos en DAB transferido a un medio normal, 6) cultivo normal transferido al medio con putrescina exógena (control). Panel B. control de carga con el gen β *tubulina* carrii: 1) Marcador de 100pb, 2) condición normal, 3) tricomonas crecidas en presencia del inhibidor DAB, 4) parásitos crecidos en presencia de DAB transferido al medio con putrescina exógena, 5) parásitos crecidos en DAB transferido al medio normal, 6) cultivo normal transferido a putrescina (control). Panel C. Densitometría de la expresión de *tveIF-5A* normalizado con β - *tubulina*.

A.



B.



C.

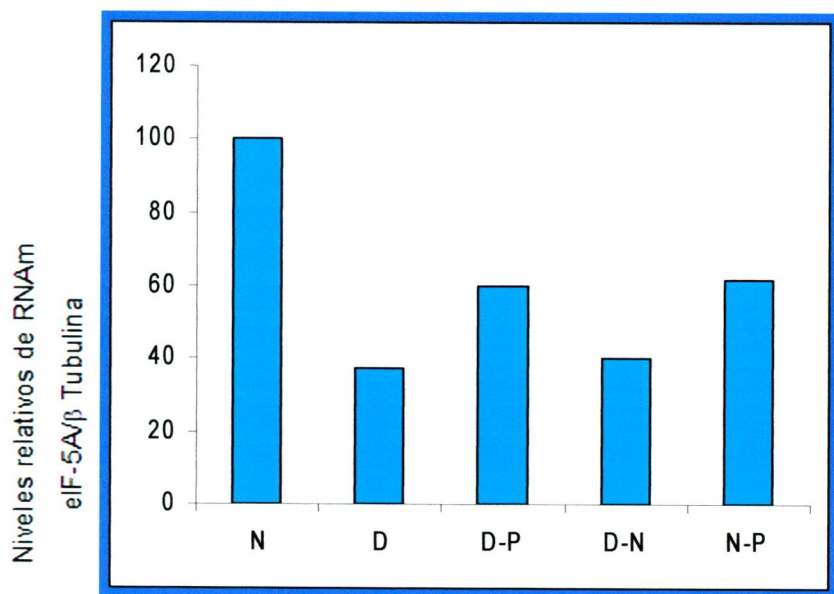


FIG. 21. Cambios en la expresión de *tveIF-5A* en presencia y ausencia de poliaminas. qRT-PCR en tiempo real para cuantificar las diferencias en los niveles del RNAm de *tveIF-5A* en tricomonas después de la inhibición de la síntesis de poliaminas con DAB y después de la adición de putrescina exógena a parásitos tratados con DAB. Los datos fueron normalizados contra los valores obtenidos con el gen control usando *β -tubulina*. N) Parásitos crecidos en condiciones normales., D) Parásitos tratados con el inhibidor DAB., D-P) Parásitos crecidos en presencia de DAB y transferidos a putrescina exógena., D-N) Parásitos crecidos en presencia de DAB transferidos a medio normal., N-P) Parásitos crecidos en medio normal y transferidos a putrescina exógena (control).

eIF-5A RNAm

Niveles relativos de RNAm

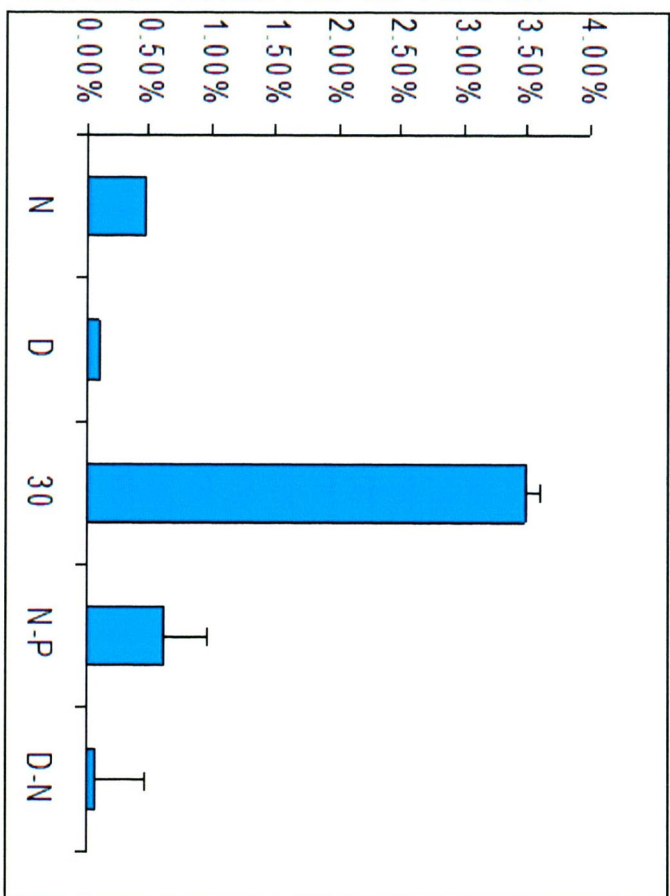


FIG. 22. Alineamiento de las secuencias de los productos de RT-PCR. Alineamiento de las secuencias de los productos de RT-PCR. La condición normal se muestra en la primera secuencia como *tveIF-5ANORMAL*, la segunda secuencia es la condición en presencia del inhibidor DAB mostrada como *tveIF-5ADAB*, la tercera secuencia es la correspondiente al gen *tveIF-5A 2* reportado en la base de datos TIGR y la última secuencia corresponde al gen *tveIF-5A 1* reportado en el genoma de *T. vaginalis* en la base de datos TIGR. Los nucleótidos idénticos se muestran en negro y los nucleótidos divergentes en blanco.

FIG. 23. Alineamiento de las secuencias obtenidas de las clonas por RT PCR de la condición normal. Alineamiento de las 20 clonas secuenciadas utilizando el programa Clustal W, mostrando en negro la identidad de las secuencias. Cada una de las secuencias se muestra numeradas del 1F al 20F.

10. Clonación del gen *tvelf-5A* de *T. vaginalis*

La clonación del gen *tvelf-5A* se realizó en el vector TOPO PCR 2.1 (Invitrogen). Una clona positiva fue crecida y el plásmido se purificó utilizando un kit comercial. Para verificar la integridad y concentración del plásmido purificado se corrió en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (Fig. 24 A). Posteriormente, se realizó la restricción del plásmido para la liberación del inserto de 504 pb (Fig. 24 B). Este inserto fue purificado y cuantificado para realizar la subclonación al vector de expresión pGEX 6P1 (GE Life Sciences) (Fig. 24 C). El vector pGEX 6P1 tiene un tamaño de 4900 pb, contiene un tag de Glutathion- S-Transferasa con un promotor inducible con IPTG, un gen de resistencia a ampicilina y un sitio múltiple de corte para las enzimas *BamHI* y *XhoI*, los cuales fueron necesarios para llevar a cabo una clonación dirigida. El inserto purificado fue utilizado para realizar la subclonación en el vector de expresión pGEX 6-P-1, previamente linearizado con las enzimas *BamHI* y *XhoI* (Fig. 25).

Para la reacción de ligación, se cuantificó el inserto purificado y el plásmido linearizado utilizando una relación 1:20 (plásmido:inserto) se transformaron células DH5 α y se obtuvo el DNA plasmídico realizando un midiprep para posteriormente realizar la restricción con las enzimas *BamHI* y *XhoI*. La restricción fue analizada en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Como control de tamaño se corrió el plásmido nativo el cual presentó un mayor tamaño, esto indicó que probablemente el DNA plasmídico candidato contenía el inserto del gen. La doble restricción del DNA plasmídico mostró una banda de 4900 pb, que corresponde al tamaño del vector y la liberación de un inserto de ~ 504 pb que corresponde al tamaño del gen *tvelf-5A* (Fig. 26).

Para conocer si el gen *tvelf-5A* se encontraba en marco de lectura se secuenció el DNA plasmídico de la clona positiva, en el secuenciador Genetic Analyser (Applied Biosystem), la secuencia obtenida fue analizada utilizando el programa Bioedit, en donde se encontró que el gen estaba en marco de lectura abierto fusionado con el tag de GST.

FIG. 24. Clonación del gen *tveIF-5A* en el vector PCR 2.1 TOPO (Invitrogen).

A) midiprep del plásmido purificado, Carriles: 1) marcador de 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 Kb), 2) DNA plasmídico purificado del vector PCR 2.1 TOPO+*tveIF-5A* señalado con la flecha con un tamaño de 3.7 Kb. B) Liberación del inserto de 504 pb, carriles: 1) marcador de 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 Kb), 2) liberación del inserto con las enzimas *BamHI* y *XhoI* (*Biolabs New England*). C) Inserto purificado, carriles: 1) marcador de tamaño molecular de 100 pb, 2) Inserto purificado de 504 pb.

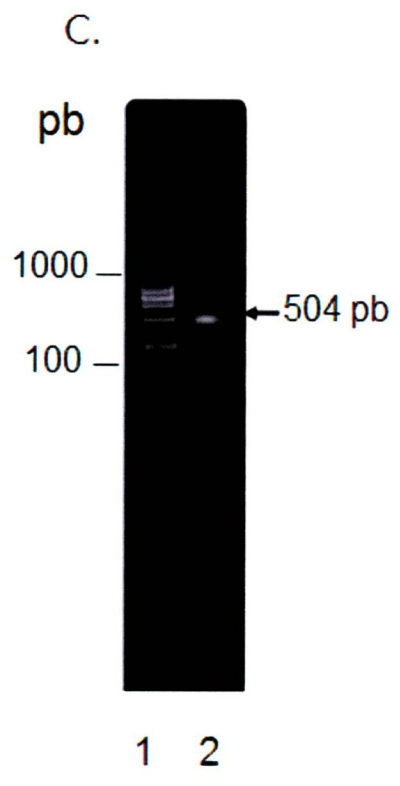
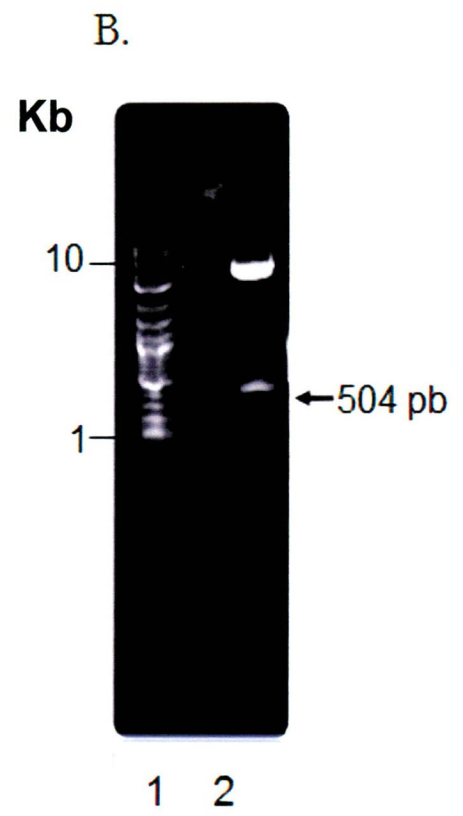
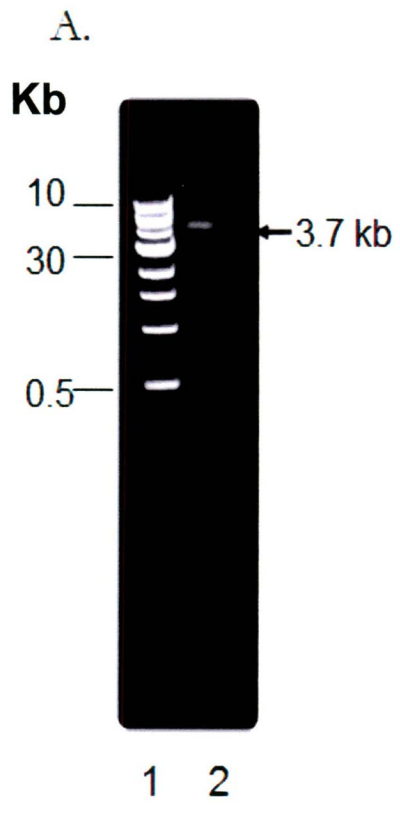


FIG. 25. Plásmido pGEX 6p1 linearizado con las enzimas *BamHI* y *XhoI*.
Carriles: 1) marcador de 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 Kb), 2) plásmido pGEX 6P1 linearizado con un tamaño de 4900 pb indicado con la flecha.

