

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

“Caracterización de la interacción de *Trichomonas vaginalis* con las células prostáticas DU-145.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A

Biol.Exp. LAURA ISABEL VÁZQUEZ CARRILLO

DIRECTORA DE TESIS

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

MÉXICO, D.F.

Noviembre 2009

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.

UACM3 TDV198

DIRECTORA

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

ASESORES

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

Dr. Mauricio Castañón Arreola
Profesor-Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Dra. Rosalía Lira Carmona
Investigadora asociada de la Unidad de Investigación Médica de
Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del IMSS.

Dr. Jaime Ortega López
Investigador titular 3C. Biotecnología y Bioingeniería
CINVEATAV-IPN

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

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 Verastegui, Dr. Mauricio Castañón Arreola, Dra. Rosalía Lira Carmona, Dr. Jaime Ortega López y M. en C. Julio César Torres Romero.

El proyecto fue financiado con fondos del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México de los proyectos ICyT (PIFUTP08-150) y CONACYT (83808 y 60231).

Apoyo Económico por parte de la UACM para Biol.Exp. Laura Isabel Vázquez Carrillo.

Agradecimientos...

Mi eterno agradecimiento a la Dra. Elizabeth Álvarez por aceptarme como miembro de su equipo de investigación, por su confianza, por su extraordinaria guía, por su paciencia y por ser un ejemplo para mí... Eternamente agradecida

Agradezco a la Dra. Rossana Arroyo por su apoyo en todo momento, por sus consejos, por abrir las puertas de su laboratorio para la realización de algunos experimentos, por ser una excelente investigadora y por cultivar en mí el amor a la ciencia.

Agradezco a mi amiga, Isabel Carvajal, por compartir conmigo buenos y no tan buenos momentos en el laboratorio, por las risas, por sus palabras de ánimo, por su apoyo y sobre todo por su amistad incondicional... gracias... sí se pudo !!!

Agradezco a Itzel Quintas, por su apoyo en la parte final de la tesis.

Agradezco a Marcos por su amistad y apoyo durante esta etapa de mi vida

Y por supuesto agradezco a mis compañeros y amigos del Posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM, por su amistad y apoyo durante el desarrollo del proyecto.

Dedicatoria

A mi Madre,

A mis Hermanas,

A mi Familia.

"La gratitud es la memoria del corazón"

(Jean Baptiste Massieu).

ÍNDICE GENERAL	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Epidemiología	1
1.2 Tricomonosis en la Mujer	1
1.3 Tricomonosis en el Hombre	3
1.4 <i>Trichomonas vaginalis</i>	6
1.5 Ciclo de Vida	8
1.6 Metabolismo de <i>T. vaginalis</i>	9
1.7 Citopatogenicidad de <i>T. vaginalis</i>	10
1.8 Adhesión	11
1.9 Citotoxicidad	12
1.10 Evasión de la respuesta inmune	14
1.11 Apoptosis	15
1.12 Importancia del Zn ²⁺ en el Hombre	15
1.13 El Zn ²⁺ como Inhibidor de Cistein Proteinasa	17
1.14 <i>Tritrichomonas foetus</i> y su interacción con células espermáticas	17
1.15 El efecto de Zn ²⁺ en <i>Tritrichomonas foetus</i>	18
2. ESTADO DEL ARTE	19
II. 1. JUSTIFICACIÓN	20
1. HIPÓTESIS	22
2. OBJETIVO GENERAL	22
3. OBJETIVOS PARTICULARES	22

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	23
IV. METODOLOGÍA	27
1. Cultivo de <i>Trichomonas vaginalis</i>	27
2. Cultivo de células DU-145 y HeLa	27
3. Lisados de parásitos	28
4. Ensayo de Ligandos	28
5. Electroforesis en doble dimensión (2D)	29
5.1 Hidratar la tira de IPG	29
5.2 Condición de Isoelectroenfoque	30
5.3 Reacción de Equilibrio de IPG	30
6. Análisis de los geles 2-D	30
7. Ensayo de Citotoxicidad	31
8. Ensayo de Adhesión	32
9. Extracción de RNA total mediante la técnica de Trizol	33
10. Síntesis de cDNA	33
11. Amplificación por PCR de <i>tvcp65</i> y <i>tvcp39</i> de <i>Trichomonas vaginalis</i>	33
12. qPCR cuantitativo por Tiempo Real	36
V. RESULTADOS	38
5.1 Análisis de extractos de proteínas totales en presencia de Zn ²⁺	38
5.2 Adhesión de <i>T. vaginalis</i> y las células DU-145	59
5.3 Citotoxicidad de <i>T. vaginalis</i> en las células DU-145	60
5.4 Actividad proteolíticas de distintas CPs que interaccionan con DU-145	68
5.5 Niveles del transcrito de <i>tvcp65</i> y <i>tvcp39</i>	69
5.6 Expresión del gen <i>tvcp65</i> y <i>tvcp39</i> en presencia y ausencia de Zn ²⁺	69

VI. DISCUSIÓN	83
VII. RESUMEN DE RESULTADOS	88
VIII. CONCLUSION	88
IX. PERSPECTIVAS	88
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA	89
XI. APÉNDICE	97

ÍNDICE DE FIGURAS y TABLAS

Figura 1: <i>Trichomonas vaginalis</i> de su forma ovoide a ameboide	6
Figura 2: Ciclo de vida de <i>Trichomonas vaginalis</i> .	9
Figura 3: Microscopía electrónica de células espermáticas de bovino (S) en contacto con <i>T. foetus</i> (T).	18
Figura 4: Curva de crecimiento de <i>Trichomonas vaginalis</i> a distintas concentraciones de Zn^{2+}	40-41
Figura 5: Expresión de proteínas totales a distintas concentraciones de Zn^{2+}	42-43
Figura 6: Gel 2D SDS-PAGE al 12% de proteínas totales de <i>T.vaginalis</i> cultivadas a distintas concentraciones de Zn^{2+} .	46-47
Figura 7: Análisis por PDQuest	48-50
Figura 8: Diagramas de Venn	52-53
Figura 9: Análisis del patrón electroforético en 2D varias regiones de P M	54-55
Figura 10: Análisis del patrón electroforético en 2D región 100 a 50kDa	56-57
Figura 11: Gráficas de dispersión de los geles 2D.	62-63
Figura 12: Adhesión de <i>T. vaginalis</i> a las células DU-145.	64-65
Figura 13: Cinética de citotoxicidad de <i>T.vaginalis</i> hacia las células DU-145.	66-67
Figura 14: Actividad proteolítica de las cisteín proteinasas de <i>T. vaginalis</i> en presencia de Zn^{2+} a diferentes temperaturas	71-75
Figura15: Expresión del gen <i>tvcp65</i> en ausencia y presencia de las distintas concentraciones Zn^{2+}	76-77
Figura 16: Cuantificación de la expresión de <i>tvcp65</i> en ausencia y presencia de distintas concentraciones de Zn^{2+} .	78-79
Figura 17: Expresión del gen <i>tvcp39</i> en ausencia y presencia de distintas concentraciones de Zn^{2+}	80-81
Tabla 1: Diferencia en por ciento del número de manchas que se expresan en las distintas concentraciones de Zn^{2+} .	45

Tabla 2: Análisis comparativo del número de manchas de *T. vaginalis* presentes en las diferentes concentraciones de Zn^{2+} . 51

LISTA DE ABREVIATURAS

➤ DNA	Ácido desoxirribonucleico
➤ DNAg	DNA genómico
➤ RNA	Ácido ribonucleicos
➤ cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
➤ cbp	Cantidad bastante para
➤ CPs	Cisteín proteinasas
➤ DMSO	Dimetil sulfóxido
➤ dNTPs	Deoxinucléotido tri-fosfatados
➤ DTT	Ditiotreitol
➤ EDTA	Ácido etilén diaiminotetra-acético
➤ g	Gramos
➤ GTP	Guanosin trifosfato
➤ HCl	Ácido clorhídrico
➤ h	Horas
➤ kDa	Kilodaltones
➤ Mg ²⁺	Magnesio
➤ Mb	Mega bases
➤ mM	Milimoles
➤ min	Minutos
➤ µg	Microgramos
➤ µm	Micrometros
➤ µL	Microlitros
➤ ml	Mililitros
➤ ng	Nanogramos
➤ nm	Nanómetros
➤ ODC	Ornitina descarboxilasa
➤ O.N.	Toda la noche
➤ OMS	Organización Mundial de la Salud
➤ PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
➤ pb	Pares de bases
➤ PBS	Fosfato amortiguador salino
➤ PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
➤ PFOR	Piruvato ferredoxina óxidoreductasa
➤ pH	Potencial de hidrógeno
➤ Pmol	Picomoles
➤ PSA	Persulfato de amonio
➤ rpm	revoluciones por minuto
➤ RT-PCR	reacción en cadena de la poimerasa utilizando retrotranscriptasa
➤ SC	Suero de caballo
➤ s	Segundos

➤ SDS	Dodecil sulfato de sodio
➤ T.A	Temperatura ambiente
➤ TCA	Ácido tri cloro acético
➤ TEMED	N, N, N', N'', tetrametilen-diamina
➤ TYM	Medio de cultivo (tripticaseina-extracto de levadura -maltosa)
➤ V	Volts
➤ VECs	Células del Epitelio Vaginal
➤ Zn ²⁺	Catión de zinc
➤ ZnCl ₂	Cloruro de Zinc

RESUMEN.

Trichomonas vaginalis es el agente causal de la tricomonosis. Este parásito infecta principalmente a la mujer mientras que el hombre es considerado como portador asintomático. El Fe^{2+} presente en el microambiente de la vagina regula factores y propiedades de virulencia de este parásito. Sin embargo, se desconoce qué ocurre cuando el parásito entra en contacto con el microambiente de la próstata, donde se expone a Zn^{2+} , descrito como tricomonocida. El objetivo de este trabajo fue el estudio del efecto del Zn^{2+} sobre la adhesión, citotoxicidad del parásito hacia las células prostáticas, así como su efecto sobre la actividad proteolítica y el transcrito del gen *tvcp65* y *tvcp39*. Para ello los parásitos fueron crecidos a diferentes concentraciones de Zn^{2+} (0.25, 1.0 y 1.6 mM) se incubaron con monocapas confluentes de células DU-145 y HeLa (4×10^4 células/pozo) para determinar el porcentaje de citotoxicidad mediante espectrofotometría, y la adhesión mediante el marcaje radiactivo. Adicionalmente, se realizaron ensayos de ligandos, los lisados de estos parásitos interaccionaron con células DU-145 fijadas, para determinar la actividad proteolítica a diferentes temperaturas (4, 25, 37 y 43.5°C) mediante geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina. Por RT-PCR y qRT-PCR se determinó la expresión del gen *tvcp65* y *tvcp39* en parásitos crecidos en presencia y ausencia de Zn^{2+} .

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) representan uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, a pesar de los avances médicos logrados en las últimas décadas. Actualmente, se reconocen más de 30 infecciones bacterianas, virales y parasitarias que puedan transmitirse por vía sexual (www.saludpublica.com.2005). Una de las ITS que se presentan con mayor frecuencia, en el mundo principalmente en las mujeres, es la tricomonosis la infección de transmisión sexual no viral más común causado por el parásito *Trichomonas vaginalis*. Existen alrededor de 250 millones de personas en el mundo afectadas por este parásito (Gerbase y col., 1998 OMS, 2005). En México esta infección se encuentra distribuida principalmente en la zona centro y sur del país. Veracruz y Estado de México registran el mayor número de casos con un porcentaje de 15.1% y 7.8%, en Puebla se presenta un 7.4%, a diferencia de la zona norte, como en Baja California Sur que presenta sólo un 0.2% (Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica, SSA., 2006).

1.2 Tricomonosis en la Mujer.

En el caso de la mujer el periodo de incubación de *T.vaginalis* en la mujer es de 5 a 30 días; la infección puede ser asintomática, aguda o crónica. De un 25 a un 50% de mujeres infectadas por este parásito son asintomáticas, presentan un pH normal de (3.8 a 4.2) y flora normal en la vagina (Spiegel y col., 1990).

Los síntomas en las mujeres puede aparecer de 4 a 28 días después de la relación sexual con una persona infectada. La sintomatología de la tricomonosis es muy variada,

puede ir desde portador asintomático y de acuerdo a la severidad de la infección se puede clasificar como: aguda, crónica y asintomática.

En las mujeres hay descargas líquidas y espesas, amarillo-verdosas y con olor desagradable. El orificio uretral, las glándulas vestibulares y el clítoris se observan intensamente inflamados y puede tener comezón, ardor y dolor vaginal, así como irritación o enrojecimiento vaginal y dolor durante las relaciones sexuales (Petrin y col., 1998).

Durante la infección aguda, el cambio al estado crónico, se produce una atenuación de los síntomas, las secreciones pierden su aspecto purulento debido a la disminución del número de parásitos y leucocitos, al aumento de las células epiteliales y al establecimiento de una flora bacteriana mixta. Cabe mencionar que se requiere un gran número de parásitos para causar síntomas. En el caso de presentarse un pequeño número de parásitos en un paciente con un pH vaginal normal y una flora vaginal normal, puede ser interpretado como un estado de portador de la misma (Shawebke y Burgess, 2004)

Este protozoario afecta más a las mujeres debido a cambios hormonales y a que durante la menstruación el parásito aprovecha el hierro existente en el flujo sanguíneo que le permite aumentar su capacidad de adherencia a tejidos. En los períodos en que no hay menstruación las concentraciones de hierro son reducidas, lo que provoca que *T.vaginalis* tenga movilidad, obligando a este parásito a adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes de la vagina para permanecer en ella (Krieger y col., 1982a; 1982b)

Aunque las secuelas de esta enfermedad no se conocen con exactitud los datos epidemiológicos muestran que las mujeres con tricomonosis pueden tener consecuencias graves como son: mayor susceptibilidad al cáncer cérvico-uterino (Laga y col., 1993),

(debido a que el parásito desencadena cambios en el epitelio del cérvix, un tipo de displasia y lesiones premalignas que pueden conducir a un cáncer *in situ*), enfermedad inflamatoria pélvica atípica (Schwebke, 2004), esterilidad (Schwebke, 2008; Benchimol y col., 2008), se le ha asociado con un incremento en la transmisión del virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH) debido a que durante el tratamiento para *T.vaginalis* en mujeres infectadas disminuyen el RNA del virus (McLellan y col.1982; Zhang y col., 1996,1995). En mujeres embarazadas provoca un mayor riesgo a la ruptura prematura de las membranas de la placenta, neonatos con bajo peso al nacer (Kigozi y col., 2003), además de infecciones posquirúrgicas del tracto reproductor. (Gilbert y col., 2000).

1.3 Tricomosis en el hombre

Aunque *T. vaginalis* afecta principalmente a la mujer, también ocurre la infección en el hombre. La mayoría de las veces en el hombre es asintomática por lo que son considerados como portadores de la enfermedad.

En el hombre la tricomonosis urogenital puede ser clasificada en tres grupos: a) El de estado de portador asintomático, identificado solo por la pareja infectada con la que tuvo contacto sexual. b) Tricomosis aguda caracterizada por uretritis profusa purulenta y infección sintomática ligera, la cual no es distinguible de la uretritis gonococca. c) Tricomosis sintomática caracterizada por las complicaciones comunes como disuria, descargas mucopurulentas, prurito y sensación de ardor inmediatamente después del contacto sexual (Krieger, 1990).

Las complicaciones en el hombre asociadas con la tricomonosis incluyen uretritis nongonococcal, prostatitis, balanopostitis, epididimitis, enfermedad uretral e infertilidad (Holmes y col., 1975; Mardh y col., 1975; Tuttle y col., 1977; Krieger y col., 1990).

Clínicamente, la severidad de la enfermedad depende del área anatómica afectada por el parásito, generalmente los síntomas son leves, pero pueden desarrollarse severos cuando el parásito invade la próstata, vesículas seminales, epididimitis y tracto urogenital superior.

El saco prepucial es un área que ofrece una superficie húmeda, donde el smegma, orina y retención de la secreción constituye un medio ideal para el crecimiento de este parásito. La higiene y la circuncisión son excelentes medidas preventivas (Schapira, 1965).

El síntoma más frecuente de la tricomonosis masculina es la uretritis. En el pasado muchos casos de uretritis por *T. vaginalis* se diagnosticaban como uretritis no específica. Después se distinguió una infección anterior y posterior en la uretra, encontrándose que el 16% de los hombres sufrían de uretritis no gonocócica debida a *T. vaginalis* (Liston y Lees, 1940).

La infección de la próstata, vesículas seminales, vejiga y tracto urinario superior son raros, pero cuando los síntomas son severos (Schapira, 1965).

El efecto de las infecciones del tracto genital sobre la viabilidad y motilidad de los espermatozoides ha sido estudiado y se ha encontrado que los espermatozoides humanos son sensibles a una gran variedad de microorganismos. Experimentos realizados con *T.*

vaginalis en contacto con semen humano fresco, demostraron una disminución en la motilidad de los espermatozoides (Tuttle y col., 1977).

Mediante técnicas histopatológicas se localizó a *T. vaginalis* dentro de la glándula prostática en cinco casos con inflamación aguda y crónica no específica (Gardner y col., 1986). La prostatitis crónica es un problema urológico común causando morbilidad en los pacientes y costos importante en los sistemas de salud (Skerk y col., 2002). La información o prevalencia de la tricomonosis en el hombre es más limitada y se complica por 3 factores: (1) La gran proporción de infecciones asintomáticas, (2) la infección es limitada por si misma y (3) la carencia de métodos diagnósticos específicos y sensibles en el hombre (Krieger, 2000).

Las concentraciones de sales de Zn^{2+} presentes en el fluido prostático normal (4.5 a 7 mM) son tricomonocidas *in vitro* lo que podría limitar o resolver la infección por tricomonas en muchos hombres. En cambio, las concentraciones de Zn^{2+} similares a las encontradas en hombres con prostatitis crónica (<1.6 mM) no son tricomonocidas (Krieger y col., 1982). Por lo tanto, se considera que el contenido de Zn^{2+} puede ser un factor limitante contra las infecciones del tracto urinario en el hombre (Krieger y col., 1982).

La tricomonosis es una fuente de morbilidad para la mujer y también con consecuencias importantes en la salud del hombre. Entre los hombres, la tricomonosis representa una importante consideración en el diagnóstico diferencial de uretritis y prostatitis (Soper, 2004). Sin embargo, se carece de estudios básicos sobre el tipo de interacción de este parásito con las células del tracto urogenital masculino.

1.4 *Trichomonas vaginalis*.

T. vaginalis es un protozoo de forma ovoide o piriforme que mide de 10 a 20 μm de largo por 7 μm de diámetro. El trofozoito se caracteriza por presentar cuatro flagelos dispuestos de dos en dos en la parte anterior y un flagelo recurrente que forma la membrana ondulante y un axostilo (Arroyo y col., 1993). El flagelo libre y la membrana ondulante le confieren al parásito la motilidad espasmódica característica de *T. vaginalis*.

La célula presenta un núcleo grande, ovalado, excéntrico y localizado en el extremo anterior. Un citoplasma rico en carbohidratos, con gran número de vacuolas (incluyendo liposomas) (Shawebke y Burgess., 2004).

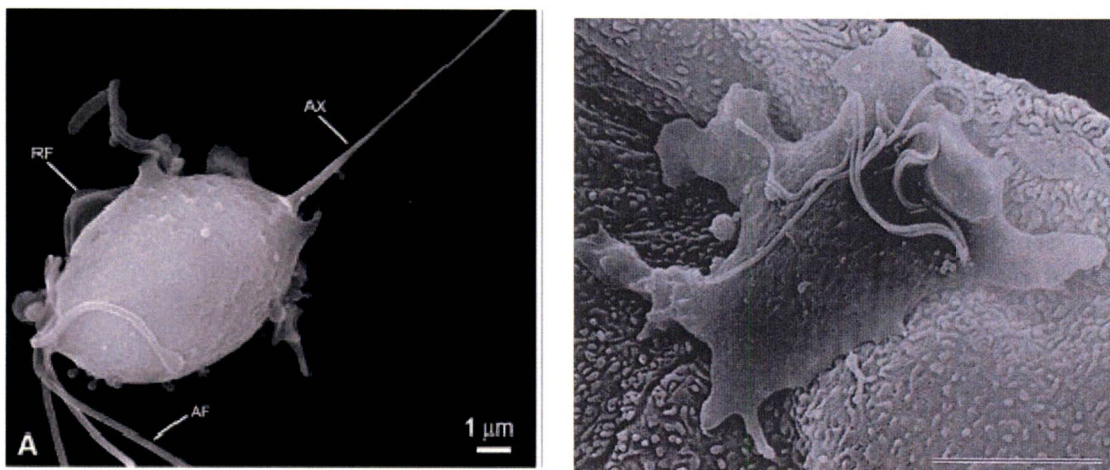


Figura 1 .Microscopía de barrido de *Trichomonas vaginalis* de su forma ovoide a ameboides

T. vaginalis no posee mitocondrias, pero posee hidrogenosomas que son organelos sin ácido desoxirribonucleico (ADN) formados por 3 gránulos cromáticos (Shawebke y Burgess., 2004). Se ha sugerido que el hidrogenosoma es una modificación de la mitocondria y que la mitocondria y el hidrogenosoma provienen de un organelo común. Este protozoo es anaerobio microaerotolerante, presenta un sistema enzimático de piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFO), reemplazando la piruvato deshidrogenasa de

organismos aerobios. Esta vía metabólica activa drogas como los 5-nitroimidazoles y ha sido encontrada en bacterias anaerobias susceptibles al Metronidazol, pero no en otros eucariontes, por lo que es considerado a *T.vaginalis* como un eucarionte primitivo (Carlton y col., 2007). Los requerimientos energéticos de este parásito se encuentra dados por la glucosa que es transformada a glicerol y a succinato en el citoplasma, seguido por la conversión de piruvato y malato a hidrógeno y acetato, en los hidrogenosomas (Carlton y col., 2007; Tay, 1995).

T. vaginalis no puede vivir naturalmente sin estrecha asociación con el tejido vaginal, pocos días después de la llegada a la vagina, los parásitos proliferan y provocan degeneración y descamación del epitelio vaginal, con infiltración leucocitaria y aumento de las secreciones vaginales (Llop y col., 2001).

En los casos típicos de tricomonosis el pH normal de la vagina (3.8-4.4) se hace más alcalino, disminuyen los depósitos de glucógeno de la mucosa, especialmente en las capas superficiales. Los procesos fisiológicos de destrucción celular aportan el glucógeno necesario para el crecimiento del bacilo de Döderlein que se encarga de metabolizar el mismo y excretar ácido láctico, proceso mediante el cuál se mantiene el medio ácido normal de la vagina. En ausencia de los depósitos normales de glucógeno la cantidad de este microorganismo disminuye y en casos severos pueden ser eliminados alterándose la protección fisiológica que ofrece la acidez vaginal estimulando el crecimiento de *T. vaginalis* y otros microorganismos (Wolfgang y col., 1983).

El parásito adopta una forma ovoide cuando se encuentra en suspensión y una ameboide cuando se adhiere a sustratos, presentando formas y tamaños variables

(Honigberg., 1990; Arroyo y col., 1993; Rasmussen y col., 1986).

En su interacción con las células del epitelio vaginal *in vitro* las transformaciones ameboides forman filipodias y pseudópodos los cuales interdigitan en distintos sitios sobre la membrana plasmática de la célula blanco. Esta transformación no ocurre cuando *T.vaginalis* interactúa con células cervicales (HeLa) (Arroyo y col., 1993).

El parasitismo inicial de las células del epitelio vaginal de un solo organismo es seguido por el establecimiento de una monocapa de tricomonas sobre la célula huésped. Los parásitos adheridos a las células del epitelio vaginal (VECs) o células HeLa inducen la síntesis de grandes cantidades de adhesinas y la síntesis de estas adhesinas están reguladas positivamente por Fe^{+2} este catión también regula la tasa de crecimiento y su multiplicación (Lenker y col., 1991; Arroyo y col., 1993).

