

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UACM

“RELOCALIZACIÓN DE LA Piruvato-ferredoxin oxido reductasa (PFOR) A LA SUPERFICIE DE *Trichomonas vaginalis*” EN PRESENCIA DE HIERRO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA

Biol. PATRICIA MEZA CERVANTEZ

Directores de Tesis:

Dra. Rossana Arroyo Verástegui
(Cinvestav-IPN)

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez
(UACM)

MÉXICO, D. F.

ENERO 2007

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.

ASESORES DE TESIS:

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez
(CINVESTAV-IPN)

Dra. María Esther Orozco Orozco
(CINVESTAV-IPN
UACM)

Este trabajo se realizó en el laboratorio 11, del Departamento de Patología Experimental del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN) bajo la codirección de las Dras. Rossana Arroyo Verástegui y María Elizabeth Álvarez Sánchez y bajo la asesoría de los Dres. Esther Orozco Orozco y Mario Alberto Rodríguez Rodríguez. El proyecto fue financiado con fondos del Departamento de Patología Experimental del Cinvestav-IPN y de los donativos del CONACYT número 33044-M y 43763-Q. Durante el desarrollo de este trabajo recibí apoyo académico y económico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM).

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de profesores del posgrado de Ciencias Genómicas por la formación y el apoyo académico que siempre me brindaron.

Al posgrado de Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por su apoyo institucional durante mi estancia como alumna.

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) en el posgrado de Ciencias Genómicas, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría y por el apoyo económico otorgado.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN) por proporcionarme las facilidades de sus instalaciones para la realización de los experimentos de mi trabajo de tesis.

AGRADECIMIENTOS

A LA DRA. ROSSANA ARROYO V:

Por ser mí guía en esta etapa y por la paciencia que tuvo hacia mí. Gracias por los consejos que me han permitido seguir adelante.

A LA DRA. ELIZBETH ÁLVAREZ:

Por su asesoría y apoyo en la realización de este proyecto.

A LETY (Leticia Ávila González):

Por el apoyo técnico, académico y también por los consejos que me han permitido culminar esta etapa.

AL TECNICO DAVID A.

Gracias por el apoyo técnico dentro del laboratorio

A CLAUDIA Y EDUARDO:

Gracias por el apoyo académico incondicional a lo largo de este trabajo.

Gracias una vez más por el apoyo moral que he recibido de parte de dos grandes amigos.

A LOS COMPAÑEROS, AMIGOS Y MAESTROS:

Gracias por todo el apoyo que he recibido de compañeros y amigos del laboratorio: Verónica, Rodolfo, Josefina, Iza, Gerardo, Francisco, Julio Cesar, Clemente y Lucero.

A mis compañeros de generación: Alberto, Nonita, Vicenta, Alma y Vero. Gracias por el apoyo académico y moral.

AGRADECIMIENTOS

A MIS PAPÁS

ESTELA Y CARLOS:

Gracias por ser parte de este gran equipo que hemos construido juntos.

Gracias por mi vida y por que en todo momento han sido mi respaldo, siempre han sido mi orgullo.

A GRIS, CARLOS y RICARDO:

Gracias por ser parte de mi vida y apoyarme en todo momento, los quiero mucho.

A MIS AMIGOS:

MONSE, SANDRA, MARIANA, LOLA, DIEGO, RICARDO ANA LILIA, MARICELA y EVELYN:

Gracias por su amistad, por todo lo que seguimos compartiendo.

A MIS HERMANAS

HILDA, RAQUEL, MARALY Y LILIANA:

Gracias por compartir su vida conmigo, siempre serán mis amigas, aunque la vida nos aleje pero sabremos que nos tenemos unas a las otras.

A MIS GRANDES AMIGOS

FRANCISCO

Gracias por estar y por dejarme entrar en tu vida.

MARY

Gracias por compartir parte de esta etapa conmigo y por las experiencias que vivimos juntas.

JORGE

Gracias

ANGEL

Gracias por no abandonarme en los momentos difíciles y por el apoyo incondicional, te quiero mucho.

LORENZO

Gracias por ser parte de mi vida te quiero mucho.

Gracias a las personas que compartieron conmigo otra etapa importante en mi vida que tuvieron que marcharse para tomar un camino distinto al mío.

Por último agradezco de corazón a las personas que han estado en los momentos difíciles que me han hecho levantarme cuando me he caído. ¡GRACIAS!

AGRADECIMIENTOS

DRA. ESTER OROZCO Y

DR. MARIO ALBERTO RODRÍGUEZ

Gracias por sus comentarios y la asesoría en la realización de este trabajo.

DR. JAIME ORTEGA,

DR. LUIS G. BRIEBA y

DR. ARTURO GONZÁLEZ

Por el apoyo académico brindado en la realización de este trabajo.

ABREVIATURAS

AP	Proteína adhesina
ATP	Adenosín trifosfato
BM1×	Amortiguador de muestra 1×
cDNA	DNA complementario
CNCD	Centro Nacional de Clínica de Displasias del Hospital General
CoA	Coenzima A
CPs	Cisteín proteinasas
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfatos
FD	Ferredoxina
g	gravedad
HeLa	Línea celular de cáncer cervical humano
Hyd	Hidrogenasa
ITS	Infecciones de transmisión sexual
kDa	Kilodaltones
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PDH	Piruvato deshidrogenasa
Pfo3.4s	Gen <i>pfor a</i> (después de la metionina –antes del codón de paro)
PFOR	Piruvato ferredoxín óxido reductasa
PFOR50	Fragmento de la Piruvato ferredoxín óxido reductasa recombinante de 50 kDa
PFOR70	Fragmento de la Piruvato ferredoxín óxido reductasa recombinante de 70 kDa
Anti-PFOR50	Anticuerpo contra la recombinante PFOR50
PFORApep	Péptido sintético específico para PFOR A
Anti-PFORApep	Anticuerpo anti-PFORApep
<i>pfor a</i>	Gen a de la piruvato ferredoxín oxido reductasa.
<i>pfor b</i>	Gen b de la piruvato ferredoxín oxido reductasa

rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
s	segundos
TAE	Amortiguador de Tris-Acetato
TE	Amortiguador Tris-EDTA
TTP	Tiamina pirofostato
u	Unidades
UTR	Región no traducida (“Untranslated Region”)
VECs	Células epiteliales vaginales
X-Gal	5- bromo- 4-cloro-e-indol- β -D-galactopiranósido

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos

Índice de Figuras

Índice de Tablas

1.- RESUMEN	15
2.- INTRODUCCIÓN	17
2.1 Epidemiología	17
2.2 Manifestaciones clínicas	19
2.3 Tratamiento	20
2.4 Características generales	20
2.4.1 Agente etiológico y morfología	20
2.4.2 Biología de <i>T. vaginalis</i>	22
2.4.3 Ciclo de vida	22
2.4.4 Metabolismo	25
2.4.5 Mecanismo de acción del metronidazol	29
2.4.6 Regulación por hierro	30
2.5 Patogénesis	31
2.5.1 Citoadherencia	31
2.5.2 Citotoxicidad	33
2.5.3 Evasión de la respuesta inmune	34
2.5.4 Apoptosis	35
3.- ANTECEDENTES	35
4.- JUSTIFICACIÓN	45
5.- HIPÓTESIS	46
6.- OBJETIVOS	47
6.1 Objetivo general	
6.2 Objetivos particulares	
7.- ESTRATEGÍA	48
7.1 Efecto del Fe ²⁺ al nivel transcripcional de genes homólogos a <i>pfor a.</i>	48

7.2 Estudiar el efecto del Fe ²⁺ en la localización de PFOR A de <i>T. vaginalis</i>	49
7.2.1 Clonar y expresar la región carboxilo terminal de la PFOR A de <i>T. vaginalis</i>	49
7.2.2. Generar anticuerpos policlonales contra la región carboxilo terminal de la PFOR A de <i>T. vaginalis</i> .	50
7.2.2.1 Producir anticuerpos anti-péptido divergente.	51
7.2.3.-Determinar la localización de PFOR en el parásito crecido en altas concentraciones de Fe ²⁺ .	52
8.- METODOLOGÍA	53
8.1 Cultivo de <i>T. vaginalis</i>	53
8.2 Extracción de DNA genómico	53
8.3 Diseño de iniciadores para la amplificación de fragmentos divergentes de genes homólogos a PFOR A.	54
8.4 Amplificación por PCR de fragmentos divergentes de genes homólogos a PFOR	57
8.5 Clonación de los productos de amplificación en el vector PCRII-TOPO (Invitrogen) de los genes homólogos al gen <i>pfor a</i>	58
8.6 Selección de clonas por "PCR colony"	58
8.7 Extracción de DNA plasmídico	59
8.8 Purificación de DNA para secuenciación	60
8.9 Congelación de clonas de <i>E. coli</i> recombinantes	61
8.10 Secuenciación de DNA	61
8.11 Extracción de RNA total de <i>T. vaginalis</i>	61
8.12 Síntesis de cDNA de <i>T. vaginalis</i> para ensayos de RT-PCR	62
8.13 RT-PCR	63
8.14 Diseño de iniciadores con sitios de restricción	64
8.15 Amplificación de los fragmentos de 1.1 y 1.9 kb de PFOR A	66
8.16 Clonación y expresión de fragmentos de PFOR A en un sistema procarionte	66
8.17 Inducción de las proteínas recombinantes PFOR50 y PFOR70 con IPTG	69

8.18 Purificación de las proteínas recombinantes por afinidad a níquel	70
8.19 Producción de anticuerpos anti-PFOR50	71
8.20 Extracción de proteínas totales por precipitación con ácido tricloroacético (TCA)	71
8.21 Electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa	72
8.22 Ensayos de Western blot	74
8.23 Fijación de parásitos para inmunolocalización	74
8.24 Inmunofluorescencia indirecta	75
8.25 Selección y diseño de un péptido sintético	76
8.26 Producción de anticuerpos anti-péptido divergente	77
9.- RESULTADOS	
9.1 Efecto del hierro en la transcripción de genes homólogos a PFOR A.	79
9.2 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes codificadas por los fragmentos de 1.1 y 1.9 kb del gen <i>pfor a</i>	81
9.3 Reconocimiento de las proteínas recombinantes PFOR50 y PFOR70 por el anticuerpo anti-histidinas.	90
9.4 Obtención de anticuerpos anti-PFOR50 en ratón	91
9.5 Obtención de anticuerpos contra un péptido sintético específico para PFOR A	95
9.6 Localización de PFORs en el parásito con el anticuerpo anti-PFOR50	103
9.- DISCUSIÓN	112
10.- CONCLUSIONES	120
11.- PERSPECTIVAS	121
12.- BIBLIOGRAFÍA	122
13.- APÉNDICE	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Incidencia de casos registrados de pacientes con tricomonosis a nivel nacional	18
Figura 2	Morfología de <i>Trichomonas vaginalis</i>	21
Figura 3	Ciclo de vida de <i>Trichomonas vaginalis</i>	24
Figura 4	Metabolismo del piruvato en hidrogenosomas de <i>T. vaginalis</i>	28
Figura 5	Reconocimiento específico del anti-TvAP120 por Western blot	38
Figura 6	Alineamiento múltiple del fragmento que reconoce el anticuerpo anti-EhPFOR y anti-PFOR A.	40
Figura 7	Alineamiento múltiple en aminoácidos de las diferentes PFOR de <i>T. vaginalis</i> ya reportadas	42
Figura 8	Comparación de los motifs de nuevas secuencias que codifican para proteína tipo PFOR.	44
Figura 9	Mapa de los vectores de expresión pCold I y pET32a(+).	68
Figura 10	Alineamiento múltiple de aminoácidos de las secuencias homólogas a PFOR A	83
Figura 11	Efecto del hierro en la transcripción de genes homólogos a PFOR A.	84
Figura 12	Amplificación por PCR de los fragmentos de 1.9 y 1.1 kb del gen <i>pfor a</i> .	85
Figura 13	Análisis por restricción de las clonas candidatas con el vector pET32a(+).	86
Figura 14	Expresión de las proteínas PFOR50 y PFOR70 codificadas por los fragmentos de 1.9 y 1.1 kb contenidos en el vector pET32a(+).	87
Figura 15	Purificación de la recombinante de 50 kDa por cromatografía de afinidad a níquel.	88
Figura 16	Purificación de la recombinante de 70 kDa por cromatografía de afinidad a níquel.	89
Figura 17	Reconocimiento de las proteínas recombinantes PFOR A de 50 y 70 kDa por el anticuerpo anti-histidinas.	92

Figura 18	Reconocimiento de las proteínas recombinantes PFOR50 y PFOR70 por el anticuerpo anti-TvAP120.	93
Figura 19	Reactividad del anticuerpo anti-PFOR50	94
Figura 20A	Selección de la región divergente del fragmento de 1.1 kb de la PFOR A	97
Figura 20B	Análisis hidropatía del péptido divergente PFORA seleccionado	98
Figura 20B1	Análisis hidropatía del péptido divergente en la secuencia completa de PFOR A.	99
Figura 20B2	Análisis <i>in silico</i> del péptido divergente en el fragmento divergente 1.1 kb de PFOR A	99
Figura 20C	Porcentaje de identidad del péptido en la base de datos de <i>T. vaginalis</i>	100
Figura 20D	Porcentaje de identidad del péptido en el genoma del ratón	100
Figura 20E	Estructura teórica en 3D de PFOR de <i>D. africanus</i> cristalizada	101
Figura 20F	Estructura teórica en 3D de PFOR A de <i>T. vaginalis</i>	101
Figura 21	Reconocimiento de la proteína PFOR50 por el anticuerpo generado contra PFORA (anti-PFORApep).	102
Figura 22	Localización de PFOR con oro coloidal de PFOR en criocortes de <i>T.vaginalis</i> .	106
Figura 23	Reconocimiento en la superficie y de organelos citoplasmicos de <i>T. vaginalis</i> por el anticuerpo anti-PFOR50.	107
Figura 24	Localización de PFOR en la superficie de <i>T. vaginalis</i> .	105
Figura 25	Localización de PFOR en la superficie de <i>T. vaginalis</i> .	109
Figura 26	Localización de PFOR en la superficie del parásito	110
Figura 27	Localización de PFOR A en la superficie del parásito	111

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1	Localización de las secuencias homólogas a PFOR A encontradas en el TIGR.	55
TABLA 2	Secuencias y ubicación de los iniciadores para amplificar los fragmentos de los genes homólogos a PFOR A.	56
TABLA 3	Oligonucleótidos para amplificar los fragmentos 1.1 y 1.9 kb de PFOR A con sitios de restricción en un vector de expresión.	65
TABLA 4	Esquema de inmunización de ratones Balb/c con la recombinante PFOR50.	73
TABLA 5	Esquema de inmunización utilizado para generar anticuerpos anti-peptido.	78

1.- RESUMEN

La tricomonosis es una de las infecciones de transmisión sexual más comunes a nivel mundial, causada por el protozoario flagelado *Trichomonas vaginalis*. En *T. vaginalis*, la adhesión es un proceso multifactorial en el que participan adhesinas, receptores y factores ambientales como el hierro. Las adhesinas AP65, AP51, AP33, AP23 y AP120 están reguladas positivamente por hierro a nivel de transcripción y traducción. Las adhesinas muestran homología con enzimas metabólicas del parásito y del hospedero. En estudios recientes se demostró que la AP120 tiene homología a la piruvato ferredoxin oxido reductasa A (PFOR A), una enzima presente en la membrana de los hidrogenosomas de *T. vaginalis*. Además, en concentraciones altas de hierro, la AP120 se sobreexpresa y se relocaliza a la superficie del parásito. Por otro lado, para analizar el efecto del Fe^{2+} a nivel transcripcional de PFOR A por ensayos de RT-PCR se amplificó un fragmento del extremo carboxilo-terminal (1.1 kb) de la PFOR A solo en altas concentraciones de hierro. En este fragmento se ubican 11 péptidos identificados por MALDI-TOF de la mancha no. 1 que constituye a la proteína de 120 kDa. Por ello, en este trabajo se estudió el efecto del Fe^{2+} en genes homólogos a *pfor a*, encontrados en el genoma de *T. vaginalis* (*pfor c*, *d* y *e*). Ninguno de los genes *pfor c*, *d* o *e* se transcribieron en las concentraciones de Fe^{2+} probadas. Estos datos indican que solo la PFOR A se expresa en altas concentraciones de hierro por lo que podría relocalizarse a la superficie del parásito. Para probar esta hipótesis, se expresaron dos proteínas recombinantes (PFOR50 y PFOR70) en un sistema procarionte, estas proteínas corresponden al extremo carboxilo-terminal de la PFOR A, las cuales se purificaron por cromatografía de afinidad a níquel. Con la proteína PFOR50 se generaron anticuerpos en ratón (anti-PFOR50). Estos

anticuerpos se probaron por ensayos de Western blot los cuales presentaron un reconocimiento cruzado entre el anticuerpo anti-PFOR50 y el anticuerpo anti-TvAP120, que es un anticuerpo hecho para la adhesina de 120 kDa. Estos anticuerpos reconocieron a las proteínas recombinantes PFOR70 y PFOR50 y una proteína de 120 kDa en extractos totales de parásitos crecidos en altas concentraciones de hierro. Además, se diseñó un péptido sintético de la región divergente entre PFOR A y PFOR B debido a su alta identidad entre las secuencias de las dos moléculas, con este péptido se generaron anticuerpos específicos para PFOR A. Con estos anticuerpos se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta para localizar a moléculas tipo PFOR en el parásito. Los resultados demostraron que PFOR A se localiza en los hidrogenosomas, en el citoplasma y en la superficie de *T. vaginalis* cuando los parásitos crecen en altas concentraciones de hierro. Nuestros datos muestran que hay una relocalización de la PFOR A de los hidrogenosomas a la superficie del parásito en presencia de hierro.

2.- INTRODUCCIÓN

2.1.-Epidemiología

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) representan uno de los principales problemas de salud pública al 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 pueden transmitirse por vía sexual (www.saludpublica.com. 2005). Una de las ITS que se presenta con mayor frecuencia, principalmente en las mujeres, es la tricomonosis causada por el parásito protozoario *Trichomonas vaginalis*, ya que existen alrededor de 250 millones de personas en el mundo afectadas por este padecimiento (OMS, 2005). La prevalencia varía entre las poblaciones estudiadas en un rango de 5-74% en mujeres y 5-29% en hombres (Anorlu y col., 2001).

En México esta infección se encuentra distribuida principalmente en la zona centro y sur del país. Los estados de Veracruz y México registran el mayor número de casos con un porcentaje de 15.1% y 7.8%, respectivamente y en Puebla con 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). En la **Figura 1** se muestra un incremento en el número de casos registrados a partir de 1999 (149,937), registrándose en 2002 el valor máximo (210,290), hasta el 2006 en el que se registran 157,270 casos de pacientes con tricomonosis a nivel nacional.

Esta enfermedad prevalece en regiones de clima cálido, en mujeres en edad fértil, de vida sexual activa con múltiples compañeros sexuales e higiene personal pobre (Arroyo, 2000).

Incidencia de Tricomonosis en México

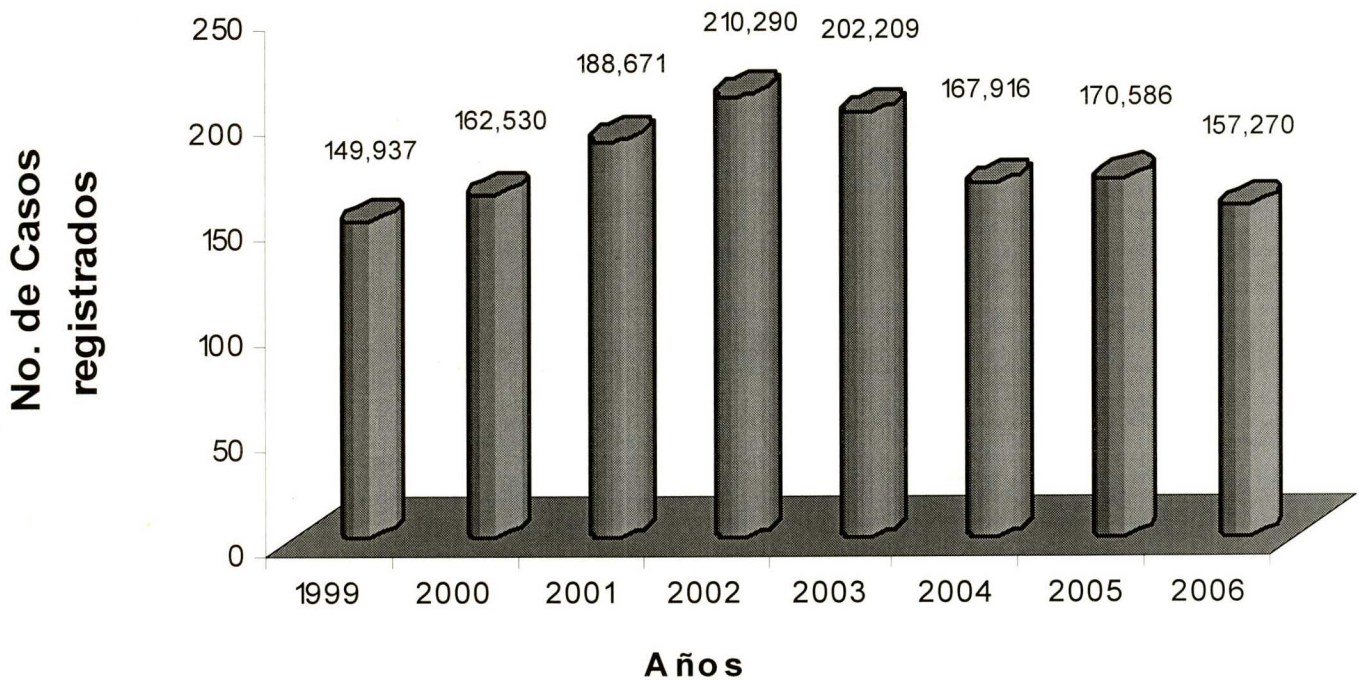


Figura 1. Incidencia de casos registrados de pacientes con tricomonosis en México desde 1999 hasta el 2006 (Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica, SSA, 2006).

2.2.- Manifestaciones clínicas

El periodo de incubación de la tricomonosis en la mujer es de 5 a 30 días. Esta infección puede ser asintomática, aguda o crónica. De un 25 a un 50% de mujeres infectadas son asintomáticas, con pH normal de 3.8 a 4.2 y flora normal en la vagina (Spiegel, 1990). En la infección aguda, los síntomas varían, empeorando durante la menstruación y el embarazo (Krieger y col., 1982a; 1982b). En la infección crónica, los síntomas son leves, con prurito y dispareunia, aunque puede haber secreción vaginal escasa y mezclada con moco. Aunque, la vaginitis es la manifestación más común, la vagina y el cérvix presentan edema y placas eritematosas que son descritas como “cérvix de fresa”. Otras complicaciones asociadas con esta parasitosis son la predisposición a la endometritis, la infertilidad, los embarazos de alto riesgo, el cáncer cérvico-uterino y la susceptibilidad a la infección por VIH (Petrin y col., 1998). Además, puede provocar infecciones respiratorias en niños recién nacidos de madres infectadas con tricomonosis (Szarka y col., 2002; Temesvari, 2002).

El hombre infectado generalmente es asintomático por lo que es considerado como un reservorio del parásito. La mayoría de las veces la tricomona se aloja en la uretra, aunque en ocasiones se localiza también en la próstata y vesículas seminales (Honigberg, 1990). Sin embargo, cuando se presentan síntomas se puede observar una tricomonosis aguda caracterizada por una uretritis purulenta; pero también se puede presentar como una infección asintomática, la cual es clínicamente indistinguible de la uretritis no gonocócica (Krieger, 1995).

2.3.- Tratamiento

Existen medicamentos antimicrobianos de amplio espectro que se utilizan comúnmente para el tratamiento de parasitosis como amibiasis, giardiasis y tricomonosis como los 5- nitroimidazoles entre los que se encuentra el tinidazol y metronidazol. El metronidazol fue originalmente sintetizado y aprobado para ser utilizado contra la tricomonosis en 1959 (Durel y col., 1967).