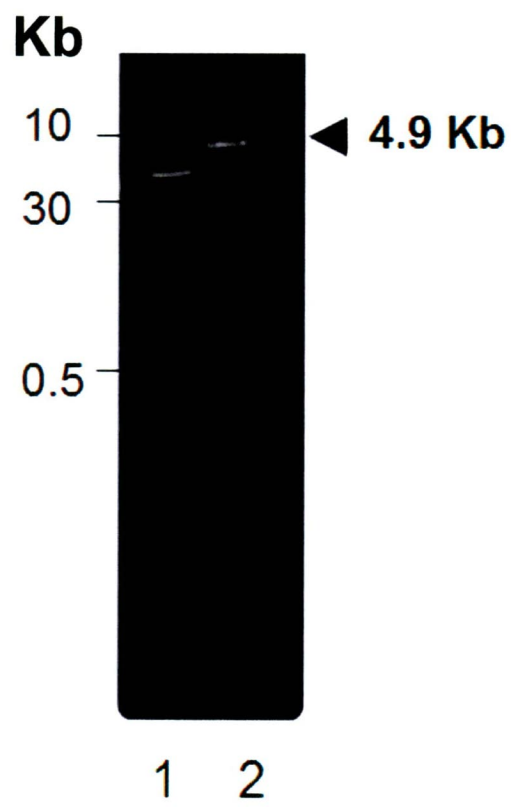
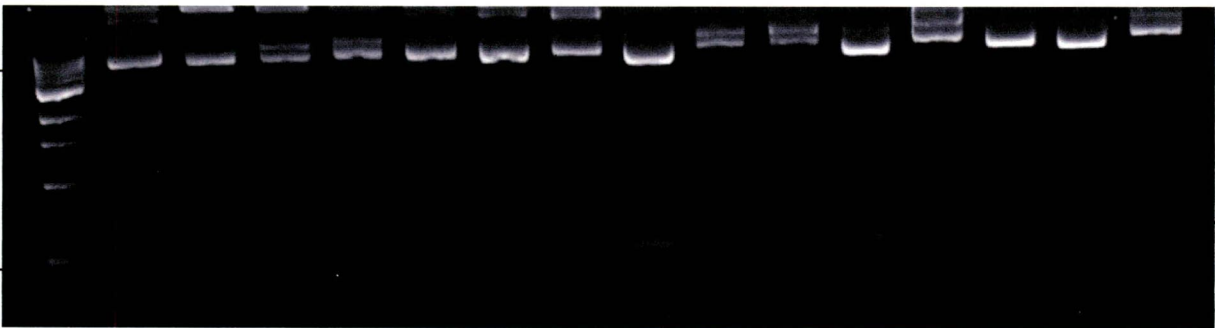


FIG. 26. Análisis por restricción de las clonas candidatas. DNA plasmídico de los candidatos *pGEX 6P1-eIF-5A* de *E. coli* DH5 α digerido con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I. Los productos liberados fueron separaron en un gel de agarosa al 1% en TAE 1x teñido con bromuro de etidio. Carriles: 1) marcador de 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 Kb), 9 y 12) inserto liberado de 504 pb.

Kb

10

0.5



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

*

*

←504 pb

FIG. 27. Expresión de la proteína TveIF-5A en el vector pGEX 6P1. Análisis por electroforesis en SDS-PAGE al 12% de los extractos bacterianos de la clona con inserto de 504 pb de *tveIF-5A*. Carriles: 1) marcador de peso molecular, 2) Extracto de *E. coli*, pGEX 6P1 vacío sin inducir (control negativo), 3) Extracto de *E. coli*, pGEX 6P1 vacío con inducción (control negativo), 4) Extracto de *E. coli*, pGEX6P1- *tveIF-5A* sin inducción, 5) Extracto de *E. coli*, pGEX6P1-*tveIF-5A* con inducción.

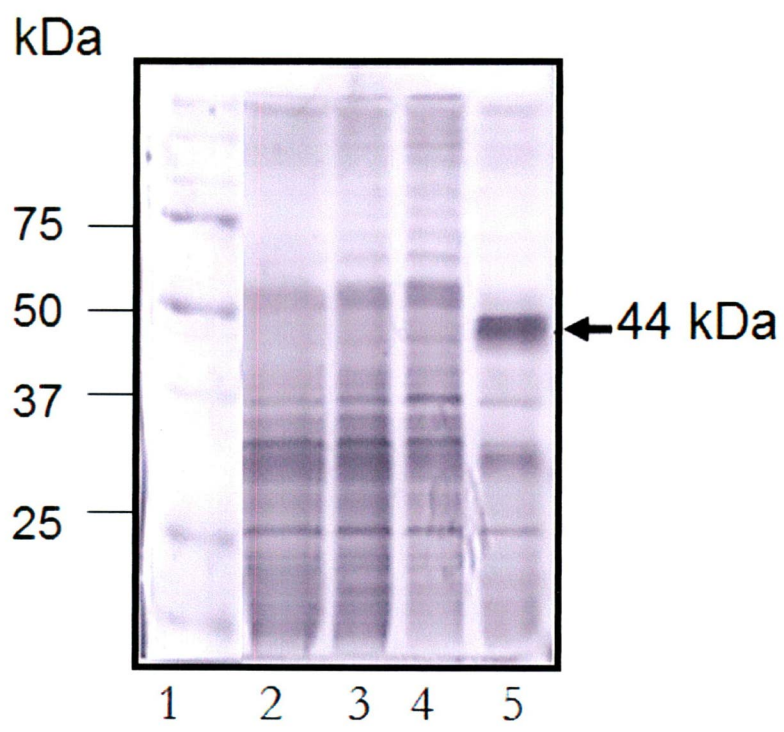


FIG. 28. Análisis de solubilidad de la proteína recombinante de 44 kDa.
Análisis de solubilidad de la proteína Tvelf-5Ar usando SDS-PAGE al 12%.
Carriles: 1) marcador se peso molecular, 2, 4, 6) fracción insoluble, 3, 5, 7)
fracción soluble, 8) fracción soluble del plásmido vacío, 9) fracción insoluble del
plásmido vacío.

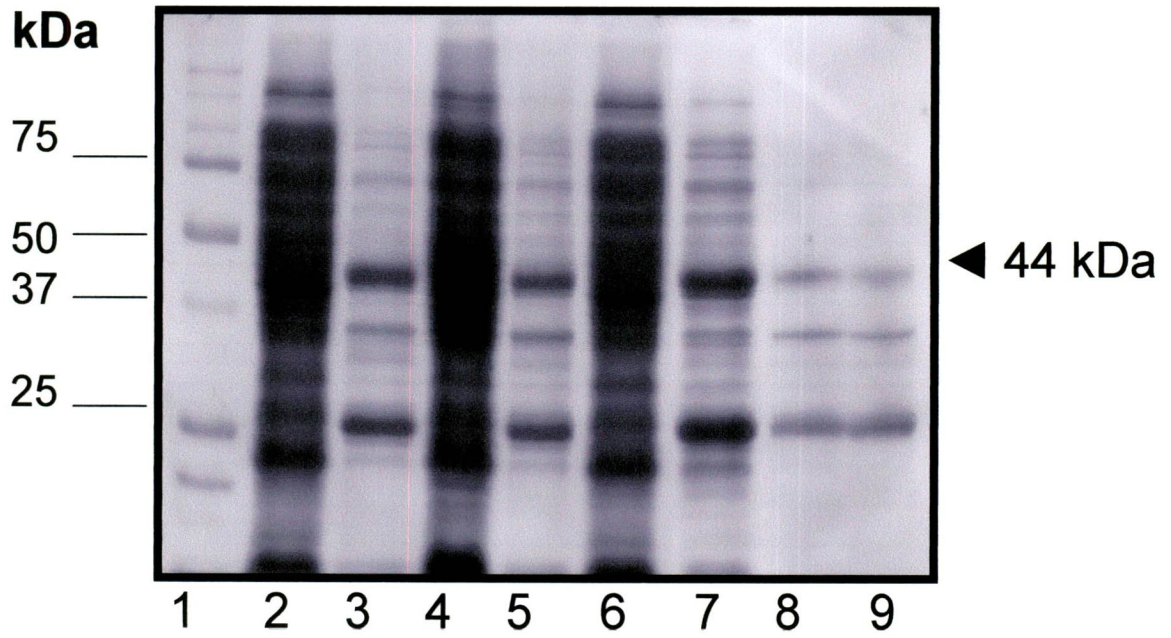
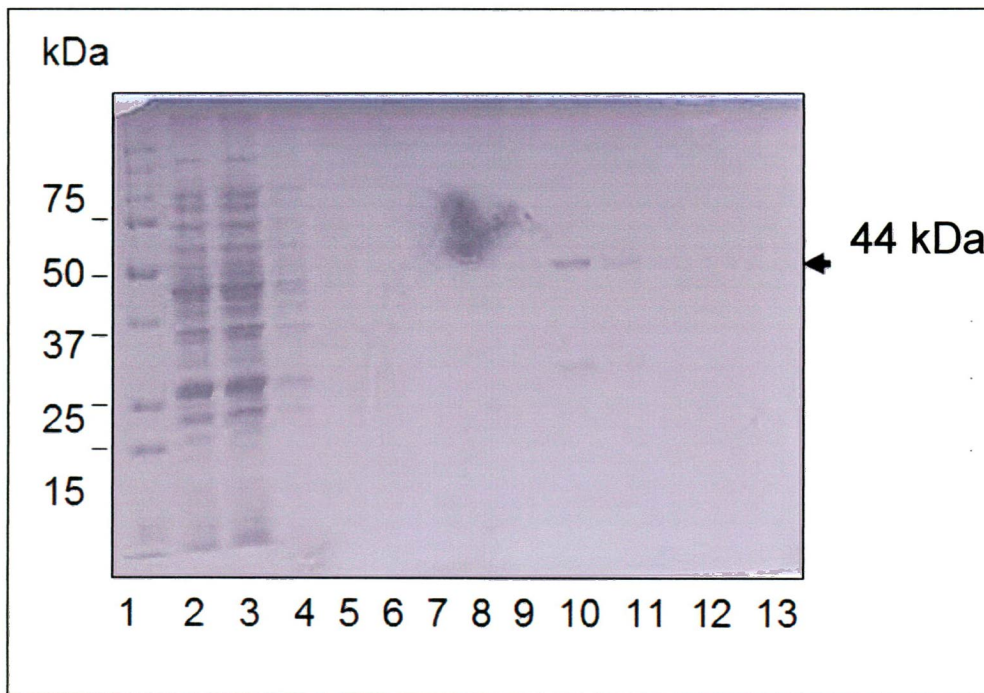
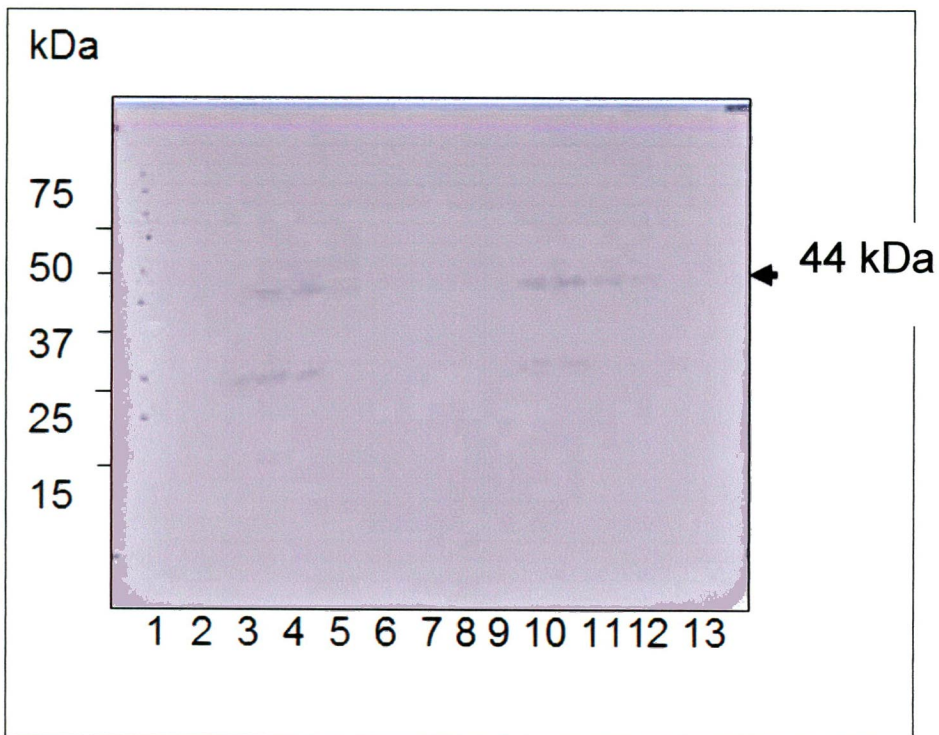


FIG. 29. Purificación de la proteína recombinante TveIF-5A por cromatografía de afinidad. A) Análisis por SDS-PAGE al 12% de la proteína TveIF-5Ar purificada. Carriles: 1) Marcador de peso molecular, 2) Sefarosa con la proteína TveIF-5Ar unida (control de especificidad de unión), 3) Fracción soluble no unida a la sefarosa., 4) Lavados de la sefarosa (Carriles 4, 5, 6, 7, 8, 9.), 5) Proteína de 44 kDa eluida de la sefarosa (Carriles 10, 11, 12, 13.). B) Western blot, el gel de poliacrilamida 12% del panel A) se transfirió a membrana de nitrocelulosa y se incubó con el anticuerpo cabra anti GST y como segundo anticuerpo se usó cabra anti IgG conjugado a HRP.