1.5 Ciclo de vida.

El ciclo de vida de *T. vaginalis*, es directo, el parásito se transmite de persona a persona por contacto sexual (Fig 2), en forma de trofozoito uninucleado y se establece en la mucosa vaginal, uretral y prostática. Este protozoario se multiplica por fisión binaria que empieza con la división nuclear, seguida de la división del blefaroplasto y el resto de los organelos (Fig 2). Finalmente, se originan dos células hijas (Gomez-Conde y col., 2000). No se conoce un estado de quiste; aunque la formación de un pseudoquiste se ha descrito en células que han experimentado estrés ambiental (Ribeiro y col., 2002).

La mitosis en *T. vaginalis* experimenta diferentes grados de condensación de los cromosomas alcanzando su máximo grado de condensación en metafase para

descondensarse en anafase (Brugerolle, 1975; Petrin y col., 1998; Gómez-Conde y col., 2000).

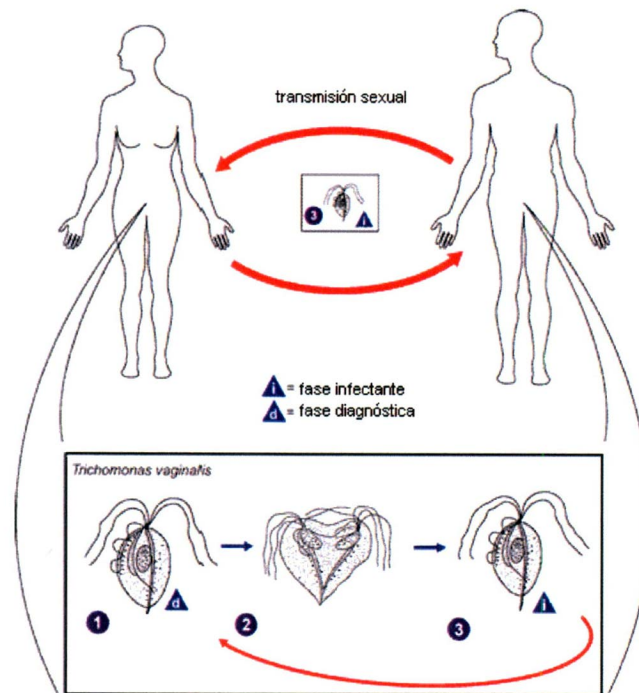


Figura 2. Ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis*. Tomado de la base de datos: Introduction "The *Trichomonas vaginalis* Genoma Database" www.tigr.or/tdb/e2k1/tvg/intro.shtml.

1.6 Metabolismos de *T. vaginalis*

Este parásito carece de muchas vías metabólicas, se alimenta de componentes solubles, células del huésped, bacterias y eritrocitos (fagocitosis) para obtener hierro (Honigberg, 1990). Este organismo tiene una alta dependencia al hierro de hasta 250 μM (Gorrell, 1985). Además, los parásitos son altamente sensibles a los cambios del microambiente, como temperatura, pH, osmolaridad y potencial redox, por lo que difícilmente sobreviven en el exterior del cuerpo humano y la infección por medio de toallas contaminadas, en albercas o retretes contaminados es casi imposible (Honigberg, 1990).

El contacto del parásito a la célula hospedera es un prerrequisito para el establecimiento de la infección, por lo tanto el organismo vence la constante secreción de la vagina (Alderete y col., 1995). Residuos de azúcares presente en el parásito, en particular alfa-D-manosa y N-acetilglucosamina se encuentran involucradas en la trasducción de señales de *T. vaginalis* a la célula epitelial del hospedero por lo que remover estos azúcares de la superficie de la célula previene la interacción ligando- receptor y con ello el daño de las células epiteliales (Mihaghani y Warton, 1998).

1.7 Citopatogenicidad de *T. vaginalis*

El primer evento que ocurre para la patogenicidad es la adhesión del parásito a la célula blanco seguida de la colonización de los tejidos. Posteriormente, se observa efectos progresivos de daño. Cuando el parásito hace contacto con la célula blanco se desencadena la trasducción de señales transmembranales que modifican la forma ovoide del parásito a su forma ameboide, con la formación de filopodios y pseudópodos. Esta transformación morfológica es específica hacia células de origen cervical. La adhesión es importante en la patogénesis del parásito y está mediada por las adhesinas localizadas en la superficie del parásito. La citotoxicidad que ocasiona daño a las células del hospedero a través de cisteín proteinasas (Arroyo y col., 1993; Lehker y col., 1991; Moreno-Brito y col., 2005; Alderete y col., 1984; Arroyo y Alderete, 1989; Garber y Lemchuk-Favel, 1989; Alvarez-Sánchez y col., 2000; 2006; Hernández-Gutiérrez y col., 2003; 2004) así como la evasión de la respuesta inmune (Alderete y col., 1991; 1992) por degradación de inmunoglobulinas de tipo IgG, IgM e IgA (Provenzano y Alderete, 1995).

1.8 ADHESIÓN

T. vaginalis presenta una forma globular típica y se transforman en células amiboideas al interactuar con las células epiteliales vaginales, maximizando el área de adhesión a la superficie de las VECs; no encontrándose esta transformación para *T. vaginalis* que interactúa con células HeLa (Arroyo y col., 1993).

Existen evidencias recientes de que la capa de microfibrillas del ectoplasma en la zona de adhesión de la forma amiboidea del parásito está compuesta fundamentalmente por microfilamentos de actina. Además se ha revelado en la región de contacto con superficie de VECs la presencia de interdigitaciones y un espacio intercelular de 2-10 nm (Arroyo y col., 1993). La función de estos microfilamentos puede ser importante en la adherencia inicial del parásito y en los eventos citolíticos posteriores (Arroyo y col., 1993).

En la adhesión de tricomonas a las células de VECs participan las proteínas de superficie (adhesinas) AP65, AP51, AP33, AP23 y AP120 (Arroyo y col., 1992; Moreno-Brito y col., 2005). Estas adhesinas presentan homología a enzimas metabólicas (Alderete y col., 1995; 1998 ó Brien y col., 1996; Engbring y Alderete, 1998) y se sobreexpresan al contacto del parásito con las células VECs (Kucknoor y col., 2005). El hierro regula la síntesis de las adhesinas a nivel postranscripcional, también favorece el crecimiento y la multiplicación de los parásitos en cultivo; esta regulación es positiva (Lehker y Alderete, 1992; Lehker y col., 1991) y recientemente ha sido demostrado el papel del hierro en la regulación de algunas propiedades de virulencia de las tricomonas. En altas concentraciones de hierro, las tricomonas se adhieren mejor a las células del epitelio vaginal al sintetizar un mayor número de adhesinas (Lehker y col., 1991).

El análisis proteómico de parásitos crecidos en presencia y ausencia de hierro por electroforesis en 2D ha demostrado que tiene un patrón amplio y diferencial de 45 proteínas cuando el parásito es cultivado en ausencia de hierro así como un cambio morfológico del parásito a una forma esférica. (De Jesús y col., 2007).

Recientemente se ha demostrado el papel de la cisteín proteinasa de 30 kDa (CP30) como la proteinasa necesaria para que se lleve a cabo la adhesión del parásito a su célula blanco en la vagina y ectocérvix. La CP30 se encuentra localizada en la superficie del parásito, es capaz de reconocer y unirse a la superficie de las células epiteliales de la vagina y del cérvix, degrada diferentes proteínas presentes en el microambiente vaginal, (fibronectina, colágeno IV y hemoglobina). Además, la CP30 es inmunogénica en pacientes con tricomonosis y se le encuentra en las secreciones vaginales. De manera interesante, la CP30 se regula negativamente por altas concentraciones de hierro, mientras que las adhesinas se regulan positivamente por las mismas concentraciones de hierro (Mendoza-López y col., 2000, Arroyo y col., 1992).

La nueva adhesina de *T. vaginalis* AP120 es una proteína de 120 kDa inducible por altas concentraciones de hierro. Esta proteína comparte algunas de las propiedades de las adhesinas (AP65, AP51, AP33 y AP23) previamente descritas y caracterizadas (Moreno y col., 2005; Arroyo y col., 1992; Lecker y col 1991).

1.9 CITOTOXICIDAD

El proceso de daño de *T.vaginalis* se ha examinado sobre diferentes tipos celulares; con base a estos estudios se han propuesto 3 mecanismos para explicar la destrucción de las células epiteliales por *T.vaginalis*, a) dependiente de contacto, b) mixto (contacto-

dependiente) c) independiente de contacto participan factores solubles como toxinas, porinas y proteinasas. Este parásito tiene muchas proteinasas, más no todas son cisteín proteinasas (CPs). Las 23 cisteín proteinasas descritas a la fecha fueron identificadas por geles de sustrato de dos dimensiones (2D). Las proteinasas están involucradas en la adhesión, citotoxicidad, hemólisis, apoptosis y evasión de la respuesta inmune. La síntesis y actividad de las proteinasas de *T. vaginalis* pueden ser controladas por factores ambientales como el hierro, pH y capacidad de óxido-reducción.

La CP65 participa en la citotoxicidad y se localiza en la superficie del parásito, degrada colágena IV y fibronectina, pero no laminina o hemoglobina, es inmunogénica en pacientes con tricomonosis y se ha demostrado mediante ensayos de citotoxicidad que es capaz de unirse a la superficie del epitelio cervical. (Álvarez-Sánchez y col., 2000).

La CP39, se ha encontrado en secreciones vaginales de pacientes infectadas con tricomonosis, siendo una molécula involucrada en la citotoxicidad a células VECs y HeLa. Dicha proteasa es capaz de degradar diversos sustratos como colágeno I, III, IV y V, fibronectina y hemoglobina humana e inmonoglobulinas A y G. Mediante inmunofluorescencia se le ha detectado en la superficie del parásito (Hernández-Gutiérrez y col., 2004). Todos estos estudios se han caracterizado en la interacción de este parásito con las células del epitelio de la mucosa vaginal y de monocapas de células HeLa (Alderete y Garza., 1985; Arroyo y Alderete 1989; Arroyo y col., 1992). Estos datos ayudan a entender en parte la patogenia de la tricomonosis en la mujer, pero no se conoce nada de lo que sucede en la tricomonosis en el hombre.

1.10 Evasión de la respuesta inmune

La relación parásito-huésped es compleja en la tricomonosis, como se evidencia por los mecanismos que *T. vaginalis* utiliza para sobreponerse a las barreras naturales de defensa del huésped. La respuesta inmune del huésped es neutralizada por numerosas enzimas proteolíticas y por la variación fenotípica que poseen las tricomonas infectadas por el virus de RNA de doble cadena (dsRNA)(TVV) (Alderete y col., 1986; Khoshnan y Alderete, 1994; Provenzano y Alderete, 1995). Este virus regula la expresión de la proteína de 270 kDa (p270) en la superficie del parásito, confiriéndole la capacidad de variación fenotípica (Musatovova y Alderete, 1999). A su vez, la expresión de p270 se regula negativamente por Fe^{2+} (Alderete, 1999). Otro evento de evasión de la respuesta inmune del huésped es la degradación de anticuerpos en secreciones vaginales de pacientes con tricomonosis (Alderete y col., 1991; Bozner y col., 1992). Estas CPs son capaces de degradar los anticuerpos locales generados por el huésped y evitar la protección a la infección (Provenzano y Alderete, 1995). Por otra parte, el mimetismo molecular es otra manera de evadir la respuesta inmune utilizando la homología que existe entre las adhesinas y algunas enzimas metabólicas del parásito que comparte con las enzimas del huésped (Alderete y col., 2001).

La otra forma en que *T. vaginalis* evade al sistema inmune del huésped es activando la vía alterna del complemento (Gillin y Sher, 1981) y aumentando su resistencia al mismo en altas concentraciones de hierro (Alderete y col., 1995). La regulación positiva de la expresión de algunas CPs que degradan inmunoglobulinas como IgG, IgM y la porción C3b de la vía del complemento sobre la superficie de los organismos, permite que

evada la destrucción mediada por el complemento (Alderete y col., 1995b).

1.11 Apoptosis

La muerte celular programada de la célula blanco es otro evento relacionado con la virulencia de *T. vaginalis*. La infección por *T. vaginalis* ocasiona un desprendimiento de células VECs seguido por su destrucción celular (Gilbert y col., 2000), la cual puede ser inducida por cisteínproteinasas (Sommer y col., 2005). *T. vaginalis* es capaz de inducir apoptosis en células RAW264-7 por la vía Bcl-x_L (Chang y col., 2004). Además alterar la expresión de Mcl-1 y la activación de la caspasa-3 induciendo apoptosis de los neutrófilos humanos (Kang y col., 2006).

1.12 Importancia del Zn²⁺ en el Hombre.

En el sexo masculino, el Zn²⁺ tiene acción sobre la diferenciación gonadal, el crecimiento testicular, el desarrollo de los túbulos seminíferos, la espermatogénesis, la esteroideogénesis testicular, el metabolismo de andrógenos y en su interacción con los receptores hormonales como las prolactina (Prasad y col., 1984; Walsh y col., 1994).

El hipogonadismo masculino se puede producir a través de dos mecanismos: 1) deterioro de la acción del factor inhibidor mulleriano necesario para la diferenciación testicular, efecto que el Zn²⁺ puede revertir. 2) reducción de la síntesis y actividad de la testosterona, acciones que son dependientes del Zn²⁺ (Favier y col., 1992). La deficiencia de Zn²⁺ interfiere con el desarrollo normal puberal en varones por supresión de la producción de andrógenos testiculares durante la pubertad (Castillo y col., 1999).

Estos efectos de la deficiencia de Zn²⁺ sobre el desarrollo sexual pueden ser o no secundarios, al retardo en el crecimiento. El incremento en los requerimientos energéticos

durante la pubertad puede poner en evidencia diferentes grados de deficiencia de Zn^{2+} , entre otros micronutrientes y desencadenar cambios negativos en el desarrollo puberal. Las alteraciones en la composición corporal también son un rasgo característico de la deficiencia de Zn^{2+} . La tendencia a tener depósito graso en lugar de muscular, se atribuye al mayor costo energético que se demanda y que no puede afrontarse durante la deficiencia de Zn^{2+} (Cavan y col., 1993). Ha sido descrito que los hombres son más sensibles que las mujeres a la deficiencia de Zn^{2+} , probablemente debido a los mayores requerimientos de este catión.

La deficiencia de Zn^{2+} moderada causa oligospermia e impotencia sexual, estas afecciones puede ser corregida en 30 semanas cuando tiene una dieta con solo 4 mg de zinc/día. (Sandstead y col., 1998).

El receptor nuclear para la testosterona, al igual que el de todas las hormonas esteroides, es una proteína de tipo dedos de zinc (*zinc-finger*) y por tanto el Zn^{2+} es esencial para su adecuado funcionamiento (Sandstead y col., 1998). La deficiencia de la enzima 5α -reductasa, que cataliza la conversión de testosterona en su metabolito activo dihidrotestosterona (DHT) es responsable de la ausencia de genitales masculinos externos, debido a que DHT es indispensable para la virilización. Los bajos niveles de Zn^{2+} séricos se han relacionado con bajas concentraciones de dihidrotestosterona (DHT) en hombres infértiles. La suplementación con Zn^{2+} logra incrementar los niveles de testosterona y DHT así como el recuento de espermatozoides; logrando de esta manera la recuperación de la fertilidad (Favier y col., 1992b)

Esta deficiencia de Zn^{2+} puede estar ubicada inicialmente en el eje hipotálamo-hipofisario. Se ha propuesto que la inanición y el retardo en el crecimiento generados por la

deficiencia de Zn^{2+} conllevan a la disminución en la liberación de gonadotrofinas y el arresto del desarrollo sexual. Otros estudios donde centran su atención en la actividad de las células de Leydig las cuales se localizan en el testículo y es lugar principal de síntesis de la testosterona. La producción de andrógenos en respuesta a la estimulación testicular con hormona gonadotrofina coriónica humana (hHCG) la deficientes de Zn^{2+} en las células de Leydig donde se afectan los niveles de síntesis de testosterona (Castillo y col., 1999).

1.13 El Zn^{2+} como Inhibidor de cisteína proteinasas.

En estudios realizados con trofozoitos de *Entamoeba histolytica* y el efecto inhibitorio del $ZnCl_2$ sobre las cisteína proteinasas de este parásito se encontró que el $ZnCl_2$ bloquea el grupo tiol de las cisteína proteinasas, en una concentración de 1.0 – 2.5 mM y que este efecto inhibitorio es revertido por adición de L-cisteína o L-histidina. El efecto inhibitorio del Zn^{2+} hacia las CPs es revertido utilizando fenantrolina, el cual actúa como un quelante del Zn^{2+} . Mediante geles de sustrato copolimerizados con gelatina donde el $ZnCl_2$ inhibe la degradación de fibronectina y de las células de unión de la amiba. En esta investigación se observó que al añadir $ZnCl_2$ el cual inhibe cisteína proteinasas de la superficie de la célula a través de la destrucción de otros procesos internos (Franco y col., 1999).

1.14 *Tritrichomonas foetus* y su interacción con células espermáticas

Tritrichomonas foetus es un parásito del tracto urogenital de los bovinos. Este parásito causa infertilidad y abortos, el primer estudio realizado con este parásito, se observó por microscopía electrónica que *T. foetus* interacciona con espermatozoides obtenidos de bovinos no infectados a los 30 min, 3h y 12h **Fig. 3**

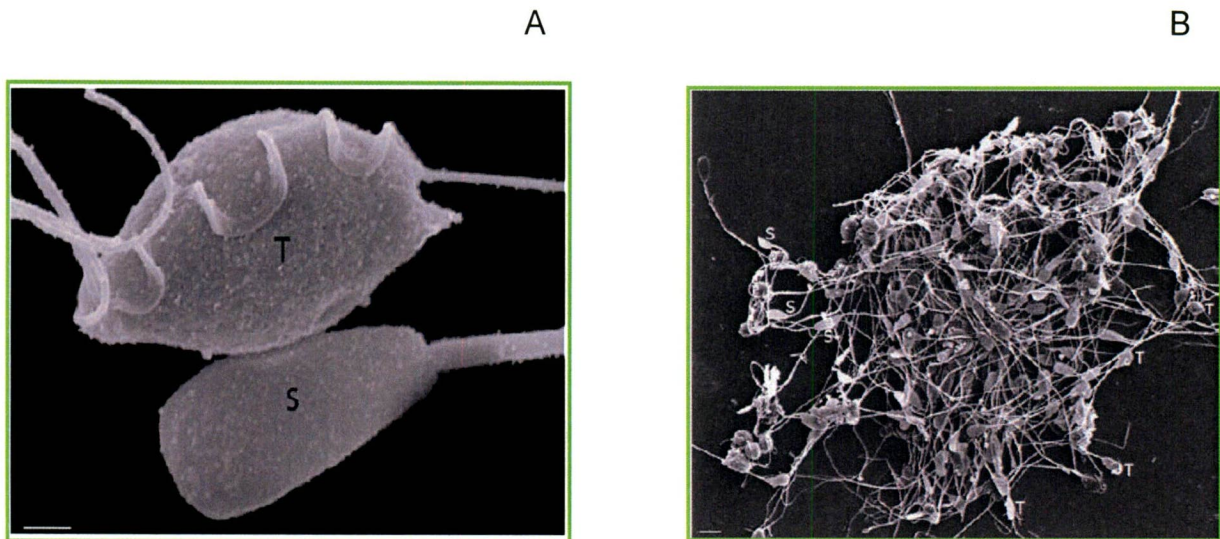


Fig. 3 Microscopía electrónica de células espermáticas de bovino (S) en contacto con *T. foetus* (T). En el panel A se muestra la interacción de *T. foetus* con las células espermáticas a los 30 min del contacto se adhieren por el cuerpo. En el panel B se observa que a los 30 min del contacto hay una aglutinación formando un agregado de *T. foetus* y células espermáticas.

Existe una disminución de la motilidad de los espermatozoides y en todos los tiempos se observó una aglutinación del semen. Con este resultados se concluyó que el parásito afecta la motilidad de las células (Benchimol y col., 2008).

1.15 El efecto de Zn^{2+} en *Trichomonas foetus*

Se conoce que los núcleos de los espermatozoides maduros contienen Zn^{2+} , en particular asociado con estructuras ricas de sulfuro que contribuyen a la estabilidad de su estructura cuaternaria de la cromatina. El Zn^{2+} se encuentra en las secreciones prostáticas y se involucra en la defensa antimicrobial del tracto urogenital masculino. Así mismo, en investigaciones previas se demostró su actividad tricomonocida, inhibiendo el crecimiento del parásito (Krieger y col., 1982 ; Benchimol y col., 1993).

Un análisis de microscopía electrónica de transmisión de tricomonas incubadas en presencia de Zn^{2+} mostró que el hidrogenosoma constituye el sitio de efecto del Zn^{2+} ; al igual que el Ca^{2+} , el Zn^{2+} está concentrado en las vesículas del hidrogenosoma el cual está formado por dos membranas envolventes. El hidrogenosoma como generador de energía es importante para la familia *Trichomonadidae* ya que son parásitos anaerobios, los cuales carecen de mitocondrias.

El hidrogenosoma presenta enzimas que participan en el metabolismo de piruvato formado en la glicólisis, en este punto se forma la molécula de hidrógeno. Las investigaciones previas siguieron que el Zn^{2+} es concentrado dentro del hidrogenosoma por un mecanismo similar al de adquisición de Ca^{2+} . De esta forma el Zn^{2+} tiene la capacidad de interaccionar con el grupo tiol de las cisteínas y estabiliza la estructura cuaternaria de las proteínas y por lo tanto podría interferir con la actividad del hidrogenosoma el cual es importante en el metabolismo de este parásito (Benchimol y col., 1993).

2. ESTADO DEL ARTE.

Las concentraciones de Zn^{2+} contenidas en el semen del hombre tienen capacidad tricomonocida contra *T. vaginalis*. En varones con niveles ($<0.8\text{mM}$) de Zn^{2+} , el parásito vive en estado latente convirtiéndose en portadores de la enfermedad. Esto ha sido demostrando por medio de estudios de cinética enzimática donde el efecto tricomonocida ocurre a una concentración de $ZnCl_2$ y $ZnSO_4$ de 1.6 mM menor a la concentración de Zn^{2+} en el fluido prostático (4.5 a 7 mM) (Krieger y Rein., 1982b). Con base a las investigaciones realizadas con secreciones prostáticas de perros y el efecto tricomonocida hacia *T. vaginalis* por el contenido de Zn^{2+} , se podría proponer que las secreciones prostáticas son un

importante agente de defensa no específico del tracto urinario en el hombre. Existen otros estudios que son realizados con la sensibilidad de *T. vaginalis* al Zn^{2+} en cultivos in vitro, en donde altas concentraciones de Zn^{2+} (2.3-15 mM) en la secreción prostática del hombre parece ser una importante defensa en el hombre a infecciones del tracto urogenital por *T. vaginalis*. La variación de la concentración de Zn^{2+} en el fluido prostático provoca en el hombre tricomonosis sintomática.

II. 1. JUSTIFICACIÓN

La tricomonosis es la enfermedad de transmisión sexual número uno a nivel mundial, hasta ahora es conocida la naturaleza de la infección en la mujer pero se desconoce que sucede, en el contacto inicial del parásito a las células prostáticas por ello es importante estudiar la naturaleza de la tricomonosis en el hombre y contribuir al entendimiento de cómo *T. vaginalis* se adapta al microambiente de la próstata.