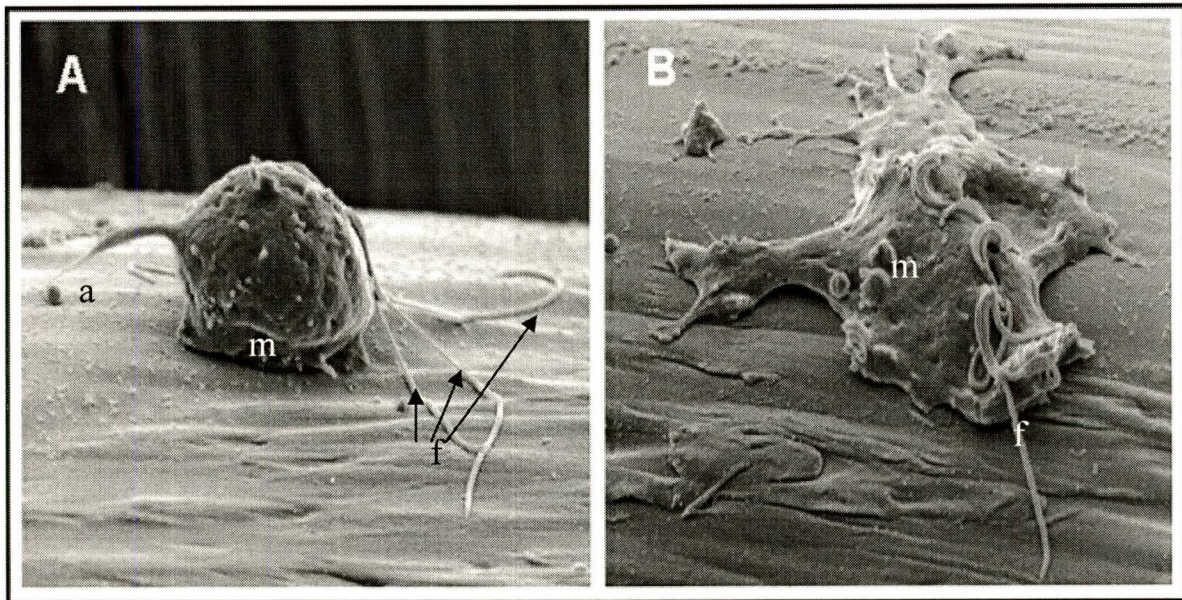
La dosis de metronidazol por vía oral recomendada es de 1.5 a 2 g por un periodo de 7 días (Martínez, 2001). La concentración mínima letal de metronidazol es de 25 a 317.5 µg/ml para aislados resistentes y de 3.1 a 12.5 µg/ml de metronidazol para aislados susceptibles a la droga (Tachezy y Kulda, 1991). Otras vías de administración son tópica e intravenosa o la dosis única es de 2 g por vía oral.

2.4.- Características generales

2.4.1.-Agente etiológico y morfología

T. vaginalis es un protozooario flagelado que mide 10-20 µm de largo, aun cuando puede llegar a medir hasta 30 µm y 7 µm de diámetro. Es organismo pleomorfico que presenta una forma ovoide o ameboide dependiendo de las condiciones en las que se encuentre, presenta cuatro flagelos anteriores libres y uno recurrente adosado a la membrana ondulante, el cual carece del extremo posterior libre (**Fig. 2**).

La membrana ondulante ocupa aproximadamente el tercio anterior del cuerpo del parásito. El núcleo es excéntrico con la cromatina distribuida uniformemente. Además, en la región de la costa y del axostilo existen gran cantidad de gránulos siderófilos, entre los que se encuentran los hidrogenosomas (Tay, 1995).



Ovoide

Ameboide

Figura 2. Morfología de *Trichomonas vaginalis*. Formas en la que se puede presentar el parásito. **A.** Ovoide: a) axostilo f) flagelo, m) membrana ondulante. **B.** Amebóide (Tomado de la tesis de Doctorado de Moreno-Brito, 2005).

2.4.2.-Biología de *Trichomonas vaginalis*

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino	Protista
Phylum	Protozoo
Subphylum	Sarcomastigophora
Clase	Zoomastigophorea
Subclase	Zoomastigia
Orden	Trichomonadida
Familia	Trichomonadidae
Género	<i>Trichomonas</i>
Especie	<i>Trichomonas vaginalis</i>

2.4.2.- Ciclo de vida

El ciclo biológico de *T. vaginalis*, es directo, el parásito se transmite de persona a persona por contacto sexual (**Fig 3**), en forma de trofozoíto uninucleado y se establece en la mucosa vaginal, uretral y prostática.

Los parásitos se adhieren a la mucosa de la vagina y del exocérvix donde permanecen a pesar de las condiciones adversas: a) pH ácido; b) cambios hormonales cíclicos; c) descamación del epitelio; d) nutrientes escasos; e) presencia de lactobacilos y g) flujo menstrual, entre otras.

T. vaginalis se alimenta de componentes solubles, células del huésped, bacterias y eritrocitos (fagocitosis) para obtener hierro (Honigberg, 1990); este organismo tiene una alta dependencia de este nutriente 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).

Este protozoo se multiplica por fisión binaria que empieza con la división nuclear, después la del blefaroplasto y el resto de los organelos (**Fig 3**). Finalmente, se originan dos células hijas (Gómez-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 caracterización de la mitosis en *T. vaginales* mostró la presencia de las 5 fases clásicas: profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis (Gómez-Conde y col., 2000). La cromatina de *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, 2000).

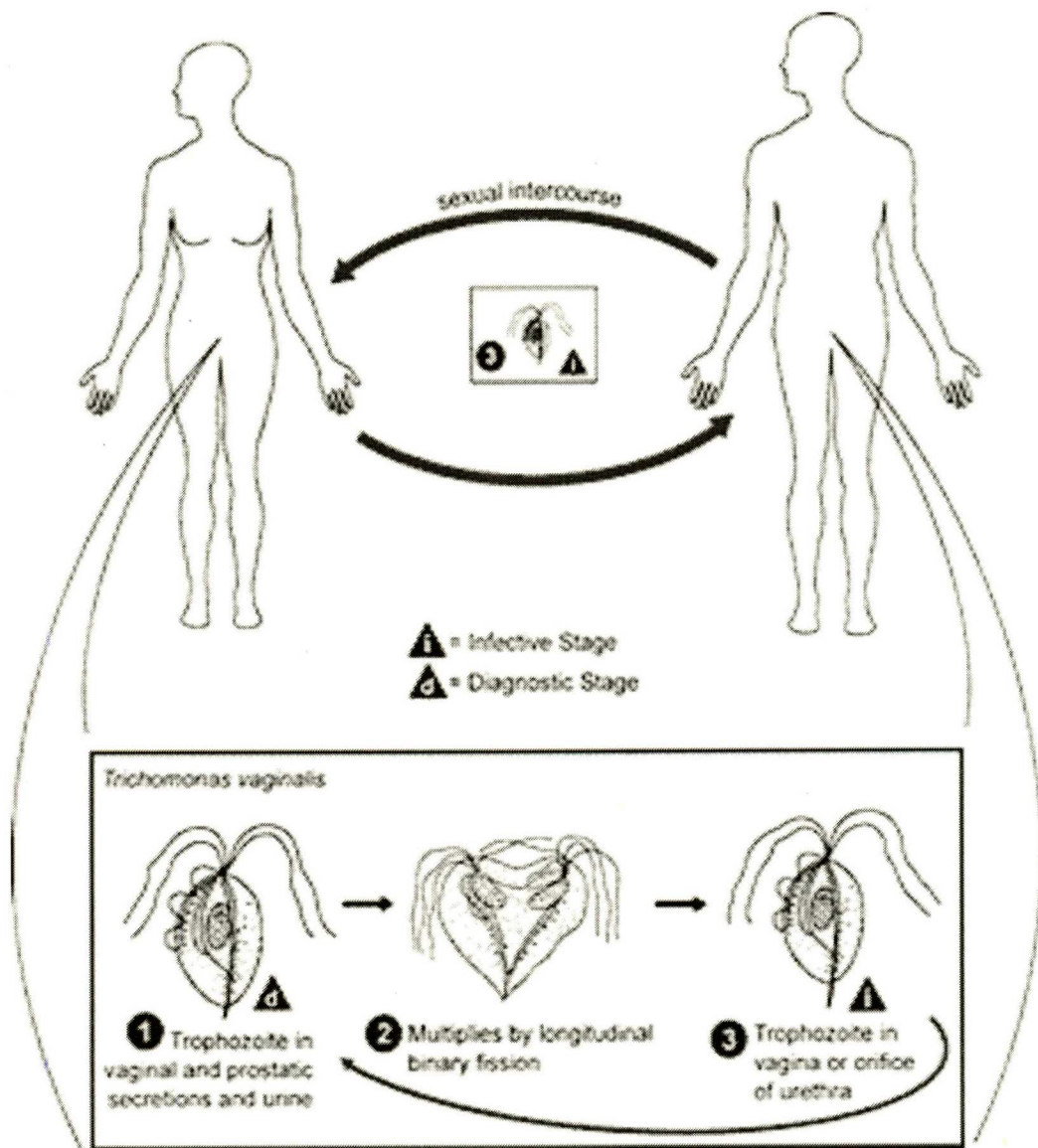


Figura 3. Ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis*. i: Estado infectivo. d: Estado de diagnóstico. 1: Trofozoitos en secreciones prostáticas 2: Fisión binaria. 3: Trofozoito en vagina o en uretra (Tomado de la base de datos: Introduction "The *Trichomonas vaginalis* Genome Database" www.tigr.or/tdb/e2k1/tvg/intro.shtml).

2.4.4.- Metabolismo

Aunque *T. vaginalis* es similar en muchos aspectos a otros eucariontes, es disímil en el metabolismo ya que se parece más a bacterias anaeróbicas primitivas, debido a que carece de mitocondrias y peroxisomas. Este protista anaeróbico aerotolerante contiene un organelo especializado llamado hidrogenosoma (Muller, 1988; Johnson y col., 1993), el cual es análogo a la mitocondria de eucariontes superiores pero menos eficiente en la producción de energía (Arroyo, 2000). A pesar de que hay marcadas diferencias entre la mitocondria y el hidrogenosoma, los organelos son funcionalmente similares, con rutas metabólicas implicadas en la producción de ATP (Cavalier-Smith, 1987).

El hidrogenosoma tiene un diámetro de 0.5 a 1.0 μm , esta rodeado por dos membranas y no contiene material genético (Muller, 1988). Los carbohidratos son la fuente primordial de energía de *T. vaginalis* y su metabolismo ocurre tanto en el citoplasma como en los hidrogenosomas (Muller, 1988). En el citoplasma la glucosa es convertida a fosfoenolpiruvato y subsecuentemente a piruvato por la vía Embden-Meyerhoff-Parnas (Muller, 1988). El piruvato se metaboliza en el hidrogenosoma y con ayuda de la enzima piruvato ferredoxín óxido reductasa (PFOR) (la cual se localiza en la membrana del hidrogenosoma) es descarboxilado para formar acetil coenzima A. El acetato es el producto final en la vía de transferencia de coenzima A a succinato (Lindmark y col., 1975) (**Fig 4**).

Subsecuentemente de la formación de acetato, la ferredoxina (Fd) acepta los electrones generados por la PFOR. La ferredoxina es reoxidada por la

hidrogenasa (HYD) produciendo hidrógeno molecular como producto final en la cadena transportadora de electrones dentro del hidrogenosoma (Dunne y col., 2003) (**Fig 4**). En condiciones limitantes de carbohidratos se ha comprobado que ciertos aminoácidos, esencialmente arginina, treonina y leucina, en ausencia de maltosa, favorecen el crecimiento y la sobrevivencia del parásito (Petrin y col., 1998).

En organismos aeróbicos, la descarboxilación del piruvato es catalizada por la piruvato deshidrogenasa (PDH) un complejo multienzimático de aproximadamente 10^3 kDa de la piruvato deshidrogenasa (PDH) (Weiland, 1983). Los mecanismos catalíticos de PFOR y la PDH son diferentes, la única propiedad que tienen en común ambas es la presencia de tiamina pirofosfato (TTP) (Kerscher y Oesterhelt, 1982). Este grupo prostético de 200–300 kDa es usado como un cofactor por los “cluster” Fe-S y está implicado en la ruptura de los enlaces carbono-carbono (Schonheit y Schafer, 1995).

Existen tres tipos de PFOR, la PFOR en algunos protozoarios y bacterias es un dímero o proteína tetramérica de aproximadamente 240 kDa. En organismos como *Halobacterium halobium*, la PFOR tiene 2 subunidades, de 86 y 42 kDa (Krescher y Oestrhelt, 1981), mientras que en *Pirococcus furiosus* posee tres subunidades de 45, 31 y 24 kDa (Blamey y Adams, 1993). *Thermotoga marítima* (Blamey y Adams, 1994) se compone de cuatro subunidades 43, 34, 23 y 13 kDa y *Archaeoglobus fulgidus* la PFOR también posee cuatro subunidades con diferente tamaño: 47, 32, 25 y 13 kDa (Kunow y col., 1995).

La PFOR se encuentra en protozoarios amitochondriados como *Giardia lamblia* (Ellis y col., 1993), *Entamoeba histolytica* (Rodríguez y col., 1996) y en *T. vaginalis* (Hrdy y Muller, 1995). En estos protistas la PFOR se encuentra formada por dos subunidades homólogas de aproximadamente 120-130 kDa cada una (Hrdy y Muller, 1995; Townson y col., 1996).

A la fecha, en *T. vaginalis* se han caracterizado dos genes para la PFOR (*pfor-a* y *pfor-b*) con un tamaño de 3,665 pb y un marco de lectura abierto de 3,474 pb que codifican para 1157 aa y una proteína de aproximadamente 120 kDa en ambos genes (Hrdy y Muller, 1995). Al comparar la secuencia deducida de aminoácidos estos dos genes presentaron 95% de identidad (Hrdy y Muller, 1995) ya que solo difieren en 211 nucleótidos. Ambos genes son ricos en A+T tanto en las regiones codificantes como en las no codificantes. Por ensayos de Northern blot se observa un transcrito de 4.2 kb para PFOR (Meza-Cervantez, 2005). Por otra parte al realizar un análisis en el genoma de *T. vaginalis* se encontró que el gen *pfor a* es unicopia, mientras que el gen *pfor b* presenta 2 copias las cuales muestran una identidad del 97% entre sus secuencias.

Metabolismo de carbohidratos en el hidrogenosoma

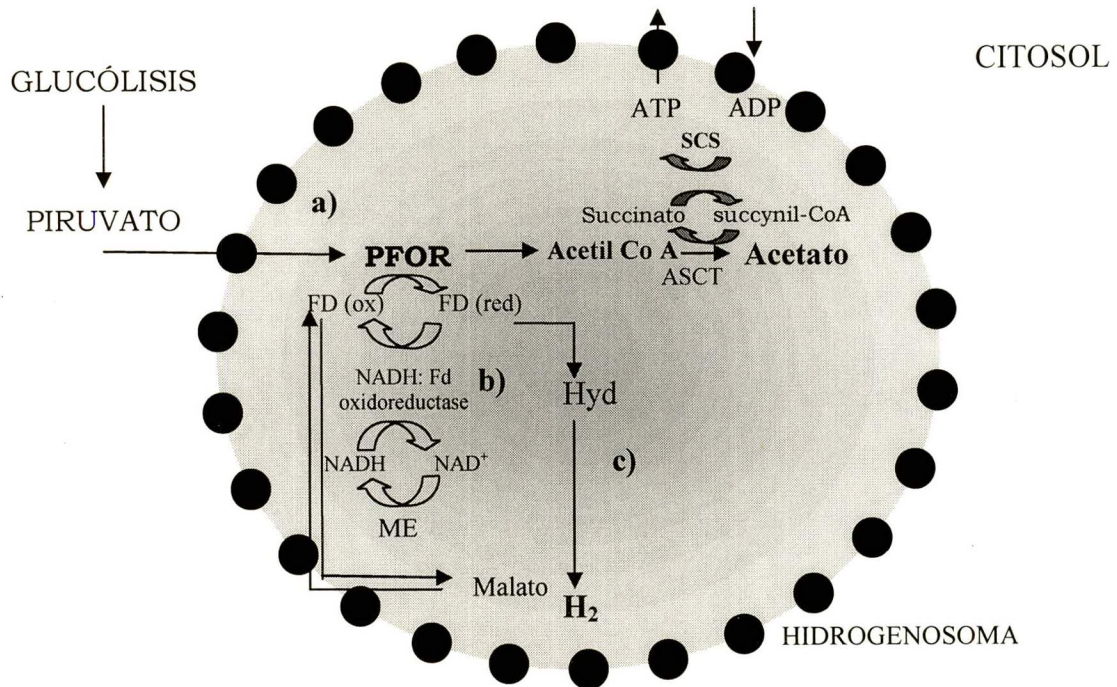


Figura 4. Metabolismo del piruvato en hidrogenosomas de *T. vaginalis*. El piruvato es generado por la glucólisis en el citosol de *T. vaginalis* y entra a los hidrogenosomas a) Oxidación del piruvato a acetil coenzima A es catalizada por la PFOR (Piruvato ferredoxín oxido reductasa). b) Reoxidación de la ferredoxina por la PFOR. c) La ferredoxina es reoxidada por la hidrogenasa (Hyd) produciendo hidrógeno molecular como producto final. SCS: succinil Co A sintetasa, ME: enzima málica, ASCT: acetato succinato Co A transferasa (Tomado de Land y col., 2004).

2.4.5.- Mecanismos de acción del metronidazol

El número de aislados de *T. vaginalis* clínicamente resistentes ha aumentado (Sobel y col., 1999) y poco se conoce acerca de las bases moleculares de la resistencia al metronidazol.

El hidrogenosoma participa en la activación del metronidazol. Esta droga entra por difusión pasiva al parásito y luego al hidrogenosoma como una prodroga donde compite con la hidrogenasa como un aceptor de electrones donados por la ferredoxina (Müller and Lindmark, 1976). La activación del metronidazol ocurre cuando un electrón es transferido al grupo nitro formándose un radical-nitro tóxico (Upcroft y Upcroft 2001; Kulda, 1999). En ausencia de la droga, los protones se reducen a hidrógeno molecular por acción de la hidrogenasa.

La importancia de la PFOR y la ferredoxina en la activación del metronidazol ha sido sustentada por aislados de *T. vaginalis* que pueden hacerse resistentes a la droga al alterar la actividad de cualquiera de las dos proteínas (Brown y col., 1999; Cerkasovova 1984; Kulda y col., 1993; Quon y col., 1992; Upcroft y Upcroft, 1999).

En estos organismos se ha observado una relación directa entre la expresión del gen de la ferredoxina y la resistencia a la droga (Kirkwood y col., 2002). Sin embargo, el reemplazo del gen de la ferredoxina, confirma que esta molécula no es la responsable de la resistencia de los diferentes aislados a este

fármaco, lo cual sugiere que hay mecanismos aún desconocidos relacionados con la resistencia al metronidazol de los aislados de *T. vaginalis* (Kirkwood y col., 2004).

2.4.6.- Regulación por hierro

La disponibilidad del hierro es necesaria para procesos metabólicos y el crecimiento de las tricomonas (Gorrell, 1985) y la expresión y regulación de su virulencia como la adherencia de este organismo a la célula huésped, ya que el hierro regula la expresión de genes que codifican para las adhesinas (García y col., 2003) y la cisteína proteinasa CP30 (Mendoza-López y col., 2000); por lo que se ha postulado que el hierro es esencial para la sobrevivencia de este protozoario.

El hierro está implicado en la regulación de una serie de mecanismos que le permite al parásito subsistir en el huésped gracias a la inducción de la síntesis de diferentes proteínas dependiendo de la concentración de este ión en el medio. De manera específica, en altas concentraciones de hierro se induce la expresión de la ferredoxina, de la succinil CoA sintetasa, de la PFOR y las adhesinas AP65, AP51, AP33, AP23, AP120 (Arroyo y col., 1992; Lehker y col., 1991; Yáñez-Gómez, 1999; Moreno-Brito y col., 2005). La regulación de la expresión de las adhesinas en alto hierro se lleva a cabo al nivel transcripcional y traduccional (Lehker y col., 1991). En ausencia de hierro estas moléculas disminuyen su expresión (García y col., 2003; Yáñez-Gómez, 1999).

En *T. vaginalis*, la adquisición de hierro es mediada por receptores que reconocen de manera específica lactoferrina, hemoglobina, citocromo c y ferritina (Lehker y col., 1990; Dailey y col., 1990).

2.5.- Patogénesis

El mecanismo de citopatogenicidad de *T. vaginalis* es un proceso multifactorial, en el que el primer evento es la adhesión del parásito a la célula blanco, seguida por el daño progresivo de ésta (citotoxicidad). Este daño se inicia por un redondeamiento celular seguido por la muerte y la fagocitosis, para que finalmente ocurra la desintegración celular (Alderete y Pearlman, 1984; Krieger y col., 1985; Arroyo, 2000).

2.5.1.-Citoadherencia

El parasitismo y la colonización del epitelio vaginal por *T. vaginalis* se realiza por medio de la unión específica del parásito a las células epiteliales vaginales (VECs) a través de proteínas de superficie del parásito (adhesinas), las cuales interactúan con moléculas de la superficie de las célula hospedera (receptores) (Alderete y Garza, 1985; 1988; Arroyo y col., 1992).

El mecanismo de citoadherencia de *T. vaginalis* es complejo, depende de pH y temperatura (Alderete y Garza, 1985), involucra la transducción de señales transmembranales (Arroyo y col., 1993), la participación de adhesinas (Arroyo y

col., 1992; Moreno-Brito y col., 2005), cisteín proteinasas de 30 (CP30), (Arroyo y Alderete, 1989; 1995, Mendoza-López y col., 2000) y 62 kDa (Hernández y col., 2004) y glicoconjugados con actividad receptora para laminina (Silva Filho y col., 1988; 1998) además de ser regulada por factores ambientales como el hierro (Lehker y col., 1991).

Este parásito presenta un sofisticado sistema de transducción de señales al contacto con la célula blanco con el cual controla la expresión de genes de virulencia como los que codifican para las adhesinas (Arroyo y col., 1993). A la fecha, se han identificado y caracterizado cinco proteínas de superficie como adhesinas, AP65, AP51, AP33, AP23 y AP120 (Alderete y Garza, 1985; 1988, Arroyo y col., 1992; Yáñez-Gómez, 1999; Moreno Brito y col., 2005). La expresión de los genes de las adhesinas se encuentra regulada de forma coordinada al nivel de transcripción por las concentraciones de Fe^{2+} en la vagina (Lehker y col., 1991) y por contacto con las células del epitelio vaginal y cervical (Arroyo y col., 1993; García y col., 2003). Además, se ha demostrado el incremento en la expresión de los genes que codifican para α -actinina después del contacto del parásito con células VECs sugiriendo que la relación parásito-huésped es muy compleja (Kucknoor y col., 2005). También se ha demostrado que se alteran genes de las células blanco (VECs) activando una cascadas de señalización en respuesta a la adherencia del parásito (Kucknoor y col., 2005).

2.5.2.-Citotoxicidad

En la citotoxicidad de *T. vaginalis* hacia la célula blanco participan porinas o proteínas formadoras de poros (Fiori y col., 1993), hemolisinas (Krieger y col., 1983; Dailey y col., 1990; Fiori y col., 1993), fosfolipasas y cisteín proteinasas (Álvarez-Sánchez y col., 2000).

En este proceso participa una cisteín proteinasa de 65 kDa (CP65), que presenta afinidad a la superficie de las células HeLa y se encuentra ausente en los aislados de *T. vaginalis* no citotóxicos (Arroyo y Alderete, 1995; Álvarez-Sánchez y col., 2000). Esta molécula se localiza en la superficie y en el citoplasma del parásito es inmunogénica. Además, la CP65 se encuentra activa a pH de 5.5 y a 37°C y puede degradar sustratos como colagena IV y fibronectina pero no laminina-1 (Álvarez-Sánchez y col., 2000). La actividad de la CP65 es modulada negativamente por concentraciones de zinc similares a las encontradas en las secreciones prostáticas (≤ 1.6 mM) de pacientes masculinos con prostatitis crónica (Álvarez-Sánchez, 2001).