A)



B)



11. Localización de la proteína TveIF-5A de *Trichomonas vaginalis*

Para el diseño del péptido sintético fueron tomados en cuenta los siguientes parámetros: que fuera divergente con la secuencia de la proteína eIF-5A en ratón y tuviera un tamaño de 15 a 20 aa: que fuera hidrofílico, que no tuviera metioninas y cisteínas, que fuera inmunogénico y antigénico. Para llevar a cabo la primera consideración, el péptido se eligió a partir de un alineamiento múltiple entre la proteína eIF-5A de diferentes organismos y eIF-5A de *T. vaginalis*.

La secuencia de aminoácidos del péptido candidato se analizó en la base de datos TIGR para asegurar que fuera específico de esta proteína, al mismo tiempo se realizó un alineamiento con la proteína eIF-5A de ratón para analizar la divergencia del péptido candidato (Fig. 30). El péptido divergente que se seleccionó consta de 15 aa localizados en el N-terminal de TveIF-5A con la secuencia SAEEEVHHDLEIQEV correspondiente del residuo 3 al 18. Este péptido bajo la escala de Hoop-Woods y Kyte Doolittle predice que el 100% del péptido es hidrofílico (Fig. 31). La estructura secundaria y el modelaje en 3D de la proteína eIF-5A se realizó tomando como modelo a la proteína eIF-5A de *Leishmania mexicana* y la de humano, mostrando que el péptido se encuentra expuesto (Fig. 32).

Para analizar la inmunogenicidad del péptido elegido se realizó la búsqueda del MHC II en ratón usando el programa MHC2Pred (<http://www.imtech.res.in/raghava/mhc2pred/>), se encontró que en ratón este péptido es inmunogénico ya que es capaz de ser reconocido por el MHC I (Fig. 33). Al mismo tiempo se realizó el análisis de antigenicidad del péptido en la base de datos ABCpred (Saha, S and Raghava G.P.S. 2006). En esta base de datos se encuentran reportados todos los péptidos que han sido altamente antigénicos, el péptido candidato se encontró en el lugar 5 de la lista, indicando que es altamente antigénico. Este péptido se mando sintetizar acoplado a MAP8 para aumentar la inmunogenicidad, este péptido se utilizó para llevar a cabo un esquema de inmunización (tabla 3), para ratones Balb/c, machos de 3 semanas de nacidos, se

extrajo 500 μ L de suero preinmune como control negativo, la inmunización fue vía intraperitoneal.

Con los anticuerpos anti-péptido TvelF-5A, se realizaron ensayos de Western blot usando membrana de nitrocelulosa con extractos totales de *T. vaginalis* y con la proteína recombinante (Fig. **32 A**). Como control positivo se utilizó un anticuerpo anti proteínas totales de *T. vaginalis* en una dilución 1:1000 y como control negativo se utilizó el suero preinmune de ratón en la misma dilución. El suero inmune del ratón con el anticuerpo anti péptido TvelF-5A para estos ensayos alcanzó un título de 1:500 revelado en color por HRP (Bio Rad) y una dilución 1:50,000 revelado por quimioluminiscencia (Fig. **34 B**)

Los ensayos de Western blot mostraron que el anticuerpo anti TvelF-5A reconoce a la proteína TvelF-5A de *T. vaginalis* así como a la proteína TvelF-5Ar.

Con este anticuerpo se realizó el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI), se utilizaron parásitos no permeabilizados crecidos sobre cubreobjetos (Fig. **35**) y parásitos permeabilizados (Fig. **36 y 37**). Las laminillas se interaccionaron con el anticuerpo anti TvelF-5A en una dilución 1:20, como control positivo del experimento se usaron anticuerpos anti proteínas totales de *T. vaginalis* en una dilución 1:100 y el control negativo se uso el suero preinmune en una dilución 1:20. Mediante el anticuerpo anti TvelF-5A se localizó a la proteína TvelF-5A en el citoplasma.

FIG. 30. Alineamiento de la proteína TveIF-5A de *T. vaginalis* y de ratón. Alineamiento de las secuencia de aminoácidos de la proteína eIF-5A de *T. vaginalis* y de ratón con el programa Clustal W. En el recuadro rojo se muestra la región divergente de ambas proteínas utilizado para el diseño del péptido sintético.

```

eIF5Araton      1  -----MADDLFETGDAGASATFPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHGH
eIF-5At.vag    1  MSSAEEEVHHDLEIQEVDAGSQEKATLPVNKLRKGGYVLEGRPCRVDITKSKTGKHGH

eIF5Araton     54  AKVHLVGIIDIFIGKKYEDICPSTHNMDEVNIKRNDFQLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLR
eIF-5At.vag    61  AKAGIAGTDLFTGRRYETHLPTSHLEVEFVDRSDYGLINIDDGHTQLLTLDGTLREDVD

eIF5Araton     114 LP-EGD--LGKEIQKYDCG---EEILITVLSAMTEEAAVAI-----
eIF-5At.vag    121 LPPEGNEMRQRVILLFNECVNTNDQVVIVLSSNGENLIVDCRKRSTN

```

FIG. 31. Análisis de hidropatía del péptido candidato. La gráfica muestra mediante la escala de Hopp Woods, los valores de hidrofiliicidad por arriba de 0 indican que el péptido es hidrofílico (gráfica morada), la escala de Kyte Doolittle muestra los valores de hidrofobicidad, por debajo de 0 indican un péptido hidrofóbico (gráfica amarilla).

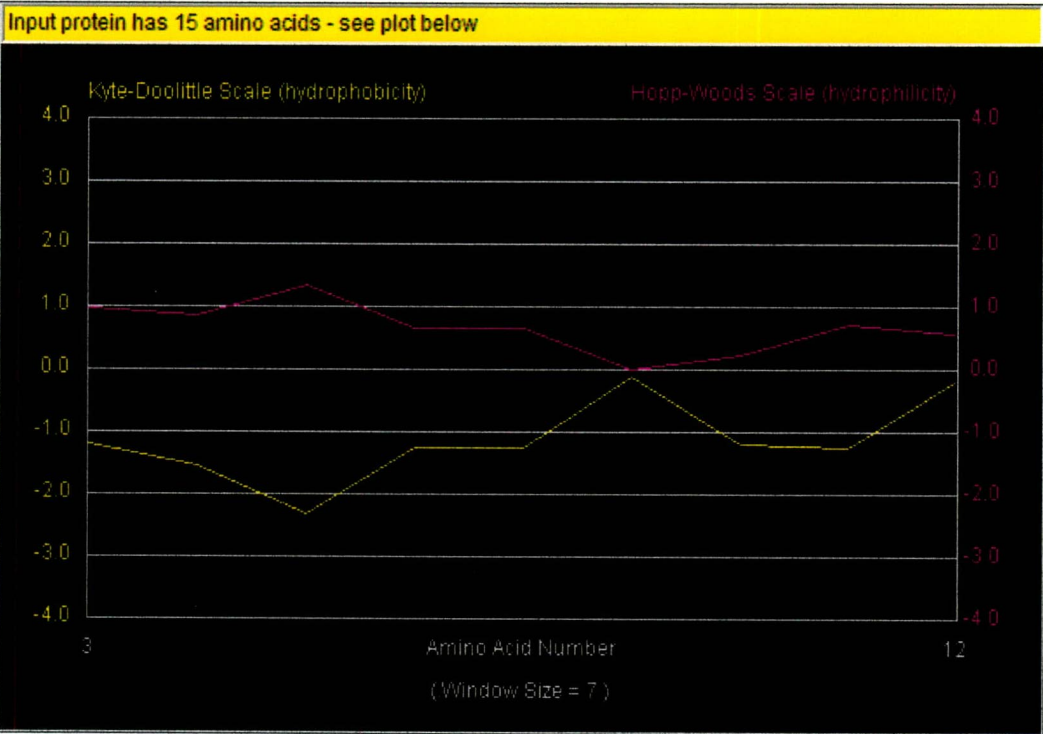


FIG. 32. Estructura 3D de TveIF-5A de *T. vaginalis*. Modelo 3D teórico de la proteína TveIF-5A predicha con el programa Phyre. El péptido candidato se muestra expuesto indicado con puntos color rosa.



FIG. 33. Análisis de inmunogenicidad en MHCII en ratón. En letras azules se muestran los péptidos que son reconocidos por MHC II en ratón, en el recuadro rojo se muestra la secuencia donde se localiza el péptido sintético.

I-Ab

MSSAEEVHHDLEIQEVDAGSQEKATIPVNKLKGGYVLIEGRPCRVDITKSKTGKHGHAKAGIAGTDLFTGRRYETHLP

I-Ad

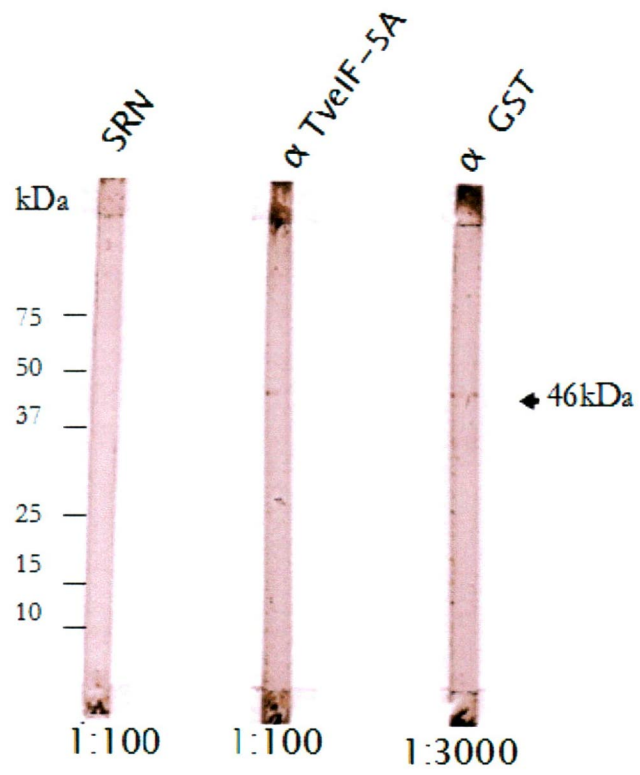
MSSAEEVHHDLEIQEVDAGSQEKATIPVNKLKGGYVLIEGRPCRVDITKSKTGKHGHAKAGIAGTDLFTGRRYETHLP

I-Ag7

MSSAEEVHHDLEIQEVDAGSQEKATIPVNKLKGGYVLIEGRPCRVDITKSKTGKHGHAKAGIAGTDLFTGRRYETHLP

FIG. 34. Reconocimiento de la proteína TveIF-5A por el anticuerpo generado contra el péptido de TveIF-5A (anti-tveIF-5A). A) Ensayo de Western blot en membrana de nitrocelulosa con extracto de bacterias con la TveIF-5A recombinante inducida, revelado por color. Carriles: 1) Incubado con el suero preinmune (control negativo) (SNR); 2) Incubado con el anticuerpo anti-tveIF-5A (dilución 1: 100) (α TveIF-5A); 3) Incubado con el anticuerpo anti-GST (dilución 1:3000) (control positivo) (α GST). B) Ensayo de Western blot en membranas de nitrocelulosa con extractos totales de proteínas de *T. vaginalis*. Carriles: 1) Incubado con el suero preinmune (control negativo) (SNR); 2) Incubado con el anticuerpo anti-tveIF-5A (dilución 1: 50 000) (α TveIF-5A); 3) Incubado con el anticuerpo anti-proteínas totales de *T. vaginalis* (control positivo) (α anti proteínas totales).

A.



B.