Los antecedentes planteados anteriormente ayudan a entender la tricomonosis en el hombre; sin embargo, no se conoce lo que sucede al nivel proteómico por la presencia de Zn^{2+} y como el microambiente puede influir en las propiedades de virulencia de *T. vaginalis*. Para ello nosotros proponemos primeramente estudiar y caracterizar la interacción de *T. vaginalis* y las células prostáticas DU145 (línea celular de adenocarcinoma de próstata humano) (Stone y col., 1978). En el caso del hombre no se conoce si existe una adhesión del parásito a las células prostáticas y si las concentraciones de Zn^{2+} de las secreciones prostáticas del hombre pueden modular los niveles de adhesión a estas células. Otro de los eventos que no se conocen es si la expresión de ciertas proteínas pudieran estar reguladas por factores ambientales como el Zn^{2+} presentes en el medio ambiente de la próstata.

Considerando que el estudio del contacto inicial del parásito a las células prostáticas es básico para entender las bases moleculares de la citoadherencia y la patogénesis molecular en el hombre.

También se analizará el daño causado por *T. vaginalis* a las células prostáticas DU145. Aunque se sabe que este parásito tiene un efecto citotóxico sobre células HeLa, VECs, CHO, MDCK, etc., se desconoce si el parásito es capaz de dañar a las células prostáticas, por lo que consideramos importante caracterizar la citotoxicidad del parásito hacia las células DU145, establecer las condiciones óptimas en las cuales el parásito es capaz de causar daño, así como analizar los niveles de citotoxicidad y como puede ser afectados por la temperatura y como es modificada por la presencia de factores ambientales como el Zn^{2+} en el medio. De la misma forma resulta interesante el estudio de las moléculas involucradas en esta propiedad de virulencia como CP39 yCP65 a nivel de la expresión del gen y actividad proteolítica.

Con este estudio podremos aportar conocimientos y entender mejor la patogenicidad de la tricomonosis en el hombre por lo que se considera importante realizar este trabajo.



2. HIPÓTESIS

Las concentraciones variables de Zn^{2+} afectan los niveles de adhesión y citotoxicidad de *T. vaginalis* hacia las células prostáticas (DU-145) así como la expresión de las proteínas involucradas en la patogenicidad de este parásito.

3. OBJETIVOS GENERAL:

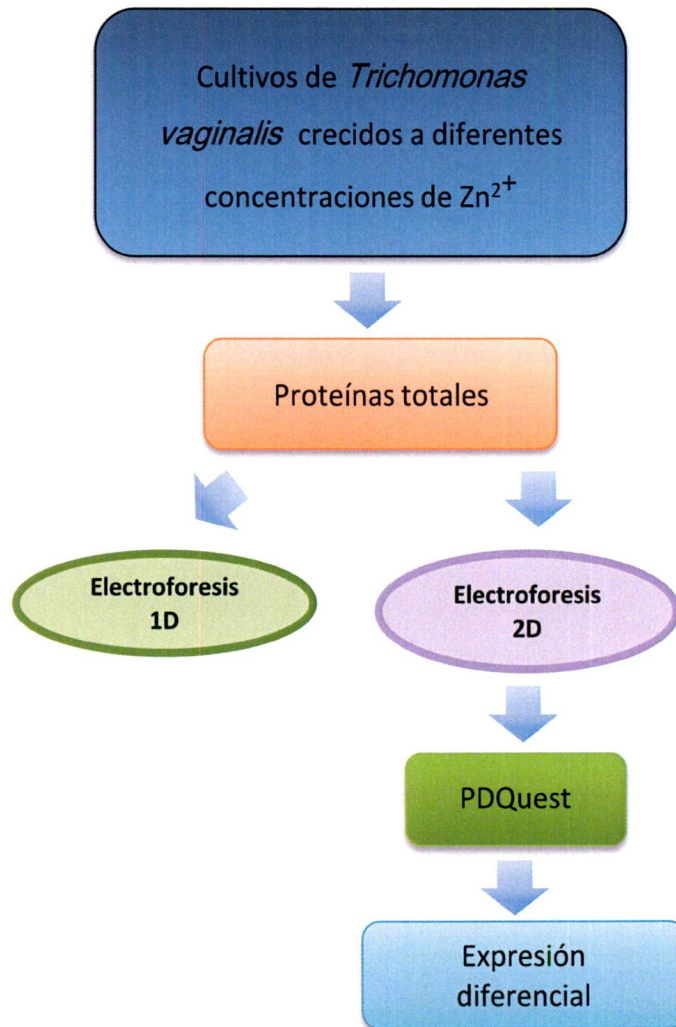
- Caracterizar la interacción de *Trichomonas vaginalis* con las células prostáticas DU-145 en presencia y ausencia de Zn^{2+} .

4. OBJETIVOS PARTICULARES

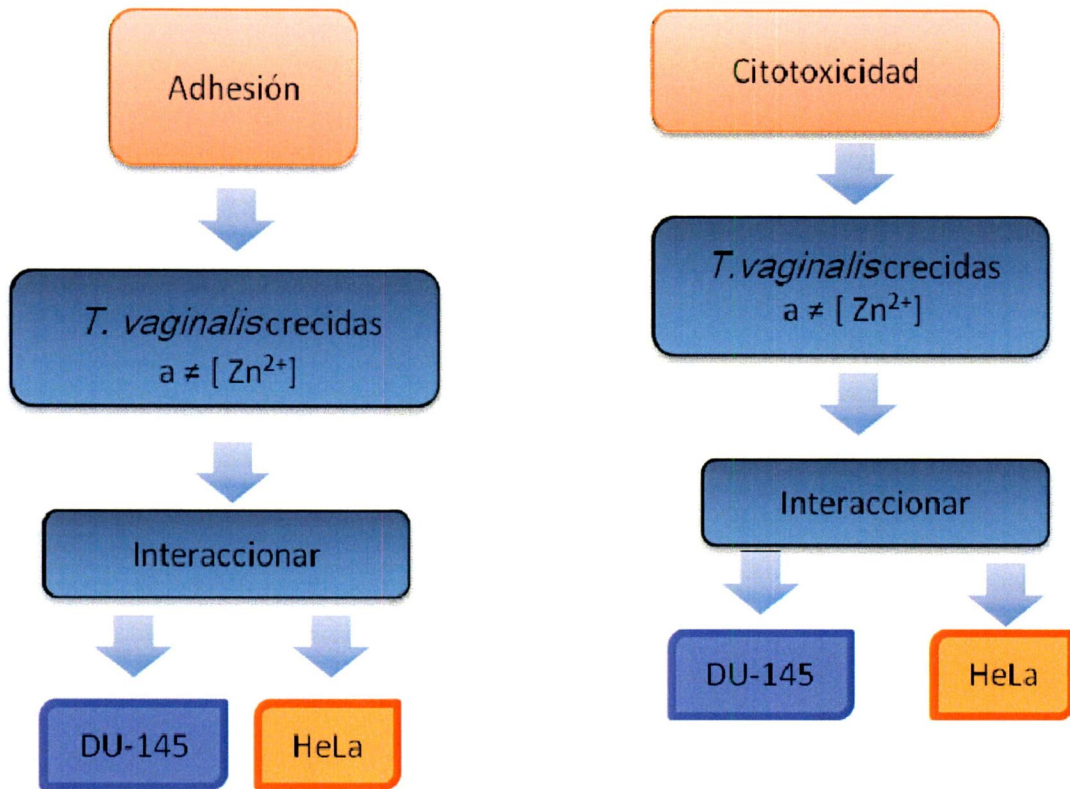
- Analizar el proteoma de *T. vaginalis* crecidas en presencia y ausencia de Zn^{2+}
- Determinar los niveles de adhesión de *T. vaginalis* a las células DU-145 en presencia y ausencia de Zn^{2+} .
- Determinar los niveles de citotoxicidad de *T. vaginalis* hacia las células DU-145 en presencia y ausencia de Zn^{2+} .
- Analizar las CPs involucradas en la interacción con las células DU-145.
- Cuantificar los niveles del transcrito *tvcp65* y *tvcp39* de *T. vaginalis* crecidas en ausencia de Zn^{2+} y presencia de Zn^{2+} .

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Análisis Comparativo



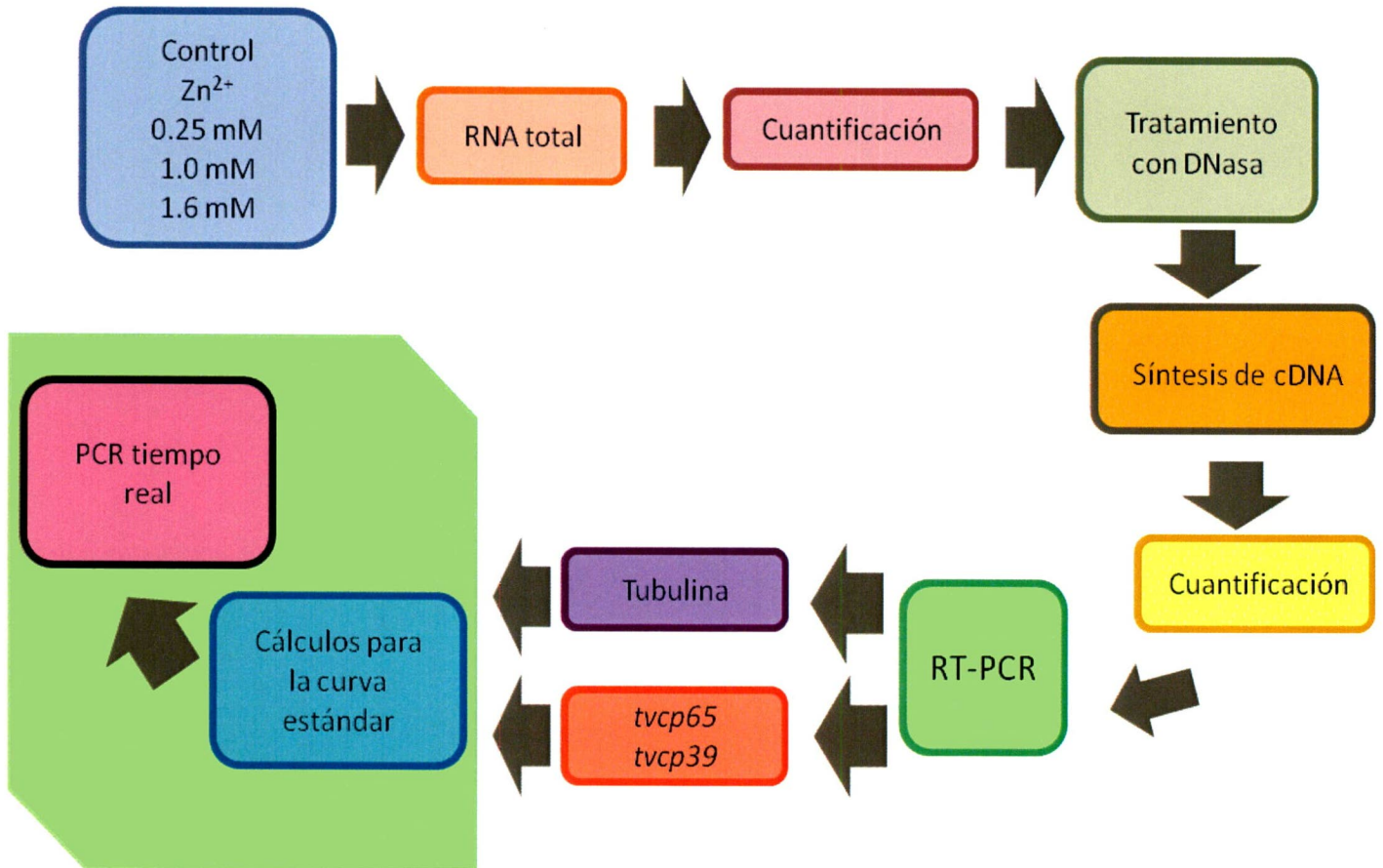
Análisis Funcional



Factores de virulencia



Expresión



IV. METODOLOGÍA

1. Cultivo de *Trichomonas vaginalis*.

El aislado de CNCD 147 de *T. vaginalis* se cultivó en medio TYM (tripticaseína y extracto de lavadura-maltosa) por 24 h a 37°C adicionado con 10% de suero de caballo (SC) inactivado por calor (30 min a 56 °C) para obtener parásitos en fase logarítmica tardía de crecimiento (Diamond, 1957). 8×10^6 *T. vaginalis* se cultivaron en 25 cm² con 30 ml de TYM-SC, por 24 h a 37°C. Para cultivo masivo se sembraron 35×10^6 tricomonas en botellas de cultivo de 75 cm² conteniendo 100 ml de TYM-SC.

2. Cultivo de células DU-145 y HeLa

Las células HeLa (ATCC) provienen de la línea celular del carcinoma de cérvix humano. Al igual que la línea celular de adenocarcinoma de próstata humana DU-145.

Las células HeLa se cultivaron en botellas desechables de 75 cm², se inocularon con 3×10^6 células en 10 ml de medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Life Technologies), con 10% de suero de caballo (SC) 41, 250 UI Penicilina y 40, 500 UI de estreptomicina, a 37°C y 5% de CO₂, para alcanzar el 80% de la monocapa en 48 horas.

Las células DU-145 se cultivaron en botellas desechable de 75 cm², se inocularon con 0.8×10^6 en 10ml de medio Dulbecco's, bajo en glucosa a pH 7.2, con 10% de suero fetal bovino (SFB), 41,250 UI de Penicilina y 40,500 UI de estreptomicina, a 37° C y 5% de CO₂, hasta que se alcanzó la monocapa a 80% de confluencia en (48 h).

Enseguida, a ambas líneas celulares se les realizó el pase de células, desechando el medio de cultivo, se agregaron 5 ml de amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.0 y ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 0.2% estéril, se incubaron a temperatura ambiente por 10

min. Las células se separaron con golpes suaves (canto de la mano), se disgregaron por lo menos 10 veces suavemente con la pipeta, se centrifugaron a $195 \times g$ por 5 min a 4°C , el sobrenadante se desechó, la pastilla se resuspendió en 5 ml de medio de cultivo nuevo y se utilizó para inocular nuevamente las botellas de cultivo desechables de 75 cm^2 .

3. Lisados de parásitos

20×10^6 parásitos se lavaron tres veces con PBS pH 7.0 y se centrifugaron a 1800 rpm/5min/ 4°C . Después se decantó el sobrenadante y al precipitado se le adicionaron 500 μl de PBS pH 8.0 y 50 μl DOC (deoxicolato de sodio) al 10%, se incubaron a $4^{\circ}\text{C}/20\text{min}$ posteriormente, se adicionaron 450 μl de PBS pH 8.0, posteriormente se adicionaron 100 μl de colchón de sacarosa (10% con PBS pH 8.0 con rojo fenol), en el fondo del tubo y el tubo fue centrifugado a 14000 rpm/30 min a 4°C . Los lisados se corrieron en un gel de poliacrilamida con sustrato de gelatina al 0.2% a 108 V/1h. El gel de sustrato se lavó con Tritón X-100 al 2.5% por 10 min y se activó con el amortiguador de acetatos 3M se incubó a $37^{\circ}\text{C}/18\text{h}$ y el gel se tiñó con azul de Coomassie por 10 min. La actividad proteolítica se observó como bandas claras contra un fondo oscuro.

4. Ensayo de Ligandos.

Este ensayo se usó para detectar proteínas con afinidad a la superficie de las células blanco y se llevó a cabo con extractos de 20×10^6 parásitos. Estos se lavaron 3 veces con PBS pH 7.0 se centrifugaron a 1800 rpm/ 4°C y posteriormente se decantó el sobrenadante. Al precipitado se le adicionaron 450 μl de PBS pH 8.0 y DOC al 10% se incubó a $4^{\circ}\text{C} / 20$ min y se le adicionó 450 μl de PBS pH 8.0. En el fondo se agregaron 100 μl de colchón de sacarosa al 10% y se centrifugó a 14000 rpm/30min/ 4°C .

El lisado se adiciono a células DU-145 previamente fijadas, en agitación lenta por 18h/4°C, después del tiempo de interacción los ligandos se centrifugaron a 14000 rpm/5min/4°C, las pastillas se lavaron 5 veces con PBS pH 8.0/DOC 1%, se eliminó la solución de lavado y se secó la pastilla a temperatura ambiente para adicionar 30 µl de amortiguador de muestra 1x en cada ligando, se incubaron a 20 min/37°C. Para eluir las proteinasas que se encuentran unidas en la superficie de las células después del tiempo de incubación se centrifugaron las muestras a 14000 rpm/5min/4°C, se realizó el análisis en un gel de poliacrilamida de sustrato con gelatina al 2%, corrido a 108 V/h. El gel de sustrato se lavó con Tritón X-100 al 2.5% por 10 min y se activó con el amortiguador de acetatos 3M pH 4.5 en incubación a 37°C/18 h. Se tiñó con azul de Coomasie por 10 min y la actividad proteolítica se observó como bandas claras contra un fondo oscuro.

5. Electroforesis en doble dimensión (2D)

5.1. Hidratar la tira de IPG

Para el análisis de extractos de proteínas totales de *T. vaginalis* crecidos en las distintas concentraciones de Zn²⁺ se emplearon geles de acrilamida SDS-PAGE al 12%. Se tomaron 120 x 10⁶ de parásitos los cuales se lavaron 3 veces con PBS pH 7.0, los parásitos se lisaron con 200 µl de amortiguador de hidratación (CHAPS 4% w/v, Urea 7M, DTT-70mM, azul de bromofenol al 1%) y se incubaron 5 min/TA, se centrifugaron a 14000 rpm/5min/4°C, se tomaron 125 µl de sobrenadante, a los que se adicionaron 1.5 µl de anfollinas de pH 3-10 y se procedió a hidratar pasivamente las tiras IPG (Bio-Rad), de 7cm (pI 4-7) de 10 a 16 h.

5.2. Condición de isoelectroenfoque.

Paso 1:	Paso2	Paso 3
250v [lineal]	4000v [lineal]	4000v [Rápido]
HRS:MIN	HRS:MIN	VHORS
ENTER TIME: 00:40	ENTER TIME 03:00	ENTER TIME: 10,000.

5.3. Equilibrio de IPG.

Al término del isoelectroenfoque a la tira de IPG se le agregó 5 ml del amortiguador de equilibrio el cual contenía 15 mg/ml de DTT para el primer lavado por 15 min, para el segundo lavado se adicionaron 5 ml de amortiguador de equilibrio el cual contenía 37.5 mg/ml de IAA (Iodoacetanude) por 15 min. El amortiguador de equilibrio contiene: Urea 6 M, Glicerol 30%v/v, Tris pH 8.8 50 mM, SDS 2% w/v. Una vez equilibrada la tira de IPG se colocara la tira en el gel SDS-PAGE al 12% se corrió a 108V/h por una 1h. Las proteínas se visualizaron por tinción con plata.

6. Análisis de los geles 2-D

La imagen de los geles fue capturada en formato digital TIFF y posteriormente se realizó el análisis comparativo de los geles utilizando el software PDQuest (Bio-Rad, USA). Para la detección de manchas se realizaron los ajustes correspondientes de manera que todos los puntos visibles fueran detectados por el programa. Los dos geles de la condición control se combinaron para crear un gel maestro, de manera que el análisis comparativo se realizó con el gel maestro del control y los geles de las distintas concentraciones de Zn^{2+} .

Para el análisis de los puntos isoelectrónicos se utilizaron marcadores de 2D (SDS-PAGE) de (Bio-rad) de pI (4.5-8.5) y PM (76-17.5 kDa)

7. Ensayo de Citotoxicidad.

Monocapas confluentes de células HeLa y DU-145 se sembraron en placas de 96 pozos de fondo plano, para lo cual se inocularon 3.5×10^4 células HeLa en 100 μ l del medio DMEM-SC se incubaron por pozo para las células DU-145 se inocularon 5.5×10^4 células en 100 μ l de medio DMEM-SFB por pozo.

Ambas placas se incubaron por 24 a 37° C en 5% de CO₂.

Enseguida, las monocapas confluentes de células HeLa (4×10^4 células /pozo) se incubaron a 37°C por 1h con una relación (1:5) parásitos en 100 μ l de medio de interacción TYM-DMEM sin suero. En el caso de DU145 se colocaron la misma relación 1:5.

Se realizó una cinética de citotoxicidad con diferentes tiempos de interacción (1, 3, 6, 8 h). Después las monocapas se lavaron suavemente 3 veces con PBS pH 7.0, se fijaron con 50 μ l de formaldehído al 2% durante 10 min/TA, se lavaron 2 veces con PBS pH 7.0, se tiñeron con cristal violeta al 0.13% en etanol-formaldehído (5:2) e inmediatamente se lavaron con PBS pH 7.0 hasta quitar el excedente de colorante y se dejó secar a TA. El colorante se eluyó con 50 μ l de SDS al 1% en 50 % de etanol por 15 min/TA. La densidad óptica del colorante eluido se obtuvo en el lector de ELISA "Multiskan" a una longitud de onda de 570 nm.

Como controles del ensayo se usaron pozos con monocapas confluentes de ambas líneas celulares que no interaccionaron con *T. vaginalis*. El porcentaje (%) de citotoxicidad se calculó considerando la densidad óptica del control como el 100% de monocapa, la absorbancia de la muestra representó la monocapa remanente y la diferencia entre el % de

la monocapa remanente y el 100% de monocapa control correspondió al % de citotoxicidad. Cada experimento se realizó por triplicado.

8. Ensayo de Adhesión

Con 5.5×10^4 de células DU-145 para llegar a confluencia en una placa de 96 pozos. Se realizó el ensayo de adhesión esta monocapa se incubo con 100µl de muestra conteniendo 2.7×10^5 parásitos marcados con timidina $[H]^3$, 1×10^6 parásitos fueron crecidos en las distintas concentraciones de Zn^{2+} y en ausencia de Zn^{2+} y se les añade 20µl de timidina $[H]^3$ y el parásito incorpora la timidina a su DNA. Estos parásitos fueron resuspendidos en una mezcla 2:1 (vol/vol) (DMEM-TYM) sin suero, en el caso de las células HeLa, es una relación 1:5 en la cual es 4×10^4 con 4×10^5 de *T.vaginalis* . Es conocido que las células HeLa se adhieren a los que en 30 min de interacción e incubación a 37°C con 5% CO₂, en las células DU-145 estos tiempos fueron los mismos para las células DU-145. Las placas se lavaron tres veces con DMEM tibio. Después a la placa se le agregó 100 µl de SDS 1% por pozo se recuperó y se agregó en 2 ml de líquido de centelleo (ecolume/mp) para determinar citoadherencia por conteo de radioactividad. Este ensayo se realizo de la misma manera para células HeLa. Los parásitos se trataron con distintas concentraciones de Zn^{2+} y el tratamiento de las monocapas fue el mismo descrito antes. Posteriormente se determinó el número tricomonas adheridas a las células DU-145. En los experimentos se evaluó la viabilidad de los parásitos por observación microscópica.

9. Extracción de RNA total mediante la técnica de 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 / TA 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 / TA 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.

10. Síntesis de cDNA.

A 1 μ g de RNA, se le adicionó 1 μ l de oligo dT (10pmol/ μ l) 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 y se cuantificó el cDNA por espectrofotometría.

11. Amplificación por PCR de *tvcp65* y *tvcp39* de *Trichomonas vaginalis*.

Para la amplificación del gen *tvcp65* se diseñaron los oligonucleótidos basados en la secuencia de nucleótidos del gen *tvcp65* reportado que su amplificado es de 370 pb (Álvarez-Sánchez y col., 2008).

Los iniciadores sentido y antisentido son los siguientes: Sentido S65 5'ACGCGATTACATCTGGAGAACTC3' y Antisentido SSY65 5'ATAAGAGGAGCGTGATGGCACAT 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 μ M], MgCl₂ [1.5 μ M], 50 ng de DNAg, Taq polimerasa [1Unidad] (Invitrogen), cbp 50 μ l de agua inyectable.

Se utilizo el siguiente programa en el termociclador.

94 °C 2 min 1 ciclo

94 °C 30 seg }
60 °C 1 min } 30 ciclos
72 °C 30 seg }
72 °C 7 min 1 ciclo

Para la amplificación del gen *tvcp39* se diseñaron los oligonucleótidos.