Otra CP implicada en la citotoxicidad es la CP39, que se une a las células HeLa y degrada colágena I, III, IV y V, hemoglobina y fibronectina. Además, la CP39 se secreta por el parásito *in vivo* e *in vitro* y se encuentra activa en un rango amplio de pH (3.6-9.0) (Hernández-Gutiérrez y col., 2004) y su actividad se ve afectada negativamente por hierro (Hernández-Gutiérrez y col., 2003). También se identificó una CP de 60 kDa que se ha demostrado que degrada sustratos como dímeros y monómeros de hemoglobina; inmunoglobulinas IgG e IgA y es considerada como una enzima ácida (Duk-Young y col., 1998).

2.5.3.-Evasión de la respuesta inmune

La relación parásito-huésped es muy compleja en la tricomonosis, como se muestra 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 la p270 se regula negativamente por hierro (Alderete, 1999). Otro evento para evadir 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 generados por el huésped y evitar la protección a la infección (Provenzano y Alderete, 1995). 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 (Alderete y col., 2001).

Otra manera que tiene *T. vaginalis* de evadir al sistema inmune del huésped, es activar la ruta alterna del complemento (Gillin y Sher, 1981) y aumentar su resistencia al complemento en altas concentraciones de hierro (Alderete y col., 1995) al regular positivamente la expresión de algunas CPs, entre ellas se encuentran las que degradan la porción C3b del complemento sobre la

superficie de los organismos, permitiendo que evada la destrucción mediada por el complemento (Alderete y col., 1995b).

2.5.4.- 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 es inducida por cisteín proteinasas (Sommer y col., 2005). También el parásito es capaz de inducir apoptosis en células RAW264-7 por la vía Bcl-x_L (Chang y col., 2004). Además de que el parásito altera la expresión de Mcl-1 y la activación de la caspasa-3 induciendo apoptosis de neutrófilos humanos (Kang y col., 2006).

3.-ANTECEDENTES

La secuencia de los genes de tres de las adhesinas de *T. vaginalis* localizadas en la superficie del parásito muestran homología significativa con enzimas metabólicas hidrogenosomales (Arroyo, 2000; García y col., 2003). La AP65 presenta una identidad del 38% con la enzima metabólica málica localizada en los hidrogenosomas y que participa en la producción de ATP (Alderete y col., 1995). Lo mismo ocurre con las subunidades α y β de la succinil-Co A sintetasa. La AP51 muestra una identidad del 44.2% con la subunidad β (Alderete y col., 1998). Los tres genes de la AP33 tienen una identidad del 53.8%, 54.5% y 54.9% con la subunidad α de la succinil-CoA sintetasa (Engbring y col., 1996).

Por otro lado, en el estudio de seis aislados mexicanos de *T. vaginalis* se determinó el efecto de altas concentraciones de hierro sobre la expresión de las adhesinas y los niveles de adhesión. En el patrón de adhesinas se observó la aparición de una banda de 120 kDa con afinidad a la superficie de las células HeLa (Yáñez-Gómez, 1998) que se comporta como una nueva adhesina de *T. vaginalis*, la AP120 (Yáñez-Gómez, 1999). De acuerdo con el peso molecular, la AP120 podría corresponder a la PFOR que tiene un peso de 120 kDa (Hrdý y Muller, 1995) o al receptor para laminina de 118 kDa (Silva Filho y col., 1988). De ahí que la AP120, podría presentar homología con una enzima metabólica hidrogenosomal, la PFOR, aunque localizada en la superficie del parásito, como la AP65, AP51 y AP33 (Engbring y col., 1996).

Enseguida, la AP120 se caracterizó por electroforesis de 2-D y por ensayos de “Western blot” con el anticuerpo anti-TvAP120 que inhibe la adhesión de *T. vaginalis* a monocapas de células HeLa (Yáñez-Gómez, 1999; Moreno-Brito y col., 2005). Al comparar el número de manchas que forman a la proteína de 120 kDa en extractos de proteínas totales de *T. vaginalis* crecidas en diferentes concentraciones de hierro (20 y 250 μM) en la región de 120 kDa. En parásitos crecidos en 20 μM de Fe^{2+} se observaron 2 manchas en la región de 120 kDa y 3 manchas en parásitos crecidos en 250 μM de hierro. El anticuerpo anti-TvAP120 reconoció a la mancha numero 1 de la región de 120 kDa que solo se encontró en parásitos crecidos en alto hierro (**Fig. 5**), la cual podría corresponder a la AP120 (Moreno-Brito y col., 2005). El mapeo tríptico (MALDI-TOF MS-“peptide mass mapping”) de esta mancha mostró que las masas de 22 de los 59 péptidos coincidieron con masas de péptidos generados teóricamente de la piruvato

flavodoxin oxido reductasa de *T. vaginalis*, conocida como piruvato ferredoxin oxido reductasa A (PFOR A). Estos datos confirman que la AP120 también presenta homología con una enzima hidrogenosomal del parásito, la PFOR A, (Moreno-Brito, 2004; Moreno-Brito y col., 2005) como las adhesinas ya mencionadas mostrando un patrón similar al de las adhesinas ya mencionadas (Alderete y col., 1985; 1995; Arroyo y col., 1992).

La homología entre AP120 y PFOR se confirmó por ensayos de “Western blot” e inmunolocalización con un anticuerpo anti-EhPFOR preparado contra un fragmento recombinante de 648 aa de la parte carboxilo-terminal de la PFOR de *E. histolytica* (del nucleótido 1,260 a 3,498 del gen *Ehpfor*). Las PFOR de estos dos parásitos presentaron una identidad del 45% (Rodríguez y col., 1998). Además, en este fragmento de la PFOR se encontraron 11 de los 22 péptidos identificados en la AP120 (Moreno-Brito y col., 2005) (**Fig. 6**). El anticuerpo anti-EhPFOR reaccionó con proteínas en la membrana del hidrogenosoma y en la superficie del parásito.

Para saber si la adhesina AP120 es codificada por el gen de la PFOR A o por un gen distinto, primero se clonó el gen de la PFOR A del aislado CNCD 188 de *T. vaginalis* a partir de la secuencia reportada en el Genebank (Hrady y Muller, 1995). La secuencia obtenida mostró 5 diferencias con respecto a la secuencia de la PFOR A previamente reportada. Estos cambios podrían deberse a errores de la enzima Taq polimerasa durante la amplificación. Por medio de un alineamiento múltiple se observó que uno de los cambios lo comparte con PFOR B (**Fig 7**).

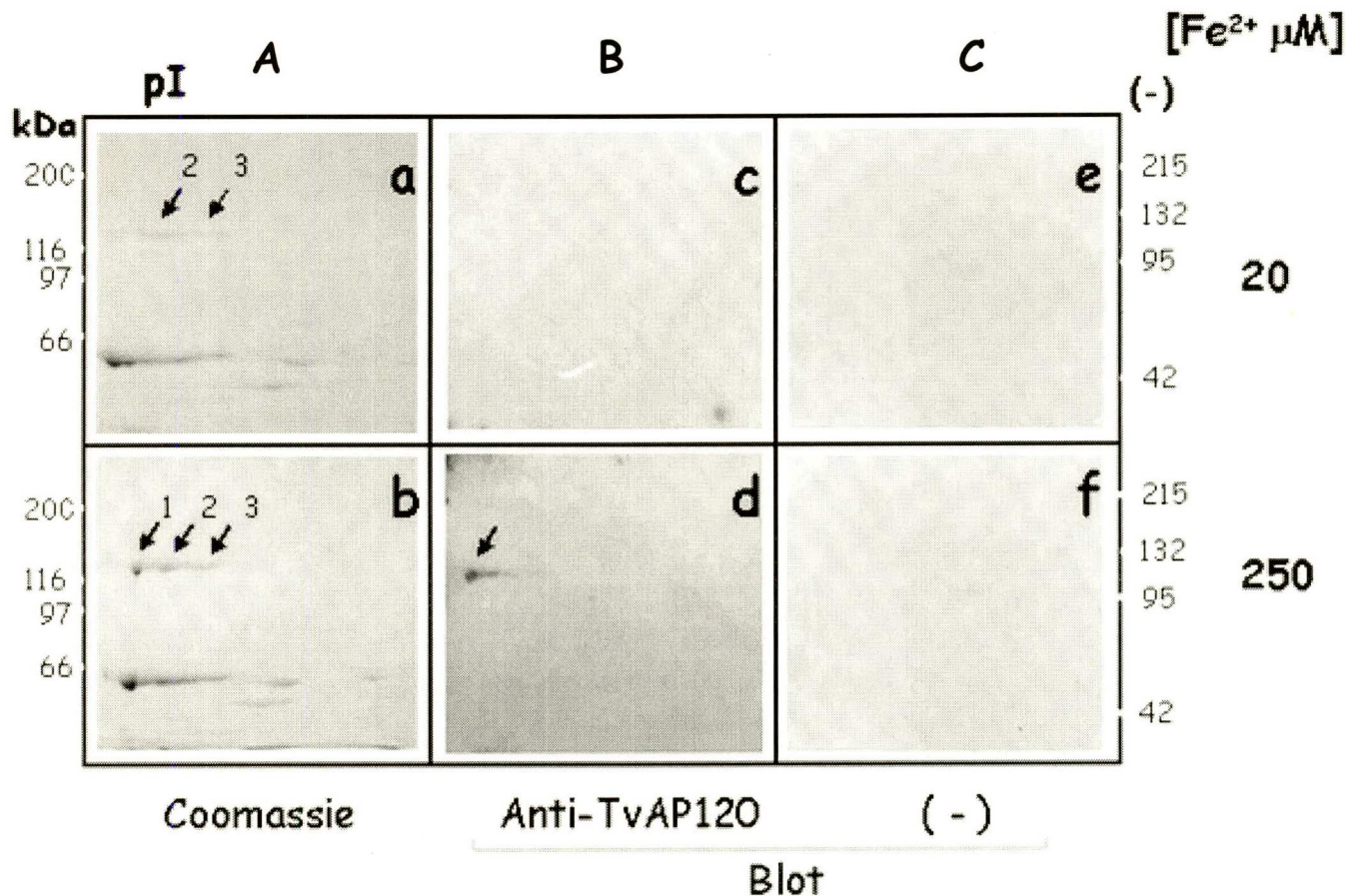


Figura. 5. Reconocimiento específico del anticuerpo anti-TvAP120 por “Western-blot” (Tomado de Moreno-Brito, 2004). Ensayos de Western blot a partir de electroforesis en 2D de la proteína de 120 kDa de parásitos crecidos en 20 μ M (panel a, c y e) y 250 μ M (panel b, d y f) de hierro. A): Electroforesis de proteínas totales de *T. vaginalis* (panel b), separados por isoelectroenfoque bidimensional para proteínas básicas en geles de poliacrilamida al 7% y teñidos con azul de Coomassie. B) Paneles c y d, Réplicas de este gel en nitrocelulosa, incubadas con el anticuerpo anti-TvAP120 a una dilución 1:10 000. C) Paneles e y f. Controles negativos de la reacción (-). [Fe²⁺ μ M]: Concentración de hierro en el medio de cultivo. Flechas. Indican la posición y el número de manchas de la p120. kDa. Tamaño molecular de los marcadores. pI: isoelectroenfoque.

Otro de los cambios hace desaparecer uno de los 3 posibles segmentos transmembranales para la proteína (**Fig. 7**) (Meza Cervantez, 2005). Además por RT-PCR se analizó el patrón de expresión al nivel de transcrito amplificando un fragmento de 1.1 kb de *pfor* a partir del RNAm de parásitos crecidos en diferentes condiciones de Fe^{2+} . El fragmento analizado corresponde a los últimos 366 aa del gen PFOR A. Este fragmento se relaciona con el fragmento recombinante que corresponde al carboxilo-terminal de la PFOR de *E. histolytica* contra el que se generó el anticuerpo utilizado para confirmar la homología y la localización de la AP120. El fragmento de 1.1 kb de *pfor a* de *T. vaginalis* solo se amplificó a partir del RNA de parásitos crecidos en altas concentraciones de Fe^{2+} (Meza-Cervantez, 2005; Moreno Brito y col., 2005).

Dado que el mRNA de una PFOR que solo se expresa en altas concentraciones de Fe^{2+} podría corresponder a la mancha numero 1 de la adhesina de 120 kDa que solo aparece en altas concentraciones de Fe^{2+} , también se planteó la hipótesis de que *T. vaginalis* posee más genes tipo PFOR en su genoma. Por lo que se realizó una búsqueda de genes tipo PFOR en el Proyecto del genoma de *T. vaginalis* TIGR (The *Trichomonas vaginalis* Genome Sequencing Project) para saber si existen otros genes que pudieran codificar para la adhesina AP120.

	I	
Frag_EhPFO	GAELEAQLPGSLKRVIAEKQIKFYTIDAIKIQEVKLGRRINMIMQTVFFKLANVIPFEK	522
Frag_TvPFOa	-ADLNKDLPGSFRKIAEKDAKLYTIDATQIAIDLKLPGRINMLMQTVFFGLANIIPAAE *:*:*:*****:::*****:*****:*.::** *****:***** **:*:*:	
	II	III
Frag_EhPFO	AIVLLKEAVQKTYGAKGPAIVKMNDAIDKALDGLVEVKVP-AEWANAPLETVTKIEAPE	582
Frag_TvPFOa	CIALLKKSIAKQYARKGKEVIQKNWDMVDHALQGLKEFKYNKAEWLNAPVEPRPKIEGIR .*****::* * . ** ::* * :*:***:* * . * * * * * :*. . * * .	
	IV	
Frag_EhPFO	FVTDVLMPLAMKGNELPVSKFAADGFMPMGTTKYEKRGIA TKIPTWEASKCCSNVICVH	642
Frag_TvPFOa	HIIDMSILQ---EGESVSVDEMVEIGLVPNDTAKYEKRGIAVTVPKWEEKKCIQCNTCAM .: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Frag_EhPFO	FNCPHAAIRCFYL TPEESAKAPAEFVQIDGKAQQAGYKFRIQVSAMDCTGCEVCTTACPV	702
Frag_TvPFOa	V-CPHAVIRPFLT-QEEAKG-LTTLKAKGKEIKN-YQFRIQITPLDCTGCATCVTSCPT .***** ** * * * * :*:*:* . : . * * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Frag_EhPFO	KCLSHTP-FEQVSEVESKNWEFAMT LSPKNSLSDRSNIKTMIHQPYLEFSGACEGCNET	762
Frag_TvPFOa	KALSHTYRNAKLDEEKGKWDQCIAPNRGHL LPTNVRNVQFRQPLIEFNGACQGCGET * . * * * * : . : * * . * * * : . : . . * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	V	
Frag_EhPFO	ALVKLINQLY GERTIIANATG C S S I W G A T W G T N P Y T V D G E G R G P A W G N S L F E D N S E Y G F G	822
Frag_TvPFOa	AICKLLTQLYGDQLYLANATGCSLWGA T F P F N P F T T N E R G H G P A W A N S L F E D N A E F G Y G * : * * : * * * * : : * * * * * * : * * * * : * * * * : * : * * * : * : * * * * : * : * *	
	VI	
Frag_EhPFO	MFKLINKEDFILNKFVKLL L L K G K L S N E L K T L L E E W I A K K E D A N E S E K I Y A A V K P L L A A E	882
Frag_TvPFOa	MPKAVEARRNITK K L V V E L L E S G E I K G E L K E L F E Q L L K V W D Q D K E S G D L A E K I K P L L A K V * * * : : . * : * : * : * * . * : : . * * * * * * : * * * : : * : * * : : * * * * : * * * * *	
	VII/VIII	
Frag_EhPFO	KDKSEVLGLIEQNSDMFVKISHWIVGGDGWAYDIGYNGVDHVLASGHVNIILVLDTEMYS	942
Frag_TvPFOa	QNPSEKMYALQSQADII SKKQVWIVGGDGWAYDIGYGGLDHVLASGENVKII IYDTEVYS : : * * : : : : * : * . *	
Frag_EhPFO	NTGGQKSKATNLGAVVKFASSGCRPKKDLGAIAMAYGDVYVASIALGANPAQAFKAFKE	1002
Frag_TvPFOa	NTGGQCSKATSRGAVANFSAAGYTKAKKDLGAI SHTYRN IYVASTCLLADPNQALKALQE * * * * * * * * * . * * * : * : * : * . : *	
	IX	
Frag_EhPFO	AESYNG---VFSYYCLLPCKSRSPITKSIEEAKMAYNSGYWSLYRDPRLVEQKPGQLQL	1062
Frag_TvPFOa	AKEYNGPAIIINYSPCINHGIKKGLGSTPKHCKDLIKTGYLNLERYNP---AKPKP-LTV * : * * * * : : * * : . : . : . : . * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * :	
	X	XI
Frag_EhPFO	DCSEVKGDLEAFLARENRFALLGRKDKETADKLHAQLKANIDKKLAHLK	1122
Frag_TvPFOa	DTKQDPYNLDPLVKGENRFAALKDIYPKEAETKFPQLINDMKTREYEGYK * . : . : * : : : * * * * * * * : * : . . * * * : : : * *	

Figura 6. Alineamiento múltiple del fragmento que reconoce el anticuerpo anti-EhPFOR, entre las proteínas EhPFOR y TvPFORa (Tomado de la tesis de Moreno-Brito 2004). Frag_EhPFOR: fragmento recombinante de 648 aa de la parte carboxilo-terminal de la PFOR de *E. histolytica*. Frag_TvPFOR A: fragmento de la proteína PFOR A del extremo carboxilo-terminal. I-XI: 11/22 péptidos identificados en la AP120.

Como sonda se utilizó la secuencia del fragmento de cDNA de 1.1 kb y se encontraron tres genes con 86, 63 y 61% de homología a PFOR A. Mediante el análisis *in silico* se encontraron “motifs” y modificaciones postraduccionales algunas características típicas de PFOR (Meza-Cervantez, 2005) (**Fig. 8**).

Sin embargo es necesario saber si alguna de estas secuencias encontradas se expresan y si tienen alguna función relacionada con la adhesina de 120 kDa. Todos estos antecedentes muestran la relación que existe entre la AP120 y la PFOR A de *T. vaginalis* sugiriendo una nueva función como adhesina para la PFOR A, cuando se localiza en la superficie del parásito. La relación de estas dos moléculas podría ser un ejemplo más de proteínas multifuncionales o “*moonlighting proteins*” ya reportadas en otros organismos (Jeffery, 1999).

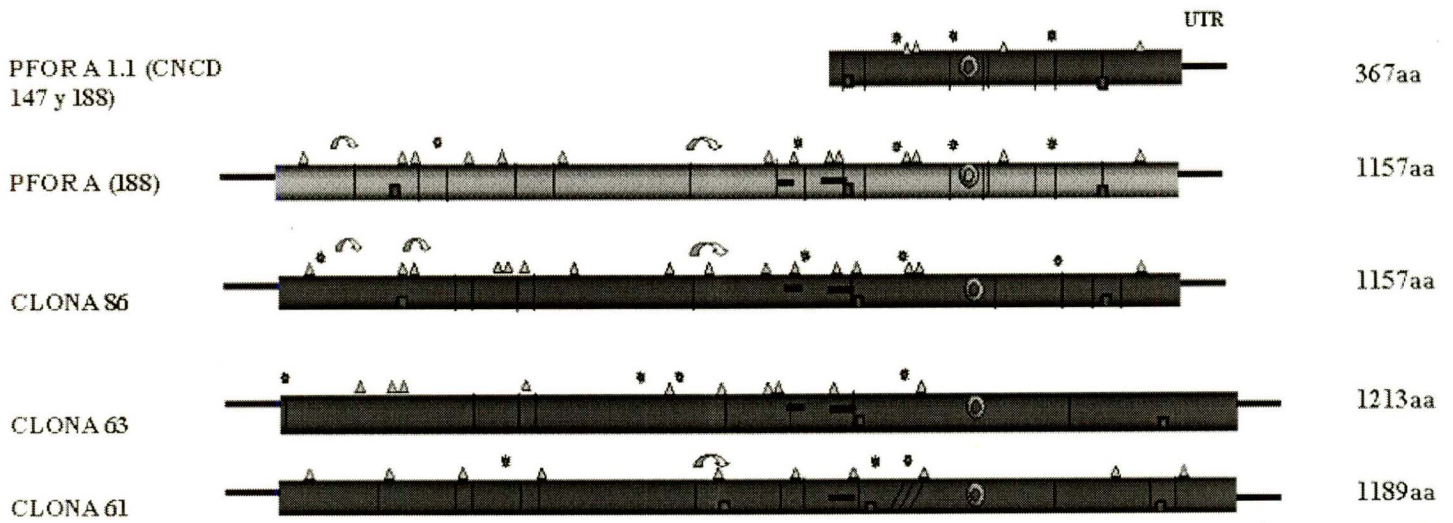
Las proteínas pueden mostrar con múltiples funciones dependiendo de diversos factores como pueden ser:

- Localización
- Expresión en un tipo celular distinto
- Formación de complejos
- Grado de oligomerización
- Concentración de un ligando, sustrato, cofactor o producto en la célula
- Sitios múltiples de unión

PFOA [188] PFOA[at.cc] PFOB1	MLPSFGKRI PCGDN TAAT SVAYQLSE TS FYIYPI TPA TTMGE LVDAM IA QGPHNIMGRKVV MLPSFGKRI PCGDN TAAT SVAYQLSE TS FYIYPI TPA TTMGE LVDAM IA QGPHNIMGRKVV MLPSFGKRI PCGDN TAAT SVAYQLSE TS FYIYPI TPA TTMGE LVDAM IA QGPHNIMGRKVV * * * * *	60
PFOA [188] PFOA[at.cc] PFOB1	MAMMQS ECGAA AVHCATAVCAL CAT PTASQ GALLM IPDMYKI IGENC PAV [REDACTED] ISARC IA MAMMQS ECGAA AVHCATAVCAL CAT PTASQ GALLM IPDMYKI IGENC PAV [REDACTED] ISARC IA MAMMQS ECGAA AVHCATAVCAL CAT PTASQ GALLM IPDMYKI IGENC PAV [REDACTED] ISARC IA * * * * *	120
PFOA [188] PFOA[at.cc] PFOB1	TSALSIYNDHCDIYAC PATGMPILFSNGVQEAHDLAAVAHL TT IHT GL PFIHT FDCPRTS TSALSIYNDHCDIYAC PATGMPILFSNGVQEAHDLAAVAHL TT IHT GL PFIHT FDCPRTS TSALSIYNDHCDIYAC PATGMPILFSNGVQEAHDLAAVAHL TS IHT GL PFIHT FDCPRTS * * * * *	180
PFOA [188] PFOA[at.cc] PFOB1	HEINTYEE LDNET LMP LIDQKALAAF PARS LNP EHP SE PCT ICCPEYVWQMHKLRKPFQ HEINTYEE LDNET LMP LIDQKALAAF PARS LNP EHP SE PCT ICCPEYVWQMHKLRKPFQ HEINTYEE LDNET LMP LIDQKALAAF PARS LNP EHP SE PCT ICCPEYVWQMHKLRKPFQ * * * * *	240
PFOA [188] PFOA[at.cc] PFOB1	ALPT EVEHMKALCDKTCGYTKGYQYAGPPD PENVI IHMGS GCDPV EYIT EHP EFKT GL ALPT EVEHMKALCDKTCGYTKGYQYAGPPD PENVI IHMGS GCDPV EYIT EHP EFKT GL ALPT EVEHMKALCDKTCGYTKGYQYAGPPD PENVI IHMGS GCDPV EYIT EHP EFKT GL * * * * *	300
PFOA [188] PFOA[at.cc] PFOB1	IKVHLF PPF SVEMFNAAI PASVKKICVLDKVV DPTC PREPL FEDVAAALICERNVKIIG IKVHLF PPF SVEMFNAAI PASVKKICVLDKVV DPTC PREPL FEDVAAALICERNVKIIG IKVHLF PPF SVEMFNAAI PASVKKICVLDKVV DPTC PREPL FEDVAAALICERNVKIIG * * * * *	360
PFOA [188] PFOA[at.cc] PFOB1	RYGISSPD FAPVHVEA IVHNLAS ELPHD RFTUCVVNPE TQL PLGCP FDHLP ECTKQCMFW RYGISSPD FAPVHVEA IVHNLAS ELPHD RFTUCVVNPE TQL PLGCP FDHLP ECTKQCMFW RYGISSPD FAPVHVEA IVHNLAS ELPHD RFTUCVVNPE TQL PLGCP FDHLP ECTKQCMFW * * * * *	420
PFOA [188] PFOA[at.cc] PFOB1	GLGSDCTV GANHQAIKLI VSNTHLYCQAYFAYD AHRSGCVT [REDACTED] LRFCAKP INAPYVQV GLGSDCTV GANHQAIKLI VSNTHLYCQAYFAYD AHRSGCVT [REDACTED] LRFCAKP INAPYVQV GLGSDCTV GANHQAIKLI VSNTHLYCQAYFAYD AHRSGCVT [REDACTED] LRFCAKP INAPYVQV * * * * *	480
PFOA [188] PFOA[at.cc] PFOB1	ADYIACHNPSY LHKFDHTKQLKGGCVFVINF PCSIAD LNFDL PCSIAD LNFDL PCSIAD LNFDL ADYIACHNPSY LHKFDHTKQLKGGCVFVINF PCSIAD LNFDL PCSIAD LNFDL PCSIAD LNFDL ADYIACHNPSY LHKFDHTKQLKGGCVFVINF PCSIAD LNFDL PCSIAD LNFDL PCSIAD LNFDL * * * * *	540
PFOA [188] PFOA[at.cc] PFOB1	ATQIAIDLKLPGR INHMLNQT VFF CLANI IPA EE CLALLPES IAKQYARRKKEVI IQPNWDM ATQIAIDLKLPGR INHMLNQT VFF CLANI IPA EE CLALLPES IAKQYARRKKEVI IQPNWDM ATQIAIDLKLPGR INHMLNQT VFF CLANI IPA EE CLALLPES IAKQYARRKKEVI IQPNWDM * * * * *	600
PFOA [188] PFOA[at.cc] PFOB1	VDHALQGLKEFKYNEA EWLNA PV EPR PFHEC IPHI IDMSIL QECESVSVDENV EI CLVFN VDHALQGLKEFKYNEA EWLNA PV EPR PFHEC IPHI IDMSIL QECESVSVDENV EI CLVFN VDHALQGLKEFKYNEA EWLNA PV EPR PFHEC IPHI IDMSIL QECESVSVDENV EI CLVFN * * * * *	660
PFOA [188] PFOA[at.cc] PFOB1	DTAKYERKGLAVTVPKWE ERKCI QCNTCAWCPHAVIR PFL LT QEEAKCLT TLKAKKKEI DTAKYERKGLAVTVPKWE ERKCI QCNTCAWCPHAVIR PFL LT QEEAKCLT TLKAKKKEI DTAKYERKGLAVTVPKWE ERKCI QCNTCAWCPHAVIR PFL LT QEEAKCLT TLKAKKKEI * * * * *	720