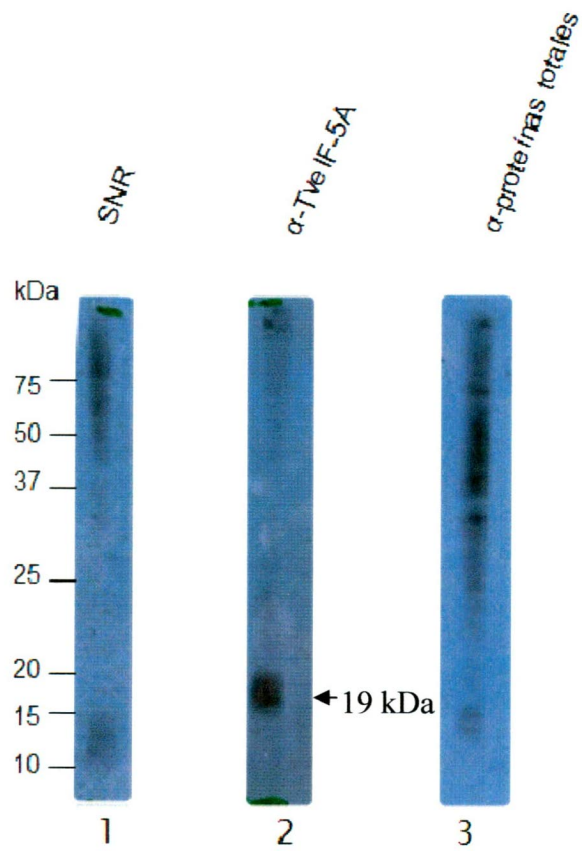


FIG. 35. Localización de la proteína TvelF-5A. Microscopia confocal 60x con parásitos no permeabilizados adheridos en laminillas, fijados con paraformaldehído al 4%. Panel 1) Microscopía de Nomasky. Panel 2) Contraste de fases. Panel 3) Microscopía de Nomasky en campo oscuro con fluorescencia. A) Parásitos incubados con el suero preinmune (1:20) control negativo. B) Parásitos incubados con el anticuerpo anti proteínas totales de *T. vaginalis* (1:100) control positivo. C) Parásitos incubados con el anticuerpo anti TvelF-5A (1:20).

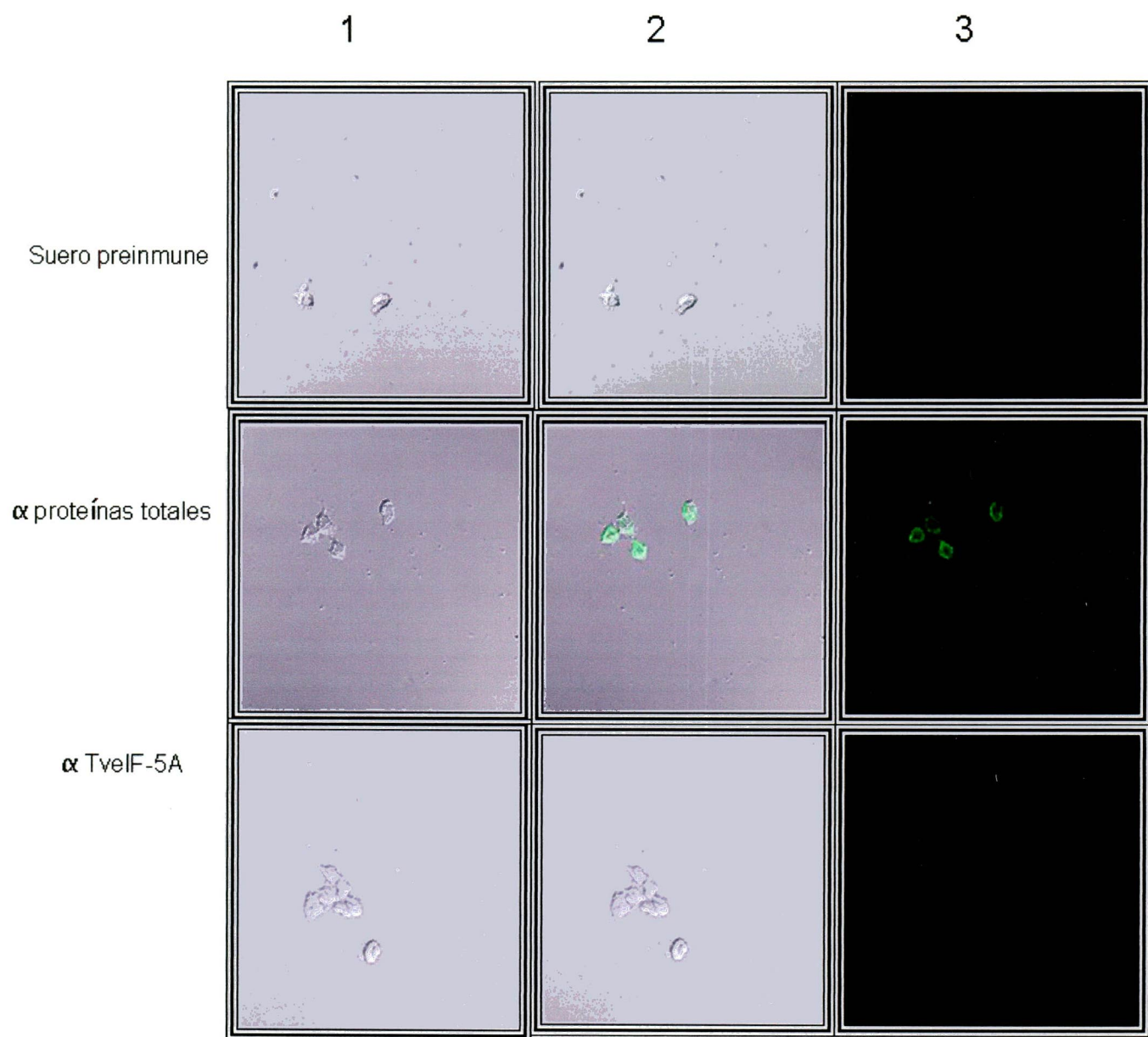


FIG. 36. Localización de TvelF-5A de *T. vaginalis*. Microscopia confocal 60x campo amplio con parásitos permeabilizados adheridos en laminillas, fijados con paraformaldehído al 4%. Panel 1) Microscopía de Nomasky. Panel 2) Microscopía de Nomasky con fluorescencia. Panel 3) Microscopía de Nomasky con sobreposición de fluorescencia. Panel 4) Contraste de fases. A) Parásitos incubados con el suero preinmune (1:20) control negativo. B) Parásitos incubados con el anticuerpo anti proteínas totales de *T. vaginalis* (1:100) control positivo. C) Parásitos incubados con el anticuerpo anti TvelF-5A (1:20).

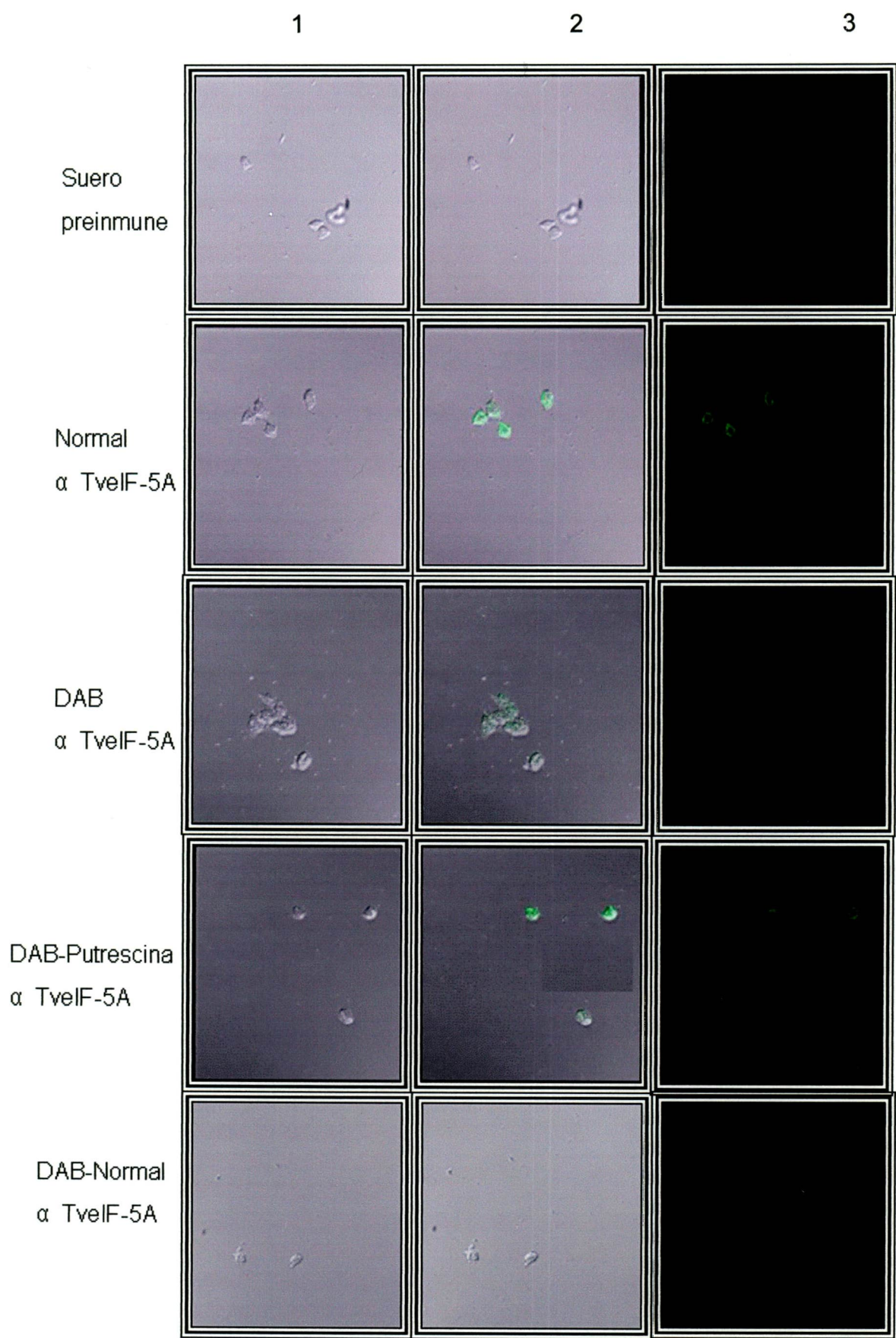
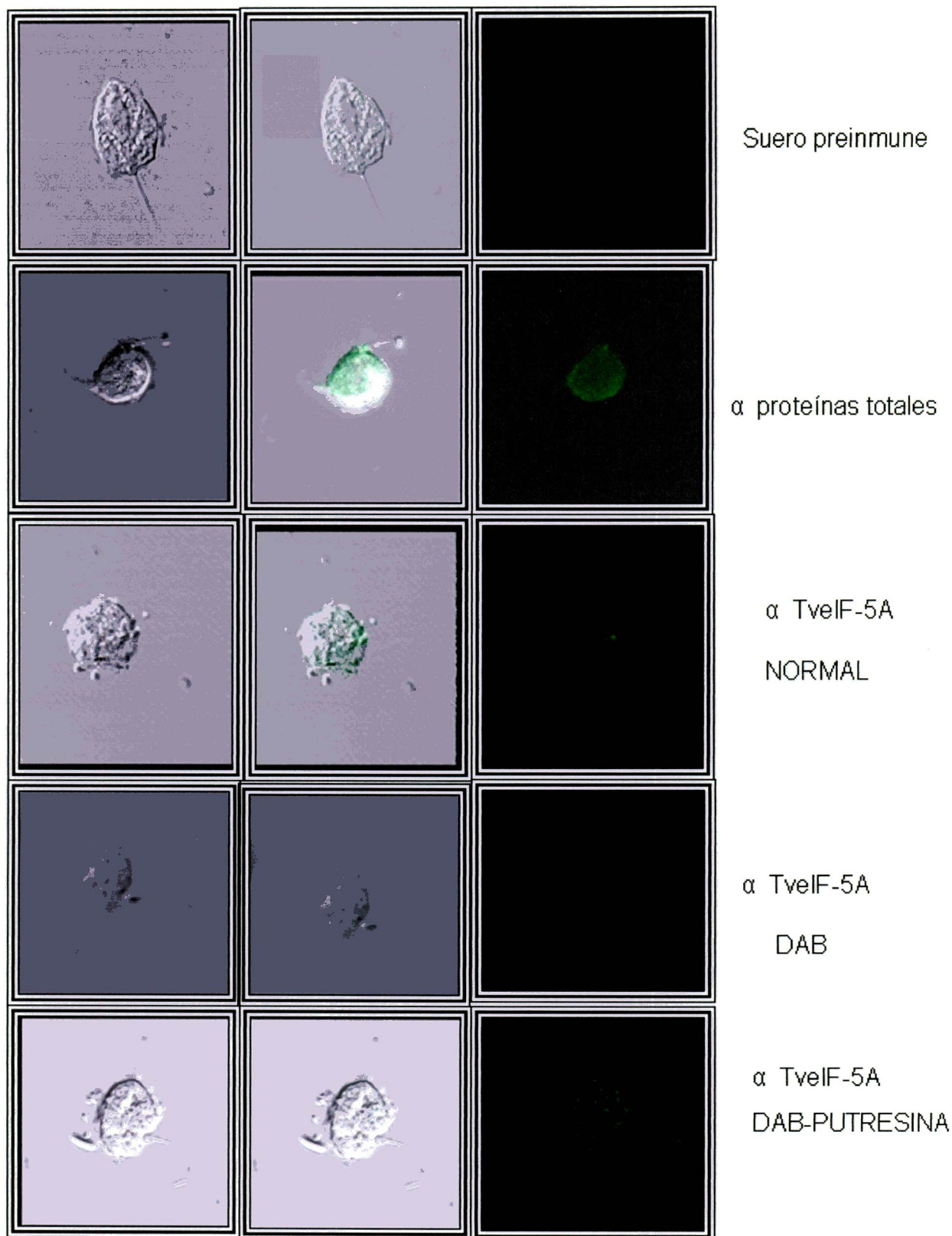


FIG. 37. Localización de TvelF-5A de *T. vaginalis*. Microscopía confocal 60x con parásitos permeabilizados adheridos en laminillas, fijados con paraformaldehído al 4%. Panel 1) Microscopía de Nomasky. Panel 2) Microscopía de Nomasky con fluorescencia. Panel 3) Microscopía de Nomasky con sobre posición de fluorescencia. Panel 4) Contraste de fases. A) Parásitos incubados con el suero preinmune (1:20) control negativo. B) Parásitos incubados con el anticuerpo anti proteínas totales de *T. vaginalis* (1:100) control positivo. C) Parásitos incubados con el anticuerpo anti TvelF-5A (1:20).