Los iniciadores sentido y antisentido son los siguientes: Sentido CP39-FRT 5'CATTATGCTATCACAACAGG3' y Antisentido CP39-Rev-RT 5'CGCCCTGGTGCTTGACAACAT 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 μ M], MgCl₂ [1.5 μ M], 50 ng de DNAg, Taq polimerasa [1Unidad] (Invitrogen), cbp 50 μ l de agua inyectable. El amplificado es de 270pb.

Se utilizo el siguiente programa

94 °C 1 min 1 ciclo

94 °C 50 seg }
55 °C 45 seg } 20 ciclos
72 °C 1:30 min }

72 °C 7 min 1 ciclo

Para la amplificación del gen de *β-tubulina*, utilizado como control de carga en las diferentes condiciones de Zn^{2+} , se utilizaron los siguientes iniciadores:

Sentido BTUB9 (5'-CATTGATAACGAAGCTCCTTTACGAT-3')

Antisentido 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], $MgCl_2$ [1.5 μM], 50 ng de DNAg, Taq polimerasa [1Unidad] (Invitrogen), cbp 50 μl de agua inyectable.

El programa de ciclaje que se utilizó 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).

12. 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 *tvcp65* 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 cargó 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] 40 ciclos	1 ciclo
95°C	30 s		
48°C	30 s		
72°C	30 s		

Para realizar PCR tiempo real del gen *tvcp65* se diseñaron los iniciadores, utilizando el programa Sequence Detection Software (version 1.3) (Applied Biosystem), los cuales se muestran a continuación:

Sentido

5' AATGTTGTTGAAGGCGATGAAA 3' tm 60

Antisentido

5' CTACAGCAGCTGGCCATTT 3' tm 60

Para el gen *tvcp65* se utilizó la siguiente reacción:

12.5 µl de SYBER green (Invitrogen)

1 µl de oligonucleótido S65

1 µl de oligonucleótido SSY65

9.5 µl de agua DEPC

Programa de ciclaje que se siguió fue:

95°C	15 min	}	1 ciclo
95°C	30 s		
57°C	30 s	}	40 ciclos
72°C	30 s		
95 °C	15 s		
60°C	30 s	}	1 ciclo
95°C	15 s		

Se realizó el análisis de los datos en programa Excel. Los valores obtenidos del gen *tvcp65* y *tvcp39* fueron normalizados con los valores del gen de *β-tubulina*.

V. RESULTADOS

En este trabajo primero se analizó el crecimiento de *T. vaginalis* en medio suplementado con diferentes concentraciones de Zn^{2+} (0.0, 0.25, 1.0, 1.6 mM) por 24 h a 37°C (**Fig.4**). Las duplicaciones de *T. vaginalis* en presencia de cantidades crecientes de Zn^{2+} disminuyeron progresivamente. Los parásitos crecidos en medio TYM-SC sin Zn^{2+} se duplicaron 4 veces en 24 h esta condición es considerada como control. Parásitos crecidos en 0.25 mM Zn^{2+} se duplicaron 3.5 veces en 24 h, mientras que en 1.0mM se duplicaron 3 veces, y en 1.6mM de Zn^{2+} se duplicaron solo una vez en 24 h. Los parásitos fueron 98% viables en todas las concentraciones de Zn^{2+} analizadas, ninguna concentración de Zn^{2+} fue tricomonocida, la viabilidad de los parásitos fue medida con Azul de Tripano.

5.1 Análisis de extractos de proteínas totales en presencia de Zn^{2+}

El patrón de proteínas totales de *T. vaginalis* fue analizado con parásitos crecidos en las distintas concentraciones de Zn^{2+} . Estos extractos fueron analizados por electroforesis en 1D en geles SDS-PAGE 9%, en donde no se observaron cambios significativos en el patrón de proteínas totales en las diferentes concentraciones de Zn^{2+} , comparados con los parásitos crecidos en ausencia de este catión (**Fig. 5**).

Debido a este resultado, los extractos de proteínas de los parásitos crecidos a diferentes concentraciones de Zn^{2+} fueron sometidos a una electroforesis en doble dimensión (2D). Para analizar la mezcla compleja de proteínas, los extractos fueron preparados en amortiguador de 2D el cual consta de: CHAPS, DTT, UREA y Azul bromofenol. La separación de proteínas en 2D se basó en su punto isoeléctrico (pI) y su

peso molecular en geles de gradientes de pH inmobilizados de rango 4 a 7 lineal en condiciones desnaturalizantes el segunda dimensión fueron geles 7cm.

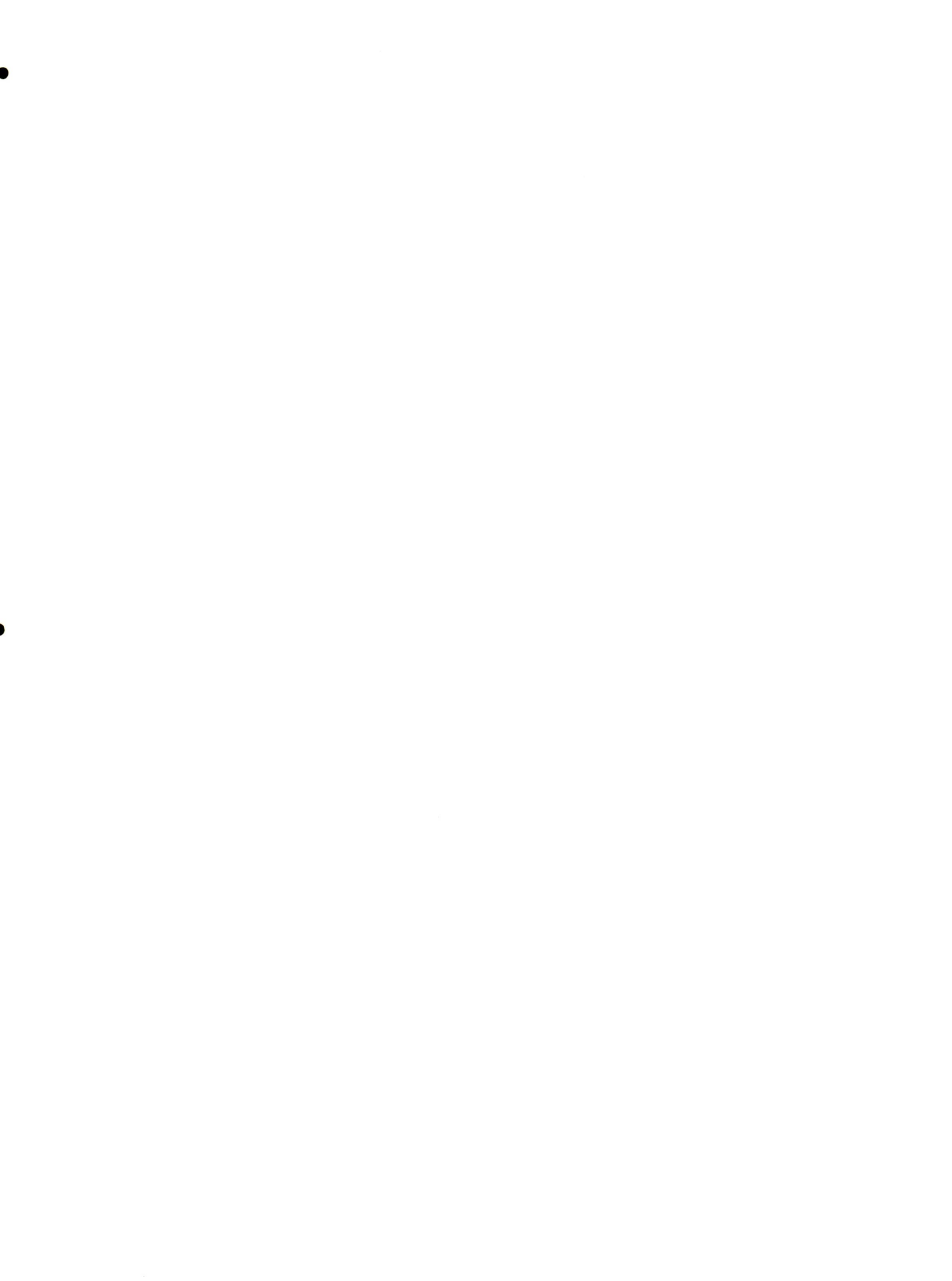


Fig. 4. Curva de crecimiento de *Trichomonas vaginalis* a distintas concentraciones de Zn^{2+} . El medio de cultivo TYM-SC se suplementó con diferentes concentraciones de $ZnCl_2$: ♦) Parásitos crecidos en TYM-SC; ■) TYM-SC+ 0.25 mM; ▲) TYM-SC+ 1.0 mM; X) TYM-SC+ 1.6 mM de Zn^{2+} . El inóculo inicial en cada una de las concentraciones fue de 1.8×10^4 . Los parásitos se contaron en la cámara de Neubauer a diferentes tiempos 0, 6 y 24 h en presencia de azul de tripano para medir la viabilidad. El crecimiento de los parásitos en medio TYM-SC en ausencia de Zn^{2+} fue considerado la replicación basal (control).

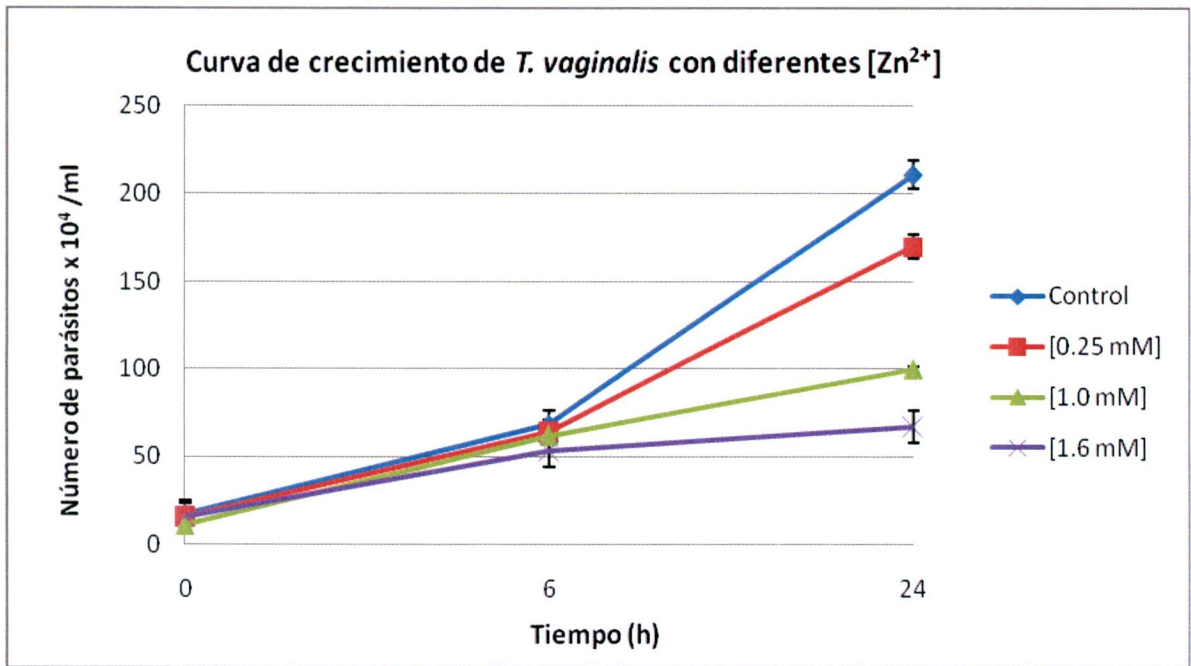
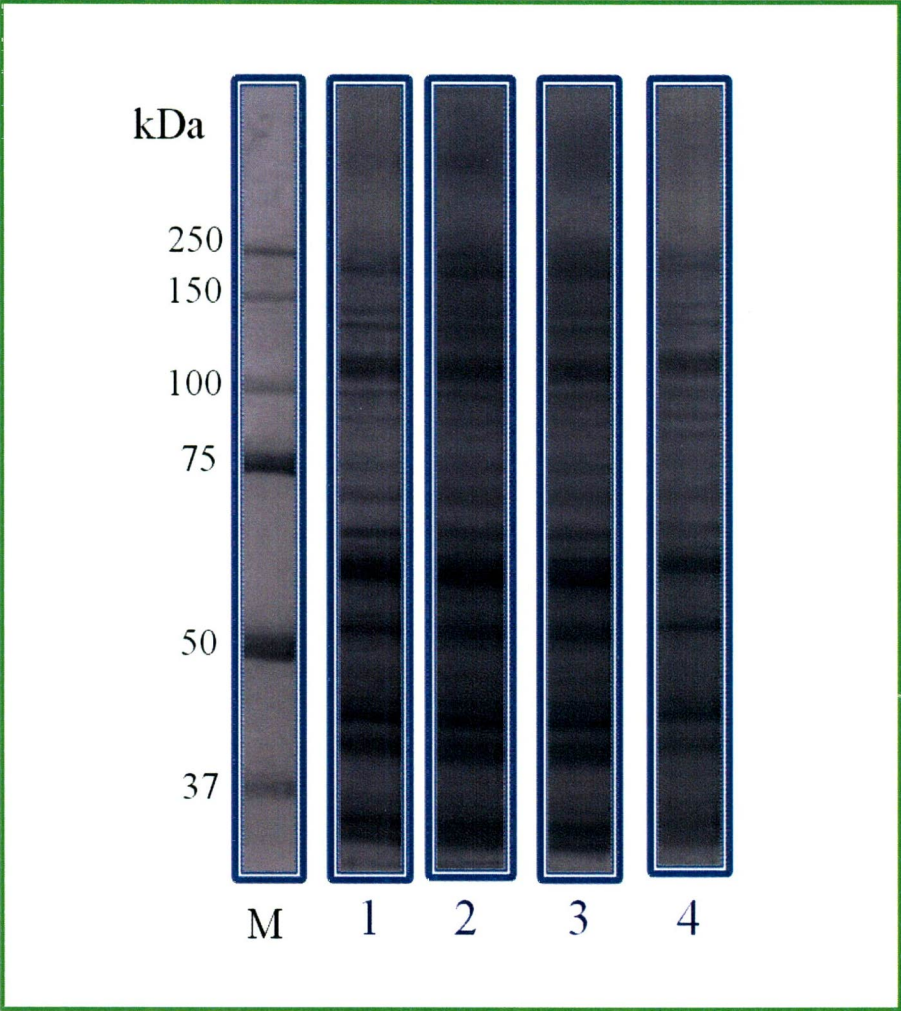


Fig. 5. Expresión de proteínas totales a distintas concentraciones de Zn^{2+} .

A) Extracto de proteínas totales de *T. vaginalis* crecidas con distintas concentraciones de Zn^{2+} , analizadas mediante electroforesis en 1D en geles de poliacrilamida al 9%. Carriles: 1) en ausencia de Zn^{2+} , 2) 0.25 mM de Zn^{2+} , 3) 1.0 mM de Zn^{2+} , 4) 1.6 mM de Zn^{2+} . M) kDa marcador de peso molecular "presicion plus protein standards" en Kilodaltones (kDa).

Proteínas Totales extractos de TCA.



Los geles en 2D permitieron cuantificar las manchas presentes en los parásitos crecidos en las diferentes condiciones de Zn^{2+} , detectando (185 ± 1.5) manchas en las proteínas presentes en la condición control. El número de manchas obtenidas en las diferentes concentraciones de Zn^{2+} varió en número 1) 0.25 mM de Zn^{2+} se presentaron 161 ± 6.5 manchas, en 2) 1.0 mM de Zn^{2+} fueron 155 ± 2.5 manchas y 3) en 1.6 mM de Zn^{2+} 148 ± 8 manchas. El número de manchas de proteínas disminuyó al aumentar la concentración de Zn^{2+} utilizada en el medio (**Fig. 6**). Estos datos correlacionan con los datos obtenidos previamente en la curva de crecimiento, en donde el número de parásitos disminuye cuando se incrementa la concentración de Zn^{2+} .

Después del análisis electroforético en 2D, los geles fueron analizados con el programa PDQuest, estos fueron realizados por triplicado en las diferentes concentraciones de Zn^{2+} y usados para elaborar el gel maestro, el cual contiene el patrón de proteínas totales en 2D de los parásitos crecidos en ausencia de Zn^{2+} , esta matriz del gel maestro fue usado para el análisis comparativo con los geles en las distintas concentraciones de Zn^{2+} . El resultado de este análisis comparativo se muestra en la **tabla 2**. En la tabla se muestra que existe cambios en el porcentaje de semejanza entre las diferentes concentraciones de Zn^{2+} , lo cual correlaciona con cambios en la expresión de las proteínas de *T. vaginalis* en las distintas concentraciones de este catión. Algunas proteínas se expresan menos, sin embargo encontramos otras que se expresan más. El porcentaje diferencial del número de manchas en las distintas concentraciones de Zn^{2+} con respecto a la condición control es mostrada en la **tabla 1**.

Tabla 1. Porcentaje de diferencia del número de manchas en las diferentes concentraciones de Zn^{2+}

Concentración de Zn^{2+}	% diferencia
Ausencia Zn^{2+}	0%
0.25mM	42%
1.0mM	65%
1.6mM	53%

Estos cambios se pueden observar en la amplificación de los geles obtenidos del análisis en el programa de PDQuest, mostrado en la (Fig. 7)

El porcentaje muestra la diferencia en el número de proteínas que existe en cada una de las concentraciones de Zn^{2+} con respecto a las proteínas presentes en el control. En 1.0mM de Zn^{2+} se tiene un mayor número de diferencia en el número de manchas correspondientes a un 65% mientras que en 1.6mM es del 53%, lo que indica que la expresión de proteínas es diferencial conforme aumenta la concentración de Zn^{2+} .

Posterior mente, se llevo a cabo la amplificación de la zona 50 -100 kDa con la finalidad de analizar la expresión diferencial y obtener aquellas proteínas con mayor expresión, las proteínas seleccionadas fueron enmarcadas en un recuadro azul. La expresión de las proteínas en la condición control es menor en 0.25mM de Zn^{2+} y se incrementa en 1.6mM de Zn^{2+} . Por otra parte en el recuadro amarillo se señala una proteína que mantiene su expresión en la condición control, así como en las distintas concentraciones de Zn^{2+} . En el recuadro de color rojo se encierran algunas proteínas que incrementan su expresión y otras que disminuyen conforme se incrementa la concentración de Zn^{2+} .

Fig. 6. Gel en 2D proteínas totales de *T. vaginalis* cultivadas a distintas concentraciones de Zn^{2+} .

A) Parásitos crecidos en ausencia de Zn^{2+} . *T. vaginalis* cultivadas en presencia Zn^{2+} . Parásitos crecidos en diferentes concentraciones de Zn^{2+} B) 0.25 mM, C) 1.0 mM, D) 1.6 mM. kDa, indica la posición de los marcadores de peso molecular en kilodaltones. pI la flecha indica la dirección de isoelectroenfoque usando tiras IPG con 4/7 lineal, (-) la flecha indica la dirección de la segunda dimensión en base al peso molecular. El gel SDS-PAGE al 12% fue teñido con plata para su visualización. En el recuadro de color azul se señalan las proteínas cambian su expresión, y en el recuadro amarillo a la proteína expresada en todas las condiciones de Zn^{2+} .

Mapas de Gel 2D

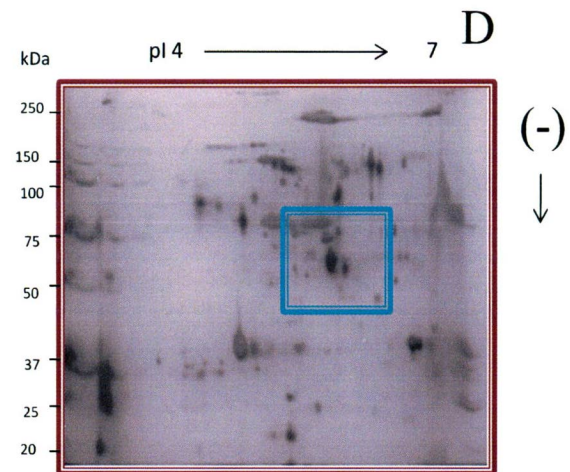
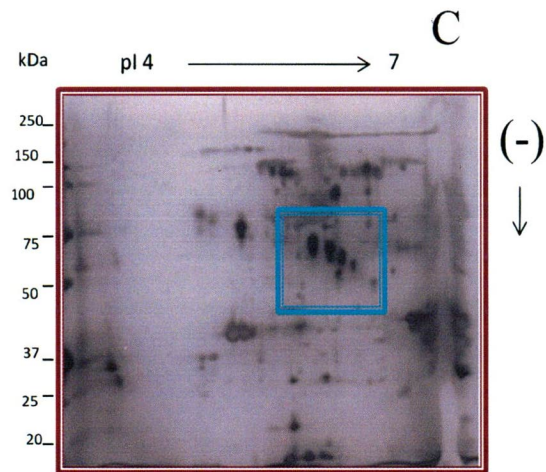
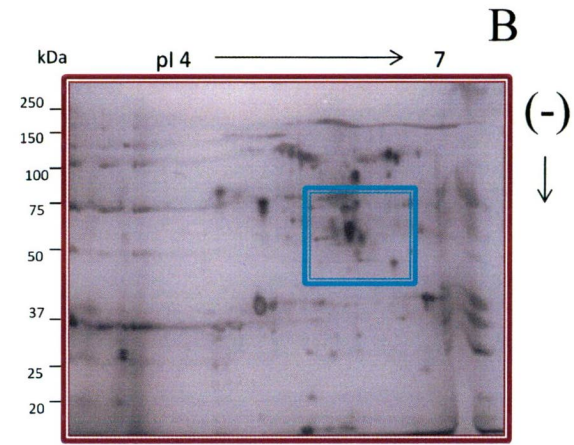
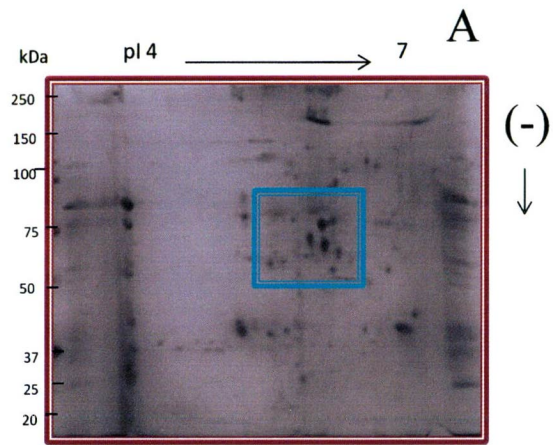
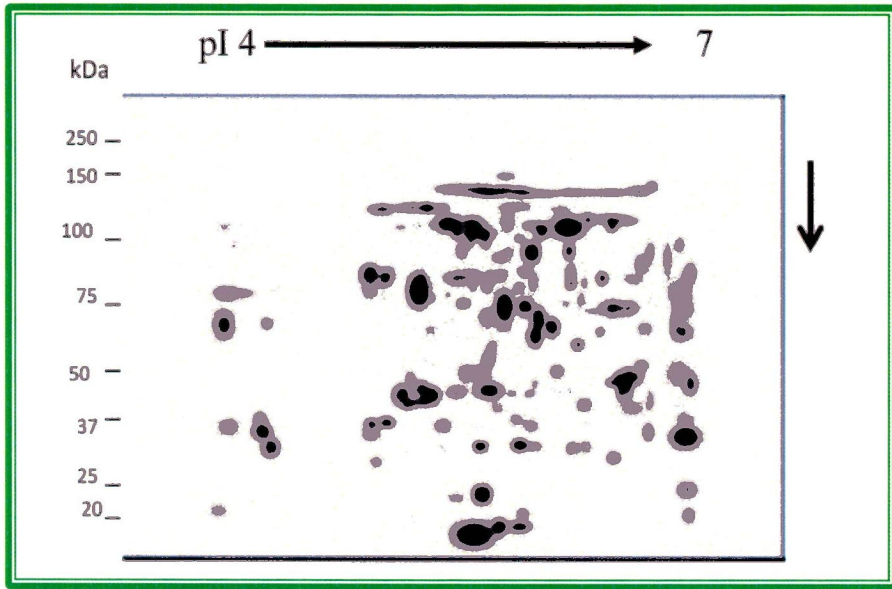
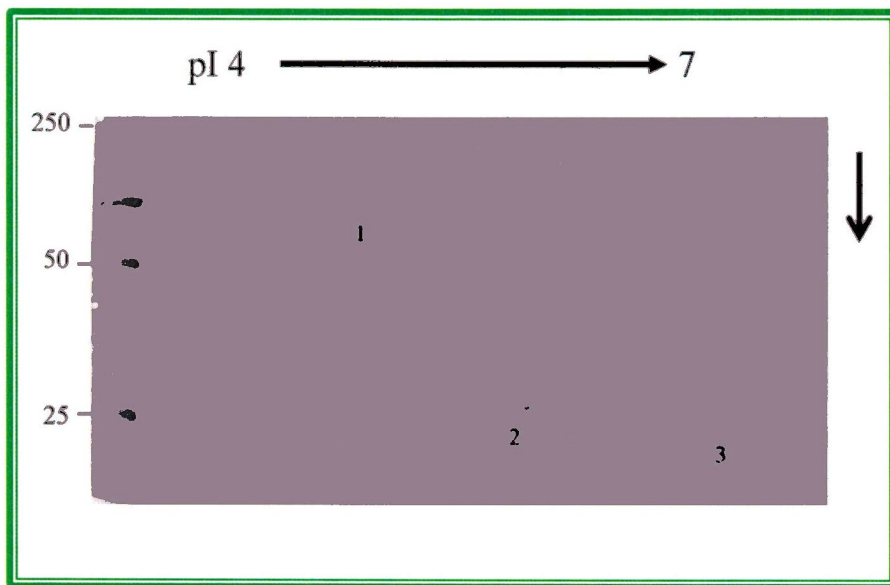


Fig. 7. Análisis por PDQuest. A) Gel maestro utilizado para el análisis comparativo de los experimentos en las diferentes concentraciones de Zn^{2+} . B) Gel de marcadores de 2D de Bio-Rad. C) pI y PM de las proteínas de los parásitos crecidos en ausencia de Zn^{2+} . Líneas (verticales) tenemos los puntos isoeléctricos y en líneas (horizontales) los pesos moleculares.