PFORA_[188]	KNYQFRIQITPLDCTCCATCVTS CPTRKALSMYRNAKLDDEEGGQMDQCLAAPNRGHL LP	780
PFORA[st.cs]	KNYQFRIQITPLDCTCCATCVTS CPTRKALSMYRNAKLDDEEGGQMDQCLAAPNRGHL LP	
PFORB1	KDYQFRIQITPLDCTCCGCTCVTS CPTRKALSMYRNAKLDDEEGGQWERLTAIPNRGHLVP	
PFORA_[188]	PTNVENVQFRQPLIEFNGACQCCGETAICHLTQLYCDQLYLANATCCSLVMGATFPFNP	840
PFORA[st.cs]	PTNVENVQFRQPLIEFNGACQCCGETAICHLTQLYCDQLYLANATCCSLVMGATFPFNP	
PFORB1	ATNVENVQFRQPLIEFNGACQCCGETAICHLTQLYCDQLYLANATCCSLVMGATFPFNP	
PFORA_[188]	FTTNERGCHCPAMANSLFEDNAEF CYGMFKAVEARBNITKGLVWELLESCEINGELKELFE	900
PFORA[st.cs]	FTTNERGCHCPAMANSLFEDNAEF CYGMFKAVEARBNITKGLVWELLESCEINGELKELFE	
PFORB1	YTTNERGCHCPAMANSLFEDNAEF CYGMFKAVEARBNITKGLIVDVTESCEVRCBLKDLFE	
PFORA_[188]	QLLKVWDQDKE SCDLAEKIKP LLAKVQNPSEKTYALQS QAD ILSEKQVMIVCGDCMAYDI	960
PFORA[st.cs]	QLLKVWDQDKE SCDLAEKIKP LLAKVQNPSEKTYALQS QAD ILSEKQVMIVCGDCMAYDI	
PFORB1	QLLKVWDQDKE SCDLAEKIKP LLAKVQNPSEKLFDLKS QAD ILAKQVMIVCGDCMAYDI	
PFORA_[188]	CYGGLDHVLASCEMVKIITYDTEVYSNTCGQCSKATSRGAVANFSAACYTKAKKD LGALA	1020
PFORA[st.cs]	CYGGLDHVLASCEMVKIITYDTEVYSNTCGQCSKATSRGAVANFSAACYTKAKKD LGALA	
PFORB1	CYGGLDHVLASCEMVKIITYDTEVYSNTCGQCSKATSRGAVANFSAACYTNAKKD LGALA	
PFORA_[188]	MTYRITYVASTCLLADPNQALKALQEAKEYNCPAIIINYSPCINHGIRKGLGSPFHCHD	1080
PFORA[st.cs]	MTYRITYVASTCLLADPNQALKALQEAKEYNCPAIIINYSPCINHGIRKGLGSPFHCHD	
PFORB1	MTYRITYVASTCLLADPNQALKALQEAKEYNCPAIIINYSPCINHGIRKGLGSPFHCHD	
PFORA_[188]	LLKTCYLNLFRYNPAKPKPLTVDTQQPDVNLDP LWKGENRFAALKD IYPKRAETKFPQLI	1140
PFORA[st.cs]	LLKTCYLNLFRYNPAKPKPLTVDTQQPDVNLDP LWKGENRFAALKD IYPKRAETKFPQLI	
PFORB1	LLKTCYLNLFRYNPSKDKPLTVDTQQPDVNLDP LWKGENRFAALKD IYPKRAETKFPQLI	
PFORA_[188]	NDNKTRYECYKGIHETQ-	1157
PFORA[st.cs]	NDNKTRYECYKGIQQTQ-	
PFORB1	NDNKTRYECYKGIQQTQ-	

Figura. 7. Alineamiento múltiple en aminoácidos de las diferentes PFOR de *T. vaginalis* ya reportadas por medio del programa CLUSTAL W (<http://workbench.sdsc.edu/>). Recuadros: cambios de la PFOR A del aislado CNCD 188 con respecto a la PFOR A ya reportada. ▼ cambio con respecto a PFOR B.



	Protein cinase C
*	Sitios de Glicosylation
⤿	Segmento transmembranal
—	4Fe-4S
⊙	Thiamina pyrofosfato
△	Casein cinase I
■	Tyrosin cinase
///	Citocrome oxidase

Figura 8. Comparación de los “motifs” de nuevas secuencias que codifican para proteínas tipo PFOR. Para la búsqueda de otros genes tipo PFOR se usó como sonda *in silico* se usó la secuencia del fragmento de 1.1 kb del gen *pfor a* del aislado CNCD 147. Las secuencias de aminoácidos encontradas en el genoma de *T. vaginalis* se analizaron por medio del programa “Prosite”. (Tomado de la tesis de licenciatura de Meza Cervantez, 2005).

4.-JUSTIFICACIÓN

La identificación y caracterización de una nueva adhesina de 120 kDa (AP120) mostró que hay una proteína de 120 kDa de *T. vaginalis* que sólo se induce en altas concentraciones de hierro (mancha no. 1) que es una de las moléculas que el parásito utiliza para adherirse al epitelio vaginal. La AP120 muestra homología con la PFOR A, una enzima hidrogenosomal al igual que las otras adhesinas ya reportadas. Por otro lado, el transcrito de la PFOR A se observa mayoritariamente en altas concentraciones de hierro. Además, aunque en el genoma de *T. vaginalis* se encontraron secuencias homólogas a PFOR A de diferentes tamaños y solo se encontró una copia del gen que codifica para la PFOR A, es necesario investigar cuales de los genes tipo PFOR se expresan en altas concentraciones de hierro y determinar la localización de la PFOR A en *T. vaginalis*. Para saber si la PFOR A es una proteína multifuncional dependiente de su localización como adhesina (superficie) o como enzima metabólica (hidrogenosoma) la PFOR A y AP120 están codificadas por genes distintos que comparten cierta homología.

5.-HIPÓTESIS

La PFOR A de *T. vaginalis* es una proteína bifuncional del hidrogenosoma que se relocaliza hacia la superficie del parásito en altas concentraciones de Fe^{2+} y funciona como AP120.

Proteína bifuncional {
enzima metabólica (hidrogenosoma)
adhesina (superficie)

6.-OBJETIVOS

6.1.-OBJETIVO GENERAL

Analizar la relocalización de la PFOR de *Trichomonas vaginalis* a la superficie del parásito en presencia de altas concentraciones de hierro.

6.2.-OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Estudiar el efecto del Fe^{2+} en la transcripción de genes con homología a PFOR A de *T. vaginalis*.

2.-Estudiar el efecto del Fe^{2+} en la localización de PFOR A de *T. vaginalis*.

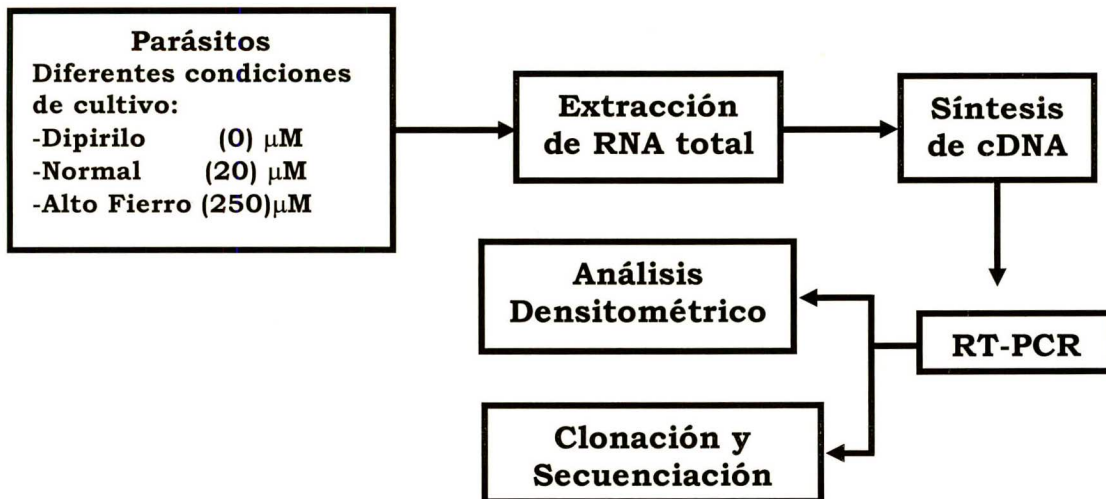
2.1.-Clonar y expresar la región carboxilo terminal de la PFOR A de *T. vaginalis*

2.2.-Generar anticuerpos policlonales contra la región carboxilo terminal de la PFOR A de *T. vaginalis*.

2.3.-Determinar la localización de PFOR en el parásito crecido en altas concentraciones de Fe^{2+} .

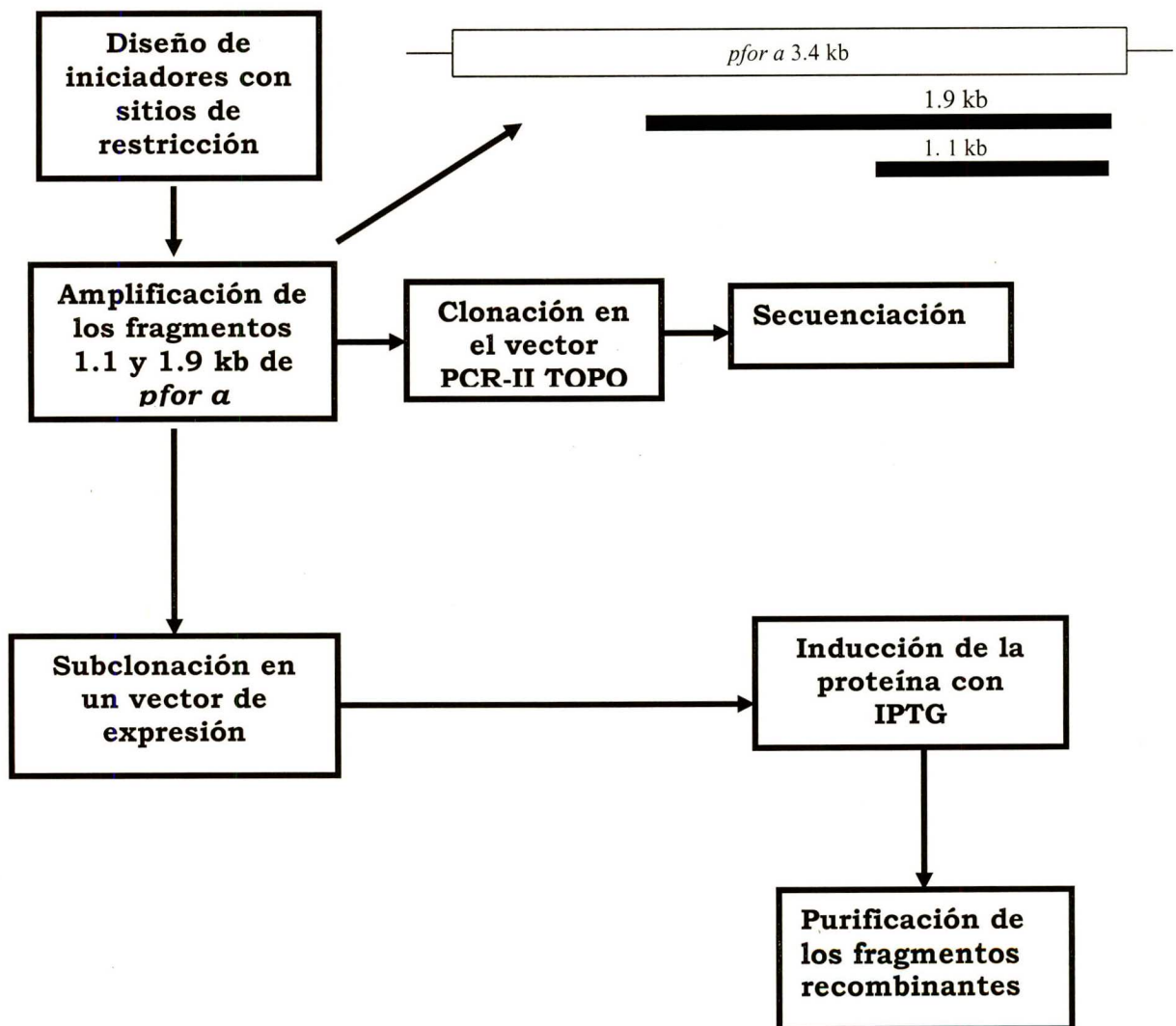
7.-ESTRATEGIA

7.1.-Efecto del Fe²⁺ al nivel transcripcional de genes homólogos a PFOR

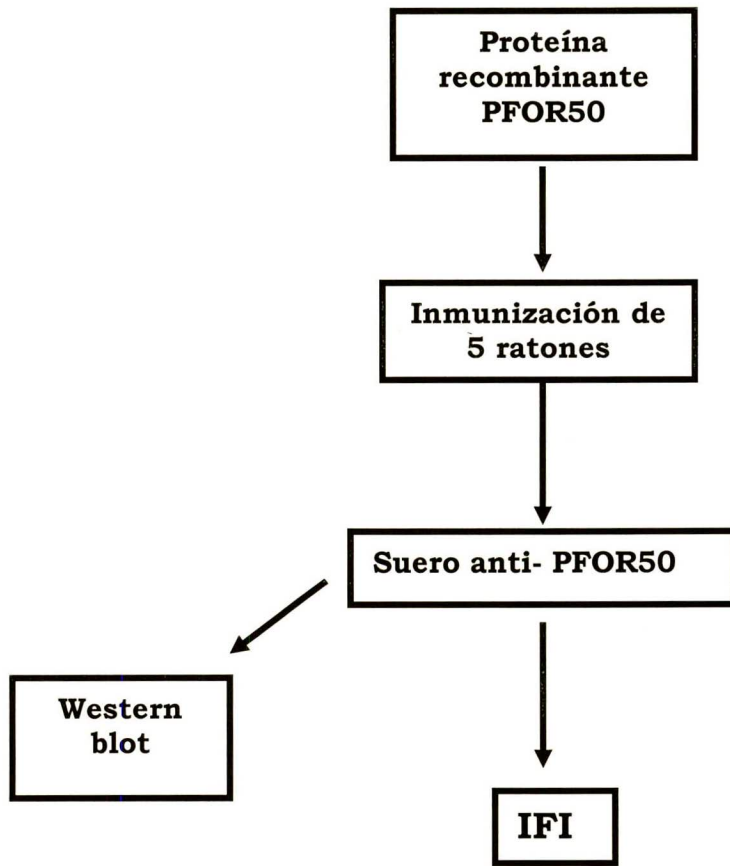


7.2.-Estudiar el efecto del Fe²⁺ en la localización de PFOR A de *T. vaginalis*

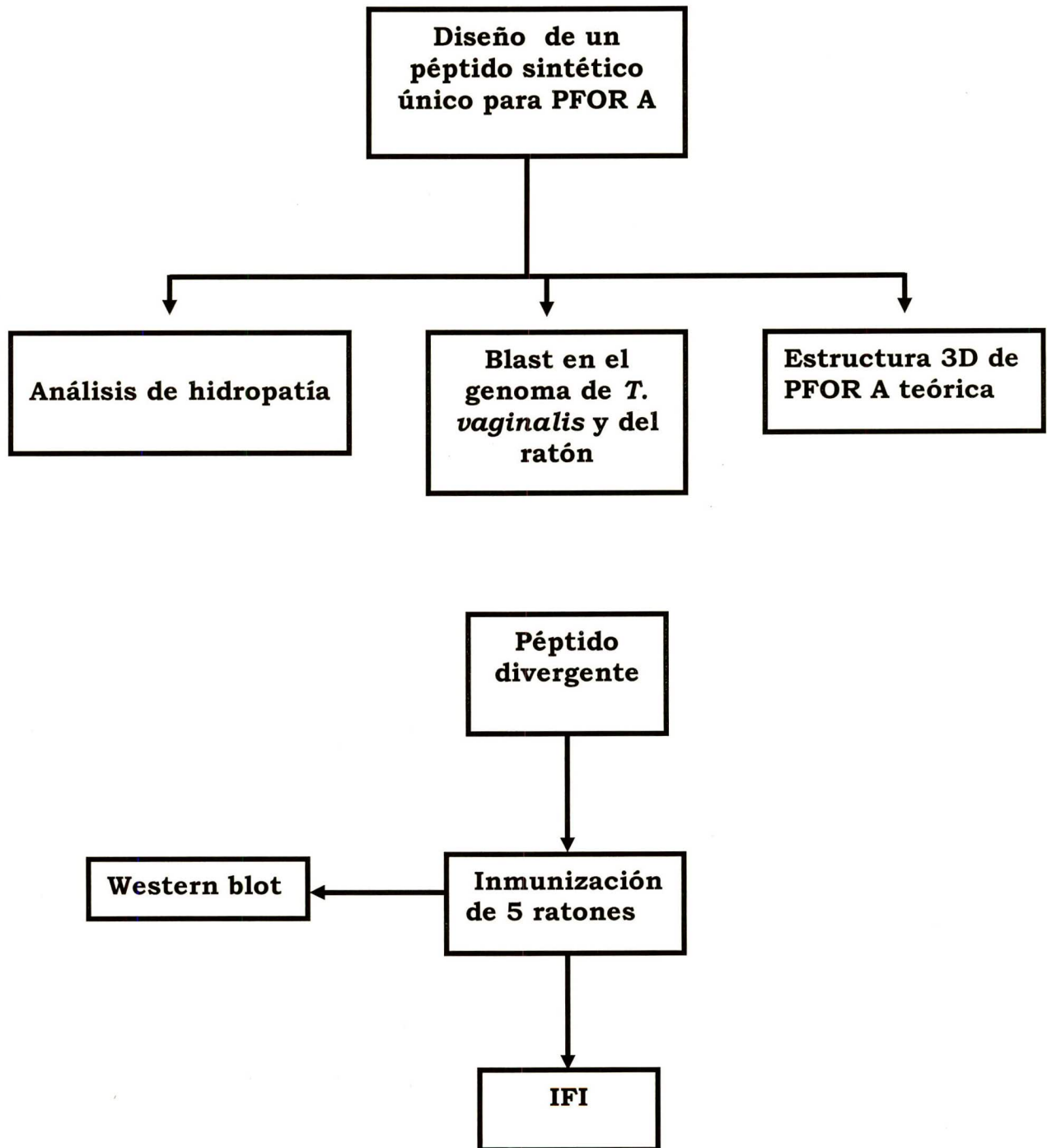
7.2.1.-Clonar y expresar la región carboxilo terminal de la PFOR A de *T. vaginalis*



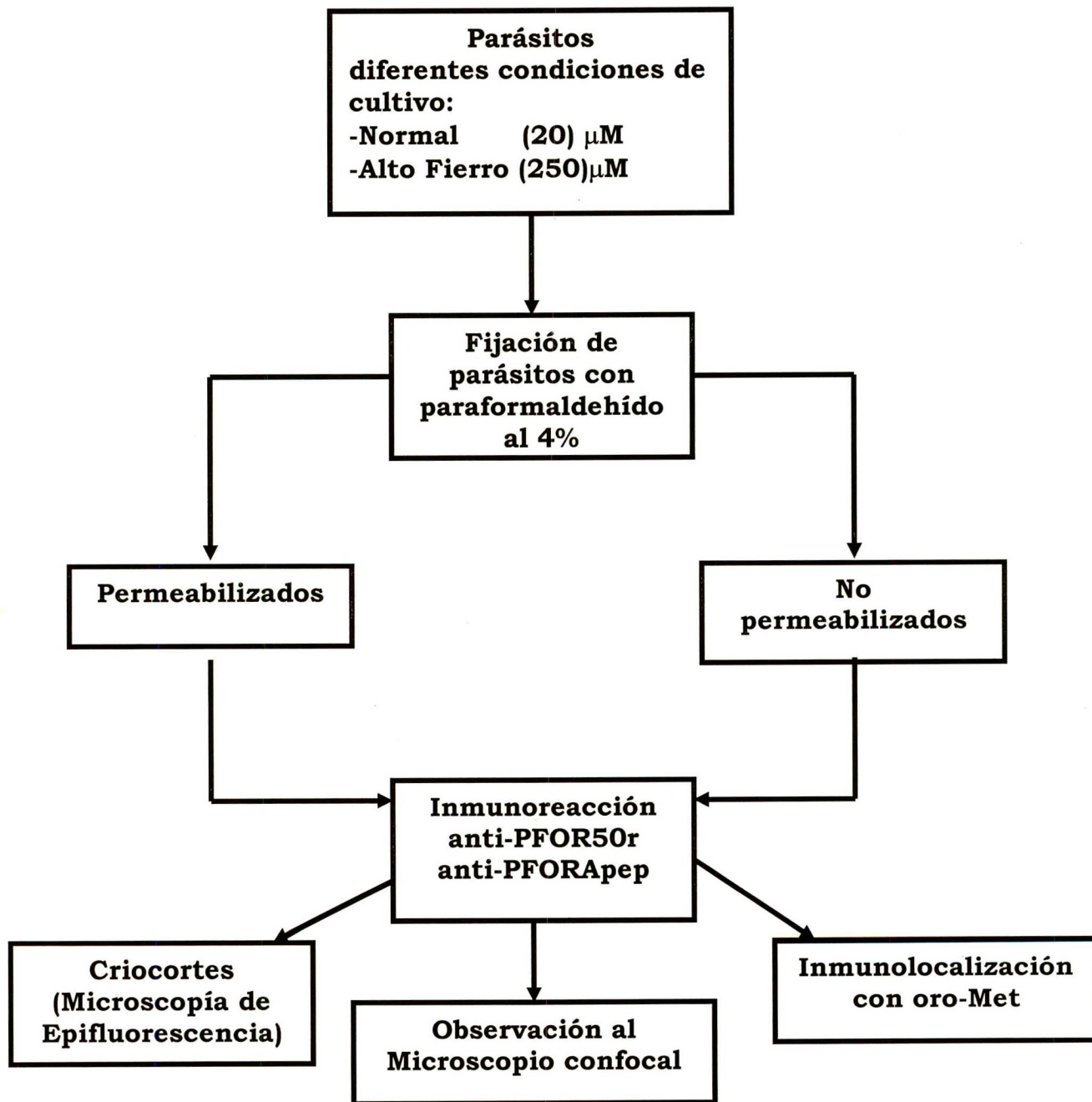
7.2.2.-Generar anticuerpos policlonales contra la región carboxilo terminal de la PFOR A de *T. vaginalis*.