IX. Discusión.

Reportes previos sobre las poliaminas han mostrado que estos súper cationes participan en la viabilidad celular, ya que se han visto involucradas en la división, diferenciación, apoptosis celular, traducción y transcripción en procariontes y eucariontes (Yarlett y col., 2000). La importancia que tienen estas moléculas en la transcripción ha sido estudiada en diversos genes como por ejemplo el gen del receptor de estrógenos (*ere*) regulado por poliaminas mediante la proteína Sp1 (Huang y col. 2006., Liu y col. 2007). En la traducción, se ha encontrado que las poliaminas pueden actuar a través de la proteína dependiente de poliaminas eIF-5A mediante la unión al RNAm en el extremo 3'UTR del gen *cox-2* (Taylor y col. 2002). Ahora se conoce que la proteína eIF-5A es indispensable para la viabilidad celular ya que se ha reportado desempeña múltiples papeles importantes como ejemplo puede llevar a cabo la traducción de proteínas involucradas en el ciclo celular en la transición de la fase G1/S como en el caso de *Cryptosporidium parvum*, (Asano y col., 2000; Valentín y col., 2001; Taylor y col. 2002). Esta proteína se ha descrito en diversos organismos eucariontes, entre ellos el parásito *Plasmodium falciparum* (Kaiser y col., 2007).

En *T. vaginalis* el metabolismo de las poliaminas también es indispensable para la viabilidad de este parásito, ya que se encuentra regulando moléculas involucradas en la patogénesis como son las adhesinas, ya que median la adhesión de *T. vaginalis* a la célula blanco (García y col., 2005). Recientemente se describió que se encuentran regulando a la CP65 (Álvarez-Sánchez y col., 2008). Cisteín proteinasa involucrada en la citotoxicidad del parásito (Álvarez-Sánchez y col., 2000). Con base a los antecedentes que se tienen sobre las poliaminas, nuestro interés en este trabajo se centró en iniciar el estudio del posible mecanismo de regulación de la citotoxicidad mediado por poliaminas. Para ello identificamos y localizamos al factor eIF-5A.

Al realizar el análisis dentro del genoma de *T. vaginalis* encontramos la presencia de dos genes *tvelf-5A* 1 y 2 hipotéticos, no es de sorprender la presencia de dos genes *tvelf-5A* en este parásito. Previamente ha sido reportado la presencia de más de un gen *tvelf-5A* en otros organismos como en el humano y en *Sacharomyces cereviciae* (Schwelberger y col., 1993; Schader y col. 2006), se ha sugerido que la presencia de dos genes se debe a la capacidad de expresarse en diferentes condiciones microambientales (Clement y col., 2003). Al realizar el análisis en *T. vaginalis* de la expresión de ambos genes se encontró que el gen *tvelf-5A2* es el único que se expresa en condiciones normales de cultivo y en presencia del inhibidor del metabolismo de poliaminas. Sin embargo no descartamos la expresión del gen *tvelf-5A 1* bajo otras condiciones. También ha sido sugerido que la existencia de más de dos genes se debe a un evento de duplicación génica, evento característico del genoma de *T. vaginalis*.

Mediante múltiples alineamientos de la secuencia de aminoácidos de la proteína eIF-5A se ha demostrado el alto grado de homología de la proteína entre diferentes especies (Cooper y col, 1983; Park y col., 1993), incluyendo a *T. vaginalis* ya que las proteínas TveIF-5A presentan los 13 aa conservados que rodean al residuo de lisina, esta región conservada ha hecho a la proteína eIF-5A única por su modificación postraducciona. Al analizar el tamaño hipotético de esta proteína se esperaba que tuviera de aproximadamente 18 kDa. Sin embargo se encontró que la proteína TveIF-5A de *T. vaginalis* es de 19 kDa, esta proteína es pequeña al igual que la proteína eIF-5A 2 de humano y *Bombix mori* con un tamaño de 18 kDa. Sin embargo existen otras proteínas eIF-5A con un mayor tamaño como es el caso de *Plasmodium falciparum* de 20 kDa y eIF-5A 1 de humano de 21 kDa (Kaiser y col., 2007), la proteína homóloga EFP de bacterias tiene un tamaño de 21 kDa.

Por otra parte el modelo 3D realizado a las proteínas TveIF-5A nos muestra una proteína rica en cadenas β plegada y con el residuo de lisina expuesto en un loop. Para conocer si esta estructura también es conservada entre los organismos, analizamos la estructura en 3D de la proteína eIF-5A de humano, *Plasmodium*

Por otra parte se ha sugerido que la proteína EFP en bacterias podría ser ancestro de la proteína eIF-5A ya que ambas actúan como factores de inicio de la traducción, además de que sus estructuras y secuencias presentan gran similitud (Park, 2005), en *Sacharomyces cereviciae* se demostró que la depleción de la proteína eIF-5A, causa únicamente la disminución de la tasa de síntesis, afectando el 30% de la traducción y arresto del ciclo celular en la fase G1, por lo que se ha propuesto que eIF-5A juega papeles sumamente importantes en la célula y no únicamente como un factor de inicio de la traducción (Kang y Hershey, 1994). Al realizar la comparación de las estructuras 3D de la proteína TveIF-5A con la proteína EFP de *E. coli* presentan gran similitud excepto en el dominio III, ya que únicamente está presente en la proteína EF-P. Este resultado era esperado ya que es una diferencia entre ambas estructuras debido a una pérdida evolutiva del dominio III de la proteína eIF-5A. Sin embargo nos encontramos que las secuencias de aminoácidos de las proteínas EFP y TveIF-5A presentan muchas diferencias ya que EFP no presenta los 13 aa conservados que rodean la lisina, sin embargo no descartamos que EFP sea un ancestro de la proteína TveIF-5A, ya que se ha visto que las secuencias no necesariamente deben ser idénticas para tener un mismo origen evolutivo, ya que la evolución no solo conserva funciones si no que también genera nuevas funciones y con ello cambios en las secuencias (Sjölander., 2004).

Para conocer el origen evolutivo de las proteínas TveIF-5A 1 y 2, realizamos un árbol filogenético en donde encontramos que ambas proteínas se agruparon en la misma rama que la proteína EF-P de la bacteria *Marimona sp.* Para analizar que las proteínas TveIF-5A de *T. vaginalis* pudieran surgir de una transferencia de genes entre la bacteria y el parásito realizamos un árbol filogenético del gen ribosomal 18s encontrando que este gen de *T. vaginalis* se agrupa junto a otro parásito, por lo cual nos sugiere que las proteínas TveIF-5A pudieron surgir de una transferencia de genes de la bacteria hacia *T. vaginalis*.

Al analizar el contenido de G+C de los genes *tveIF-5A* de *T. vaginalis* encontramos un contenido rico de G+C, por otra parte en el extremo 5´

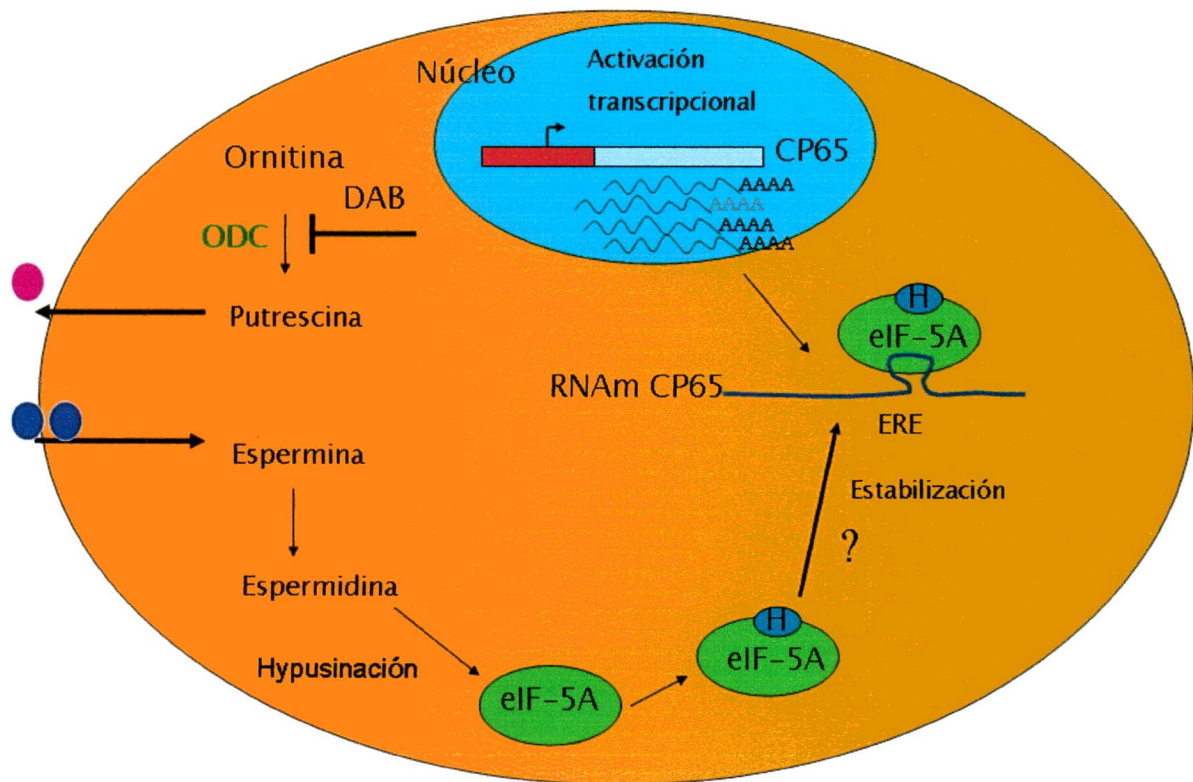
localizamos elementos reguladores Inr y en el extremo 3' se localizó el sitio de corte y poliadenilación, previamente reportado para otros genes de *T. vaginalis*. Con estos resultados podemos sugerir que ambos genes son codificantes, ya que estos elementos se han encontrado en genes codificantes en el genoma de *T. vaginalis* (Carlton y col., 2007). Pocos factores de inicio de la transcripción se han reportado en este parásito como son los factores c-Myc, Myb 1 y 2 y EFB (Liu y col., 2006), estas proteínas se ha demostrado son capaces de unirse de manera específica a los promotores de *T. vaginalis*, por lo cual localizamos sitios hipotéticos de unión de diferentes factores de transcripción como es el caso del factor c-Myc, Myb 1 y EFB en los genes *tveIF-5A 1* y *2 T. vaginalis*.