A



B



C

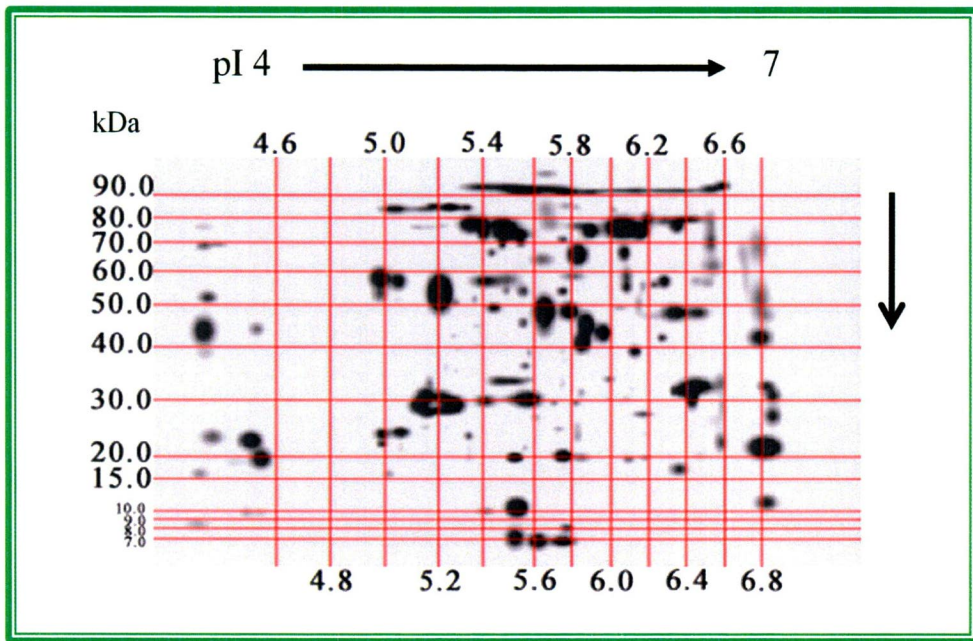


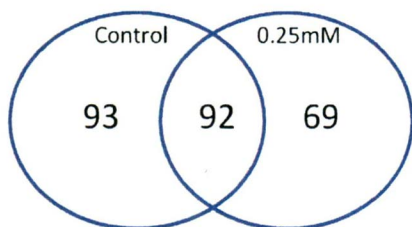
Tabla 2. Número de proteínas de *T. vaginalis* presentes en las diferentes concentraciones de Zn^{2+} .

	Manchas ¹	Empalman ²	No Empalman ³	% de Semejanza ⁴
Control	185	185	0	100
[0.25mM] de $ZnCl_2$	161	92	69	58
[1,0mM] de $ZnCl_2$	155	54	101	35
[1,6mM] de $ZnCl_2$	148	70	78	47

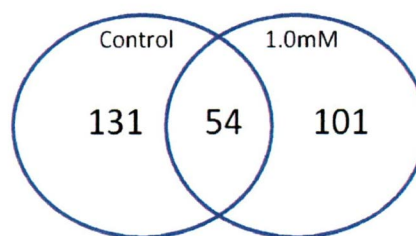
- 1) Se refiere al número total de manchas identificadas en cada una de las concentraciones y el control
- 2) Empalme es el número de manchas que coinciden en el control y en cada una de las concentraciones de Zn^{2+}
- 3) Son las manchas diferenciales en cada una de las concentraciones de Zn^{2+} comparadas con el control.
- 4) El porcentaje de semejanza se calculó tomando como el 100 al total de manchas encontradas en el control para determinar el porcentaje correspondiente de las manchas que coinciden para cada una de las concentraciones de Zn^{2+}

Fig.8. Diagramas de Ven. El número de manchas en la intercepción de los círculos se refiere aquellas que coinciden en el control y en cada una de las concentraciones de Zn^{2+} . Fuera de la intercepción se encuentran el número de manchas diferenciales en el control y en cada una de las concentraciones de Zn^{2+} . Así como en los diagramas de abajo están la comparación de cada una de las concentraciones de Zn^{2+}

Comparación del control y 0.25mM de Zn²⁺



Comparación del control y 1.0mM de Zn²⁺



Comparación del control y 1.6mM de Zn²⁺

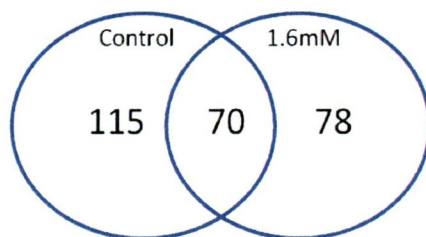


Diagrama de Venn de
0.25 y 1.0mM de Zn²⁺

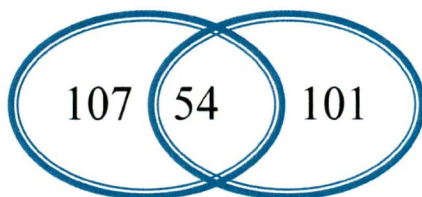


Diagrama de Venn de
0.25 y 1.6mM de Zn²⁺

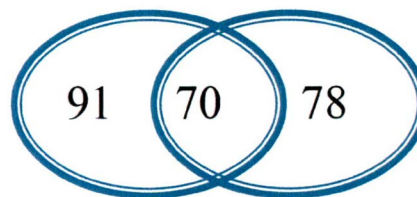


Diagrama de Venn de
1.0 y 1.6 mM de Zn²⁺

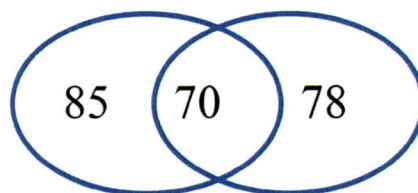


Fig. 9. Análisis del patrón electroforético en 2D de varias regiones de PM.

Perfil proteómico de los parásitos crecidos en ausencia de Zn^{2+} (0.0), o en presencia de Zn^{2+} (0.25, 1.0, 1.6 mM) .en la región de 250-25kDa.

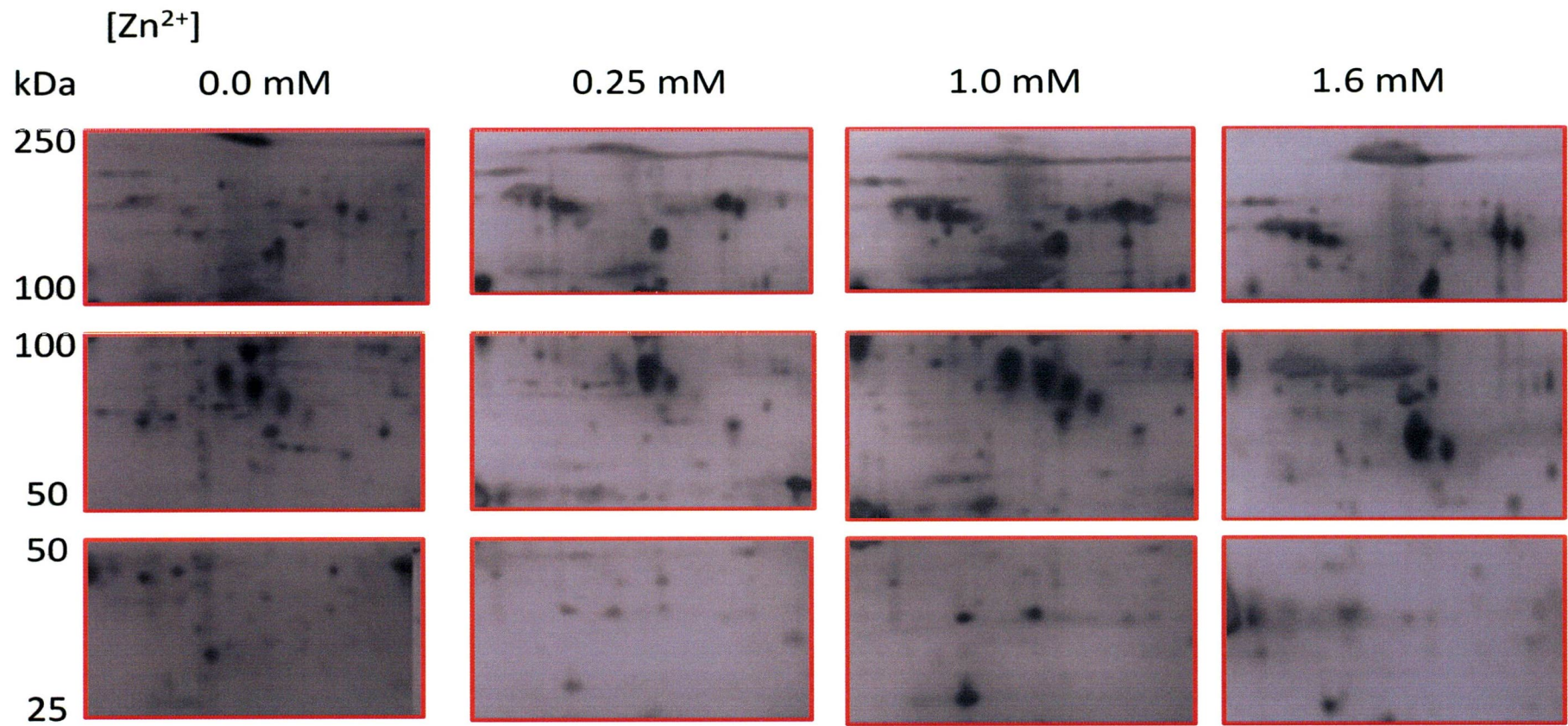
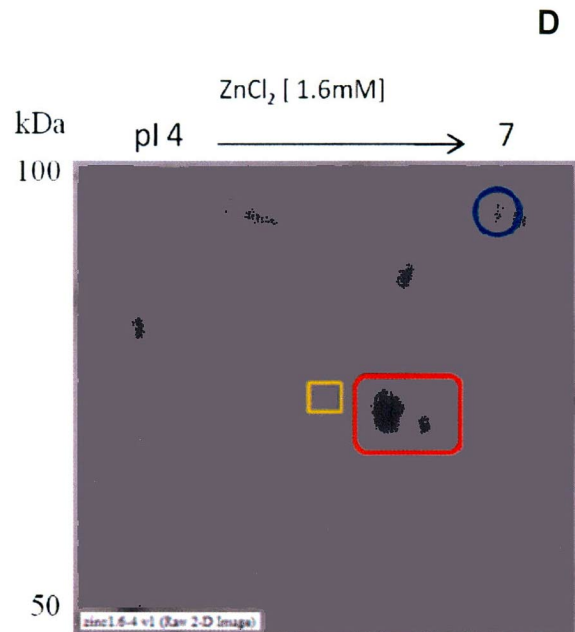
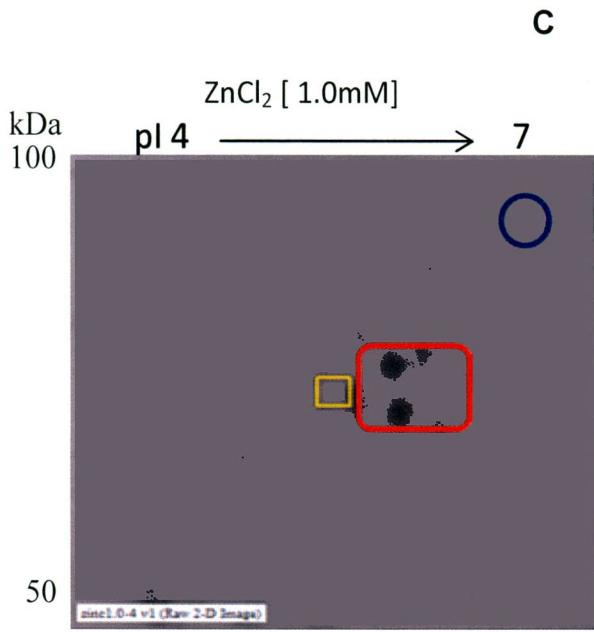
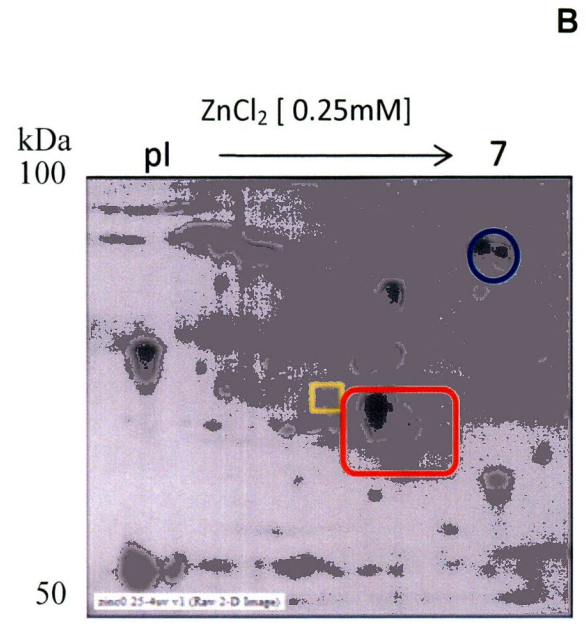
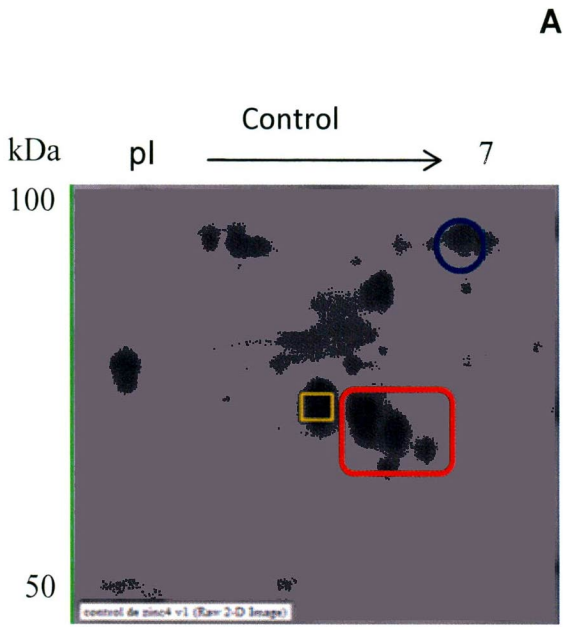


Fig. 10. Análisis del patrón electroforético en 2D región 100-50 kDa.

De los parásitos crecidos en ausencia y presencia de Zn^{2+} . Panel A. Patrón proteómico de parásitos crecidos en ausencia de Zn^{2+} . Panel B) 0.25 mM, C) 1.0 mM y D) 1.6 mM de las proteínas totales de los parásitos crecidos en las diferentes concentraciones de Zn^{2+} . Se observa algunas proteínas que cambian su expresión (cuadro rojo), una proteína que conserva su expresión en todas las concentraciones de Zn^{2+} y el control (cuadro amarillo) y otra proteína que disminuye su expresión conforme aumenta la concentración de Zn^{2+} (círculo azul)



La **Fig. 7A** corresponde al gel maestro obtenidos con el programa de PDQuest, al recopilar la imagen del triplicado mostrando el proteoma de los parásitos crecidos en ausencia de Zn^{2+} . En la (**Fig. 7B**) se muestra un gel de marcadores de 2D, en donde se obtuvieron proteínas con pI y P M conocidos (1-albumina, 2- anhidrasa carbónica de bovino y 3-mioglobina equina), el cual se utilizó para calcular los puntos isoelectricos y los pesos moleculares, tanto del control y las distintas concentraciones de Zn^{2+} , (**Fig 7C**).

En la (**Fig. 8**) se muestran los diagramas de Venn de un análisis del número de manchas entre la concentración control y cada una de las concentraciones, se obtiene en la intersección del diagrama el número de proteínas que coinciden en cada una de las concentraciones con respecto al control, este número de manchas son las que son semejantes para cada una de las concentraciones. La comparación entre las concentraciones de Zn^{2+} utilizadas nos da un total de 70 manchas que conciden en las concentraciones altas de Zn^{2+} .

Por otra parte se realizó un análisis del patrón electroforético de 2D de cada unas de las concentraciones en una amplificación para observar el mayor número de manchas las cuales cambian su expresión conforme aumenta la concentración de Zn^{2+} en las distintas región es de peso molecular (**Fig. 9**).

Para poder observar mejor estas proteínas se realizó un análisis del patrón electroforético en 2D de la region 100-50 kDa, el cual muestra algunas proteínas que cambiaron su expresión conforme aumenta la concentración de Zn^{2+} recuadro de color rojo, a una proteína que se conserva su expresión en todas las concentraciones de Zn^{2+} recuadro amarillo y proteínas que disminuyen su expresión circulo azul (**Fig 10**).

A continuación se realizaron curvas de dispersión para los geles en 2D en: A) las proteínas de los parásitos crecidos en ausencia de Zn^{2+} en un pH 4-6.5 ; B) las proteínas de los parásitos crecidos en 0.25 mM de Zn^{2+} en un pH 4-7 ; C) 1.0 mM de Zn^{2+} un pH 4-6 y en D) 1.6 mM de Zn^{2+} en un pH 4-6. En las concentraciones 0.25 mM y 1.6 mM de Zn^{2+} así como en ausencia de Zn^{2+} las proteínas tuvieron PM 20-60 kDa excepto en la concentración de 1.0mM en donde se pueden encontrar proteínas con P.M hasta de 80 kDa. Las gráficas de dispersión muestran una disminución del número de proteínas conforme se incrementa la concentración de Zn^{2+} (Fig 11).

5.2 Adhesión de *T.vaginalis* y las células DU-145

Los ensayos de adhesión fueron llevados a cabo con *T. vaginalis* y células prostáticas DU-145. Para ello, primero se estandarizó el número de células DU-145 que se colocarían en placas de 96 pozos, las cuales fueron crecidas 24 h, tiempo en el cual se obtuvo una monocapa confluyente del 100% y se les agregan a 400ul de medio de interacción, se toman 2.5×10^6 para que interactúen con las monocapas fijadas de células DU-145 y HeLa, relación 1:5 (parásito: célula) por 30min 37°C, 5% CO_2 y después las monocapas fueron lavadas con SDS 1%. La adhesión de los parásitos fue medida mediante un contador de centelleo. A los parásitos adheridos a la monocapa de células se agregó líquido de centelleo y se tomaron lecturas de cpm. La adhesión de los parásitos a las células HeLa fue considerado como 100%, para comparar con la adhesión de los parásitos a las células DU-145 fue de 60%. Estos experimentos se realizaron por triplicado (Fig.12A)

El análisis de adhesión se llevo a cabo con parásitos crecidos en distintas concentraciones de Zn^{2+} e interaccionaron con células DU-145. El porcentaje de adhesión en ausencia Zn^{2+} fue considerado como el 100%, y en las diferentes concentraciones de Zn^{2+} fueron: en 0.25mM Zn^{2+} , 133%, en 1.0mM Zn^{2+} , 20% y en 1.6mM de Zn^{2+} , 10% de adhesión. Los niveles de adhesión disminuyeron conforme se incrementaron las concentraciones de Zn^{2+} (**Fig 12B**).

5.3 Citotoxicidad de *T.vaginalis* hacia células DU-145

Para conocer la citotoxicidad de *T.vaginalis* hacia las células DU-145, el ensayo de citotoxicidad, fue estandarizado colocando un inóculo 5.5×10^4 células DU-145 en cada pozo de una placa de 48 pozos para obtener una monocapa confluyente a las 24h de incubación $37^{\circ}C$ y 5% de CO_2 .

Estas monocapas interaccionaron con *T. vaginalis* en una relación 1:5 parásitos: células. El ensayo se llevó a cabo a diferentes tiempos para obtener una cinética de citotoxicidad de los parásitos y las células DU-145. En la (**Fig. 13**) se muestra la gráfica de porcentaje de citotoxicidad de los parásitos crecidos en las diferentes concentraciones de Zn^{2+} con respecto al tiempo. A 1 h la citotoxicidad del parásitos hacia las células DU-145 fue del 20% en todas las concentraciones de Zn^{2+} , a las 3 h los porcentajes de citotoxicidad de los parásitos cultivados a las diferentes concentraciones de Zn^{2+} (0.25, 1.0 y 1.6 mM) fue del 40% de daño citotoxicidad mientras que en ausencia de Zn^{2+} fue del 60%. A las 6 h la citotoxicidad fue de 80% en ausencia de Zn^{2+} , mientras que en las diferentes concentraciones de Zn^{2+} fue de 60%, en el tiempo 8 la citotoxicidad de los parásitos que

fueron cultivados con las concentraciones de Zn^{2+} presentan una disminución de un 20% con respecto al control.

Debido a que la citotoxicidad de los parásitos hacia las células DU-145 se ve disminuida en presencia de Zn^{2+} se realizaron ensayos de ligando para determinar las proteínas presentes en la interacción de *T. vaginalis* con células DU-145.

Fig. 11. Gráficas de dispersión de los geles en 2D.

A) Ausencia de Zn^{2+} (Control), B) 0.25 mM de Zn^{2+} , C) 1.0 mM de Zn^{2+} y D) 1.6 mM de Zn^{2+} . Los rombos representan la localización de las manchas según P M y p I.