7.2.2.1.- Producir anticuerpos anti-péptido divergente



7.2.3.-Determinar la localización de PFOR en el parásito crecido en altas concentraciones de Fe^{2+} .



8.-METODOLOGÍA

8.1.-CULTIVO DE *T. vaginalis*

El aislado CNCD 188 de *T. vaginalis*, se cultivó por 24 h a 37 °C en medio TYM (“trypticase-yeast extract-maltose”) con 10% de suero de caballo (SC) (JSR, Lenexa, Kans) inactivado por calor (Diamond, 1957). Los parásitos se cosecharon en fase logarítmica de crecimiento para todos los experimentos.

Los cultivos de parásitos se suplementaron con altas concentraciones de hierro, al agregar sulfato ferroso amoniacal (MERK) (250 μ M final) al medio TYM. Para concentraciones bajas de hierro al medio se agregó 2-2'-dipiridil (Sigma) (150 μ M final), un agente quelante de hierro. Estos compuestos se agregaron 24 h antes de hacer la resiembra de parásitos.

8.2.-EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

La extracción de DNA genómico de *T. vaginalis* se realizó a partir de 1.5×10^8 parásitos por medio de la técnica de fenol-cloroformo (Chou y Tai, 1996) modificada por Espinosa y col., (2001). Los parásitos se lavaron tres veces centrifugando a $510 \times g$ por 5 min a 4°C con 20 ml de PBS, pH 7.4. El botón celular se resuspendió en 2 ml de PBS y se transfirió a dos tubos Eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente, a cada tubo se le agregaron 300 μ l de amortiguador de lisis (apéndice) y 300 μ l de fenol (equilibrado con Tris-HCl, pH 8.0), se agitó suavemente por 30 s y se centrifugó a $15,000 \times g$ por 3 min a 4°C en microcentrífuga. La fase superior se tomó cuidadosamente, sin tocar la interfase,

se colocó en un tubo Eppendorf nuevo con 300 μ l de fenol y 300 μ l de cloroformo al 100%, se agitó y se centrifugó de la misma forma que en el paso anterior. La fase superior se colocó en un tubo Eppendorf nuevo con 500 μ l de cloroformo al 100%, se agitó y se centrifugó. Posteriormente, la fase superior se colocó en otro tubo Eppendorf nuevo y el DNA se precipitó con 40 μ l de acetato de sodio 3M y 1 ml de etanol al 100% (2.5 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M), a -20°C durante 2 h y se centrifugó a 15,000 \times g durante 15 min para obtener los ácidos nucleicos. El sobrenadante se retiró y el botón de ácidos nucleicos se lavó con 1 ml de etanol al 70%, se retiró el etanol y la pastilla se secó y se resuspendió en 50 μ l de amortiguador TE (Apéndice). Finalmente, se agregó 0.5 μ l de ribonucleasa A (2 mg/ml) y se incubó durante 30 min a 37°C. El DNA se analizó en geles de agarosa al 1% en TAE 1 \times y se almacenó a 4°C.

8.3.-DISEÑO DE INICIADORES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DIVERGENTES DE GENES HOMÓLOGOS A PFOR A

A partir de las secuencias de DNA con 86, 63 y 61%homología a *pfor a* encontradas en el genoma de *T. vaginalis* (TIGR) utilizando como sonda la secuencia de 1.1 kb de *pfor a*, se realizó un alineamiento múltiple en el cual se ubicaron las regiones divergentes (**Fig. 10**). En la Tabla 1 se muestra la ubicación de las secuencias homólogas dentro del genoma Proyecto del *T. vaginalis*, el nombre y el tamaño de cada gen. Con estas secuencias se diseñaron oligonucleótidos específicos en sentido (5'→3') y en antisentido (5'←3') por medio del programa OLIGO 4 (MAC) (**Tabla 2**).

Tabla 1. Localización de las secuencias homólogas a PFOR A, encontradas en el TIGR (The *Trichomonas vaginalis* Genome Sequencing Project) (Upcroft y col., 2006). <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tvg/>

Gen	Nombre del gen	No. de Conting en el TIGR	Longitud (nt)	Nombre del locus	Posición
Clona 86	Piruvato:ferredoxin oxido reductasa E	1047229024257	3,474	88728.m00102	34108-30596
Clona 63	Piruvato:ferredoxin oxido reductasa D	1047229024066	3,642	83584.m00142	11887-8246
Clona 61	Piruvato:ferredoxin oxido reductasa C	1047229023630	3,570	83862.m00065	29108 - 25538

Tabla 2. Secuencias y ubicación de los iniciadores para amplificar los fragmentos de los genes homólogos a PFOR A.

Gen	Nombre	Secuencia (5' → 3')	Long. (nt)	Tamaño esperado del amplicón (kb)	Posición (aa)
PFOR A	PFOR5'	GAA GAG GGC AAG AAC TGG GA	20	1.1	759-767
	PFOA3'	<u>AGCG GCC GCA</u> TCT TCT TGT AGC CCT CGT AA	29		1145-1153
PFOR E	PFO865'	CCT TTC AAT GCT TCA GTC CG	20	2.1	61-68
	PFO863'	TGG AGC GCC GAA GCA CTT GA	20		767-773
PFOR D	PFO6315'	ACT CGC AAA CCC ATA CTA CG	20	1.2	238-245
	PFO633'	CTC GTG TGT CTT CTC TTC AA	20		646-652
PFOR C	PFO61A5'	GGT TTC ATG GCT ATT GGC GA	20	1.8	357-363
	PFO613'	GTG GGA TTG TCT TGA GGA TG	20		956-963

^a Sitio de restricción para Not I

8.4.- AMPLIFICACIÓN POR PCR DE FRAGMENTOS DIVERGENTES DE GENES HOMÓLOGOS A PFOR

Para amplificar los fragmentos de genes homólogos a *pfor a*, para la desnaturalización, extensión, hibridación y el número de ciclos suficientes se consideró el tamaño de los fragmentos y las temperaturas de alineamiento de los iniciadores específicos para cada gen. En un tubo eppendorf estéril de 500 µl, con paredes delgadas, se colocó 1 µl de cada uno de los iniciadores (1µg/µl) (sentido y reverso) (**Tabla 2**). Como control negativo se preparó una reacción de 50 µl sin DNA genómico, se puso una segunda reacción con el mismo volumen que la anterior a la cual se le agregó 1 µl de DNA genómico (1 µg/µl) y una tercera a la cual se le adicionó 1 µl de DNA plasmídico (1 µg/µl) de la clona que contiene al gen *pfor a*, el cual es un control de reacción negativo. La mezcla de PCR se hizo con 1 µl de la enzima Taq polimerasa (Perkin Elmer 7.5 µg/µl), 9 µl de MgCl₂ 25 mM, 5 µl de amortiguador para PCR (10×) y 1 µl de deoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's) 0.2 mM (dATP, dTTP, dGTP y dCTP). Las condiciones de PCR utilizadas para el gen *pfor e*: 94°C por 2 min, 1 ciclo, después 35 ciclos de 94 °C 1 min, 61°C 35 seg, 72°C 4 min y las condiciones de extensión final de 72 °C 7 min 1 ciclo. Para el gen *pfor d*: 94°C por 2 min, 1 ciclo, después 94 °C 1 min, 51°C 35 seg, 72°C 2 min 30 ciclos y las condiciones de extensión final 72 °C 7 min 1 ciclo. Para el gen *pfor c*: 94°C por 2 min, 1 ciclo, después 94 °C 1 min, 56°C 35 seg, 72°C 2.5 min 30 ciclos y las condiciones de extensión final 72 °C 7 min 1 ciclo. Para visualizar los productos, se corrió un gel de agarosa al 1%, en amortiguador TAE 1× y se tiñó con bromuro de etidio utilizando.

8.5.- CLONACIÓN DE PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN EN EL VECTOR

pCRII-TOPO (Invitrogen) DE LOS GENES HOMÓLOGOS AL GEN *pfor a*

Para clonar los productos amplificados de los genes homólogos al gen *pfor a* se tomaron 4 µl de la reacción respectiva de PCR, 0.5 µl del vector PCR II - TOPO (Invitrogen), 0.5 µl de H₂O, 1 µl de sales contenidas en el kit del vector (Invitrogen) y la mezcla se incubó por 5 min a temperatura ambiente.

Posteriormente, bacterias químicamente competentes (*E coli* TOP 10) se transformaron con 4 µl de la mezcla de ligación se incubaron por 30 min en hielo, posteriormente se les dio un choque térmico (42°C por 30 s), e inmediatamente se pasó a hielo; después se agregaron 250 µl de medio SOC (ver apéndice), se incubaron en agitación a 200 rpm y 37°C por 1 h. Enseguida 75 ó 100 µl del cultivo se plaquearon en dos cajas con medio LB + ampicilina (100 mg/ml) y 40 µl de X-Gal (40 mg/ml) y se incubaron a 37°C por 18 h. Finalmente, las colonias blancas y azules se contaron y las colonias blancas se sembraron en una caja maestra donde cada una de las clonas se enumeró para su posterior análisis por restricción, previa extracción del DNA plasmídico por “Miniprep”.

8.6.-SELECCIÓN DE CLONAS POR “PCR COLONY”

Para seleccionar las clonas candidatas que tuvieran los fragmentos de DNA de interés, se realizó una “PCR colony” en la cual se utilizó como templado cada una de las clonas de la caja maestra y los oligonucleótidos utilizados para amplificar inicialmente los fragmentos (**Tabla 2**). Para la

amplificación de cada clona se preparó una mezcla de reacción de PCR de 50 μ l volumen final un tubo Eppendorf de 0.5 ml de paredes delgadas conteniendo 1.5 μ l de cada uno de los iniciadores, 1 μ l Taq polimerasa (Perkin Elmer 7.5 μ g/ μ l), 9 μ l de $MgCl_2$ 25 mM, 5 μ l de amortiguador de PCR (10 \times) y 1 μ l de deoxirribonucleótidos trifosfatados 10 mM (dATP, dTTP, dGTP y dCTP), además se agregó H_2O para un volumen total de 50 μ l, como DNA molde se agregó con un palillo esteril una porción de la colonia candidata y finalmente se agregó 50 μ l de aceite de silicona. Como control positivo se utilizó DNA genómico de cada uno de los fragmentos inicialmente amplificados. El control negativo se preparó de la misma manera, pero sin DNA molde. Las condiciones de PCR fueron las utilizadas para la amplificación de los fragmentos a partir de DNA genómico. Para visualizar los resultados, se corrió un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1 \times y se tiñó con bromuro de etidio.

8.7.-EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

Una colonia de bacterias se inoculó en 5 ml de medio LB con 5 μ l de ampicilina (100 mg/ml) y se incubó a 37°C durante 16-18 h en agitación a 200 rpm. Las bacterias se empastillaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, por centrifugación a 15,000 \times g por 2 min, se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 μ l de la solución I (ver apéndice) fría, se agitó hasta resuspender la pastilla. Enseguida, se agregaron 200 μ l de la solución II recién preparada (ver apéndice), se mezcló suavemente por inversión, después se agregaron 150 μ l de Solución III fría (ver apéndice), se mezcló suavemente por inversión, se incubó en hielo durante 5 min y se centrifugó a 15,000 \times g durante

5 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se agregó un volumen igual de la mezcla de fenol-cloroformo 1:1, se agitó y se centrifugó de la misma manera que en el paso anterior. La fase superior se transfirió (sin tomar la interfase) a un tubo limpio, se agregaron 2 volúmenes de etanol al 100% frío y se precipitó por 2 h a - 20 °C, luego se centrifugó a 15, 000 × g durante 20 min a 4°C. La pastilla obtenida se lavó 3 veces con etanol al 70% frío, se secó a temperatura ambiente, se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada estéril, después se agregó Ribonucleasa A (10 mg/ml) y se incubó por 1h. Para determinar la calidad del DNA plasmídico obtenido se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1%. La extracción de DNA plasmídico a gran escala (maxiprep) se hizo a partir de un cultivo de 50 ml.

8.8.-PURIFICACIÓN DE DNA PARA SECUENCIACIÓN

Para purificar DNA plasmídico por medio del kit “gene clean” (Q.Biogene) de la clonas que contienen los fragmentos de interés, se partió de 100 µl de DNA plasmídico (Maxiprep), al que se le agregaron 3 volúmenes de NaI (4M) y se incubó a 50°C por 5 min, luego se agregaron 5 µl de “Glassmilk”, se agitó por 30 min a temperatura ambiente, y se centrifugó a 15,000 × g por 2 min. El sobrenadante se decantó y la pastilla se lavó tres veces con 500 µl de “New Wash” por centrifugación a 15,000 × g por 5 min a temperatura ambiente. La pastilla se secó, se resuspendió en 100 µl de H₂O bidestilada estéril, se incubó a 55°C por 10 min, se centrifugó a 15,000 × g por 2 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendofit nuevo. La concentración de DNA se determinó en el espectrofotómetro a una absorbancia de 260 nm.

8.9.-CONGELACIÓN DE CLONAS DE *E. coli* RECOMBINANTES

Para la preservación la clona candidata se inoculó en 5 ml de medio LB con 5 µl de ampicilina (100 mg/ml) y se incubó en agitación (200 rpm) a 37° C por 18 h. Después, al tubo de cultivo de bacterias se agregó 4.5 ml de glicerol - LB (1:1) estériles, se mezcló y se hicieron alícuotas de 1 ml en tubos Eppendorf de 1.5 ml estériles. (en presencia de mechero) y los tubos se almacenaron a -70° C.

8.10.-SECUENCIACIÓN DE DNA

Para confirmar que el producto de PCR clonado corresponde a la secuencia del gen *pfor a* reportada por Hrdy y col., (1995) o de los otros genes tipo PFOR, la secuenciación del DNA plasmídico de las clonas seleccionadas se realizó por el método de Sanger (Sanger y col., 1977) con iniciadores universales (T7 promotor y M13 reverse) el secuenciador automático del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Posteriormente, la traducción teórica de la secuencia se hizo con el programa "Translate tool" (<http://us.expasy.org/>). En el caso de los fragmentos de mayor tamaño los oligonucleótidos se diseñaron con el programa OLIGO 4 (MAC).

8.11.-EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE *T. vaginalis*

La extracción de RNA total se realizó a partir del aislado CNCD 188 de *T. vaginalis*. Los parásitos se crecieron en tres diferentes condiciones de hierro: en medio normal, en presencia de dipirilo y en alto hierro. Para cada condición se

cosecharon 1.4×10^8 parásitos, se lavaron dos veces con PBS pH 7.0, se centrifugaron a $510 \times g$ por 5 min a $4^\circ C$ y se lisaron por inversión con 7 ml de TRIzol (GIBCO BRL). Las muestras se incubaron 5 min a temperatura ambiente para permitir una disociación completa de complejos nucleoprotéicos; enseguida se agregó 0.2 ml de cloroformo y se mezcló por inversión durante 15 s, se incubó a temperatura ambiente por 3 min y las muestras se centrifugaron a $15,000 \times g$ durante 15 min a $4^\circ C$. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, se precipitó con 0.5 ml de alcohol isopropílico, se incubó a temperatura ambiente por 20 min, se centrifugó a $15,000 \times g$ durante 20 min a $4^\circ C$ y el sobrenadante se eliminó. Las pastillas de RNA se lavaron con 1 ml de etanol al 70%, se secaron a temperatura ambiente, se resuspendieron en 100 μl de H₂O-DEPC y se almacenaron a $-70^\circ C$. Finalmente, la concentración de RNA se cuantificó en el espectrofotómetro a una absorbancia de 260 nm y la calidad del RNA se verificó por electroforesis de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1 \times y se tiñó con bromuro de etidio.

8.12.-SÍNTESIS DE cDNA DE *T. vaginalis* PARA ENSAYOS DE RT-PCR.

A partir de RNA total de parásitos crecidos en bajas, normales y altas concentraciones de hierro, el cDNA se sintetizó con el kit "SuperScript II RNasa H-Reverse Transcriptase" (Invitrogen). En un tubo Eppendorf nuevo esteril y horneado de 1.5 ml se agregaron 5 μg de RNA total, a cada tubo se le agregó 1 μl de oligo dT (Invitrogen) y H₂O DEPC hasta completar 12 μl de reacción, se desnaturalizó durante 10 min a $70^\circ C$ y se enfrió rápidamente sobre hielo por 5 min. Durante los 5 min en hielo se agregaron 5 μl de amortiguador 5 \times "first

strand buffer”, 2 µl de DTT 0.1 M, 2 µl de una mezcla de dNTPs (10 mM de cada uno: dATP, dCTP, dTTP y dGTP), se mezcló suavemente y se centrifugó. Enseguida, la mezcla se incubó durante 2 min a 42°C, se agregó 1 µl de SuperScript II- RT y se incubó 50 min a 42 °C y la enzima se inactivó durante 15 min a 70°C . Para amplificar productos mayores de 1 kb se utilizó 2U de RNAsa H para remover el RNA complementario al cDNA. La cuantificación del cDNA se hizo de las tres condiciones de hierro se realizó en el espectrofotometro a una absorbancia de 260 nm.

8.13.-RT-PCR

Para analizar el efecto de Fe²⁺ al nivel de cantidad de transcrito de cada uno de los genes homólogos al gen *pfor a*, se realizaron ensayos de RT-PCR. Los fragmentos divergentes de cada uno de los genes, se amplificaron utilizando como templado 1 µg del cDNA del aislado CNCD 188 y los oligonucleótidos específicos para cada gen. El cDNA se obtuvo de parásitos crecidos en diferentes condiciones de hierro (normal, bajo y alto hierro) tomando en cuenta las mismas condiciones de amplificación a partir de DNA genómico descritas para los genes homólogos al gen *pfor a* (*pfor c*, *pfor d* y *pfor e*). Como control positivo se amplificó el fragmento de 1.1 kb que codifica para el extremo carboxilo-terminal de la PFOR A, con los oligonucleótidos PFOR5' 5'-GAA GAG GGC AAG AAC TGG GA-3' diseñado de las bases 2,277 a 2,299 y PFOA3' 5'-GCG GCC GCA TCT TCT TGT AGC CCT CGT AA-3' diseñado de las bases 3,436 a 3,457 nt, a partir de la secuencia del gen *pfor a* del aislado CNCD 188 (no. de acceso AY661465) (**Tabla 2**). Como control positivo de reacción para cada gen tipo *pfor* se utilizó DNA genómico como molde. Para cada reacción se preparó una mezcla de 50 µl con 1.5 µl de los

oligonucleotidos, 1 μ l (10 pmol/ μ l) de Taq polimerasa (Invitrogen), 3 μ l de MgCl₂ (25 mM), 5 μ l de amortiguador de PCR (10 \times), 1 μ l de deoxirribonucleótidos trifosfatados 10 mM (dATP, dTTP, dGTP y dCTP), se agregó H₂O para un volumen final de 50 μ l. También se agregó 50 μ l de aceite de silicona. El control negativo contenía todos los componentes de la reacción, pero sin cDNA.

Como control de cantidad se amplificó un fragmento de 112 pb del gen para la β -tubulina de *T. vaginalis* (Madico y col., 1998) con el iniciador en sentido BTUB9 (5'-CAT TGA TAA CGA AGC TCT TTA CGA T-3') diseñado de las bases 850 a 874 y en antisentido, BTUB2 (5'-GCA TGT TGT GCC GGA CAT AAC CAT-3') diseñado de las bases 961 a 938. Las condiciones de PCR fueron 94°C por 2 min, 1 ciclo, 25 ciclos de 94 °C 1 min, 48°C 1 min, 72°C 30 s y la condición de extensión final a 72 °C 7 min 1 ciclo. Para visualizar los resultados, se corrió un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1 \times y se tiñó con bromuro de etidio.

8.14.-DISEÑO DE INICIADORES CON SITIOS DE RESTRICCIÓN

Para amplificar los fragmentos de 1.1 y 1.9 kb del extremo carboxilo-terminal de la PFOR A y subclonarlos en un vector de expresión, se tomaron en cuenta enzimas con sitios de restricción que solo corten en el vector y no en los fragmentos de interés los cuales se agregaron a los oligonucleótidos específicos. (**Tabla 3**). Los oligonucleótidos en sentido tienen el sitio de restricción para *Bam*HI y el oligonucleótido en antisentido tiene el sitio de restricción para *Hind* III.

Tabla 3. Oligonucleótidos para amplificar los fragmentos 1.1 y 1.9 de PFOR A con sitios de restricción para su expresión en un vector de expresión.

Fragmento	Nombre	Secuencia (5'→3')	Long. (nt)	Posición (aa)
1.9 kb	PFO1.95'	G GCG GGA TCC GCT GAC CTC AAC AAG GAC CTT C	32	515-521
	PFO3'R	G GCG AAG CTT TTA CTG TGT TTC GTG GAT CTT C	32	1151-1158
1.1 kb	PFO1.15'	GGCG GGA TCC GAA GAG GGC AAG AAC TGG GAT C	32	760-767
	PFO3'R	G GCG AAG CTT TTA CTG TGT TTC GTG GAT CTT C	32	1151-1158

8.15.-AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE 1.1 Y 1.9 kb DE PFOR A

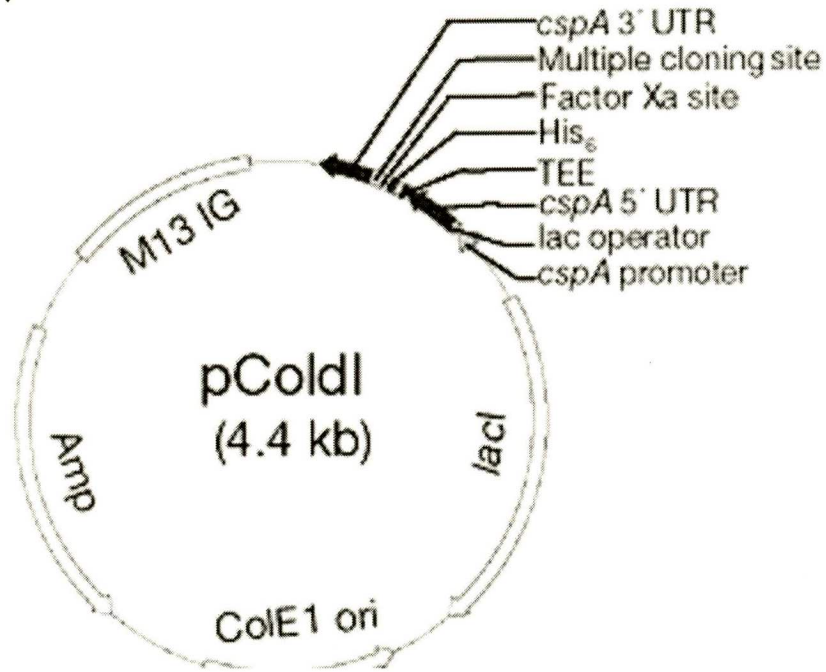
Para amplificar los fragmentos de 1.1 y 1.9 kb como templado se utilizó el DNA plasmídico de la clona PFOR A y los iniciadores respectivos (**Tabla 3**). En un tubo Eppendorf estéril de 500 μ l, de paredes delgadas, se colocó 1.5 μ l (1 μ g/ μ l) de cada uno de los iniciadores, 1 μ l de la enzima Taq Polimerasa (PFUturbo) (Stratagene), 9 μ l de MgCl₂ (25 mM), 5 μ l de amortiguador para PCR (PFU) (10 \times) y 1 μ l de deoxirribonucleótidos trifosfatados 0.2 mM (dATP, dTTP, dGTP y dCTP). Como control negativo se preparó una reacción de 50 μ l sin DNA genómico. Las condiciones de PCR utilizadas para los fragmentos 1.9 y 1.1 kb fueron: 94°C por 60 s, 1 ciclo, después 26 ciclos de 94 °C 50 s, 55°C 45 seg, 1.40 min y las condiciones de extensión final 72 °C 5 min 1 ciclo. Para visualizar los productos, se corrió un gel de agarosa al 1%, en amortiguador TAE 1 \times . Posteriormente, los amplificados obtenidos se clonaron en el vector PCRII-TOPO para su secuenciación.