En base al antecedente que teníamos de que el metabolismo de las poliaminas es capaz de regular la expresión del gen *tvcp65* (Álvarez Sánchez y col., 2008), en donde se utilizó el inhibidor reversible de la ODC, para conocer si el gen *tveIF-5A* también es regulado por las poliaminas, se utilizó el mismo inhibidor y se determinó la expresión del gen *tveIF-5A* mediante el RNAm en presencia de DAB y en la restauración de la expresión al adicionar putrescina exógena. En este experimento encontramos que las poliaminas están regulando la expresión del gen *TveIF-5A 2* el cual se expresa únicamente en estas condiciones. Este comportamiento pudiera deberse a un mecanismo de autorregulación ya que encontramos que la secuencia del RNAm en el extremo 3'UTR de *tveIF-5A* contiene una secuencia consenso tipo ERE, al igual que el gen *cox 2* donde al unirse eIF-5A a esta secuencia, se estabiliza el RNAm y regula su expresión. Hasta el momento no se ha reportado una autorregulación por parte de la proteína eIF-5A por poliaminas. Otra explicación basada en genes regulados por poliaminas a nivel transcripcional, como el gen *c-myc* en donde las poliaminas son capaces de unirse al DNA y regular la expresión de este gen pudiera estar sucediendo en el gen *tveIF-5A* (Shile y col., 2003) o bien a través de una proteína regulada por poliaminas como p21Cip1 a nivel transcripcional (Liu y col., 2006). Por otra parte es importante resaltar que el gen *TveIF-5A 2* se expresó bajo la condición normal y con depleción de poliaminas, ya que se sabe que en otros

organismos como en *Sacharomyces cereviciae* los genes *TIF51A* y *TIF51B* se expresan en diferentes condiciones de oxígeno (Schnier y col., 1991).

Debido a que se ha reportado mediante ensayos de inmunofluorescencia en otros organismos la presencia de la proteína eIF-5A en núcleo y citoplasma en diferentes organismos como la bacteria *Methanococcus jannaschii* (Kyu y col., 1998), en base a que se ha propuesto que esta proteína actúa como transportadora de RNAm de núcleo a citoplasma como en *Sacharomyces cereviciae*, donde la proteína eIF-5A actúa como transportadora del RNA Rev del virus del VIH. Sin embargo esta propuesta todavía no ha sido aceptada debido a que no se ha podido comprobar que eIF-5A sea la molécula transportadora o bien otro conjunto de proteínas con función de transportadoras (Schatz., 1997), también se ha propuesto que eIF-5A está presente únicamente en citoplasma, en células de mamífero como por ejemplo ovocitos de *Xenopus* (Shi y col., 1996). Para localizar a la proteína TveIF-5A de *T. vaginalis*, se utilizaron los anticuerpos anti TveIF-5A generados contra el péptido sintético, con los cuales encontramos a la proteína eIF-5A de *T. vaginalis* localizada en el citoplasma de este parásito. En parásitos no permeabilizados no reconoció ninguna proteína de membrana por lo cual sugerimos que esta proteína es específica de citoplasma. Estos datos apoyan que la localización de esta proteína se encuentra mayoritariamente en citoplasma ya que no se observó una colocalización en núcleo. Sin embargo, no descartamos la presencia de esta proteína en núcleo en diferentes condiciones de estudio.

Con base a los datos obtenidos en este trabajo, en donde identificamos y localizamos la proteína TveIF-5A de *T. vaginalis*, proponemos el siguiente modelo de la regulación de la citotoxicidad mediado por poliaminas a través del factor TveIF-5A.



Modelo propuesto del posible mecanismo de regulación mediado por poliaminas a través de la proteína TveIF-5A en *T. vaginalis*. A través de la ruta biosintética de las poliaminas comenzando por la ornitina mediante la enzima ornitina descarboxilasa se da la formación de putrescina, esta a su vez mediante el sistema antiporte con la salida de una putrescina y la entrada de dos espermina, mediante una reacción enzimática forma a espermidina, la cual mediante una reacción enzimática por la enzima DHS dona un carbono aminobutil al residuo de lisina de la proteína eIF-5A precursora, la segunda enzima DOHH hidroxila el carbono aminobutil para modificar a la proteína eIF-5A precursora a su forma madura (hipusinada), eIF-5A madura es capaz de unirse a los elementos de respuesta a eIF-5A (ERE) estabilizando al RNAm del gen *tvcp65*, aumentando la expresión de la CP65 y por lo tanto aumentando la citotoxicidad de *Trichomonas vaginalis*.

X. CONCLUSIONES.

1.- *T. vaginalis* posee dos genes *tvelF-5A 1* y *tvelF-5A 2*, que se localizan en dos *loci* diferentes dentro del genoma de este parásito, presentan un contenido de G+C del 49.2%. Ambos genes tienen Inr, lo cual es característico en *T. vaginalis*. *tvelF-5A 1* y *tvelF-5A 2* codifican para dos proteínas hipotéticas TvelF-5A 1 y TvelF-5A 2 que presentan alta homología con la proteína eIF-5A de diversos organismos.

El análisis filogenético, sugiere un transferencia de genes de bacterias hacia *T. vaginalis*.

2.- Únicamente el gen *tvelF-5A 2* se expresa y su expresión es de manera diferencial en presencia y ausencia de poliaminas, sugiriendo una regulación mediada por el metabolismo de poliaminas en *T. vaginalis*.

3.-La proteína recombinante TvelF-5A-GST, es soluble y se encuentra en su forma precursora.

4.- Los anticuerpos anti péptido TvelF-5A, reconocen a la proteína TvelF-5Ar de 44 kDa y a TvelF-5A en extracto total de *T. vaginalis* de 19 kDa. La localización de la proteína TvelF-5A es en citoplasma.

En conclusión podemos decir que *T. vaginalis* tiene dos genes hipotéticos *tvelF-5A 1* y *2*, solo el gen *tvelF-5A 2* se expresa y su expresión se encuentra regulada mediante el metabolismo de poliaminas, esta proteína tiene un tamaño aproximado de 19 kDa y su localización es en citoplasma.

XI. PERSPECTIVAS

Clonar y expresar el gen *dhs* de *Trichomonas vaginalis*

Clonar y expresar el gen *eIF-5a* madura de *Trichomonas vaginalis*.

Identificar y clonar la secuencia EREs en el gen *tvcp65*

Caracterizar funcionalmente la interacción de TveIF-5a madura con las secuencias EREs del gen *tvcp65*

Determinar el efecto de las secuencias ERES en el extremo 3'UTR del RNAm del gen *tvcp65* en la estabilidad

XII. REFERENCIA BIBLIOGRAFÍA.

ALDERETE JOHN F AND PEARLMAN E. 1984 Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers. Br J Vener Dis. 60, 2, 99.

ALDERETE JF, BENCHIMOL M, LEHKER MW, CROUCH ML. 2002. The complex fibronectina *Trichomonas vaginalis* interactions and Trichomonosis. Parasitol Int. 51, 3,285.

ALDERETE JOHN F, CROUCH MARIE-LAURE Y ARROYO ROSSANA; Mecanismos de patogénesis de la trichomonosis: La enfermedad de transmisión sexual no viral número uno causada por *Trichomonas vaginalis*. La frontera: genética molecular de la enfermedad. 169.

ALDERETE JOHN F, GARZA G. E. Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytheadherence. 1988. Infect Immun. 56(1):28-33.

ALDERETE, JOHN F. AND GARZA G. E. 1985. Specific nature of *Trichomonas vaginalis* parasitism of host cell surfaces. Infect. Immun. 50,701.

ÁLVAREZ SÁNCHEZ, M.E; AVILA-GONZÁLEZ, L; BECERRIL-GARCÍA, C; FATTEL-FACENDA L; ORTEGA-LÓPEZ, J; ARROYO, R. 2000. A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* envolved in citotoxicity. Microbial Pathog. 28, 193.

ALVAREZ-SÁNCHEZ ELIZBETH; CARVAJAL-GAMEZ; SOLANO-GÓNZALEZ; GARCÍA, A; ALDERETE JOHN; ARROYO ROSANA. 2008. Polyamines Depletion Down-regulated Gene Expression of the *Trichomonas vaginalis* Cytotoxic 65 kDa CP65 Cystein Proteinase. J. Biochem. Cell. 10, 1016.

ÁLVAREZ-SÁNCHEZ ME; SOLANO-GONZÁLEZ E; YAÑEZ-GÓMEZ C; ARROYO R. 2007. Negative iron regulation of the CP65 cysteine proteinase cytotoxicity in *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect.* 9, 14, 1597.

ANORLU R.I; FAGBENRO-BEYIOKU A.F; FAGORALA T. 2001. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* in patients with vaginal discharge in Lagos Nigeria. *Nigeria Postgrad. Med. J.* 8, 183.

ARROYO R AND JOHN F. ALDERETE. 1989. *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infect Immun.* 57, 2991.

ARROYO R; A. GONZÁLEZ-ROBLES; MARTÍNEZ-PALOMO, JOHN F. ALDERETE. 1993. Signalling of *Trichomonas vaginalis* for ameboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. *Mol. Microbiol.* 7, 2, 299.

ARROYO, R. 2000. Biología molecular de la trichomonosis. *Genética y Biomedicina Molecular.* Edit. Limusa, Noriega. 19, 287.

ARROYO, R; ENGBRING J AND ALDERETE JONH F. 1992. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Microbiol.* 853, 862.

BEACH D H, HOLZ G JR, SINGH B N, LINDMARK D G. 1990. Fatty acid and sterol metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Mol Biochem Parasitol.* 38, 175.

BEACH, D. H., G. G. HOLZ, JR., B. N. SINGH, AND D. G. LINDMARK. 1990. Fatty acid and sterol metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 38, 175.

BEACH D H, HOLZ G G JR, SINGH B N, LINDMARK D G. 1991 Phospholipid metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. Mol Biochem Parasitol. 44, 97.

BOTTENTUIT LÓPEZ LUCIENE, BANDEIRA DE MELO BRAGA MARIANE, ORTEGA LÓPEZ JAIME, ARROYO ROSSANA and COSTA E SILVA FILHO FERNANDO. 2000. Strategies by which some Pathogenic Trichomonads integrate Diverse Signals in the Decision-making Process. An. Acad. Bras. Ci.17,185.

CARLTON JANE M., HIRT, ROBERT P., SILVA JOANA C., DELCHER ARTHUR L., SCHATZ MICHAEL., ZHAO QI., WORTMAN JENNIFER R., L. BIDWELL SHELBY, ALSMARK U. CECILIA M., BESTEIRO SÉBASTIEN, SICHERITZ-PONTEN THOMAS, CHRISTOPHE NOEL J., DACKS JOEL B., FOSTER PETER G., CEDRIC SIMILLION, YVES VAN DE PEER, MIRANDA-SAAVEDRA DIEGO, BARTON GEOFFREY J., WESTROP GARETH D., MÜLLER SYLKE, DESSI DANIELE, FIORI PIER LUIGI, QINGHU REN, PAULSEN IAN, ZHANG HANBANG, BASTIDA-CORCUERA FELIX D., SIMOES-BARBOSA AUGUSTO, BROWN MARK T., HAYES RICHARD D., MUKHERJEE MANDIRA, OKUMURA CHERYL Y., SCHNEIDER RACHEL, SMITH ALIAS J., VANACOVA STEPANKA, VILLALVAZO MARIA, HAAS BRIAN J., PERTEA MIHAELA, FELDBLYUM TAMARA V., UTTERBACK TERRY R., SHU CHUNG-LI, OSOEGAWA KAZUTOYO, DE JONG PIETER J., HRDY IVAN, HORVATHOVA LENKA, ZUBACOVA ZUZANA, DOLEZAL PAVEL, MALIK SHEHRE-BANOO, LOGSDON JR JOHN M., HENZE KATRIN, GUPTA ARTI, WANG CHING C., DUNNE REBECCA L., UPCROFT JACQUELINE A., UPCROFT PETER, WHITE OWEN, SALZBERG STEVEN L., TANG PETRUS, CHIU CHENG-HSUN, LEE YING-SHIUNG, EMBLEY T. MARTIN, COOMBS GRAHAM H., MOTTRAM JEREMY C., TACHEZY JAN, FRASER-LIGGETT CLAIRE M., JOHNSON PATRICIA J. 2007. Draft Genome Sequence of the Sexually Transmitted Pathogen *Trichomonas vaginalis*. Science. 315.

CELANO PAUL S, STEPHEN B. BAYLIN AND CASERO ROBERT A. 1989. Polyamines Differentially Modulate the Transcription of Growth associated Genes in Human Colon Carcinoma Cells. J. Biol. Chem. 264, 15.

CHAN K. L., D. GHANDHI NEW, S., WONG F., LAM C. M. C., AND WONG J. T. Y. 2001. Transcript levels of the eukaryotic translation initiation factor 5A gene peak at early G1 phase of the cell cycle in the Dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*, App. Enviro. Microbiol. 22, 2284.

CHATTOPADHYAY MK, TABOR CW, TABOR H. 2003. Spermidine but not spermine is essential for hypusine biosynthesis and growth in *Saccharomyces cerevisiae*: spermine is converted to spermidine in vivo by the FMS1-amine oxidase. Proc Natl Acad Sci. 24, 13869.