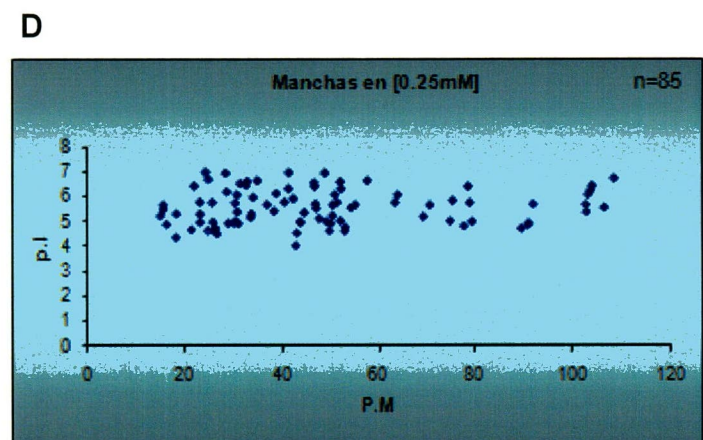
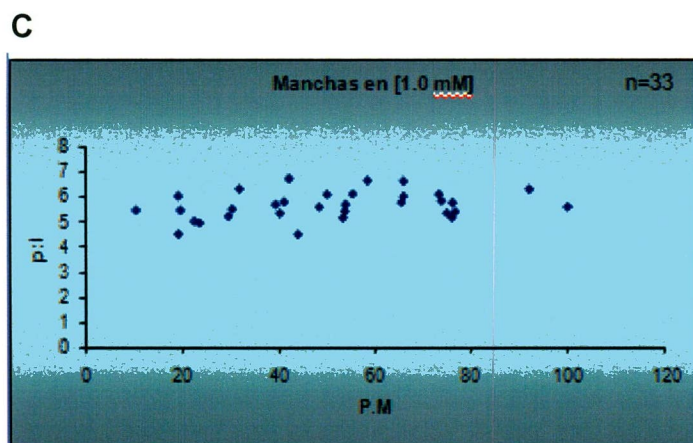
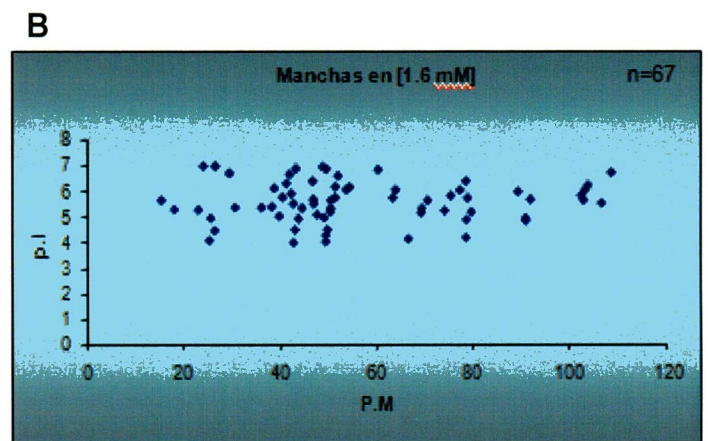
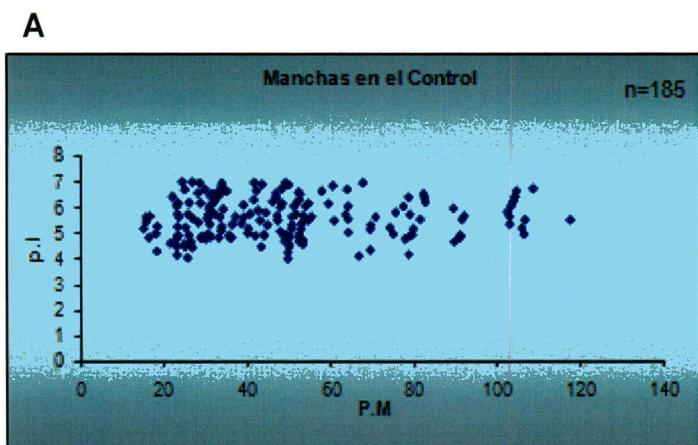


Fig. 12. Adhesión de *T. vaginalis* a las células DU-145.

A) Adhesión de *T. vaginalis* en interacción con células HeLa y células DU-145. B) Adhesión de *T. vaginalis* crecidas a diferentes concentraciones de Zn^{2+} a las células DU145. Las barras indican las desviaciones estándar

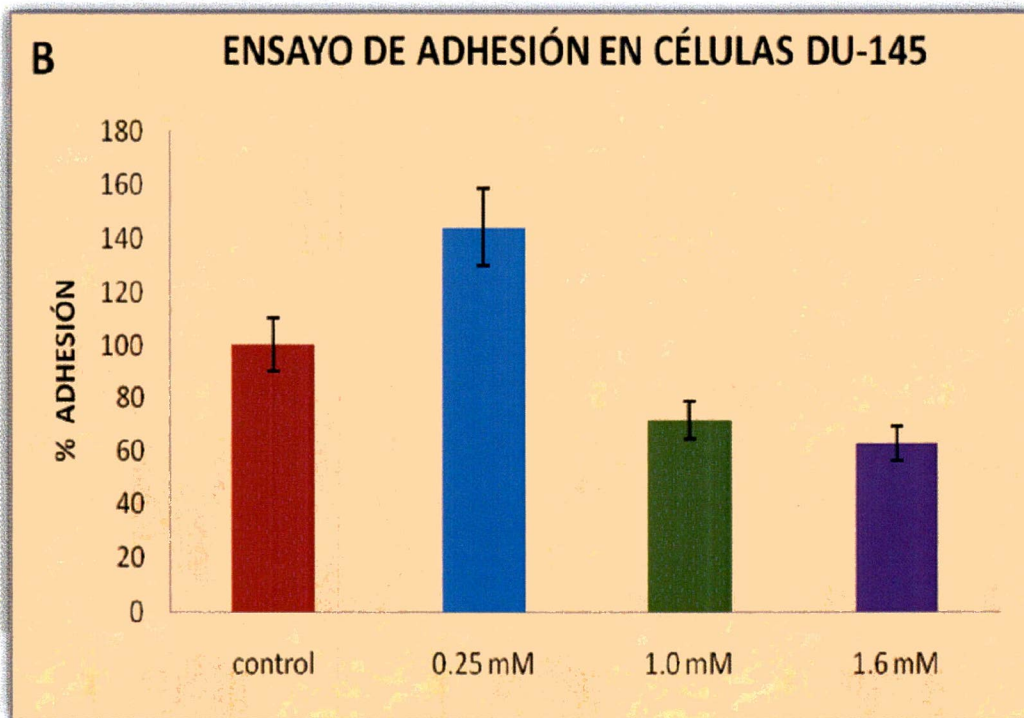
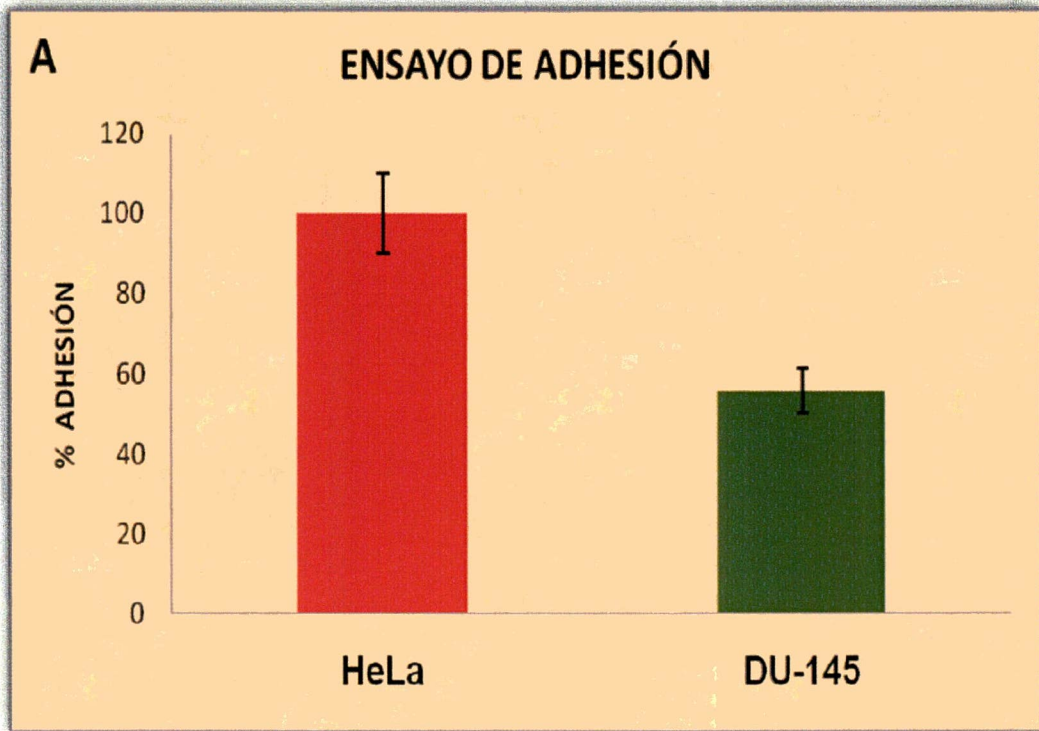
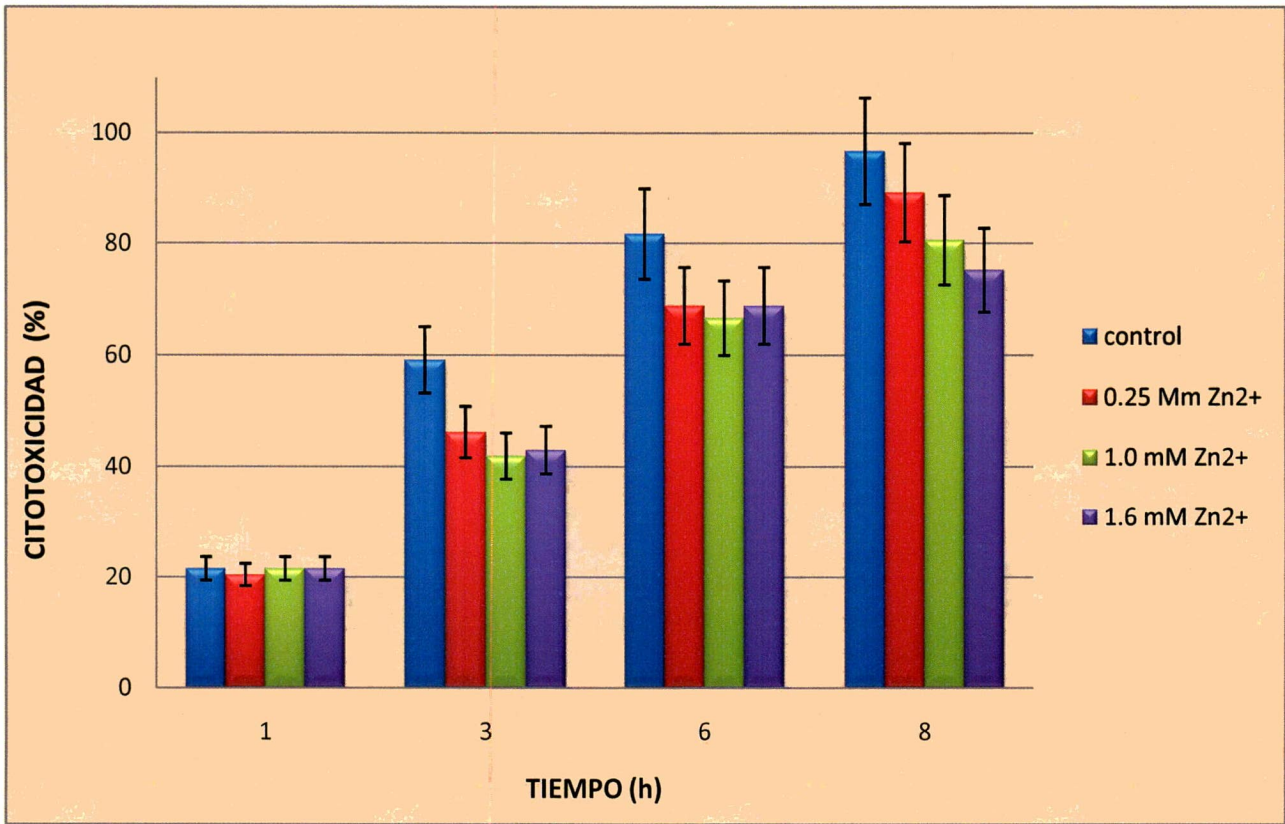


Fig. 13. Cinética de citotoxicidad de *T. vaginalis* hacia las células DU-145.

Citotoxicidad de *T. vaginalis* crecidas en diferentes concentraciones de Zn^{2+} , 0.25, 1.0 y 1.6 mM como en ausencia de Zn^{2+} e interaccionando con células prostáticas DU-145 a diferentes tiempos. Las barras indican las desviaciones estándar.



5.4 Actividad proteolíticas de las CPs que interaccionan con células DU-145.

La actividad proteolítica de las cistein-proteinasas de los parásitos crecidos en las diferentes concentraciones de Zn^{2+} fue analizada como extracto total y además mediante el ensayo de ligando, en geles SDS-PAGE, copolimerizados con gelatina al 9% (**Fig. 14**). Los geles fueron activados a distintas temperaturas ($37^{\circ}C$, $4^{\circ}C$, $25^{\circ}C$ y $43.5^{\circ}C$) y en amortiguador de activación de acetatos pH 4.5. El patrón de proteinasas con afinidad hacia las células DU-145 difiere con el patrón proteinasas con afinidad a las células HeLa previamente reportadas. En la (**Fig 14A**) se muestra los geles de sustrato en donde la actividad de las proteinasas a una temperatura de $37^{\circ}C$ no permite obtener bandas definidas de las proteínasa en esta temperatura, sin embargo obtenemos a CP65, CP39, CP25 y CP20, observando una disminución de la actividad proteolítica de estas proteinasas conforme se incrementa la concentración de Zn^{2+} como lo muestra el análisis densitométrico (**Fig.14B**). Al realizar la activación a $4^{\circ}C$, se obtuvo una mejor definición de las bandas de actividad de estas proteinasas mostrando a CP70, CP65, CP39, CP25 y CP20 en (**Fig.14C**), el análisis densitométrico muestra que existe una disminución de la actividad proteolítica en la concentración 1.6mM de Zn^{2+} de las proteínasas CP70, CP65, CP39, CP25 y CP20 como se muestra en (**Fig.14D**).

Las bandas de actividad de las proteinasas a la temperatura de $25^{\circ}C$ en (**Fig.14E**) fue la misma que cuando se activo a $4^{\circ}C$ (CP70, CP65, CP39, CP25 y CP20). El análisis densitométrico (**Fig.14F**) muestra que existe una disminución de la actividad proteolítica de las proteínasas. Sin embargo cuando se cambio la temperatura de activación de las

proteinasas a 43.5°C observamos que la actividad proteolítica de CP70, CP65, CP39, CP25, CP20 disminuye y análisis densitométrico corrobora esta tendencia (**Fig.14H**).

5.5 Niveles del transcrito de *tvcp65* y *tvcp39*

El daño de *T.vaginalis* hacia monocapas de células DU-145 es menor al daño ocasionado por los parásitos a células HeLa, Por otro lado, la actividad proteolítica de CP65 y CP39 disminuye en altas concentraciones de Zn^{2+} como se demostró en ensayos de ligandos. Debido a que CP65 y CP39 están involucrada en la citotoxicidad de *T.vaginalis* hacia monocapas de células HeLa, se analizó el nivel de transcrito de estas proteinasa en los parásitos crecidos a las distintas concentraciones de Zn^{2+} para relacionar la disminución de la citotoxicidad de los parásitos hacia las células DU-145 con la disminución de la actividad de CP65 y CP39 a su vez con la cantidad de transcrito presente.

5.6 Expresión del gen *tvcp65* y *tvcp39* en presencia y ausencia de Zn^{2+} .

Con el RNAm de *T. vaginalis* cultivadas a distintas concentraciones de Zn^{2+} y en ausencia de Zn^{2+} se sintetiza cDNA, el cual fue utilizado como molde para amplificar mediante RT-PCR un fragmento de 370pb del gen *tvcp65* y otro fragmento del gen *β -tubulina* (**Fig.15A**), La intensidad de la banda del amplicon de 370pb del gen *tvcp65* amplificado a partir del cDNA de parásitos crecidos en ausencia de Zn^{2+} fue tomada como el 100% para realizar el análisis densitométrico.(**15B**). De acuerdo a este análisis los niveles relativos de RNAm del gen *tvcp65* disminuyeron un 20% y en un 40% en parásitos crecidos en 1.0mM y en 1.6mM de Zn^{2+} respectivamente. En el control (RT-) no se observo ningún amplicon obtenido por RT-PCR lo que indica que la amplificación de los fragmentos de los genes *tvcp65* y *β -tubulina* se relaciona con los niveles del transcrito presente en las

diferentes muestras analizadas. Las diferentes concentraciones de Zn^{2+} no afectaron la expresión del gen *β tubulina*, el cual fue utilizado como control de carga. **(Fig.15C)**.

La expresión diferencial del gen *tvcp65* fue cuantificada por qRT-PCR en Tiempo Real. Mediante esta cuantificación se estimó que los parásito cultivados en presencia de 0.25mM de Zn^{2+} tienen una disminución en la expresión del 90% comparado a la condición control, por otra parte en 1.0mM de Zn^{2+} disminuye un 15% con respecto al control y en 1.6mM disminuye un 20% comparado con el control. El gen *β -tubulina* que se usó como control interno no tuvo cambios de expresión en las diferentes condiciones de Zn^{2+} **(Fig. 16)**.

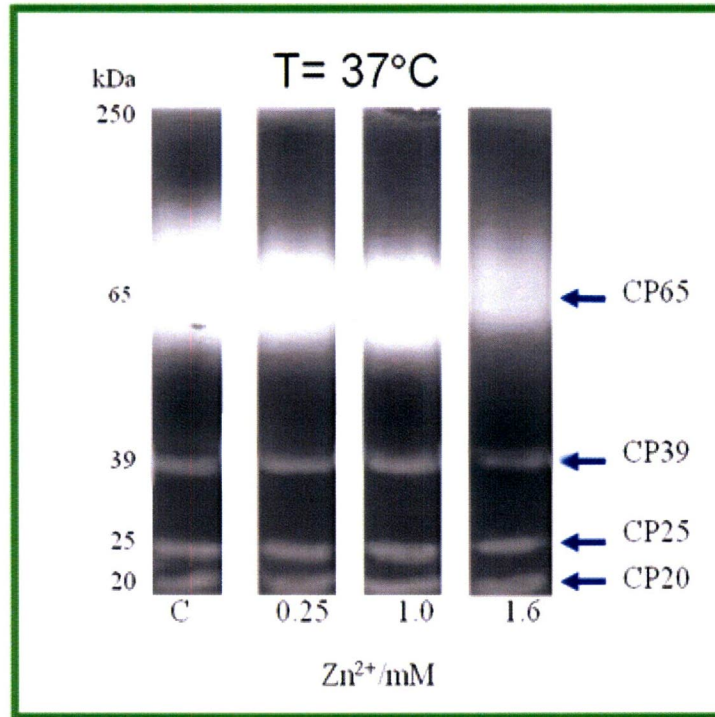
Para el gen de *tvcp39* de 270 pb se realizó de la misma forma que el gen *tvcp65* donde se obtuvo el RNAm de *T. vaginalis* cultivadas a distintas concentraciones de Zn^{2+} y en ausencia de Zn^{2+} se sintetiza cDNA, el cual fue utilizado como molde para amplificar mediante RT-PCR un fragmento de 270 pb del gen *tvcp39* y otro fragmento del gen *β -tubulina* **(Fig.17A)**, la intensidad de la banda del amplicon de 270 pb del gen *tvcp39* amplificado a partir del cDNA de parásitos crecidos en ausencia de Zn^{2+} fue tomada como el 100% para realizar el análisis densitométrico **(Fig.17B)**. De acuerdo a este análisis los niveles relativos de RNAm del gen *tvcp39* estos cambios en la expresión fueron en la concentración de 1.0 mM de Zn^{2+} aumento un 20% y en 1.6 mM de Zn^{2+} disminuye 65%. En el control (RT-) no se observó ningún amplicon obtenido por RT-PCR lo que indica que la amplificación de los fragmentos de los genes *tvcp39* y *β -tubulina* se relaciona con los niveles del transcrito presente en las diferentes muestras analizadas. Las diferentes concentraciones de Zn^{2+} no afectaron la expresión del gen *β tubulina*, el cual fue utilizado como control de carga. **(Fig.17C)**.

Fig. 14. Actividad proteolítica de las Cisteín proteinasas de *T. vaginalis* en presencia de Zn²⁺ a diferentes temperaturas

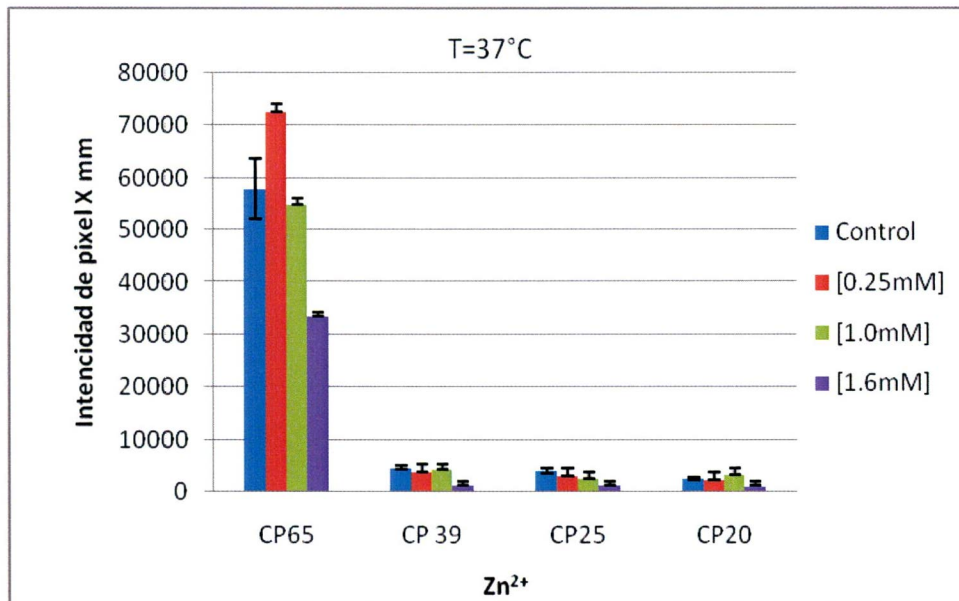
Las proteinasas con afinidad a las células DU145 fueron obtenidas mediante un ensayo de ligando-proteinasa y su actividad fue analizada mediante un gel de poliacrilamida SDS-PAGE copolimerizado con gelatina al 9% donde 1) es en ausencia de Zn²⁺, 2) concentración de 0.25mM, 3) 1.0mM, y 4) 1.6mM. Se muestra la actividad proteolítica en el panel A,C,E,G, con sus correspondientes análisis intensidad de pixel por milímetro en panel B,D,F,H.