8.16.-CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE FRAGMENTOS DE PFOR A EN UN SISTEMA PROCARIONTE.

Los amplificados de los fragmentos que corresponden al extremo carboxilo-terminal de 1.1 kb y 1.9 kb se clonaron de forma directa en los vectores de expresión pCold I (TAKARA BIO. INC.) y pET32a(+) (Novagene). El vector pCold I tiene un tamaño de 4,407 pb, un marcador de resistencia a ampicilina y una secuencia de 6 histidinas para la purificación de la proteína recombinante por afinidad a níquel. El vector pET32a(+) (Novagene) tiene un tamaño de 5,900 pb,

un marcador de resistencia a ampicilina y 2 secuencias de 6 histidinas, una en el extremo carboxilo-terminal y otra en el extremo amino-terminal, y un sitio de corte para la proteasa trombina (Tb) (**Fig 9**). Para la subclonación de los fragmentos de 1.1 y 1.9 kb se realizó una amplificación a partir de DNA plasmídico PCR-IITOPPO (Invitrogen) conteniendo el gen *pfor a* del aislado CNCD 188 (no. de acceso AY661465 en el GENBANK) (Meza-Cervantez, 2005). Enseguida, los amplificados se purificaron por el método de Qiagen (Amersham), después extremos cohesivos por digestión con las enzimas *BamHI* y *HindIII*. Para ello, se realizó una doble restricción tanto de los amplificados ya purificados y de los plásmidos [pCold I y pET32a(+)] y se incubó a 37°C por 18 h. Nuevamente, tanto los amplificados como los plásmidos digeridos se purificaron por el método de Qiagen (Amersham).

a)



b)

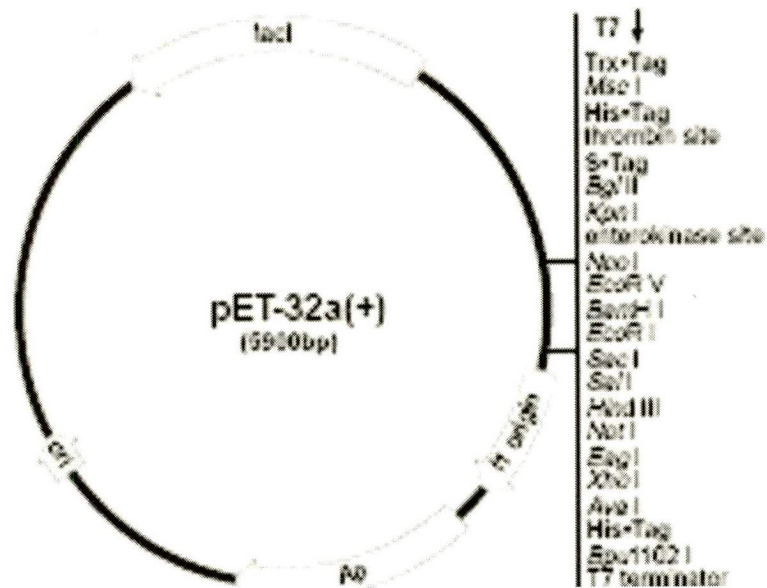


Figura 9. Mapa de los vectores de expresión pCold I (a) y pET32a (+) (b). El vector pCold I tiene un tamaño de 4.4 kb, un marcador de resistencia a ampicilina y un tag de histidinas; el vector pET32a (+) tiene un tamaño de 5.9 kb, un marcador de resistencia a ampicilina y dos tag de histidinas.

EL DNA plasmídico de los vectores y los amplificadores de 1.9 y 1.1 kb del gen *pfor a* restringidos y purificados se ligaron en una proporción 1:10 (vector-inserto) usando 1 μ l de T4 DNA ligasa 40,000 U (Biolabs) en una reacción de 15 μ l durante 16 h a 16 °C. Después en las células competentes *DH5a* de *E. coli* (50 μ l) el DNA plasmídico se transformó con 1.5 μ l y la mezcla de ligación, se incubaron en hielo por 20 min, se les dio un choque térmico a 42 °C por 45 s, se transfirieron a hielo durante 2 min, se les adicionó 900 μ l de medio LB y se incubó a 37 °C durante 1 h en agitación a 200 rpm. Enseguida, las bacterias transformadas se sembraron en placas LB-ampicilina (100 μ g/ml). Para determinar la presencia de inserto se obtuvo el DNA plasmídico de las clonas y se analizó por restricción con las mismas enzimas usadas en la clonación (*BamHI* y *HindIII*) a 37°C por 16 h. Estas restricciones se analizaron en un gel de agarosa al 1%. Las clonas positivas se almacenaron con glicerol al 10% a -72 °C.

8.17.- INDUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES PFOR50 Y PFOR70 CON IPTG

Para la expresión de las proteínas recombinantes, en células competentes BL21 (DE3) pLys de *E. coli*, 1.5 μ l de los plásmidos pColdI-PFO1.1, pColdI-PFOR1.9, pET32a(+)-PFOR1.1 y pET32a(+)-PFOR1.9 se transformaron. La inducción de las proteínas recombinantes se realizó de acuerdo al manual del sistema pET (Novagen) y el sistema pCold I (TAKARA). Para ello, 50 ml de medio LB con ampicilina (100 μ g/ml) en matraces de 250 ml se inocularon con las bacterias transformantes correspondientes, los cultivos se incubaron a 37 °C y 200 rpm hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0.6 a 600 nm. Para los cultivos que contienen al vector pET32a(+) la inducción se realizó con 1 mM de

isopropil β -D tiogalacto-piranósido (IPTG) (Sigma) a una temperatura de 37 °C por 2 h. Para los cultivos que contienen el vector pCold I la inducción se realizó con IPTG 1mM a 16 °C por 24 h.

El análisis de la expresión de las proteínas recombinantes se visualizó por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida al 8%. Las proteínas de cada una de las pastillas obtenidas de los cultivos, se solubilizaron con amortiguador de muestra 1 \times (BM1 \times) y se hirvieron por 3 min.

Para saber si las proteínas recombinantes son solubles, los cultivos se centrifugaron a 2,500 \times g para obtener una pastilla de bacterias, la cual se resuspendió con vortex por 10 min en 20 ml de amortiguador de lisis (ver apéndice), los lisados se sonicaron en frío por 8 periodos de 40 s, a velocidad constante. Después, los lisados de bacterias se centrifugaron a 30,000 \times g por 25 min y la pastilla obtenida (fase insoluble) como el sobrenadante (fase soluble) se analizaron por SDS-PAGE al 10%.

8.18.- PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES POR AFINIDAD A NÍQUEL

Para la cromatografía de afinidad a níquel, la fracción soluble obtenida del lisado de bacterias que expresan a las proteínas recombinantes con el vector pCold I (aunque gran parte de la proteína se almacenó en cuerpos de inclusión), se filtró por una membrana 0.22 μ m y se pasó por una resina de níquel utilizando columnas comerciales His-TrapTMFF (Amersham Biosciences). Primeramente, la columna se hidrató, se equilibró con amortiguador de lisis y se

pasó el lisado de bacterias ya filtrado. Posteriormente, la columna se lavó con el amortiguador de lavado 1 y lavado 2 (ver apéndice) y la proteína recombinante se eluyó con el amortiguador de elusión (ver apéndice). Las proteínas recombinantes purificadas se visualizaron por SDS-PAGE.

8.19.- PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS anti-PFOR50

Para producir anticuerpos policlonales contra la PFOR50 se inmunizaron cuatro ratones Balb/c machos de 3-4 semanas de edad. El suero preinmune control se obtuvo antes de inmunizar a los ratones. Las inmunizaciones se realizaron por vía intraperitoneal con 10 µg de proteína recombinante, siguiendo el esquema de inmunización estándar (Harlow y Lane, 1988). La primera inmunización se hizo con adyuvante completo de Freund 1:1 (Sigma). La segunda inmunización se realizó con adyuvante incompleto de Freund 1:1 y las tres inmunizaciones subsecuentes se realizaron con la proteína recombinante en PBS 1x. Los ratones finalmente se sangraron a muerte para obtener la mayor cantidad de suero (**Tabla 4**).

8.20.- EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE *T. vaginalis* POR PRECIPITACIÓN CON ÁCIDO TRICLOROÁCETICO (TCA) AL 10%.

Para extraer las proteínas totales de *T. vaginalis*, se utilizaron 2×10^7 parásitos previamente se lava dos veces con PBS por centrifugación a $510 \times g$ por 5 min a 4 °C. Posteriormente, los parásitos se resuspendieron en 0.9 ml de PBS frío pH 7.0, se agregaron 0.1 ml de TCA al 100%, se mezcló vigorosamente y se incubó a 4 °C por 18 h. Enseguida, se concentró el precipitado por

centrifugación a $15,000 \times g$ por 3 min a 4°C , la pastilla se lavó tres veces con PBS frío a $15,000 \times g$, 3 min, se resuspendió en 0.4 ml de amortiguador de muestra (BM1 \times) y el patrón electroforético de proteínas se analizó por SDS-PAGE.

8.21.-ELECTROTRANSFERENCIA A MEMBRANA DE NITROCELULOSA

En un recipiente con amortiguador de transferencia (ver apéndice) se colocó la unidad de transferencia que contiene una esponja, papel filtro Whatman[®] no. 3, el gel de poliacrilamida, una membrana de nitrocelulosa de $0.45 \mu\text{m}$, papel filtro Whatman[®] y una esponja. Enseguida la unidad de transferencia se colocó dentro de la cámara de transferencia junto con el amortiguador. La transferencia se realizó en hielo a 100 volts durante 1 h con agitación suave.

Para verificar la transferencia, las membranas se tiñeron con la solución de rojo de Ponceau (Sigma) por 5 min a temperatura ambiente, se destiñeron con PBS 1 \times pH 7 se bloquearon con leche al 5% en PBS-Tween 20 al 0.05% toda la noche en agitación suave a 4°C .

Tabla 4. Esquema de inmunización en ratones Balb/C con la proteína recombinante de 50 kDa (PFOR50).

Semana	Cantidad de antígeno $\mu\text{g}/\text{ratón}$	adyuvante completo de Freund	adyuvante incompleto de Freund	Sangrado	Western blot
1 ^a	10	+	-	-	-
2 ^a	10	-	+	-	-
3 ^a	10	-	-	-	-
4 ^a	10	-	-	-	-
5 ^a	10	-	-	-	-
6 ^a	-	-	-	+	+
7 ^a	-	-	-	+	+
8 ^a	-	-	-	+	+

8.22.-ENSAYOS DE WESTERN BLOT

Para estos ensayos los extractos totales de *T. vaginalis*, las proteínas recombinantes puras, y los lisados para adhesinas se separaron por electroforesis (SDS-PAGE) al 9% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (NC) por el método estandar de electrotransferencia. Enseguida, las membranas de NC se incubaron con los diferentes sueros a probar, diluidos en PBS-Tween al 0.1% por 18 h a 4 °C, y luego las membranas se lavaron con PBS-Tween 0.1% y se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo o anti-ratón (Pierce), acoplado a peroxidasa diluido 1:3,000. La detección se realizó por color con 4-cloro naftol.

8.23.- FIJACIÓN DE PARÁSITOS PARA INMUNOLocalIZACIÓN

Para la fijación de parásitos en suspensión, para microscopía electrónica los parásitos se lavaron con PBS 1× pH 7.0 tres veces por centrifugación a $510 \times g$, a 4°C. Posteriormente, se le agregó paraformaldehído al 4% (recién preparado) con glutaraldehído al 0.5% disuelto en PBS 1× pH 7.0 a temperatura ambiente por 1 h, usando 1 ml por cada 20×10^6 parásitos.

Para la fijación de parásitos adheridos a laminilla (cubre objetos), los parásitos se crecieron por 24 h a 37°C en tubos cónicos estériles de 50 ml los que contienen rejillas de aluminio en las que se colocan los cubreobjetos estériles. Para condiciones normales de cultivo se inocularon 8×10^6 parásitos y 3×10^6 parásitos para concentraciones altas de hierro. Para microscopía confocal, las laminillas conteniendo parásitos adheridos se enjuagaron en PBS pH 7.0 a

37°C se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS pH 7.0 a 37°C por 1 h, usando 1 ml por cada laminilla.

8.24.- PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA INCLUIR CRIOCORTES EN RESINA L.R. WHITE.

Los criocortes realizados a partir de parásitos fijados con paraformaldehído al 4% (recién preparado) y glutaraldehído al 0.5% se deshidrataron con etanol al 30%, 50%, 70% y 90% por 10 min cada uno. Después la preinclusión de los cortes se hizo con etanol al 95% y la resina L.R. WHITE a 20°C, durante 1 h, se cambió tres veces la resina (por 1 h a 20°C cada cambio en una relación 1:2). Las muestras se incubaron en la resina L.R. WHITE toda la noche a 4°C. Enseguida, la inclusión se hizo en cápsula de gelatina con resina nueva. Las cápsulas se cerraron en una gradilla sin catalizador. La polimerización de la resina se llevó a cabo por 48 h a 56°C. Después se realizó la inmunoreacción con los anticuerpos.

8.25.-INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Parásitos en altas concentraciones de hierro y condiciones normales de cultivo se crecieron adheridos a cubreobjetos por 24 h a 37°C. Enseguida, se lavaron con PBS, pH 7.0 a 37°C filtrado, se fijaron con paraformaldheído al 4% por 1 h a 37°C. Después de lavarlos con PBS, se bloquearon con suero fetal bovino (SFB) al 1% por 15 min y con glicina 0.5 M durante 1 h a 37°C y luego, se realizaron tres lavados con PBS-albumina al 1%. Todo el proceso se realizó para parásitos no permeabilizados. Para permeabilizar los parásitos antes del bloqueo,

primero se eliminó el RNA neutralizando con cloruro de amonio 50 mM-PBS 1× por 10 min y después se realizaron tres lavados con PBS por 5 min. Enseguida, se agregó HCl 1N por 2 h a temperatura ambiente, se realizaron tres lavados con PBS 1×, las laminillas se hidrataron por 10 min con PBS, se permeabilizaron con Triton 100-X al 0.2% por 10 min y después se bloquearon como se mencionó antes. Posteriormente, las muestras se incubaron con los siguientes anticuerpos: anti-TvAP120 (1:50) como control positivo, un suero preinmune de ratón (1:200) como control negativo, anti-PFOR50 (1:200) y por último el anticuerpo antiPFOR Apep (1:80). Todos los anticuerpos se diluyeron en PBS-albumina al 1%. Los segundos anticuerpos de cabra anti-ratón y anti-conejo acoplados a fluoresceína (FITC) (Pierce) se diluyeron en PBS a una dilución 1:100, se agregaron a las laminillas y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente. Para los parásitos permeabilizados se realizó una contratinción con yoduro de propidio (10µg/ml) por 30 s. Por último, a las laminillas se les agregó 8 µl de resina Vectasheild (Vector Laboratories) y se observaron en un microscopio confocal.

8.25.-SELECCIÓN Y DISEÑO DE PÉPTIDO SINTÉTICO

Con el objeto de encontrar la secuencia más divergente de PFOR A para la generación de anticuerpos en contra de un péptido sintético, se realizó un alineamiento múltiple con el programa CLUSTAL W entre las secuencias homólogas que podrían codificar para enzimas tipo PFOR encontradas en el genoma de *T. vaginalis* del TIGR (www.tigr.org). Al ubicar la región más divergente entre las diferentes secuencias tipo PFOR (A, B, C, D y E), se le realizó un análisis de hidropatía y antigenicidad con el programa de Hopp-Woods (<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/>) en busca de la región más antigénica. El

diseño teórico en 3-D de la molécula PFORA se realizó con el programa Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>) para determinar si la región seleccionada se encuentre expuesta en la molécula. Los parámetros que se tomaron en cuenta para la selección del péptido ideal (Salas- Garrido 2005, Tesis de Maestría) para la producción de anticuerpos fueron: a) una región divergente entre las PFOR de 13 aminoácidos (suficiente para que este péptido sea inmunogénico), b) el péptido sintético se acopló a una acarreador de lisinas (MAPs), c) aunque se recomienda que el péptido sintético sea hidrosoluble en este caso es un péptido hidrofóbico, d) un modelo teórico en 3-D de la proteína para analizar si el fragmento peptídico se encuentra expuesto.

8.26.-PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PÉPTIDO DIVERGENTE

Para obtener anticuerpos policlonales específicos contra la PFOR A, se sintetizó un péptido específico de PFOR A de 13 aminoácidos, acoplado a MAP 8 (Invitrogen) con el que se inmunizaron cinco ratones Balb/c machos de tres semanas de edad, siguiendo el esquema de inmunización (**Tabla 5**).

Tabla 5. Esquema de inmunización utilizado para generar anticuerpos anti-péptido.

Semana	Cantidad de antígeno µg/ratón	adyuvante completo de Freund	adyuvante incompleto de Freund	Sangrado	Western blot
1	300	+	-	-	-
2	300	-	+	-	-
3	150	-	+	-	-
4	150	-	-	-	-
5	75	-	-	+	+
6	-	-	-	-	-
7	75	-	-	-	-
8	-	-	-	+	+
9	50	-	-	-	-
10	-	-	-	+	-
11	50	-	-	-	-
12	-	-	-	+	+
13	25	-	-	-	-
14	-	-	-	+	+
- : no realizado					

9.- Resultados

9.1.- EFECTO DEL HIERRO EN LA TRANSCRIPCIÓN DE GENES HOMÓLOGOS A PFOR A.

Dado que en el genoma de *T.vaginalis* se encontraron otros cuatro genes (*pfor b*, *pfor c*, *pfor d* y *pfor e*), que codifican para proteínas tipo PFOR además de los ya reportados (*pfor a* y *pfor b*), que muestran alta homología, se analizó el efecto del Fe^{2+} en la transcripción de los genes tipo PFOR por ensayos de RT-PCR. Se investigó si alguno de los genes encontrados en el genoma de *T. vaginalis* también se expresan en altas concentraciones de hierro como el gen *pfor a*. Para determinar si la adhesina AP120 con homología a PFOR A es codificada por el gen *pfor a* o si es codificada por alguno de los genes tipo PFOR.

Para amplificar específicamente el transcrito de cada uno de los genes tipo PFOR por RT-PCR, primeramente se realizó un alineamiento múltiple (**Fig. 10**) para identificar las regiones divergentes y generar oligonucleótidos específicos para cada gen (**Tabla 2**).

Para los ensayos de RT-PCR se utilizaron los oligonucleótidos de las regiones más divergentes de cada una de las secuencias como templado se utilizó cDNA sintetizado a partir de RNA total extraído de parásitos crecidos en diferentes concentraciones de Fe^{2+} para amplificar fragmentos específicos para cada gen.

BIBLIOTECA UACM

Los ensayos de RT-PCR con RNA de parásitos crecidos en diferentes concentraciones de hierro muestran que el transcrito del gen *pfor a* esta presente en altas concentraciones de hierro (**Fig. 11, Carril 5, *pfor a***) ya que se observa la amplificación de un fragmento de 1.1 kb, del mismo tamaño al observado cuando se utiliza DNA genómico como molde (**Fig.11, Carril 2, *pfor a***). Sin embargo, aunque se amplificó de 1.2 kb para el gen *pfor d* (**Fig.11, Carril 2, *pfor d***), de 1.8 kb para el gen *pfor c* (**Fig.11, Carril 2 *pfor c***) y de 2.1 kb para el gen *pfor e* (**Fig.11, Carril 2, *pfor e***) cuando se realizó una reacción de PCR con DNA genómico como molde y los oligonucleótidos específicos para cada gen; *pfor c*, *pfor d* y *pfor e* no se transcriben en alguna de las condiciones de hierro probadas (**Carriles 3-5**) cuando se utilizó cDNA como molde; a pesar de que con el cDNA de las tres condiciones de hierro se amplificó un fragmento de 112 pb de β -tubulina (**Fig. 11, Carriles 3-5, β -tub**) utilizado como control de cantidad.

Estos resultados muestran que los genes *pfor c*, *pfor d* y *pfor e* no se transcriben bajo las condiciones de cultivo estudiadas, lo que sugiere que solo PFOR A se expresa en altas concentraciones de hierro y no otros genes tipo PFOR. Estos resultados apoyan a que sea la proteína tipo PFOR A sea la que se relocalice a la membrana del parásito en presencia de altas concentraciones de hierro y pudiera participar en la interacción parásito-huésped.

9.2.- EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CODIFICADAS POR LOS FRAGMENTOS DE 1.1 Y 1.9 kb DEL GEN *pfor a*.

Para localizar a la proteína, PFOR A en *T. vaginalis* se necesitaba tener anticuerpos contra la región carboxilo-terminal de PFOR A. Por lo que se amplificaron dos fragmentos de 1.1 y 1.9 kb del extremo carboxilo-terminal de PFOR A a partir del DNA plasmídico de la clona TOPO-PFOR7 (**Fig.12**), que contiene el gen *pfor a* del aislado CNCD 188 de *T. vaginalis*. Estos fragmentos de *pfor a* se clonaron en los vectores de expresión pCold I y pET32a(+), para su expresión en *E. coli*.

Después del proceso de selección, se obtuvieron 7 clonas que contienen el vector pET32a(+) con el inserto 1.9 kb y una sola clona con el inserto de 1.1 kb. Con el vector pCold I, se obtuvieron 8 clonas con el inserto de 1.9 kb y 8 con el inserto de 1.1 kb (datos no mostrados). De las clonas positivas se extrajo el DNA plasmídico y por un análisis de restricción se confirmó que contenían los fragmentos de interés. Por ejemplo, en la **Figura 13** se muestra la digestión de tres clonas positivas para el vector pET-32a (+) con el inserto de 1.9 kb de *pfor a* (Carriles 2, 3 y 5) y una clona positiva para pET32a(+) con el inserto de 1.1 kb (Carril 4).

Enseguida, los DNA plasmídicos pET32a(+) y pCold I que contienen los insertos de 1.9 y 1.1 kb se transformaron en bacterias *E. coli* BL21 (DE3) pLys, se obtuvieron 3 con el inserto de 1.1 kb y 4 con el inserto de 1.9 kb. En cuanto al vector pCold I se obtuvieron 4 clonas con el inserto 1.9 kb y 3 clonas con el

inserto de 1.1 kb. A las clonas obtenidas se les indujo la expresión de las proteínas recombinantes con IPTG. Los extractos protéicos bacterianos se analizaron por electroforesis desnaturizante en los que se observó la inducción de una proteína de 50 kDa (**Fig. 14, Carriles 1,3,5**) codificada por el fragmento de 1.1 kb y de una proteína de 70 kDa (**Fig. 14, Carriles 7,9,11y13**) codificadas por los fragmentos de 1.1 y 1.9 kb del gen *pfor a* (**Fig.14**). Los extractos bacterianos sin inducir se muestran en la **Fig. 14, Carriles: 2,4,6 8,10,12 y 14**.

Para determinar en que fracción se encontraban las proteínas recombinantes se analizó tanto la fracción soluble como la insoluble de los lisados bacterianos, en las **Figs. 15 y 16** muestran que la mayor parte de las proteínas recombinantes se encontraron en la fracción insoluble (datos no mostrados). Sin embargo, para la purificación se utilizó proteína de la fracción soluble. Las proteínas recombinantes se purificaron por cromatografía de afinidad en columnas de níquel comerciales y se analizaron por electroforesis SDS-PAGE. **En las Figs. 15 y 16** se muestran los perfiles protéicos del proceso de purificación y la obtención de las proteínas puras de 50 y de 70 kDa, repectivamente.