COSTMAGNA, SIXTO RAUL Y PRADO FIGUEROA MARIA. 2001. On the ultrastructure of *Trichomonas vaginalis*: cytoskeleton, endocytosis and hydrogenosomes. Parasitol. 10,108.

COTCH, M F., PASTOREK, J. G. NUGENT, R.P., HILLER, S.L., GIBBS, R.S., MASRTIN, D. H. 1997. *Trichomonas vaginalis* associated with low- birth weight and preterm delivery. The vaginal infections and prematurity study group. Sex. Transm. Dis. 24, 353.

COOMBS, G. H., Y M. J. NORTH. 1983. An analysis of the proteinases of *Trichomonas vaginalis* by acrylamide gel electrophoresis. Parasitol. 86,16.

DON C. DAILEY AND J. F. ALDERETE. 1991. The Phenotypically Variable Surface Protein of *Trichomonas vaginalis* Has a Single, Tandemly Repeated Immunodominant Epitope. Infect. And Immun. 59, 6.

DYALL SD, YAN W. DELGADILLO-CORREA MG, LUNCEFORD A. LOO J.A, CLARKE CF, JONSON PJ. 2005. Non-mitochondrial complex I proteins in a Hydrogenosomal oxidoreductasa complex. *Nature*. 434, 29.

ESTADISTICA DE LAS ETS A NIVEL MUNDIAL SEGÚN LA OMS. Se puede encontrar en:

<http://thaisyjosef.com/hombremujer/enfermedadessexuales/enfermedadessexuales.htm>.

<http://www.who.int/es/>

ESPINOSA N, HERNÁNDEZ R, LÓPEZ-GRIEGO L, LÓPEZ-VILLASEÑOR I. 2002. Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in *Trichomonas vaginalis* mRNAs. *Gene*. 1, 289, 81.

GARCÍA A. F., BENCHIMOL M., AND ALDERETE JOHN F. 2005. *Trichomonas vaginalis* polyamine metabolism Is linked to host cell adherente and cytotoxicity. *Infec. Immun.* 26, 2261.

GARCÍA A. F., CHANG TE- HUNG, BENCHIMOL MARLENE, JICHAEL, KLUMPP DAVID LEHKER MICHAEL W. AND ALDERETE JOHN. 2003. Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Microb.* 47, 5.

GOMEZ-CONDE, E, MENA-LÓPEZ, R., HERNANDEZ-JAUREGUI P, GONZALEZ- CAMACHO M. 2000. *Trichomonas vaginalis*; chromatin and mitotic spindle during mitosis. *Exp. Parasitol.* 96, 3, 130.

HERNANDEZ-GUTIERREZ R, ORTEGA-LÓPEZ J, 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.* 50,696.

HEYWORTH P G, GUTTERIDGE W E, GINGER C D. 1982. Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. FEBS Lett. 141, 106.

HEYWORTH P G, GUTTERIDGE W E, GINGER C D. 1984 Pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. FEBS Lett.176, 55.

HONIGBERG, B. M., AND BRUGEROLLE. 1990. Trichomonads parasitic in human. In. B. M. Honigberg. 5, 35.

HONIGBERG, B. M., KING V. M. 1964. Structure of *Trichomonas vaginalis*. *Donné. J. Parasitol.* 50, 345.

HORNER DS, HIRT RP, KILVINGTON S, LLOYD D, EMBLEY TM. 1996. Molecular data suggest an early acquisition of the mitochondrion endosymbiont. *Proc Biol Sci.* 22, 263, 1373.

HUANG YI, KEEN JUDITH C., PLEDGIE ALLISON, MARTON LAURENCE J., ZHU TAO, SUKUMAR SARASWATI, PARK BEN HO, BLAIR BRIAN, BRENNER KEITH, CASERO ROBERT A., JR., AND DAVIDSON NANCY E. 2006. Polyamine analogues down-regulate estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 281, 28, 1905.

IGARASHI K., KASHIWAGI, K., 2000. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun.* 19, 271,3.

KEMPER., W. M., BERRY, K. W. AND MERRICK, W. C.1976. Purification and properties of rabbit reticulocyte protein synthesis initiation factors M2Balpha and M2Bbeta. *J. Biol. Chem.* 251, 5551.

PETERSON KENNETH M AND ALDERETE JOHN. F. 1984. Iron uptake and increase intracellular enzyme activity follow host lactoferrin binding by *Trichomonas vaginalis* receptors. J. Exp. Med. 160, 398.

KRIEGER JN, REIN MF. 1982. Zinc sensitivity of *Trichomonas vaginalis*: in vitro studies and clinical implications. J Infect Dis. 146, 3, 341.

KRIEGER JN, POISSON MA, REIN MF. 1983. Beta-hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* correlates with virulence. Infect Immun. 41,3,1291.

KRIEGER JOHN N. AND MICHAEL REIN. 1982. Canine Prostatic Secretions Kill *Trichomonas vaginalis*. Infect. Immun. 7, 81.

KUCKNOOR ASHWINI S., MUNDODI VASANTHAKRISHNA, AND ALDERETE J. F. 2005. Adherence to human vaginal epithelial cells signals for increased expression of *Trichomonas vaginalis* genes. Infect. Immun. 64, 6478.

KYRPIDES NIKOS C. AND WOESE CARL R. 1998. Evolution universally conserved translation initiation factors. Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 224.

LAHTI. C., D'OLIVEIRA, C., AND JONSON, P. 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.

LEHKER MICHAEL W AND ALDERETE JOHN F. 2000. Biology of Trichomonosis. Curr. Opin Infect Dis 13, 37.

LEHKER MICHAEL W., ARROYO ROSSANA AND ALDERETE JOHN F. 1991. The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. J. Exp. Med. 174, 311.

LEHKER M W, CHANG T H., DAILEY D. C., AND ALDERETE J. E. 1990. Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for *Trichomonas vaginalis*. J. Exp. Med. 171, 2165.

JAO LI-EN DAVID AND YU CHEN KUANG. 2002. Subcellular localization of the hypusine-containing eukaryotic initiation factor 5A by Immunofluorescent staining and green fluorescent protein tagging. J. Cell. Biochem. 86, 590.

LINSTEAD D. 1981. New defined and semi-defined media for cultivation of the flagellate *Trichomonas vaginalis*. Parasitol. 83,12.

LISTON D.R. AND JOHNSON P.J. 1998. Gene Transcription in *Trichomonas vaginalis*. Parasitol. Today. 14, 7.

LIU LAN, GUO XIN, RAO JALADANKI N., BERNARD TONGTONG., JIE S., CASERO JOSE, ROBERT A., JR AND WANG JIAN-YING. 2006. Polyamine-modulated c-Myc expression in normal intestinal epithelial cells regulates p21Cip1 transcription through a proximal promoter region. J. Biochem. 398, 257.

MENDOZA-LÓPEZ M. REMEDIOS, BECERRIL-GARCÍA CECILIA, FATTELFACENDA LORIZ V., AVILA-GONZALEZ LETICIA, RUIZ-TACHIQUIN MARTHA E., ORTEGA-LÓPEZ JAIME AND ARROYO ROSSANA. 2000. CP30 a Cistein Proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. Infect. Immuni. 49, 4912.

MOLITOR ILKA M., KNÖBEL SEBASTIAN, DANG CHANTIP, SPEIELMAMNN TOBIAS, ALLÉRA AXEL, KÖNIG GABRIELE M. 2004. Translation initiation factor EIF-5A from *Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol. 137, 65.

MORENO-BRITO V, YÁÑEZ-GÓMEZ C, MEZA-CERVANTEZ P, AVILA-GONZÁLEZ L, RODRÍGUEZ MA, ORTEGA-LÓPEZ J, GONZÁLEZ-ROBLES A, ARROYO R. 2005. A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. *Cell Microbiol.* 7,2, 245.

MUNDODI V, KUCKNOO AS AND ALDERETE JF. 2007. Antisense RNA decreases AP33 gene expression and cytoadherence by *T. vaginalis*. *BMC Microbiol.* 7, 64,1186.

MUNDODI V, KUCKNOOR AS, CHANG TH, ALDERETE JOHN F. 2006. A novel surface protein of *Trichomonas vaginalis* is regulated independently by low iron and contact with vaginal epithelial cells. *BMC Microbiol.* 31, 6, 6.

MUNDODI V, KUCKNOOR AS, KLUMPP DJ, CHANG TH, ALDERETE JF. 2004. Silencing the ap65 gene reduces adherence to vaginal epithelial cells by *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol.* 53, 4.

NIKOS KYRPIDES C AND WOESE CARL R. 1998. Evolution Universally conserved translation initiation factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 22, 228.

PARK MH., LEE YB., JOE YA. 1997. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biol. Signals.* 6, 3, 115.

PARK MYUNG HEE. 2006. The Post-Translational Synthesis of a Polyamine-Derived Amino Acid, Hypusine, in the Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF-5A). *J. Biochem.* 139, 161.

PEGG ANTHONY E. 1988. Polyamine Metabolism and Its Importance in Neoplastic Growth and as a Target for Chemotherapy. *Cancer Research* 48, 759-774.

PESTOVA TATYANA V., KOLUPAEVA VICTORIA G., LOMAKIN IVAN B., PILIPENKO EVGENY V., SHATSKY IVAN N., AGOL VADIM I., AND HELLEN CHRISTOPHER U. T. 2001. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 13, 7029.

PINES J. 1994. Protein kinases and cell cycle control. *Cell Biol.* 5, 6, 399.

PROVENZANO D, ALDERETE JF. 1995. Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun.* 63, 9, 3388.

QUON DV, DELGADILLO MG, JOHNSON PJ. 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, 3, 253.

RASMUSSEN, S.E; NIELSEN, M.H; LIND, I; RHODES, M.J. 1986. Morphological studies of the cytotoxicity of *Trichomonas vaginalis* to normal human vaginal epithelial cells in vitro. *Genitourin. Med.* 62, 240.

REIS, A.I., MARTÍNEZ, P.M., YARLETT, N., JOHNSON, J.P., SILVA-FILHO, F.C., AND VANNIER- SANTOS, M.A. 1999. Inhibition of polyamine synthesis arrests trichomonad growth induces destruction of hydrogenosomes. *Antimicrob. Agent Chemother* 43, 1919.

ROSENTHAL BEN, MAIL ZHIMING, CAPLIVSKI DANIEL, GHOSH SUDIP, DE LA VEGA HUMBERTO, GRAF THOMAS AND SAMUELSON JOHN. 1997. Evidence for the Bacterial Origin of Genes Encoding Fermentation Enzymes of the Amitochondriate Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Bacteriol.* 179, 11, 3736.

SCHATZ OCTAVIAN, OFT MARTIN, DASCHER CHRISTIANE, SCHEBESTA MICHAEL, ROSORIUS OLAF, JAKSCHE HERBERT, DOBROVNIK MARIKA, BEVEC DORIAN, AND HAUBER JOACHIM. 1998. Interaction of the HIV-1 rev cofactor eukaryotic initiation factor 5a with ribosomal protein. *Cell Biol.* 95,1607.

SCHMIDT, G.D., L. S. ROBERTS. 1989. *Foundations in parasitology*. Fourth Edition. 35, 54, 87.

SCHNIER JOACHIM, SCHWELBERGER T HUBERT G., SMIT-MCBRIDE ZELJKA, AH KANG HYUN, AND HERSHEY JOHN W. B. 1991. Translation initiation factor 5a and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 31, 3114.

SCHUBER FRANCIS. 1989. Influence of polyamines on membran function. *J.Biochem.* 296, 1.

SCHWEBKE JANE R. AND BURGUÉS DONALD. 2004. Trichomoniasis. *Clin. microbiol.* 794-803.

SOLANO-GONZÁLEZ EDUARDO, BURROLAS- BARRAZA EDUVIGES, LEÓN-SICARIOS CLAUDIA, AVILA- GONZÁLEZ LETICIA., GUTIÉRREZ-ESCOLANO LORENA., ORTEGA LÓPEZ JAIME., ARROYO ROSSANA. 2007. The trichomonad cysteine proteinase TVCP4 transcript contains an iron- responsive element. *FEBS Letters.* 581, 2919.

SPIEGEL, C.A. 1990. Microflora associated with *Trichomonas vaginalis* and vaccination against vaginal trichomoniasis. 213-224. In B. M. Honigberg (ed.). *Trichomonads parasitic in human*. Springer- Verlag, New York, N.Y.

SWYGARD H, SENA A, HOBBS M, AND COHEN M. 2004. Trichomoniasis: clinical manifestations, diagnosis and management. *Sex Transm Infect.* 80, 2,915.

TABOR CELIA WHITE AND TABOR HERBERT. 1985. Polyamines in Microorganisms. *Microbiol.* 81, 49, 1.

BOZNER, P. 1997. Immunological detection and subcellular localization of Hsp70 and Hsp60 homologs in *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitol.* 83, 224.