Ensayo de ligando a distintas Temperatura con *T.vaginalis* y Células DU-145

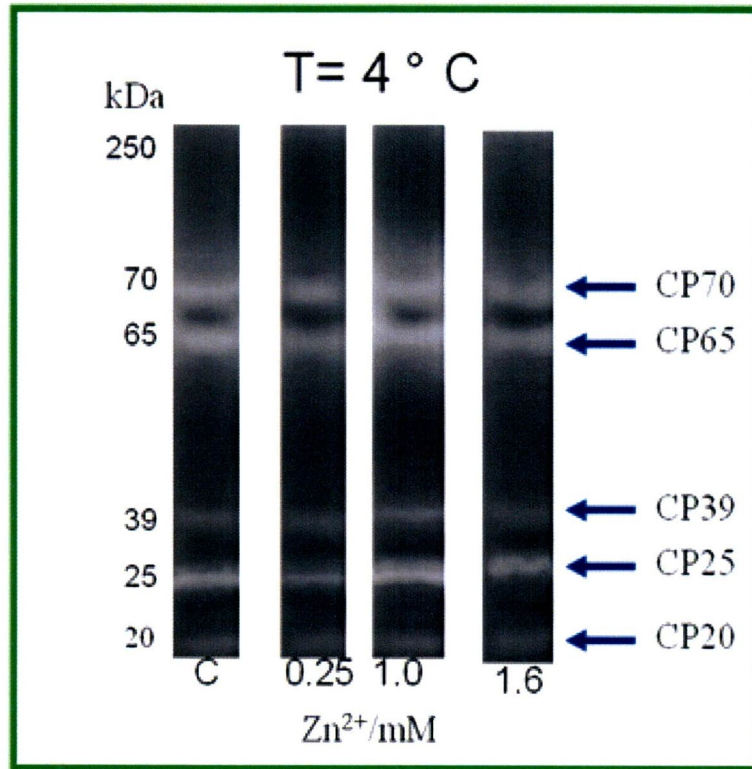
A



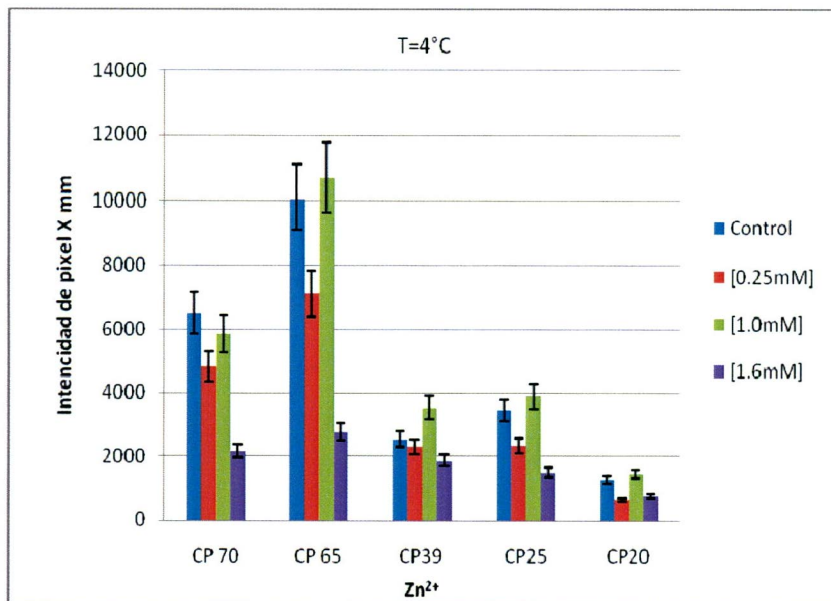
B



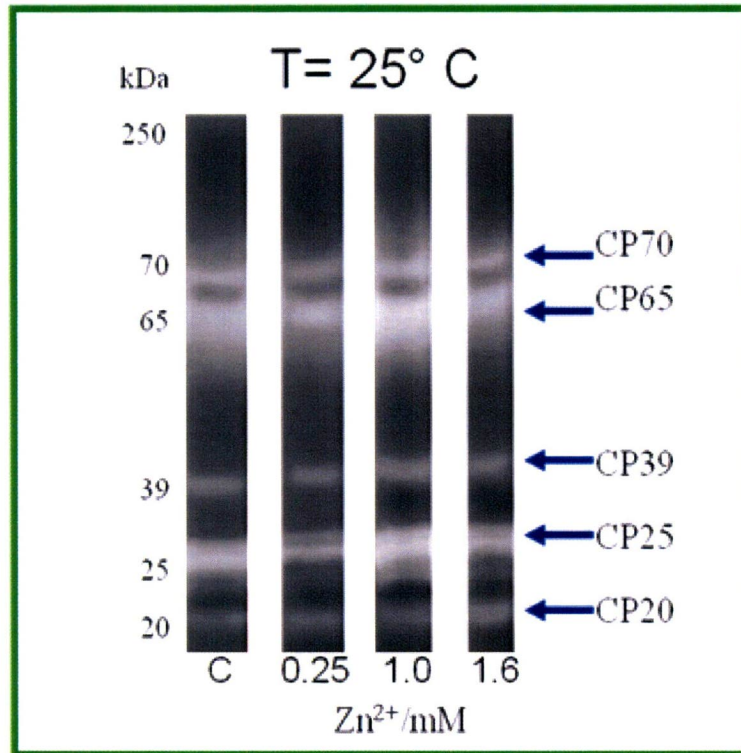
C



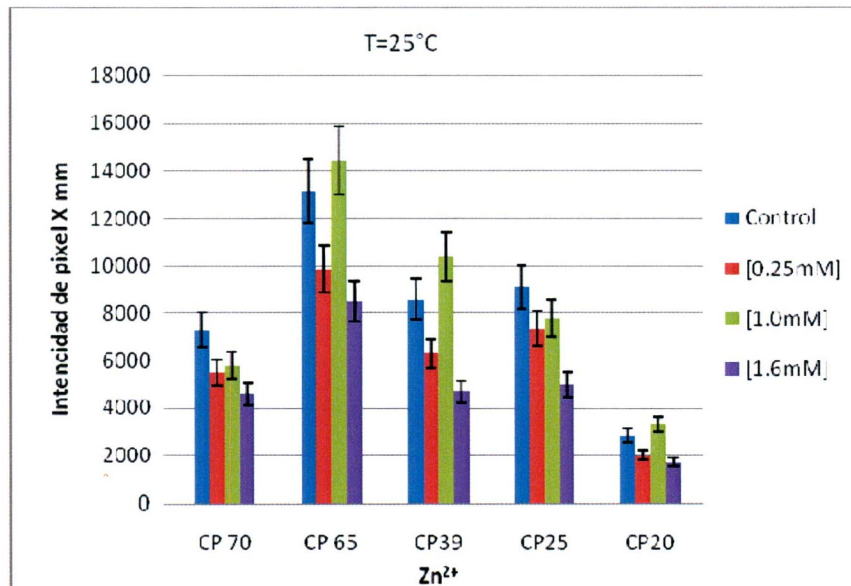
D



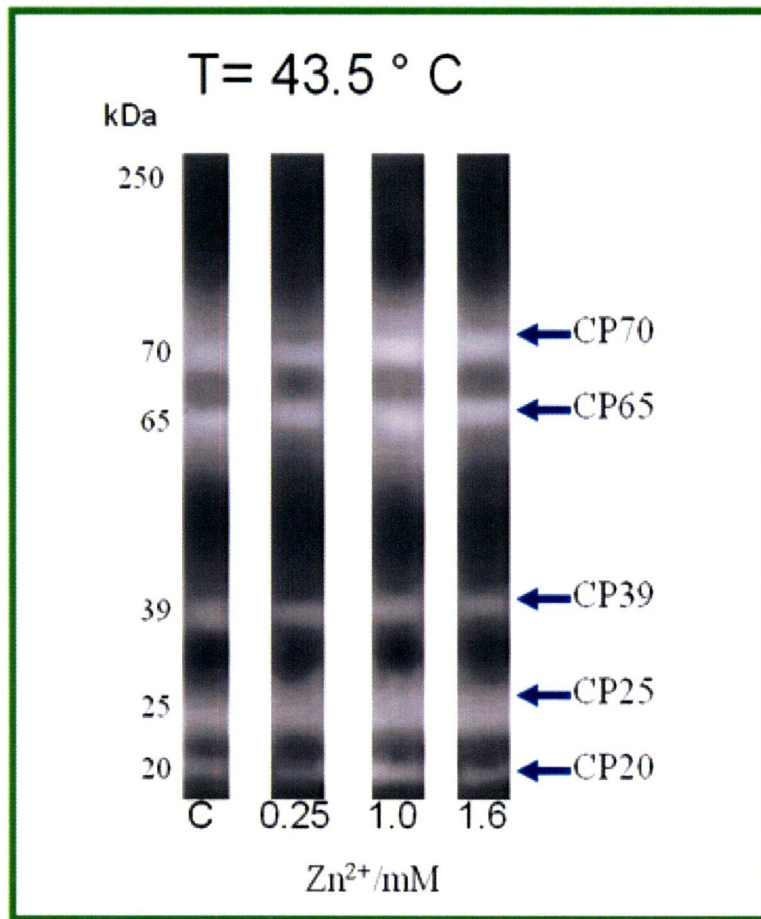
E



F



G



H

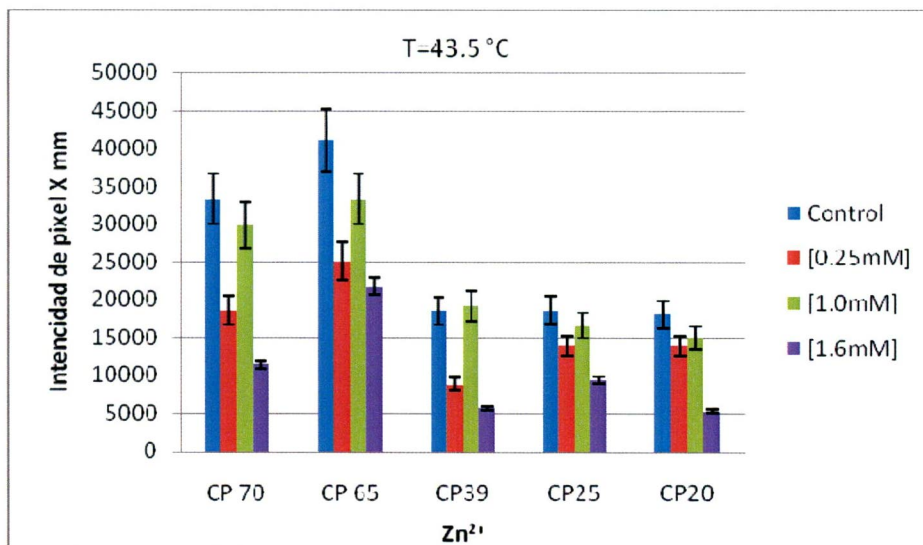
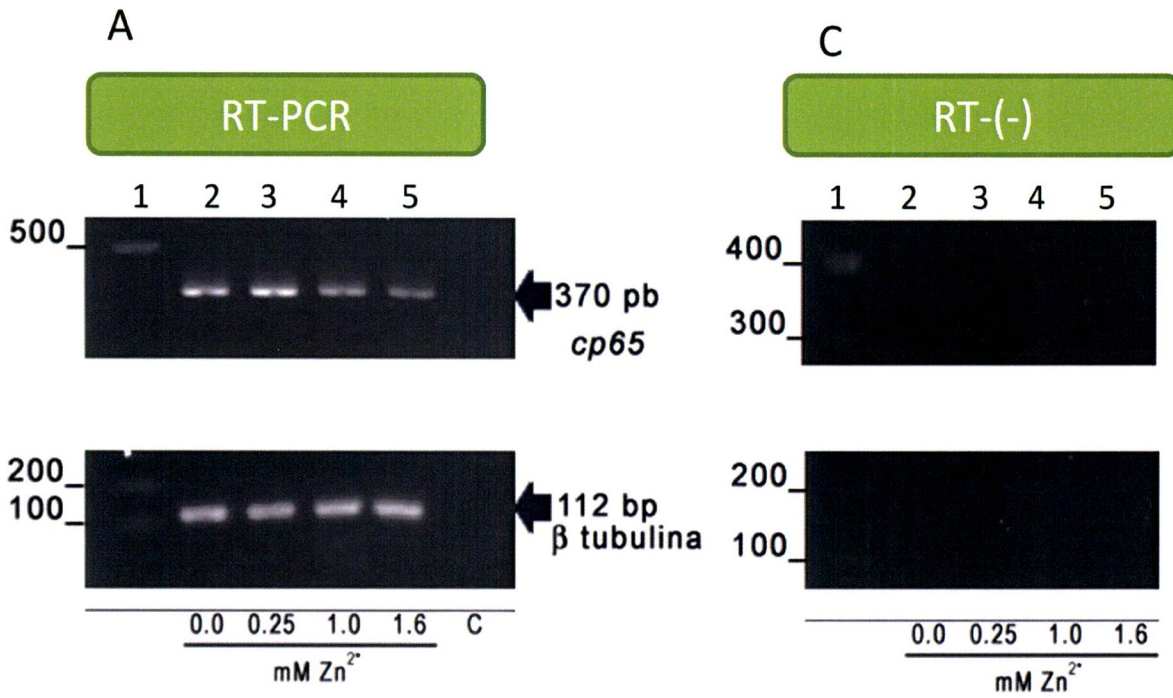


Fig. 15. Expresión del gen *tvcp65* en ausencia y presencia de las distintas concentraciones Zn^{2+} . A) Expresión del gen *tvcp65* en diferentes concentraciones de Zn^{2+} . Carril: 1) marcador de 100 pb, 2) condición normal, 3) 0.25 mM de Zn^{2+} , 4) 1.0 mM de Zn^{2+} , 5) 1.6 mM de Zn^{2+} , en la parte abajo el control de carga con el gen *β tubulina* carril: 1) Marcador de 100pb, 2) condición normal, 3) 0.25mM de Zn^{2+} , 4) 1.0mM de Zn^{2+} , 5) 1.6mM de Zn^{2+} . B) Densitometría de la expresión de *tvcp65* normalizado con *β - tubulina*. C) Control de RT (-) de *tvcp65* así como de *β tubulina*.



B

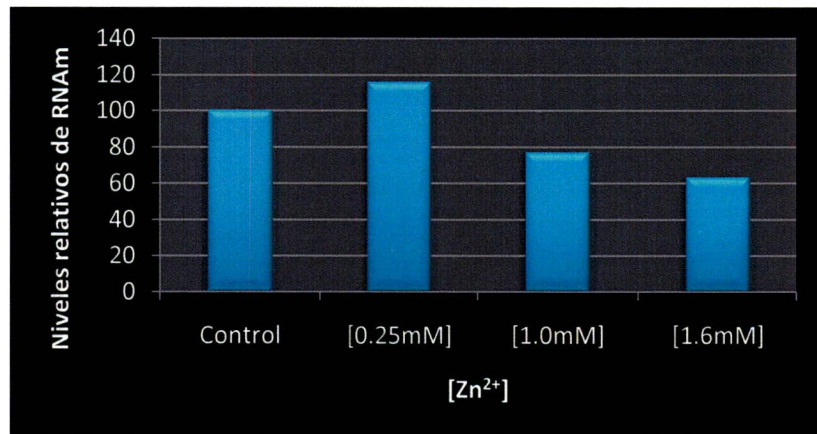


Fig. 16. Cuantificación de la expresión de *tvcp65* en ausencia y presencia de distintas concentraciones de Zn^{2+} . qRT-PCR en tiempo real para cuantificar las diferencias en los niveles del RNAm del gen *tvcp65* en parásitos crecidos en distintas concentraciones de Zn^{2+} . Los datos fueron normalizados contra los valores obtenidos con el gen control usando β -*tubulina*. Control: Parásitos crecidos en ausencia de Zn^{2+} , y en 0.25, 1.0, 1.6mM de Zn^{2+} .

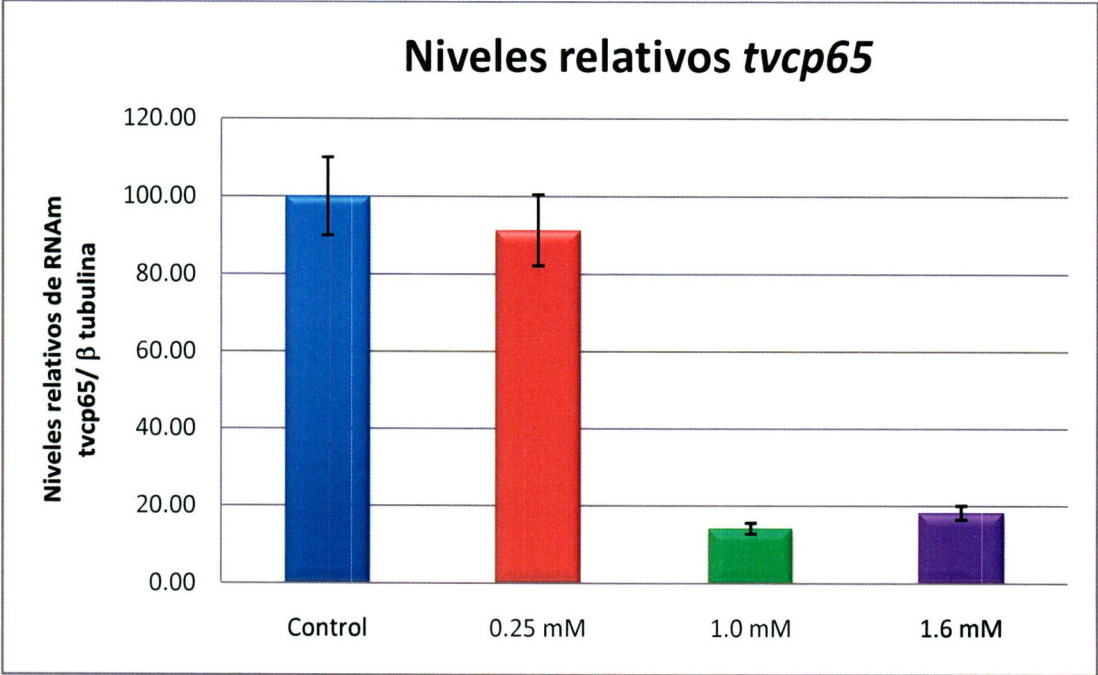
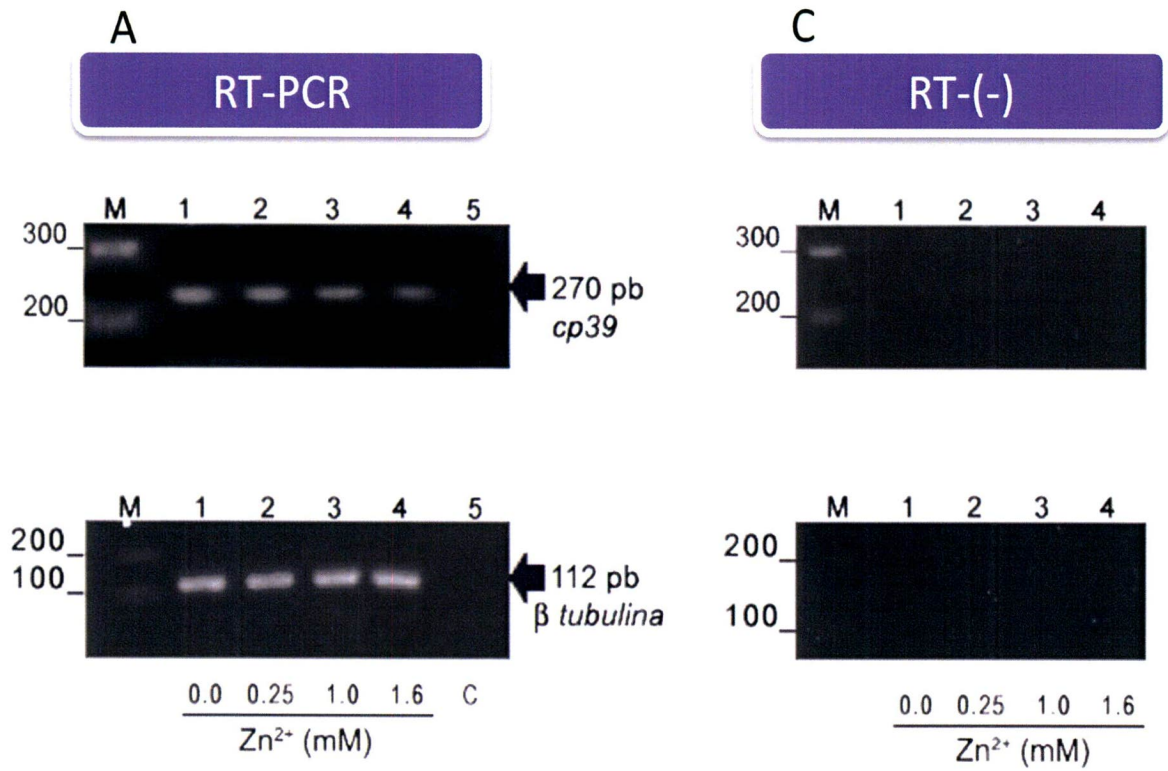


Fig.17. Expresión del gen *tvcp39* en ausencia y presencia de las distintas concentraciones Zn^{2+} . A) Expresión del gen *tvcp39* en diferentes concentraciones de Zn^{2+} . Carril: 1) marcador de 100 pb, 2) condición normal, 3) 0.25mM de Zn^{2+} , 4) 1.0mM de Zn^{2+} , 5) 1.6mM de Zn^{2+} como en la parte inferior el control de carga con el gen *β tubulina* carril: 1) Marcador de 100pb, 2) condición normal, 3) 0.25mM de Zn^{2+} , 4) 1.0mM de Zn^{2+} , 5) 1.6mM de Zn^{2+} . B) Densitometría de la expresión de *tvcp39* normalizado con *β - tubulina*. C) Control de RT (-) de *tvcp39* y en el gel inferior de *β tubulina*.



B

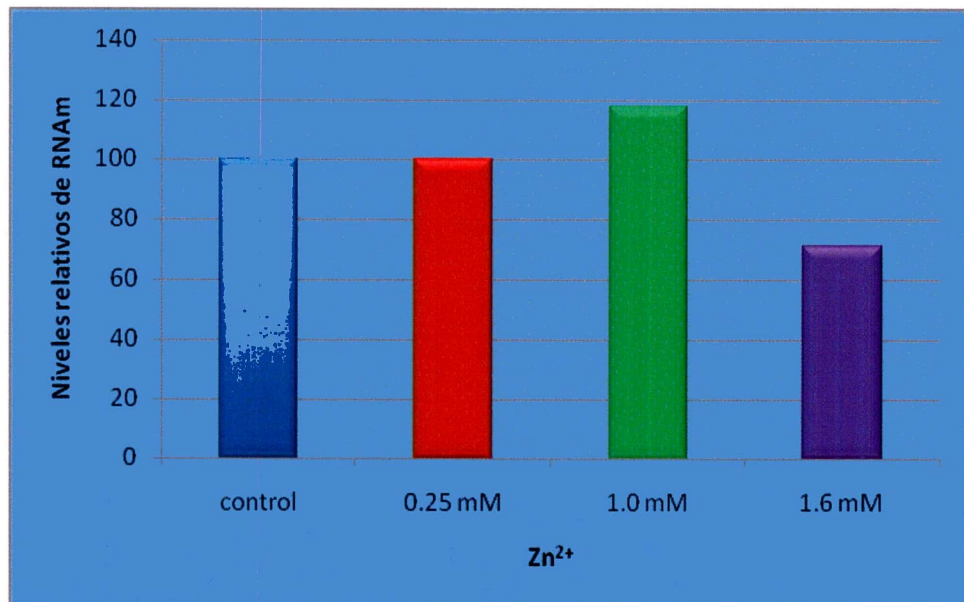


Tabla resumen del efecto del Zn^{2+} en *Trichomonas vaginalis*

	No. Manchas totales	Adhesión	Citotoxicidad	RT-PCR <i>tvcp65</i>	RT-PCR <i>tvcp39</i>	Actividad proteolítica CP65	Actividad proteolítica CP39
Control	185	C	C	C	C	C	C
0.25mM	161	↑	↓	↓	S.V.	↑	↓
1.0mM	155	↓	↓	↓	↑	↓	↑
1.6mM	148	↓	↓	↓	↓	↓	↓
(C) control , (S.V.) sin variación , ↑ indica aumento o ↓ disminución de la determinación sobre las diferentes concentraciones de Zn^{2+}							

VI. DISCUSIÓN

En *Trichomonas vaginalis* el hierro regula distintas propiedades de virulencia, como la síntesis de adhesinas, la actividad proteolítica de cisteín proteínasas (CP65 y CP39) así como el transcrito de estos genes (*tvcp65* y *tvcp39*) y la citotoxicidad del parásito hacia las células del hospedero, entre otras propiedades de patogenicidad (Alderete y Garza, 1988; Dailey y Alderete, 1991; Arroyo y col., 1992). Este hierro puede estar presente en el microambiente de la vagina y las fluctuaciones de Fe^{2+} ocurren durante el ciclo menstrual. Por otra parte, en el fluido prostático se encuentra presente el Zn^{2+} a concentraciones dentro del rango 4.5 a 7 mM; este catión es capaz de resolver la infección provocada por este parásito, debido a que presenta un efecto tricomonocida a las concentraciones reportadas en los fluidos prostáticos. Cabe mencionar que los perros pueden desarrollar tricomonosis cuando en sus fluidos prostáticos los niveles de Zn^{2+} son inferiores a 0.8 mM (Krieger y Rein, 1982). Este dato representa un antecedente directo a este estudio, y generó la interrogante de que es lo que sucede con el parásito, sus moléculas y propiedades en presencia de Zn^{2+} y que le permiten al parásito adaptarse al microambiente de la próstata. En este trabajo se estudió el efecto del Zn^{2+} sobre el crecimiento, las propiedades de virulencia y la expresión génica de *T.vaginalis*. El Zn^{2+} afecta el crecimiento de este parásito, específicamente el número de duplicaciones disminuyó en presencia de este catión sin embargo, *T. vaginalis* fue capaz de duplicarse y sobrevivir en las diferentes concentraciones de Zn^{2+} utilizadas (0.25, 1.0 y 1.6 mM). Estos resultados correlacionan con los datos previamente obtenidos por Krieger y Rein (1982), en los que encontró a una concentración de 0.8 mM de Zn^{2+} el parásito parece adquirir resistencia y sobrevive a este microambiente

de Zn^{2+} . Sin embargo, a concentraciones mayores (1.6 mM de Zn^{2+}) disminuye su tasa de duplicación. Estos resultados son acordes con el número de parásitos presentes en fluidos prostáticos de perros, considerándose esta concentración como la mínima concentración tricomonocida (Krieger y Rein, 1982).