Figura 10. Alineamiento múltiple de aminoácidos de las secuencias homólogas a PFOR A. Alineamiento entre las diferentes secuencias de PFOR por medio del programa CLUSTAL W (<http://workbench.sdsc.edu/>). Las flechas representan los oligonúcleotidos específicos en sentido y antisentido para cada una de las secuencias homólogas a PFOR A. PFOR A (188): verde, PFOR B: violeta, PFOR C: Azul, PFOR D: naranja y PFOR E: Rosa.

FFORA_ [100] -HLRS--F GKR--IPGDONTAATS WAY QL SET SF IYP IT PATTHGELVDAMI AQC-BK
FFORA_ [455] -HLRS--F GKR--IPGDONTAATS WAY QL SET SF IYP IT PATTHGELVDAMI AQC-BK
FFORE1 -HLRN--F GKR--OPGDONTAATS WAY QL SET SF IYP IT PATTHGELVDAMI AQC-BK
FFORE2 -HLRN--F GKR--VPGDONTAATS WAY QL SET SF IYP IT PATTHGELVDAMI AQC-BK
FFORE -HLRN--F GKR--VAGDONTAATS WAY QL SET SF IYP IT PATTHGELVDAMI AQC-BK
FFORC -HLSIGDAPSRGKXUMVUDGNAAAYVYAFTEFAF GVP IT PTTA TELVE GAAKXDKH
FFORD MTLNLTGTRFASX--LUPMDGNAAARUVAYNHSEAF IYV IT PTTM GDDYDNGS CA G-KX

FFORA_ [100] NIOGKXVIMAHNGS EG GAAAUVG ATAVGAL CATTI ASQGALLM IPHIXKI IGENC PAU S
FFORA_ [455] NIOGKXVIMAHNGS EG GAAAUVG ATAVGAL CATTI ASQGALLM IPHIXKI IGENC PAU S
FFORE1 NIOGKXVIMAHNGS EG GAAAUVG ATAVGAL CATTI ASQGALLM IPHIXKI IGENC PAU S
FFORE2 NIOGKXVIMAHNGS EG GAAAUVG ATAVGAL CATTI ASQGALLM IPHIXKI IGENC PAU S
FFORE NIOGKXVIMAHNGS EG GAAAUVG ATAVGAL CATTI ASQGALLM IPHIXKI IGENC PAU S
FFORC NIOGKXVIMAHNGS EG GAAAUVG ATAVGAL CATTI ASQGALLM IPHIXKI IGENC PAU S
FFORD NIOGKXVIMAHNGS EG GAAAUVG ATAVGAL CATTI ASQGALLM IPHIXKI IGENC PAU S

FFORA_ [100] HIASRC IAT SALS IYNDHG DI YAC PATGPI LFS NGVQEAHDLAAVAH LTT IHT GLPTI H
FFORA_ [455] HIASRC IAT SALS IYNDHG DI YAC PATGPI LFS NGVQEAHDLAAVAH LTT IHT GLPTI H
FFORE1 HIASRC IAT SALS IYNDHG DI YAC PATGPI LFS NGVQEAHDLAAVAH LTT IHT GLPTI H
FFORE2 HIASRC IAT SALS IYNDHG DI YAC PATGPI LFS NGVQEAHDLAAVAH LTT IHT GLPTI H
FFORE HIASRC IAT SALS IYNDHG DI YAC PATGPI LFS NGVQEAHDLAAVAH LTT IHT GLPTI H
FFORC HIASRC IAT SALS IYNDHG DI YAC PATGPI LFS NGVQEAHDLAAVAH LTT IHT GLPTI H
FFORD HIASRC IAT SALS IYNDHG DI YAC PATGPI LFS NGVQEAHDLAAVAH LTT IHT GLPTI H

FFORA_ [100] FTDFGFTSHEI MYEELDMETLWPLI DQKALAAFRA BSLNPEH SERGT IC GPEYVQGMH
FFORA_ [455] FTDFGFTSHEI MYEELDMETLWPLI DQKALAAFRA BSLNPEH SERGT IC GPEYVQGMH
FFORE1 FTDFGFTSHEI MYEELDMETLWPLI DQKALAAFRA BSLNPEH SERGT IC GPEYVQGMH
FFORE2 FTDFGFTSHEI MYEELDMETLWPLI DQKALAAFRA BSLNPEH SERGT IC GPEYVQGMH
FFORE FTDFGFTSHEI MYEELDMETLWPLI DQKALAAFRA BSLNPEH SERGT IC GPEYVQGMH
FFORC FTDFGFTSHEI MYEELDMETLWPLI DQKALAAFRA BSLNPEH SERGT IC GPEYVQGMH
FFORD FTDFGFTSHEI MYEELDMETLWPLI DQKALAAFRA BSLNPEH SERGT IC GPEYVQGMH

FFORA_ [100] ENLKRKPTQALPTEVENHEKAL GDKTGKRYKPYQVAGPREPENOI IHNGS GCDPEVEEYITE
FFORA_ [455] ENLKRKPTQALPTEVENHEKAL GDKTGKRYKPYQVAGPREPENOI IHNGS GCDPEVEEYITE
FFORE1 ENLKRKPTQALPTEVENHEKAL GDKTGKRYKPYQVAGPREPENOI IHNGS GCDPEVEEYITE
FFORE2 ENLKRKPTQALPTEVENHEKAL GDKTGKRYKPYQVAGPREPENOI IHNGS GCDPEVEEYITE
FFORE ENLKRKPTQALPTEVENHEKAL GDKTGKRYKPYQVAGPREPENOI IHNGS GCDPEVEEYITE
FFORC ENLKRKPTQALPTEVENHEKAL GDKTGKRYKPYQVAGPREPENOI IHNGS GCDPEVEEYITE
FFORD ENLKRKPTQALPTEVENHEKAL GDKTGKRYKPYQVAGPREPENOI IHNGS GCDPEVEEYITE

FFORA_ [100] H--PEPNTGLI KVBLE RPF SVIME NAAIPAS VKX IC VLDKVVUPTG PREPLIFEDVAAL I
FFORA_ [455] H--PEPNTGLI KVBLE RPF SVIME NAAIPAS VKX IC VLDKVVUPTG PREPLIFEDVAAL I
FFORE1 H--PEPNTGLI KVBLE RPF SVIME NAAIPAS VKX IC VLDKVVUPTG PREPLIFEDVAAL I
FFORE2 H--PEPNTGLI KVBLE RPF SVIME NAAIPAS VKX IC VLDKVVUPTG PREPLIFEDVAAL I
FFORE H--PEPNTGLI KVBLE RPF SVIME NAAIPAS VKX IC VLDKVVUPTG PREPLIFEDVAAL I
FFORC H--PEPNTGLI KVBLE RPF SVIME NAAIPAS VKX IC VLDKVVUPTG PREPLIFEDVAAL I
FFORD H--PEPNTGLI KVBLE RPF SVIME NAAIPAS VKX IC VLDKVVUPTG PREPLIFEDVAAL I

FFORA_ [100] GER-NUKXII GGRYV IS SROFAPVHVAI VUKHLAS ELPKDRFTGUVN--PETQLFLGKPF
FFORA_ [455] GER-NUKXII GGRYV IS SROFAPVHVAI VUKHLAS ELPKDRFTGUVN--PETQLFLGKPF
FFORE1 GER-NUKXII GGRYV IS SROFAPVHVAI VUKHLAS ELPKDRFTGUVN--PETQLFLGKPF
FFORE2 GER-NUKXII GGRYV IS SROFAPVHVAI VUKHLAS ELPKDRFTGUVN--PETQLFLGKPF
FFORE GER-NUKXII GGRYV IS SROFAPVHVAI VUKHLAS ELPKDRFTGUVN--PETQLFLGKPF
FFORC GER-NUKXII GGRYV IS SROFAPVHVAI VUKHLAS ELPKDRFTGUVN--PETQLFLGKPF
FFORD GER-NUKXII GGRYV IS SROFAPVHVAI VUKHLAS ELPKDRFTGUVN--PETQLFLGKPF

FFORA_ [100] DMLPEG-TX QCHWGL GSDGTUGANK QAI KL IUS NTKLV GQAST AVDAHKS GCVTT SHLR
FFORA_ [455] DMLPEG-TX QCHWGL GSDGTUGANK QAI KL IUS NTKLV GQAST AVDAHKS GCVTT SHLR
FFORE1 DMLPEG-TX QCHWGL GSDGTUGANK QAI KL IUS NTKLV GQAST AVDAHKS GCVTT SHLR
FFORE2 DMLPEG-TX QCHWGL GSDGTUGANK QAI KL IUS NTKLV GQAST AVDAHKS GCVTT SHLR
FFORE DMLPEG-TX QCHWGL GSDGTUGANK QAI KL IUS NTKLV GQAST AVDAHKS GCVTT SHLR
FFORC DMLPEG-TX QCHWGL GSDGTUGANK QAI KL IUS NTKLV GQAST AVDAHKS GCVTT SHLR
FFORD DMLPEG-TX QCHWGL GSDGTUGANK QAI KL IUS NTKLV GQAST AVDAHKS GCVTT SHLR

FFORA_ [100] FGAKPI NAPVYVQADYIA CHNPS VLKCF IHTKQLKGGVTVINFP GS--ADLXKDLPG S
FFORA_ [455] FGAKPI NAPVYVQADYIA CHNPS VLKCF IHTKQLKGGVTVINFP GS--ADLXKDLPG S
FFORE1 FGAKPI NAPVYVQADYIA CHNPS VLKCF IHTKQLKGGVTVINFP GS--ADLXKDLPG S
FFORE2 FGAKPI NAPVYVQADYIA CHNPS VLKCF IHTKQLKGGVTVINFP GS--ADLXKDLPG S
FFORE FGAKPI NAPVYVQADYIA CHNPS VLKCF IHTKQLKGGVTVINFP GS--ADLXKDLPG S
FFORC FGAKPI NAPVYVQADYIA CHNPS VLKCF IHTKQLKGGVTVINFP GS--ADLXKDLPG S
FFORD FGAKPI NAPVYVQADYIA CHNPS VLKCF IHTKQLKGGVTVINFP GS--ADLXKDLPG S

FFORA_ [100] FRNA IAKNDKALYT IDATQIA IDLKLPGR INHLS QVTFGLANI IPAECCI ALLKXSIAX
FFORA_ [455] FRNA IAKNDKALYT IDATQIA IDLKLPGR INHLS QVTFGLANI IPAECCI ALLKXSIAX
FFORE1 FRNA IAKNDKALYT IDATQIA IDLKLPGR INHLS QVTFGLANI IPAECCI ALLKXSIAX
FFORE2 FRNA IAKNDKALYT IDATQIA IDLKLPGR INHLS QVTFGLANI IPAECCI ALLKXSIAX
FFORE FRNA IAKNDKALYT IDATQIA IDLKLPGR INHLS QVTFGLANI IPAECCI ALLKXSIAX
FFORC FRNA IAKNDKALYT IDATQIA IDLKLPGR INHLS QVTFGLANI IPAECCI ALLKXSIAX
FFORD FRNA IAKNDKALYT IDATQIA IDLKLPGR INHLS QVTFGLANI IPAECCI ALLKXSIAX

FFORA_ [100] QVARKGKXV IQKMGHSDVHAL QGLX--EFKYKKAIDLNA P-----VPPFKHEG-
FFORA_ [455] QVARKGKXV IQKMGHSDVHAL QGLX--EFKYKKAIDLNA P-----VPPFKHEG-
FFORE1 QVARKGKXV IQKMGHSDVHAL QGLX--EFKYKKAIDLNA P-----VPPFKHEG-
FFORE2 QVARKGKXV IQKMGHSDVHAL QGLX--EFKYKKAIDLNA P-----VPPFKHEG-
FFORE QVARKGKXV IQKMGHSDVHAL QGLX--EFKYKKAIDLNA P-----VPPFKHEG-
FFORC QVARKGKXV IQKMGHSDVHAL QGLX--EFKYKKAIDLNA P-----VPPFKHEG-
FFORD QVARKGKXV IQKMGHSDVHAL QGLX--EFKYKKAIDLNA P-----VPPFKHEG-

FFORA_ [100] ---IRMI IDMS ILQEGESV SVDEHVE IGLVFN--DTAKYKXG IAVTVPKMGEKK CIQC
FFORA_ [455] ---IRMI IDMS ILQEGESV SVDEHVE IGLVFN--DTAKYKXG IAVTVPKMGEKK CIQC
FFORE1 ---IRMI IDMS ILQEGESV SVDEHVE IGLVFN--DTAKYKXG IAVTVPKMGEKK CIQC
FFORE2 ---IRMI IDMS ILQEGESV SVDEHVE IGLVFN--DTAKYKXG IAVTVPKMGEKK CIQC
FFORE ---IRMI IDMS ILQEGESV SVDEHVE IGLVFN--DTAKYKXG IAVTVPKMGEKK CIQC
FFORC ---IRMI IDMS ILQEGESV SVDEHVE IGLVFN--DTAKYKXG IAVTVPKMGEKK CIQC
FFORD ---IRMI IDMS ILQEGESV SVDEHVE IGLVFN--DTAKYKXG IAVTVPKMGEKK CIQC

FFORA_ [100] NTCAMVCPHAW IRPFLITQEE-A-----XGLTTLKAKGKE IKDYQTRI QITPLDC TGC A
FFORA_ [455] NTCAMVCPHAW IRPFLITQEE-A-----XGLTTLKAKGKE IKDYQTRI QITPLDC TGC A
FFORE1 NTCAMVCPHAW IRPFLITQEE-A-----XGLTTLKAKGKE IKDYQTRI QITPLDC TGC A
FFORE2 NTCAMVCPHAW IRPFLITQEE-A-----XGLTTLKAKGKE IKDYQTRI QITPLDC TGC A
FFORE NTCAMVCPHAW IRPFLITQEE-A-----XGLTTLKAKGKE IKDYQTRI QITPLDC TGC A
FFORC NTCAMVCPHAW IRPFLITQEE-A-----XGLTTLKAKGKE IKDYQTRI QITPLDC TGC A
FFORD NTCAMVCPHAW IRPFLITQEE-A-----XGLTTLKAKGKE IKDYQTRI QITPLDC TGC A

FFORA_ [100] TCVTSCPTKAL SMYTRNAXLDEEE GKIMEDQLAAPPBGHLLPPTNR-----N
FFORA_ [455] TCVTSCPTKAL SMYTRNAXLDEEE GKIMEDQLAAPPBGHLLPPTNR-----N
FFORE1 TCVTSCPTKAL SMYTRNAXLDEEE GKIMEDQLAAPPBGHLLPPTNR-----N
FFORE2 TCVTSCPTKAL SMYTRNAXLDEEE GKIMEDQLAAPPBGHLLPPTNR-----N
FFORE TCVTSCPTKAL SMYTRNAXLDEEE GKIMEDQLAAPPBGHLLPPTNR-----N
FFORC TCVTSCPTKAL SMYTRNAXLDEEE GKIMEDQLAAPPBGHLLPPTNR-----N
FFORD TCVTSCPTKAL SMYTRNAXLDEEE GKIMEDQLAAPPBGHLLPPTNR-----N

PFORA_(188) VQTRQPLIEFRGAC QGCGETAICKLLTQLYGDQLYLANATGCSLWGGATPPFNPITTRER
PFORA_(A5,88) VQTRQPLIEFRGAC QGCGETAICKLLTQLYGDQLYLANATGCSLWGGATPPFNPITTRER
PFORBL VQTRQPLIEFRGAC QGCGETAICKLLTQLYGDQLYLANATGCSLWGGATPPFNPITTRER
PFORBS VQTRQPLIEFRGAC QGCGETAICKLLTQLYGDQLYLANATGCSLWGGATPPFNPITTRER
PFORC VQTRQPLIEFRGAC QGCGETAICKLLTQLYGDQLYLANATGCSLWGGATPPFNPITTRER
PFORD VQTRQPLIEFRGAC QGCGETAICKLLTQLYGDQLYLANATGCSLWGGATPPFNPITTRER

PFORA_(188) GNGPAAANG LFEDNAEFQY GHPKAVEARRNI TKKLWVLELLESGE --- IKGELKELTEQL
PFORA_(A5,88) GNGPAAANG LFEDNAEFQY GHPKAVEARRNI TKKLWVLELLESGE --- IKGELKELTEQL
PFORBL GNGPAAANG LFEDNAEFQY GHPKAVEARRNI TKKLWVLELLESGE --- VNGELKELTEQL
PFORBS GNGPAAANG LFEDNAEFQY GHPKAVEARRNI TKKLWVLELLESGE --- VNGELKELTEQL
PFORC GNGPAAANG LFEDNAEFQY GHPKAVEARRNI TKKLWVLELLESGE --- VNGELKELTEQL
PFORD GNGPAAANG LFEDNAEFQY GHPKAVEARRNI TKKLWVLELLESGE --- VNGELKELTEQL

PFORA_(188) LKWDQDKE SGLAEX IKP LLANV QNPSEKRYVAL QS QAD IL SKX QWQI WGGDGAAYDIGY
PFORA_(A5,88) LKWDQDKE SGLAEX IKP LLANV QNPSEKRYVAL QS QAD IL SKX QWQI WGGDGAAYDIGY
PFORBL LKWDQDKE SGLAEX IKP LLANV QNPSEKRYVAL QS QAD IL SKX QWQI WGGDGAAYDIGY
PFORBS LKWDQDKE SGLAEX IKP LLANV QNPSEKRYVAL QS QAD IL SKX QWQI WGGDGAAYDIGY
PFORC LKWDQDKE SGLAEX IKP LLANV QNPSEKRYVAL QS QAD IL SKX QWQI WGGDGAAYDIGY
PFORD LKWDQDKE SGLAEX IKP LLANV QNPSEKRYVAL QS QAD IL SKX QWQI WGGDGAAYDIGY

PFORA_(188) GGLDMOLAS GENK II IYDTEWYS NTGGQCS KAT SREGAVANFSAAGYTKAKKDL GA IANT
PFORA_(A5,88) GGLDMOLAS GENK II IYDTEWYS NTGGQCS KAT SREGAVANFSAAGYTKAKKDL GA IANT
PFORBL GGLDMOLAS GENK II IYDTEWYS NTGGQCS KAT SREGAVANFSAAGYTKAKKDL GA IANT
PFORBS GGLDMOLAS GENK II IYDTEWYS NTGGQCS KAT SREGAVANFSAAGYTKAKKDL GA IANT
PFORC GGLDMOLAS GENK II IYDTEWYS NTGGQCS KAT SREGAVANFSAAGYTKAKKDL GA IANT
PFORD GGLDMOLAS GENK II IYDTEWYS NTGGQCS KAT SREGAVANFSAAGYTKAKKDL GA IANT

PFORA_(188) YKNIYVAST CLLADP --NOALKALQEAKYNGPA II IYVSPCINNG IAKGLGSTPK ---
PFORA_(A5,88) YKNIYVAST CLLADP --NOALKALQEAKYNGPA II IYVSPCINNG IAKGLGSTPK ---
PFORBL YKNIYVAST CLLADP --NOALKALQEAKYNGPA II IYVSPCINNG IAKGLGSTPK ---
PFORBS YKNIYVAST CLLADP --NOALKALQEAKYNGPA II IYVSPCINNG IAKGLGSTPK ---
PFORC YKNIYVAST CLLADP --NOALKALQEAKYNGPA II IYVSPCINNG IAKGLGSTPK ---
PFORD YKNIYVAST CLLADP --NOALKALQEAKYNGPA II IYVSPCINNG IAKGLGSTPK ---

PFORA_(188) HCKDLLKTCGLMLFKYMPANPK --- PLTVDTKQP -DYNLDPLVNGIGRFAALKDIYPKI
PFORA_(A5,88) HCKDLLKTCGLMLFKYMPANPK --- PLTVDTKQP -DYNLDPLVNGIGRFAALKDIYPKI
PFORBL HCKDLLKTCGLMLFKYMPANPK --- PLTVDTKQP -DYNLDPLVNGIGRFAALKDIYPKI
PFORBS HCKDLLKTCGLMLFKYMPANPK --- PLTVDTKQP -DYNLDPLVNGIGRFAALKDIYPKI
PFORC HCKDLLKTCGLMLFKYMPANPK --- PLTVDTKQP -DYNLDPLVNGIGRFAALKDIYPKI
PFORD HCKDLLKTCGLMLFKYMPANPK --- PLTVDTKQP -DYNLDPLVNGIGRFAALKDIYPKI

PFORA_(188) AETKFPQLI NDKNTREYGYKKI QDTQ ---
PFORA_(A5,88) AETKFPQLI NDKNTREYGYKKI QDTQ ---
PFORBL AETKFPQLI NDKNTREYGYKKI QDTQ ---
PFORBS AETKFPQLI NDKNTREYGYKKI QDTQ ---
PFORC AETKFPQLI NDKNTREYGYKKI QDTQ ---
PFORD AETKFPQLI NDKNTREYGYKKI QDTQ ---

Figura 11. Efecto del hierro en la transcripción de genes homólogos a PFOR

A. RT-PCR con oligonucleótidos específicos para los genes *pfor a, b, c, d y e*. Carriles 3-5 cDNA de parásitos crecidos en diferentes concentraciones de Fe^{2+} : Carril 3 (B), bajo hierro; Carril 4 (N), condiciones normales de cultivo; Carril 5 (A), altas concentraciones de hierro. Como control de cantidad se amplificó un fragmento del gen de *β -tubulina*. Carril 1 (-), PCR control negativo (sin DNA genómico). Carril 2 (+), control positivo con DNA genómico. Los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 1% en TAE 1 \times y se tiñieron con bromuro de etidio.

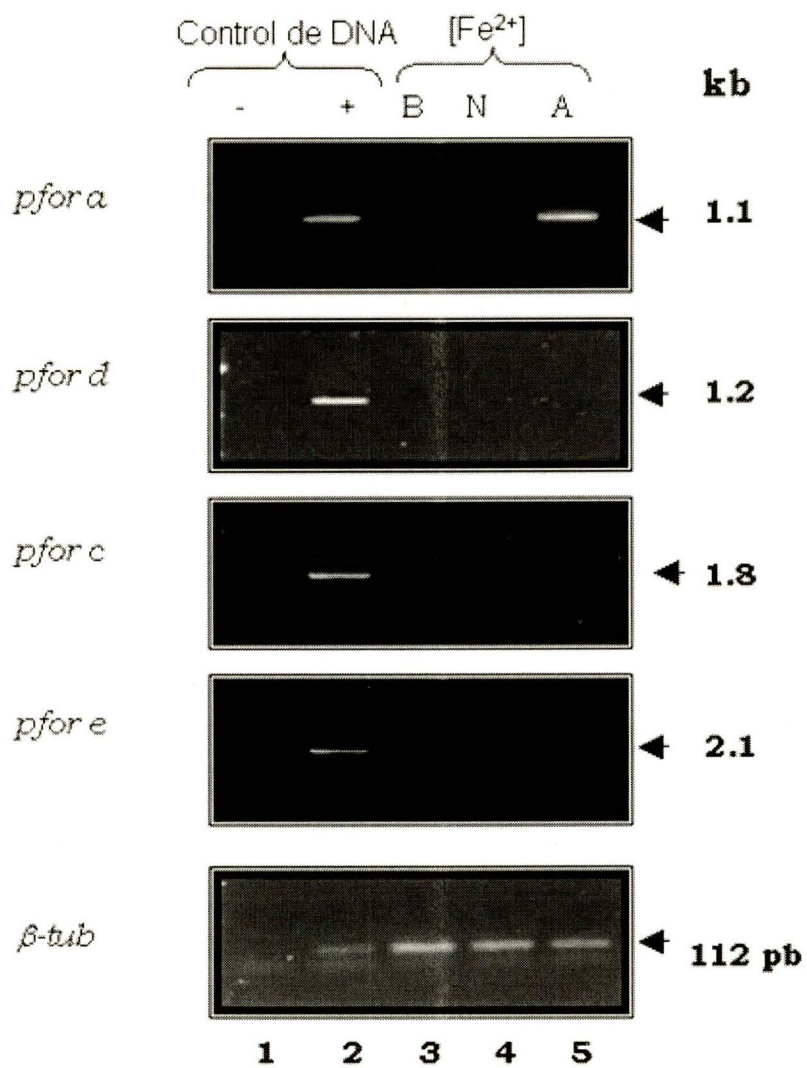


Figura 12. Amplificación por PCR de los fragmentos de 1.9 y 1.1 kb del gen *pfor a*. La amplificación PCR se realizó a partir de DNA plasmídico que contiene el gen *pfor a* en el vector PCRII-TOPO. M: Marcadores de peso molecular 1 kb “Plus DNA Ladder”. Carril 1: Amplificación del fragmento de 1.1 kb. Carril 2: Amplificación del fragmento de 1.9 kb. Carril 3: Control de reacción sin DNA. Los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 1% en TAE 1× y se tiñieron con bromuro de etidio.