TADOLINI B. 1988. Polyamine inhibition of lipoperoxidation. The influence of polyamines on iron oxidation in the presence of compounds mimicking phospholipid polar heads. *J. Biochem* 249,1, 33.

TAYLOR PARKER MICHELE, GERNER EUGENE W. 2002. Polyamine-mediated post-transcriptional regulation of COX-2., *Biochem.* 84, 815.

TORRES-MACHORRO AL, HERNÁNDEZ R, SÁNCHEZ J, LÓPEZ-VILLASEÑOR I. 2006. The 5S ribosomal RNA gene from the early diverging protozoa *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol.* 145,2, 269.

TSAI CHU-DANG, LIU HSING-WEI, AND TAI JUNG-HSIANG. 2002. Characterization of an Iron-responsive promoter in the protozoan pathogen *Trichomonas vaginalis*. *J. Biol. Chem.* 277, 7.

VAN DER POL B, KWOK C, PIERRE-LOUIS B, RINALDI A, SALATA RA, CHEN PL, VAN DE WIJGERT J, MMIRO F, MUGERWA R, CHIPATO T, MORRISON CS. 2008. *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. *J Infect Dis.* 15, 197,4.

VAÑACOVA STEPANKA, YAN WEIHONG, CARLTON JANE M., AND JOHNSON PATRICIA J. 2005. Spliceosomal introns in the deep-branching eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *PNAS.* 22, 102.

HEATHER WALLACE M., FRASER ALISON V. AND HUGHES ALUN. 2003. A perspective of polyamine metabolism. *J. Biochem.* 376,114.

YARLETT N, MARTINEZ MP, GOLDBERG B, KRAMER DL, PORTER CW. 2000. Dependence of *Trichomonas vaginalis* upon polyamine backconversion. *Microbiology.* 146 :2715-22.

YONG-SEOK KIM, HYUN-OUK SONG, IK-HWA CHOI, SOON-JUNG PARK AND JAE-SOOK RYU. 2006. Hydrogenosomal activity of *Trichomonas vaginalis* cultivated under different iron conditions. *J. Parasitol.* 44, 373.

YOON K, RYU J S, MIN D Y. 1991. Cytotoxicity of lymphokine activated peritoneal macrophages against *Trichomonas vaginalis*. *J Parasitol.* 29, 381.

ZANELLI CF., VALENTINI SR. 2007. Is There a role for eIF-5A in translation ?. *Amino Acids.* 33, 2, 351.

ZHANG, Z. F. 1996. Epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. A perspective study in China. *Sex. Transm.* 23,415.

ZHANG, Z. F., S. GRAHAM, S.Z. YU, J. MARSHALL, M. ZIELEZNY, Y. X. CHEN, M. SUN, S. L. TANG, C. S. LIAO, J. L. XU. 1995. *Trichomonas vaginalis* and cervical cancer. A prospective study in China. *Ann. Epidemiol.* 5:325-332.

XIII. APÉNDICE.

Gel de Agarosa al 1%

Agarosa (Gibco BRL)	0.20gr
TAE 1x	20ml
Bromuro de Etidio	4 μ l ((0.5 mg/ml)

Amortiguador TAE 50x

Trizma Base (Sigma)	242 gr.
Ácido acético glacial	57.1 ml
EDTA (Sigma)	37.2 gr.

Se afora a 1 litro con H₂O destilada, se ajusta el pH a 8.5.

Extracción de DNA

PBS 1x

NaCl (MERCK)	8g
KCl	8g
Na ₂ HPO ₄	0.65g
KH ₂ PO ₄	0.2g

Se ajusto 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	10 mM, pH 8.0
Tris-HCl	10 mM, pH 8.0

Etanol al 70%

Para 50ml:

Etanol al 100%	35%
H ₂ O destilada	15%

TDSET

Tris-HCl pH 7.8 1M 1 ml

DOC 10%	2 ml
SDS	0.5 ml
EDTA pH 8.0	2.0 ml
Tritón X-100	1 ml

Se mezclan los componentes en 50 ml y se afora a 100 ml.

EDTA pH 8.0

EDTA	46.525 g
H ₂ O	250 ml

El agua destilada es ajustada a un pH de 8.0, posteriormente se adiciona el EDTA y se vuelve ajustar el pH a 8.0.

PBS – EDTA 0.2%

PBS 1X p 7.0 500 ml

EDTA 1g

Se disuelve el EDTA y se esteriliza por autoclave 121°C/ 20 min

Sacarosa 10% en PBS pH 8.0

Sacarosa 1 g

H₂O DESTILADA 10 ml

Adicionar una punta de micropipeta de 200 µL en la solución de sacarosa.

Extracción de DNA plasmídico

Solución I (Estéril)

Glucosa 50mM

Tris-HCl 25mM, pH 8.0

EDTA 10mM, pH 8.0

Solución II (recién preparada)

NaOH 0.2 M

SDS (Dodecil sulfato de Sodio) 1%

Solución III

Acetato de sodio 5 M	60ml
Ácido acético glacial	11.5 ml
H ₂ O destilada	28.5 ml

Se ajusta el pH 5.2 con ácido acético glacial, se esteriliza por autoclave.

Medio de cultivo

Medio Luria Bertani (LB)

Cloruro de sodio	10g
Tristona	10g
Extracto de Levadura	5g

Se ajusta el pH a 7.0 y se afora con H₂O destilada a 1litro. Por último se esteriliza en autoclave.

Ampicilina (100 µg/ml)

Se filtra por 0.22µm, 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 µg/ml) y se transfiere a cajas Petri en esterilidad.

Extracción de RNA total

Etanol al 70%

Etanol absoluto	700 ml
H ₂ O-DEPC	300 ml

Preparación de 1,4-diamino-2-butanona (DAB) 20 mM.

Para preparar 90 ml de medio TYM con DAB 20 mM (Sigma) se requiere 0.35012 g de DAB (PM 175.06 g/mol) disuelto en 2 ml de medio TYM, este stock se filtra por 0.22µm, la solución stock es adicionada a los 90 ml de medio TYM y es guardada a 4°C por 12 h.

Preparación de putrescina 40 mM

Para preparar 54 ml de medio TYM con putrescina 40 Mm (Sigma) se requiere 0.4025 g de putrescina (PM 161.1 g/mol) disuelto en 2.5 ml de medio TYM, la solución stock es filtrada por 0.22 µm y es guardada a 4°C 12 h.

Acrilamida al 30%/bisacrilamida al 0.8%

Acrilamida	29.2 g
Bisacrilamida	0.8 g

Disolver en 40 ml de agua destilada. Una vez disuelto aforar hasta 100 ml.

Filtrar a través de papel filtro "Whatman" No. 1.

Almacenar a 4°C hasta un mes, previamente protegido de la luz.

Tris-HCl/SDS 4x, pH 8.8 (1.5 M Tris-Cl, 0.4% SDS)

Trizma-base (Sigma) 9.08g

SDS (Sigma) 0.2 g

Disolver en 20 ml de agua destilada y ajustar a pH 8.8 con HCl.

Afora a un volumen final de 50 ml con agua destilada. Filtrar la solución almacenar a 4 °C.

Tris-HCl/SDS 4x, pH 6.8 (1.5 M Tris-Cl, 0.4% SDS)

Trizma-base (Sigma) 3.025g

SDS (Sigma) 0.2 g

Disolver en 20 ml de agua destilada y ajustar a pH 8.8 con HCl.

Afora a un volumen final de 50 ml con agua destilada. Filtrar la solución almacenar a 4 °C.

Persulfato de amonio al 10%

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

TEMED (Bio- Rad)

0.01ml (10µl)

SDS-amortiguador 2x

Trizma-base 1.52 g

SDS 2g

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

Glicerol 20 ml

Agua destilada (aforar a 100 ml)

Amortiguador de muestra 1x (BM 1x)

SDS amortiguador 2x 500 μ l

β – mercaptoetanol 5% 50 μ l

Azul de bromofenol 50 μ l

(stock 10 mg /ml)

Agua destilada 400 μ l

Amortiguador de muestra 2x (BM 2x)

SDS amortiguador 2x 400 μ l

β – mercaptoetanol 5% 50 μ l

Azul de bromofenol 50 μ l

(stock 10 mg /ml)

Amortiguador de electroforesis 5x (stock)

Glicina (Sigma) 72 g

Trizma-base (Sigma) 15.1g

SDS (Sigma) 5.0 g

Aforar con agua destilada a 1 litro.

Amortiguador de electroforesis 1x

Amortiguador de electroforesis 5x 100 ml

Agua destilada 400 ml

Solución Colorante de proteínas (Azul brillante de Coomassie) 0.05%

Metanol 500 ml

Ácido acético glacial 100 ml

Agua destilada 400 ml

Azul de Coomassie 0.5g

Disolver toda la noche. Filtrar con papel "Whatman" no. 1. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución decolorante de geles de poliacrilamida

Metanol 165 ml

Ácido acético glacial 50 ml

Agua destilada 785 ml

Almacenar a temperatura ambiente.

Preparación de Gelatina al 9%

0.0324 g en 10 ml de agua destilada incuba a 37°C para solubilizar.

Gel separador

- 4. 50 ml Poliacrilamida/Bisacrilamida al 30%
- 3.75 ml 4x Tris-CL/SDS pH 8.8
- 6.75 ml Gelatina al 9%
- 0.05 ml Persulfato de amonio al 10%
- 0.01 ml TEMED

Gel concentrador

- 0.65 ml Poliacrilamida/Bisacrilamida al 30%
- 1.25 ml 4X Tris-CL/SDS pH 6.8
- 3.05 ml Agua
- 0.025 ml Persulfato de amonio al 10%
- 0.005 ml TEMED

Amortiguador de activación de proteasas pH 4.5 3M

Acetato de sodio	13.61 g
DTT	0.154 g
Ácido acético	20 ml
H ₂ O	980ml

Se disuelve en 500 ml el acetato de sodio, DTT posteriormente se adiciona el ácido acético y se ajusta el pH y se afora a 1 litro.

Tritón X- 100 2.5%

Tritón X-100	25 ml
H ₂ O destilada	cbp 1000 ml

Amortiguador de transferencia

Trizma- base	25mM	3.03 g
Glicina	190mM	14.25 g
Metanol	20%	200 ml

Disolver primero el Trizma y Glicina. Una vez disuelto 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	500 Mm	29.22 g

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

Solución reveladora HRP (por color Bio Rad)

Solución A:

HRP	7.5 mg
Metanol frío	2.5 ml

Solución B:

TBS 1X pH 7.5	12.5 ml
H ₂ O ₂	7.5 ml

Primero se prepara la solución B, se mezcla el TBS 1X con el H₂O₂ y se mezcla, posteriormente se prepara la solución A, se mezcla el reactivo HRP (Bio Rad) en los 2.5 de metanol frío y se adiciona a la solución B.

Paraformaldehído al 4%

Paraformaldehído 4 g en 100 ml de PBS 1X previamente filtrado, se disuelve a 55°C y se adicionan 4 gotas de NaOH hasta disolver totalmente.

PBS 1X

NaCl	8 g
KCl	8 g
Na ₂ HPO ₄	0.65 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g

Se disuelve en 500 ml de agua destilada y se ajusta el pH a 7.0, posteriormente se afora a 1 litro y se esteriliza por autoclave, y se filtra por membrana de 0.22 µm.

NH₄Cl/PBS 1X pH 7.0 50 Mm

HCl/ PBS 1X pH 7.0 1 M

GLICINA 0.5 M/ PBS 1X pH 7.0

SUERO FETAL BOVINO 1%/ PBS 1X pH 7.0

SUERO FETAL BOVINO 0.2% PBS 1X pH 7.0

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 29 de agosto del 2008, en la Ciudad de México, para optar al grado de Maestría en Ciencias Genómicas, a la Q.F.B. Bertha Isabel Carvajal Gamez.

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez.



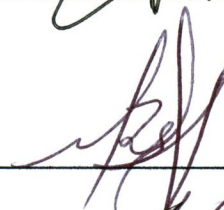
Dra. Rossana Arroyo Verástegui.



Dra. Minerva Camacho Nuez.



Dr. Mario César López Camarillo.



M. en C. Máximo B. Martínez Benítez.



M. en C. Julio Cesar Torres Romero.





EL ARTE DE ENCUADERNAR

TESIS URGENTES EN 8Hrs



**AV. IPN No 1891
COL. LINDAVISTA
DEL. G.A.M.
TEL. 5754-3924
NEXTEL. 1089-0507**

**HDA. ZOTOLUCA No 9
ESQ. RANCHO SECO
EDO. DE MEX.
COL. IMPULSORA
TEL. 5712-0055**



NEXTEL. 1089-0506