También se encontró que *T.vaginalis* en presencia de Zn^{2+} cambió a una forma esférica, estos cambios morfológicos son similares a los que presenta *T.vaginalis* cuando se crece en ausencia de Fe^{2+} en donde se ha observado internalización del axostilo y de los flagelos afectando la movilidad de los parásitos. Esta condición de estrés favorece la formación de pseudoquistes (De Jesus y col., 2007).

Hasta el momento los estudios proteómicos de *T.vaginalis* que existen se han enfocado a conocer las proteínas involucradas en el mecanismo de patogenicidad cuando el parásito se encuentra en un microambiente similar al que existe en la vagina y la presencia de Fe^{2+} (De Jesus y col., 2007). Sin embargo, se conoce muy poco de la tricomonosis en hombres, por esta razón, nuestro interés se centró en conocer el mapa proteómico de *T.vaginalis* crecido en diferentes concentraciones de Zn^{2+} , así como la identificación de aquellas proteínas que son expresadas diferencialmente en presencia de este catión. *T.vaginalis* crecidas en presencia de diferentes concentraciones Zn^{2+} expresa diferencialmente algunas proteínas, las cuales posiblemente estén involucradas en la adaptación de *T.vaginalis* al microambiente que existe en la próstata del hombre. No obstante, se requiere de la identificación de estas moléculas por espectrometría de masas, para poder proponer las posibles moléculas involucradas en la adaptación del parásito al microambiente de la próstata. Recientemente,

se identificaron cuarenta y cinco proteínas de expresión diferencial cuando *T. vaginalis* es crecida en presencia y ausencia de Fe^{2+} (De Jesus y col., 2007).

Algunas de las proteínas obtenidas de los mapas proteómicos de *T. vaginalis* crecida en ausencia y presencia de Zn^{2+} coinciden en puntos isoelectrónicos y pesos moleculares con el mapa proteómico de extractos de proteínas totales de *T. vaginalis* crecidos en presencia y ausencia de Fe^{2+} (De Jesus y col., 2007). Un ejemplo de esto es la proteína de choque térmico HSP70, la cual se encontró expresada en bajas concentraciones de Fe^{2+} por lo que podría estar relacionada con el estrés. Esta proteína también se encuentra expresándose diferencialmente en altas concentraciones de Zn^{2+} . Sin embargo este dato podrá ser confirmado con la identificación de esta mancha por MALDI-TOF o bien mediante ensayos Western blot utilizando anticuerpos específicos anti-HSP70 y poder determinar su participación en el estrés bajo las concentraciones de Zn^{2+} .

Se ha sido observado que el primer paso para que se lleve a cabo el establecimiento de este parásito en las células del epitelio vaginal se requiere de la adhesión del parásito y se tienen datos de la adhesión de *T. vaginalis* a diferentes líneas celulares como células HeLa, CHO, MDCK, etc, pero no existe reportes sobre la adhesión del parásito hacia células prostáticas, por lo que el análisis de la adhesión hacia este tipo de células resulta interesante. Nosotros encontramos que la adhesión de los parásitos hacia células DU-145 es menor en un 60% con respecto a las células HeLa. Adicionalmente, la adhesión de los parásitos crecidos a 1.0 y 1.6 mM de Zn^{2+} disminuyó un 30% y 40% respectivamente. Sin embargo en parásitos crecidos a una concentración de 0.25 mM de Zn^{2+} la adhesión aumentó en un 40% comparado con el control, estos resultados podrían sugerir que el aumento en la adhesión

del parásito a las células DU-145 posiblemente se deba a un sistema de resistencia del parásito a ser arrastrado por las secreciones prostáticas y en altas concentraciones de Zn^{2+} (1.6 mM) el parásito se encuentra adaptado a este ambiente.

La citotoxicidad fue otro de los factores de patogenicidad importantes por estudiar en este trabajo, se conoce que existen dos proteasas de 65 y 39 kDa que participan en el daño a las VECs y a células HeLa (Hernández-Gutiérrez y col., 2003; Álvarez-Sánchez y col., 2000). Para conocer la citotoxicidad de *T. vaginalis* hacia las células DU-145, se realizaron cinéticas de citotoxicidad en monocapas confluentes de dichas células, obteniendo como resultado que la citotoxicidad disminuye en parásitos crecidos a 1.6 mM de Zn^{2+} desde las 3 hasta 8 h en un 20% con respecto al control. Esta disminución en la citotoxicidad puede deberse como se ha descrito en *Tritrichomonas foetus* a que el Zn^{2+} es capaz de entrar al hidrogenosoma del parásito vía canales de calcio, el Zn^{2+} sustituye al grupo tiol de las cisteínas estabilizando la estructura cuaternaria de la proteína, interfiriendo con la función del hidrogenosoma, el cual es un organelo esencial para la glicolisis, además de ser el sitio donde se lleva a cabo la formación de moléculas de hidrógeno (Benchimol y col., 1993). Los resultados mostrados, sugieren que el Zn^{2+} podría estar actuando como un inhibidor de cisteín proteínasas, ya que se ha reportado que este catión inhibe reversiblemente bloqueando el grupo tiol de las CPs de *Entamoeba histolytica*, (Franco y col., 1999) este efecto inhibitorio podría explicar porque la infección es menos severa en el hombre.

Para evaluar esto se realizó un análisis de la expresión del transcrito del gen *tvcp65* por RT-PCR y qRT-PCR, el cual disminuyó gradualmente en las diferentes concentraciones Zn^{2+} siendo más notoria la disminución en los parásitos crecidos en 1.6 mM, posiblemente este

resultado pueda ser debido a que el Zn^{2+} a través de proteínas con dedos de zinc descritas en otros organismos, capaces de unirse a RNA, DNA y proteinasas, posiblemente podrían estar regulando estos cambios a nivel postranscripcional (Krishna y col., 2003). Siendo el transcrito menos estable a la concentración de 1.6 mM de Zn^{2+} .

Al analizar el transcrito del gen *tvcp39* en los parásitos crecidos en las diferentes concentraciones de Zn^{2+} se observaron cambios en los niveles de transcrito. El transcrito del gen *tvcp39* en 0.25 mM de Zn^{2+} no mostró variaciones con respecto al control, sin embargo, a 1.0 mM de Zn^{2+} aumentó un 20% respecto al control. En la concentración de 1.6 mM de Zn^{2+} disminuyó un 65% con respecto al control. Esta disminución posiblemente se deba a un mecanismo similar al que se propone para el caso del transcrito de *tvcp65*.

En base a los resultados se propone que el Zn^{2+} presente en las secreciones prostáticas es un importante agente de defensa del tracto genitourinario en el hombre y que este catión se encuentra regulando propiedades de este parásito de manera importante. Sin embargo, el mecanismo de regulación de estas propiedades es desconocido.

VII. RESUMEN DE RESULTADOS.

El proteoma de *T. vaginalis* es diferencial en cada una de las concentraciones de Zn^{2+} , la adhesión y la citotoxicidad se encuentran reducidas en presencia de Zn^{2+} .

La actividad proteolítica de CP65 y CP39 disminuyen en 1.6 mM de Zn^{2+} .

El nivel del transcrito del gen *tvcp65* disminuye en 1.6mM de Zn^{2+} sin embargo la expresión del transcrito de *tvcp39* disminuye en la concentración de 1.6mM de Zn^{2+} .

VIII. CONCLUSION.

El proteoma, la adhesión y la citotoxicidad de *T. vaginalis* se encuentran reducidos en presencia de Zn^{2+} así como los niveles del transcrito de *tvcp65*.

IX. PERSPECTIVAS.

- ❖ Secuenciar las proteínas que se expresan de manera diferencial en presencia de Zn^{2+}
- ❖ Clonar y expresar al menos un gen que se exprese diferencialmente en presencia de Zn^{2+}
- ❖ Obtención de anticuerpos contra la(s) proteína(s) diferencial(es) recombinante.
- ❖ Inmunodetectar la(s) proteína(s) candidato en muestras de hombres.

X. REFERENCIA BIBLIOGRAFÍA.

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

ALDERETE J.F, KASMALA L, METCALFE E., AND GARZA G.E. 1986. Phenotypic variation and diversity among *Trichomonas vaginalis* and correlation of phenotype with tricomonal virulence determinants. Infect Immun. 53:285-293.

ALDERETE J.F., PROVENZANO D. AND LENKER M.W. 1995a. Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. *Microb Pathogen*. 57:193-202.

ALDERETE J.F., LEHKER M., AND ARROYO,R. 1995b. The mechanisms and molecules involved in cytoadherence and pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parásitol. Today* 116:45-86.

ALDERETE J.F. 1999. Iron modulates phenotypic variation and phosphorylation of p270 in double-stranded RNA virus-infected *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.*67:298-302.

ALDERETE JF, BENCHIMOL M, LEHKER MW, CROUCH ML. 2002. The complex fibronectina *Trichomonas vaginalis* interactions and Trichomonosis. *Parásitol Int.* 51, 3,285.
javascript:PopUpMenu2_Set(Menu12243782)

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. 1988 Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence.. *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* involved in cytotoxicity. *Microbial Pathog.* 28, 193.

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.

BENCHIMOL. M, AQUINO. J, LINS. U, RODRIGUES.N, AND SOUZA.W. 1993. Electron Microscopic Study of the Effect of Zinc on *Tritrichomonas foetus*. Antimicrobial Agent and Chemotherapy. Vol.37, 12.

BENCHIMOL.M, ANDRADE.I, SILVA.R AND BURLA. J.2008. *Trichomonas* adhere and phagocytose esperm cells: adhesion seems to be a prominent stage during interaction. Parásitol Res 102:597-604.

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.

BOZNERP, GOMBOSOVA A, VALENT M, DEMES P, ALDERETE J.F. 1992 .Proteinases of *Trichomonas vaginalis*: antibody response in patients with urogenital trichomoniasis. Parásitologica 11:457-468.

CASTILLO D.C AND CASSORLA F. 1999.Trace minerals in human growth and development. J Pediatr Endocrinol Metab, 12(5 Suppl2):589-601.

CAVAN K.R., GIBSON R.S., GRAZIOSO C.F., ISALGUE A.M AND SOLOMONS NW. 1993. Growth and body composition of periurban Guatemalan children in relation to zinc status: a cross-sectional study. *Am J Clin Nutr*, 57:334-343.

CHANG J.H, RYANG Y.S, KIM S.K, AND PARK J.Y.2004. *Trichomonas vaginalis*-induced apoptosis in RAW264-7 cells is regulated through Bcl-xL, but not Bcl-2. *Parasite Immun.*26:141-150.

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.

DEJESUS. J, CUERVO.P, JUNQUEIRA. M, BRITO. C, COSTA. F, FILPO. S, SOARES. J, CUPOLILLO. E, FERNANDES. O, DOMONT G. 2007. A further proteomic study on the effect of iron in the human pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Proteomics* 7, 1961-1972

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/>

FAVIER A.E. 1992 Hormonal effects of zinc on growth children. *Biol. Trace. Elem Res*, 32:383-398.

FAVIER A.E.1992b. The role of zinc in reproduction. Hormonal mechanisms. *Biol. Trace. Elem Res*, 32:363-381.

FRANCO E., ARAUJO R.M AND MEZA I. 1999. Specific and Reversible Inhibition of *Entamoeba histolytica* Cysteine-Proteinase Activities by Zn²⁺: Implications for Adhesion and Cell Damage. *Archives of Medical Research* 30:82-88.

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.

GERBASE, A.C; ROWLEY,J.T; HERMAN, D.H.L;BERKLEY; S.F.B;PIOT,P. 1998. Sex. Transm.Inf. 74:S12-S16.

GILBERT RO, ELIA G, BEACH DH, KLAESSIG S, SINGH BN. 2000 Cytopathogenic effect of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultured in vitro. Infect Immun. Jul;68(7):4200-6.

GILLIN F.D. AND SHER.A 1981. Activation of the alternative complement pathway by *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultured in vitro. 68:4200-4206.

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.

HUANG Y. YI CHIEN.K,CHUN Y, MINHSU. W, RUEI.R, AND TANG. P.2008. A proteome map of *Trichomonas vaginalis* .Parásitol Res. Springer-Verlag 2008.

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.

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.

KANG J.H., SONG H.O., RYU., J.S., SHIN M.H., KIM J.M., CHO Y.S., ALDERETE J.F., AHN M.H., AND MIND.Y.2006. *Trichomonas vaginalis* promotes apoptosis of human neutrophils by activating caspase-3 and reducing Mcl-1 expression. Parasite Immunol.28:439-446.

KIGOZI GG, BRAHMBHATT H, WABWIRE-MANGEN F, WAWER MJ, SERWADDA D, SEWANKAMBO N, GRAY RH. 2003. Treatment of *Trichomonas* in pregnancy and adverse outcomes of pregnancy: a subanalysis of a randomized trial in Rakai, Uganda. *Am J Obstet Gynecol.* Nov;189(5):1398-400.

KHOSHMAN.A, PROVENZANO D, ALDERETE J F.1994. Unique double-stranded RNAs associated with the *Trichomonas vaginalis* virus are synthesized by viral RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of virology*;68(11):7108-14.

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

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

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

KRIEGER JN, TORIAN BE, HOM J, AND TAM,M.R 1990. Inhibition of *Trichomonas vaginalis* motility by monoclonal antibodies is associated with reduced adherence to HeLa cell monolayers. *Infect Immun.* Jun;58(6):1634-9.

KRISHNA S, MAJUMDAR I, AND GRISHIN V. 2003. Structural Classification of zinc fingers. *Nucleic Acids.* 31.2

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.

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.

LEHKER M. W. AND ALDERETE J .F. 1992 Iron regulates growth of *Trichomonas vaginalis* and the expression of immunogenic trichomonad proteins. Molecular microbiology ;6(1):123-32.

MCLELLAN R, SPENCE MR, BROCKMAN M, RAFFEL L, SMITH JL. 1982. The clinical diagnosis of trichomoniasis. Obstet Gynecol. Jul;60(1):30-4.

MENDOZA-LÓPEZ M. REMEDIOS, BECERRIL-GARCÍA CECILIA, FATTEL-FACENDA 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.

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.

MUSATOVOVA O; ALDERETE J F 1999. The *Trichomonas vaginalis* phenotypically varying P270 immunogen is highly conserved except for numbers of repeated elements. Microbial pathogenesis 27(2):93-104.

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.

PETRIN.D, DELGATY.K, BHATT.R, AND GARBER.G.1998. Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*.*Clinical Microbiology*. 11:2.

PRASAD A.S.1984. Discovery and importance of zinc in human nutrition. *Fed. Proc*, 43:2829-2834.

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

QUINTAS. LI, OROZCO.E, BRIEBA.LG, ARROYO.R, ORTEGA.J. 2009. Purification, refolding and activation of the re combinant cysteine proteínasas Ehcp112 from *Entamoeba histolytica*. *Protein Expr Pufn*. Jan 63:1.

SOMMER U, COSTELLO C.E, HAYES G.R, BEACH D.H, GILBERT R.O,LUCAS J.J, AND SINGHB.H.2005 Identification of *Trichomonas vaginalis* Cysteine Proteases that Induce Apoptosis in Human Vaginal Epithelial cells. *J.of Biological Chem*.25:23853-23860.

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.

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

SKERK V, SCHONWALD S, GRANIC J, KRHEN I, BARSIC B, MAREKOVIC I, ROGLIC S, DESNICA B, ZELJKO Z. 2002. Chronic prostatitis caused by *Trichomonas vaginalis*--diagnosis and treatment. *J Chemother*. 2002 Oct;14(5):537-8.

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.

STONE K.R., MICKEY DON D., WUNDERLI H., MICKEY G.H AND PAULSON D.F.1978. Isolation of a Human Prostate carcinoma cell line (DU-145). Int.J.Cancer 21:274-281.

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

TUTTLE.J; HOLBROOK.T AND DERRICK .F.1977. Interference of Human Spermatozoal motility by *Trichomonas vaginalis*. Journal of Urology. 118.

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.

WALSH T. CAR'OL.1994. Zinc Health Effects and Reseafch Priorities for the 1990s.Bostori University School of Medicine, Boston, Massachusetts, University of Texas School of Medicine, Galveston, Texas; Wayne State University, School of Medicine, Michigan, Michigan State University, East Lansing,Michigan.102:2:5,6,9,10,321 11994.

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.

XI. APÉNDICE.

Acrilamida al 30% bisacrilamida al 0.8%

Acrilamida 29.2g

Bisacrilamida 0.8g

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

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

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

Tris-HCl/SDS 4x, pH8.8 (1.5M Tris-Cl,0.4%SDS)

Trizma-base (Sigma) 9.08g

SDS (Sigma) 0.2g

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

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

Tris-HCl/SDS 4x, pH6.8 (1.5M Tris-Cl,0.4%SDS)

Trizma-base (Sigma) 3.025g

SDS (Sigma) 0.2g

Disolver en 20 ml de agua destilada y ajustar a pH 6.8 con HCl

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

Persulfato de amonio al 10% (Bio-Rad)

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

TEMED (Bio-Rad)

0.01 ml (10µl)

SDS-amortiguador 2X

Trizma – base 1.52g

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 500µl

β-mercaptoetanol 5% 50µl

Azul de bromofenol 50µl

(stock 10 mg/ml)

Agua destilada 400µl

Amortiguador de electroforesis 5X (stock)

Glicina (Sigma)	72g
Trizma-base (Sigma)	15.1g
SDS (Sigma)	5.0g

Aforar con agua destilada a 1litro.

Amortiguador de electroforesis 1X

Amortiguador de electroforesis 5X	100 ml
Agua destilada	400ml

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 incubar a 37°C para solubilizar.

Gel separador

Poliacrilamida /Bispoliacrilamida al 30%	4.50 ml
4XTris-Cl/SDS pH 8.8	3.75 ml

Gelatina al 9% o Agua destilada	6.75 ml
Persulfato de amonio al 10%	0.05 ml
TEMED	0.01 ml

Gel concentrador

Poliacrilamida /Bispoliacrilamida al 30%	0.65 ml
4XTris-CI/SDS pH 6.8	1.25 ml
Agua destilada	3.05 ml
Persulfato de amonio al 10%	0.025 ml
TEMED	0.005 ml

Buffer de activación de proteasas pH 4.5 3M

Acetato de sodio	13.61 g
DTT	0.154g
Ácido acético	20 ml
Agua destilada	980 ml

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

Tritón 2.5%

Tritón X-100	25 ml
Agua destilada	1000 ml

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	1.0 ml

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

PBS-EDTA 0.2%

PBS 1X pH 7.0

500 ml

EDTA

1g

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

Solución Amortiguadora de Rehidratación

Urea 7M, CHAPS (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato) 4% w/v, DTT 70mM, azul de bromofenol al 0.001%, anfolinas (Bio-Lyte pH 3-10, Bio-Rad) 0.1%.

Rehidratar el CHAPS, la urea y el azul de bromofenol con la muestra de proteína, agregar el DTT y H₂O_d cbp el volumen final deseado de la mezcla. Para tiras gradiente inmobilizado de pH (IPG) de 7cm, mezclar 120µL de la solución amortiguadora de rehidratación con las anfolinas. Las tiras IPG se rehidratan de 10 a 16h a temperatura ambiente.

Solución Amortiguadora de Equilibrio

Urea 6M, Glicerol 30% v/v, Tris pH8.8 50mM, SDS 2% w/v, Azul de bromofenol 0.002%. Las tiras IPG se equilibran 15min en solución amortiguadora de equilibrio con DTT (15 mg/mL) y posteriormente con IAA (37.5mg/mL).

Solución de agarosa para sellar

Agarosa 0.5%w/v, Buffer de corrida 5X 10mL, Azul de bromofenol 0.002%w/v, H₂O_d 40mL. Fundir la agarosa en el H₂O_d y almacenar a 4°C.

Tinción con plata

	Solución	Tiempo
1. Fijación	EtOH 40%, CH ₃ COOH 5%	4h o toda la noche
2. Lavado	EtOH 5%	2x20min
3. Pre-	H ₂ O _d	3x5min

tratamiento	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.2g/L	2min
4. Lavado	H_2O	3x20s
5. Impregnación	AgNO_3 2g/L, formaldehído 37% 0.4 mL/L	25min
6. Lavado	H_2O	2x20s
7. Revelado	NaCO_3 30g/L, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4mg/L, formaldehído 37% 0.4mL/L	10min o según la aparición de los puntos
8. Lavado	H_2O	2x2min
9. Paro	CH_3COOH 10%	10min

Las soluciones de pre-tratamiento, impregnación y revelado deben prepararse al instante. No es recomendable rehusar más de tres veces las soluciones de fijación y paro. Los geles pueden almacenarse en la solución de paro a 4°C hasta por una semana. Antes de secar los geles entre dos hojas de papel celofán, se recomienda hacer un lavado con solución de glicerol al 10% durante 10min.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 20 de Noviembre del 2009, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestra en Ciencias Genómicas, a la Biol. Exp. Laura Isabel Vázquez Carrillo

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez



Dra. Rossana Arroyo Verástegui



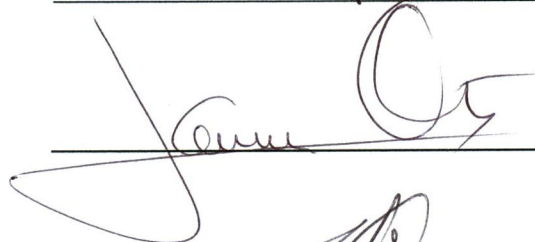
Dr. Mauricio Castañón Arreola



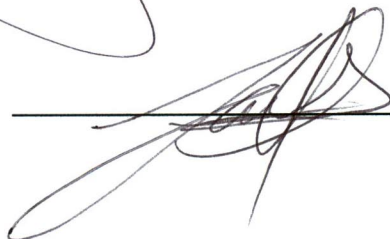
Dra. Rosalía Lira Carmona



Dr. Jaime Ortega López



M. en C. Julio Cesar Torres Romero



Coordinación de Certificación y Registro

UACM
Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada Humano me es ajeno

ESTA TESIS FUE IMPRESA Y EMPASTADA EN:



AV. IPN No. 1927 COL. LINDAVISTA
TELS.: FAX 16 61 13 14 * 42 01 08 59 * CEL. UNEFON 10635881
Email: tesisvyr@gmail.com
AÑO 2009