M 1 2 3

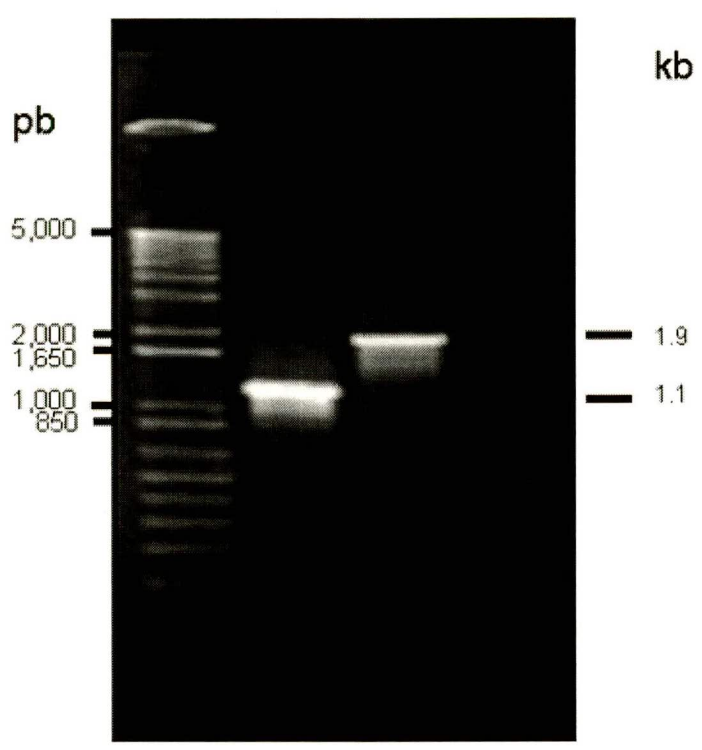


Figura 13. Análisis por restricción de las clonas candidatas en el vector pET32a(+). DNA plasmídico de clonas candidatas de *E. coli* DH5 α con el vector pET32a(+) digerido con *Bam*HI y *Hind* III. M: Marcadores de peso molecular DNA del fago λ digerido con *Hind* III. Carriles 2, 3 y 5: Liberación del inserto de 1.9 kb. Carril 4: Liberación del inserto de 1.1 kb. Los productos liberados se separaron en un gel de agarosa al 1% en TAE 1 \times .

M 1 2 3 4 5

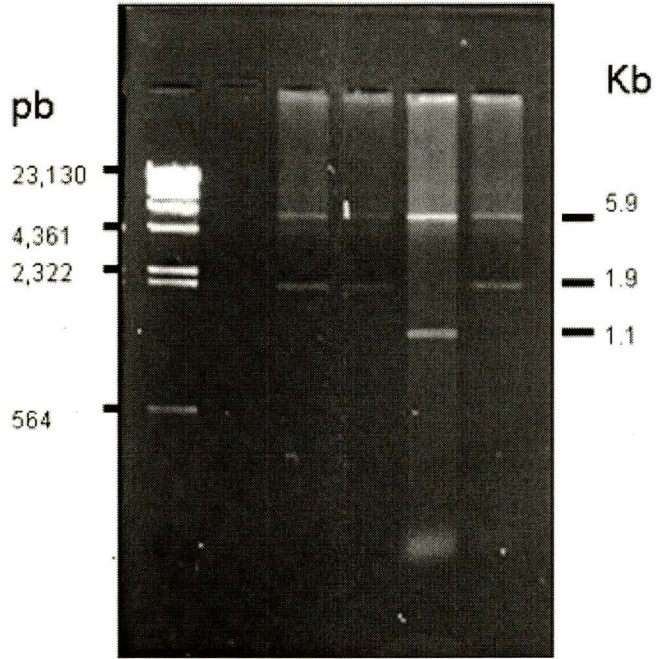


Figura 14. Expresión de las proteínas PFOR70 y PFOR50 codificadas por los fragmentos de 1.9 y 1.1 kb contenidos en el vector pET32a(+). Análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% de los extractos bacterianos de las clonas con los insertos de 1.1 y 1.9 kb de PFOR A. M: Marcadores de tamaño molecular de amplio rango. Carril 1, 3 y 5: Extractos de *E. coli*, pET32a(+)-PFOR50 inducidos con IPTG 1 mM por 2 h. Carril 2, 4, y 6: Extractos de *E. coli*, pET32a(+)-PFOR50 sin inducir. Carril 7, 9, 11 y 13: Extractos de *E. coli*, pET32a(+)-PFOR70 inducidos con IPTG 1 mM por 2 h. Carril 8, 10, 12 y 14: Extractos de *E. coli*, pET32a(+)-PFOR70 sin inducir.

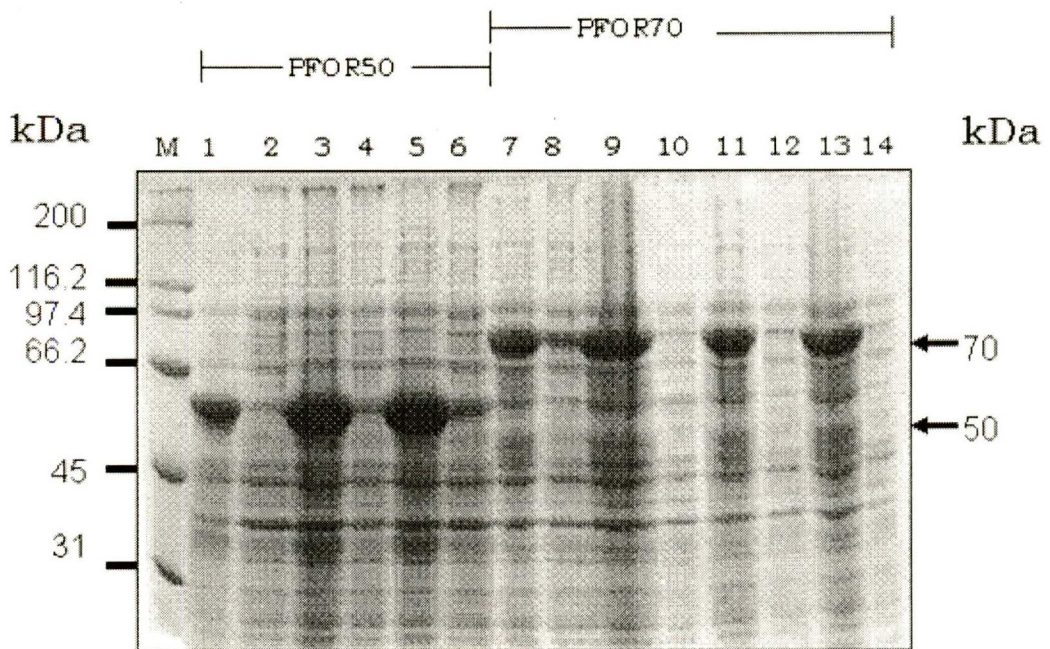


Figura 15. Purificación de la proteína recombinante de 50 kDa por cromatografía de afinidad a níquel. Análisis en geles de poliacrilamida al 12%. M: Marcadores de tamaño molecular de amplio rango. Carril 1, extractos de *E. coli*, pCold-PFOR50 sin inducir; carril 2, extractos de *E. coli*, pCold-PFOR50 inducida con IPTG; carril 3, fracción soluble; carril 4, fracción soluble que no se pegó pasada a través de la columna; carril 5, lavado 1 de la columna; carril 6, lavado 2 de la columna; carril 7, proteína recombinante de 50 kDa eluída de la columna de níquel.

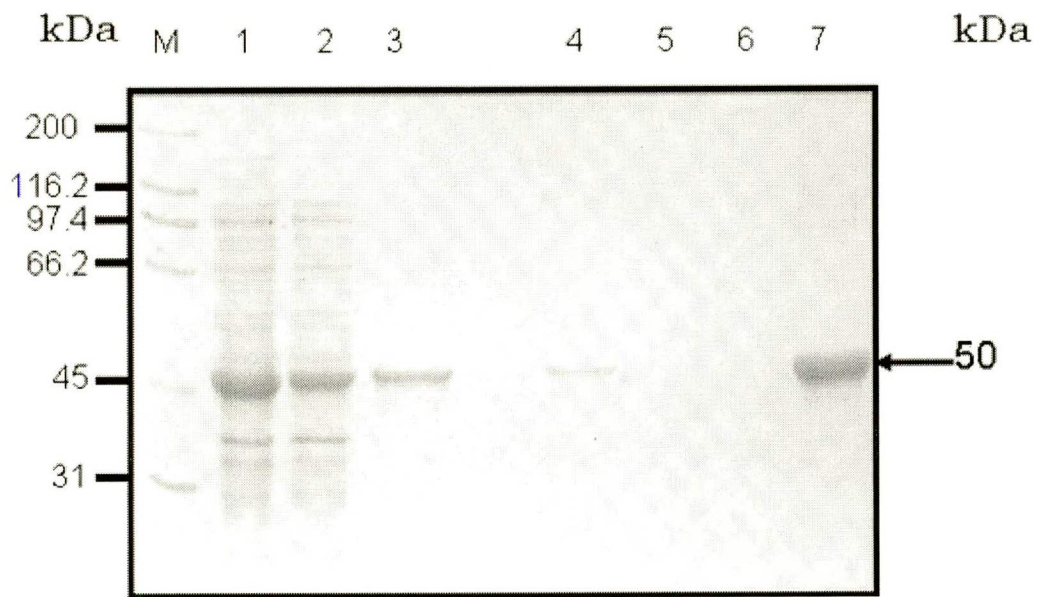
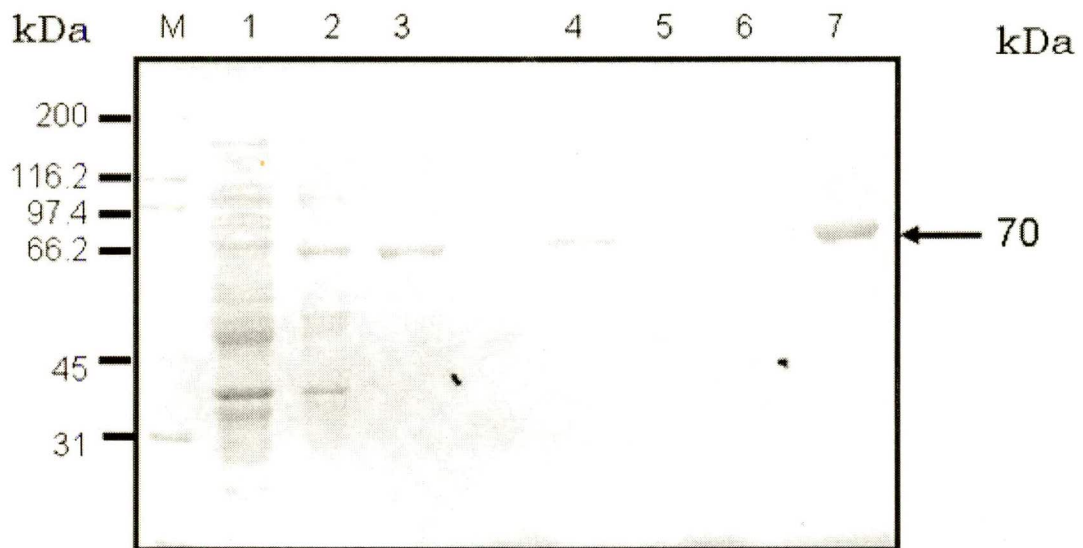


Figura 16. Purificación de la recombinante de 70 kDa por cromatografía de afinidad a níquel. Análisis por SDS-PAGE 10%. M: Marcadores de tamaño molecular de amplio rango. Carril 1: extractos de *E. coli*, pCold-PFOR70 sin inducir; carril 2, extractos de *E. coli*, pCold-PFOR70 inducida con IPTG; carril 3, fracción soluble; carril 4, fracción soluble que no se pego pasada a través de la columna; carril 5, lavado 1 de la columna; carril 6, lavado 2 de la columna; carril 7, proteína recombinante de 70 kDa eluída de la columna de níquel.



9.3.- RECONOCIMIENTO DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES PFOR50 y PFOR70 POR EL ANTICUERPO ANTI-HISTIDINAS

Para confirmar que las proteínas purificadas de 50 y 70 kDa son las proteínas recombinantes, se realizaron ensayos de Western blot utilizando un anticuerpo anti-histidinas, membranas de nitrocelulosa y con cada una de las proteínas recombinantes ya purificadas (**Fig. 17, carriles 1 y 2**), ya que los vectores de expresión contienen al menos una bandera de histidinas. Este anticuerpo reconoció a las dos proteínas purificadas de 50 y 70 kDa (**Fig. 17, carriles 3 y 4**). Con lo que se confirma que estas bandas son las proteínas recombinantes inducidas por IPTG.

Dado que se sugiere que PFOR A y la AP120 pudiera ser la misma proteína, se realizaron ensayos de Western blot con las proteínas recombinantes y el anticuerpo anti-TvAP120. En la **Figura 18** se muestran en un gel de poliacrilamida a las proteínas inducidas PFOR50 y PFOR70 (**carriles 1 y 2**). El anticuerpo anti-TvAP120 reconoció a las proteínas recombinantes de 50 y 70 kDa (**Fig 18, carriles 4 y 5**). Como control positivo se utilizó una membrana con la proteína p120 obtenida de parásitos crecidos en altas concentraciones de hierro, reconocida por el anticuerpo anti-TvAP120 (**carril 6**). Como control negativo se utilizó suero preinmune de ratón (SNR) (**carril 7**) que no mostró reactividad alguna. Con estos resultados se corrobora que hay un reconocimiento cruzado entre la región carboxilo-terminal de la PFOR A y la AP120 debido a la homología que existe entre ellas (Moreno-Brito y col., 2005).

9.4.-OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PFOR50 EN RATÓN

Para investigar la localización de PFOR A en el parásito, se produjeron anticuerpos anti-PFOR50 en ratón utilizando a la proteína recombinante como antígeno.

Enseguida, por ensayos de Western blot se probó la reactividad del suero anti-PFOR50, en membranas de nitrocelulosa conteniendo a las proteínas recombinantes PFOR50 y PFOR70 (**Fig. 19, carriles: 1 y 2**). Como control negativo se utilizó un suero preinmune de ratón (**carril: 5**). El suero de todos los ratones inmunizados con la proteína recombinante PFOR50 alcanzó un título máximo de 1/80,000 por revelado en color cuando se probó contra la proteína recombinante PFOR50, lo que sugiere que se trate de una proteína inmunogénica. También reaccionó contra la PFOR70 a una dilución de 1/2,000. Dado que el hierro influye en la expresión de las proteínas de la banda de 120 kDa en *T. vaginalis* entre otros efectos. También se probó la reactividad del anticuerpo anti-PFOR50 en membranas conteniendo extractos de proteínas totales de parásitos crecidos en altas y bajas concentraciones de Fe²⁺ (**Fig.19, carriles 3 y 4**). Los resultados del Western blot muestran que el anticuerpo anti-PFOR50 reconoció a la proteína de 120 kDa con mayor intensidad en parásitos crecidos en alto que en bajo hierro que pudiera corresponder a la AP120. Estos datos sugieren una reactividad cruzada entre la PFOR A y la AP120 de *T. vaginalis*.

Figura 17. Reconocimiento de las proteínas recombinantes PFOR de 50 y 70 kDa por el anticuerpo anti-histidinas. Proteínas recombinantes de 50 y 70 kDa de la región carboxilo-terminal de la PFOR A purificadas por cromatografía de afinidad a níquel y separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, (carriles 1 y 2) teñidos con azul de coomassie; transferidos a membranas de nitrocelulosa para ensayos de Western blot (carriles 3 y 4) y con el suero preinmune, carril 5.

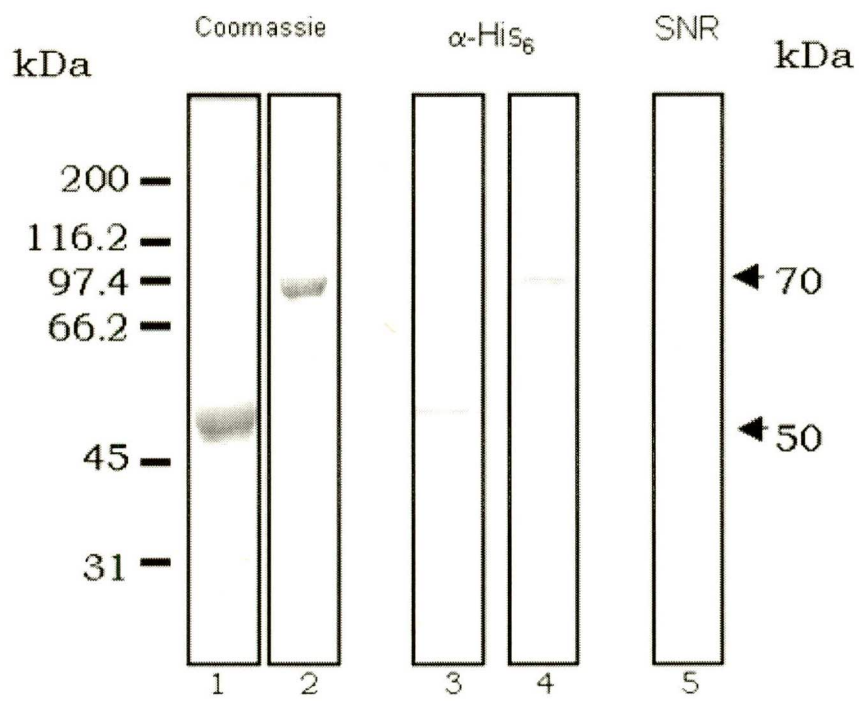


Figura 18. Reconocimiento de las proteínas recombinantes PFOR50 y PFOR70 por el anticuerpo anti-TvAP120. Proteínas recombinantes de 50 y 70 kDa de la región carboxilo-terminal de la PFOR A purificadas por cromatografía de afinidad a níquel y separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (carriles 1, 2 y 3) teñidos con azul de coomassie, transferidos a membranas de nitrocelulosa para ensayos de Western blot (carriles 4,5 y 6) y con el suero preinmune, carril 7.

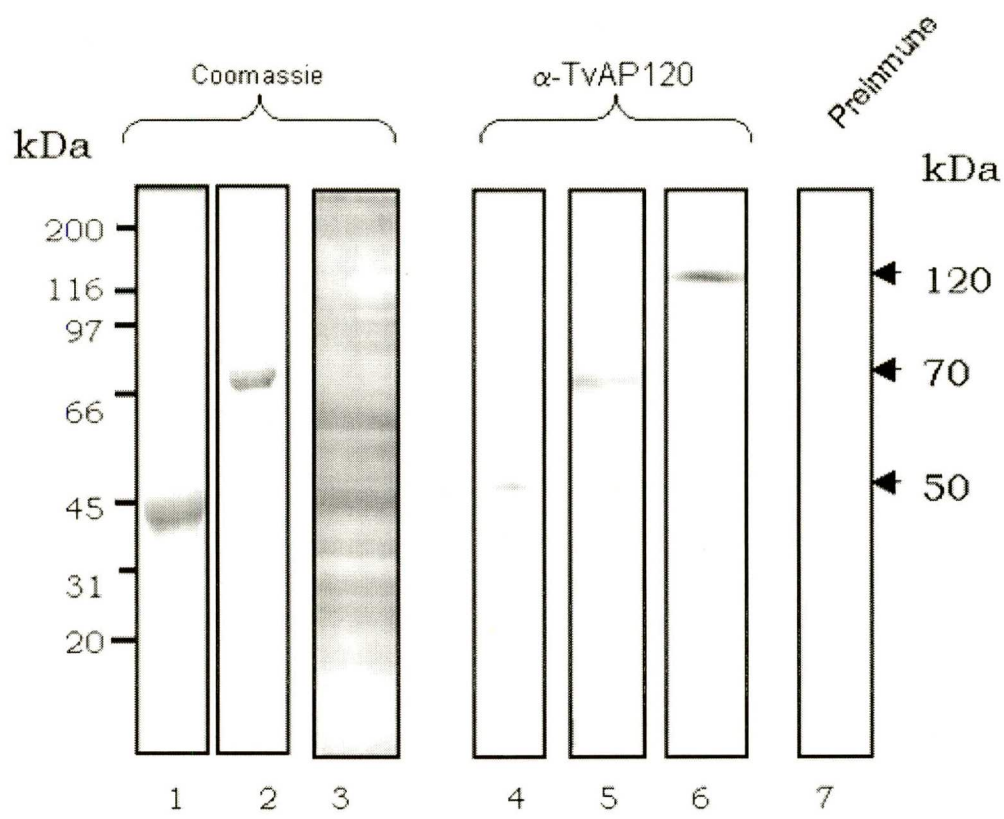
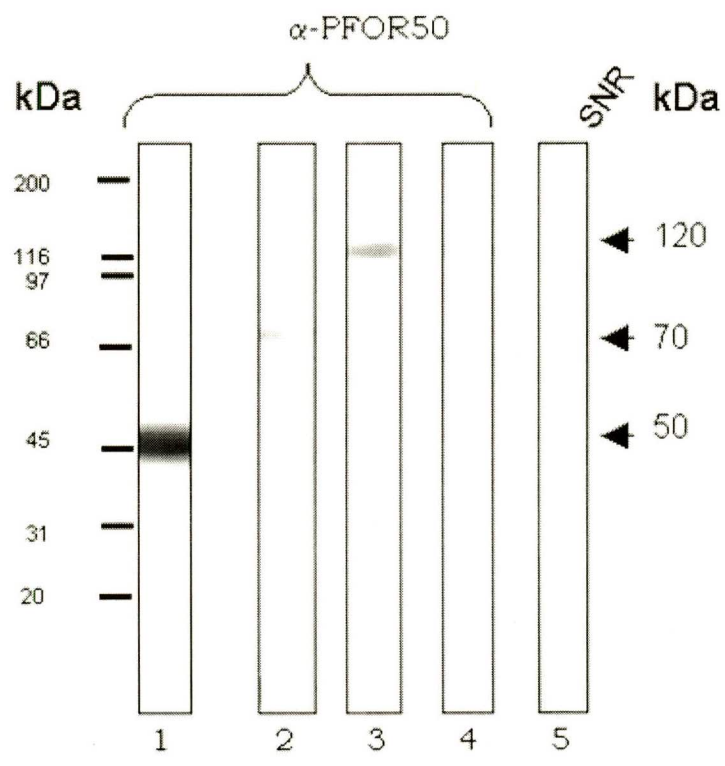


Figura 19. Reactividad del anticuerpo anti-PFOR50. Ensayos de Western blot con el anticuerpo anti-PFOR50 en membranas de nitrocelulosa con la proteína PFOR50 purificada, carril 1; proteína purificada PFOR70, carril 2; extractos de parásitos crecidos en altas concentraciones de Fe^{2+} , carril 3; extractos de parásitos crecidos en bajas concentraciones de Fe^{2+} , carril 4; extractos de proteínas totales de parásitos crecidos en altas concentraciones de Fe^{2+} incubados con suero preinmune, utilizados como control negativo, carril 5.



9.5.- OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA UN PÉPTIDO SINTÉTICO ESPECÍFICO PARA PFOR A.

Para confirmar la localización de PFOR A en el parásito debido a la alta identidad que muestra *pfor b* con *pfor a*, se generó un anticuerpo monoespecífico contra un péptido sintético divergente, específico de PFOR A.

El péptido divergente se escogió a partir de un alineamiento múltiple entre las secuencias de los genes *pfor a* y *pfor b* (Hrady y Muller, 1995) y los genes tipo PFOR encontrados en el genoma de *T. vaginalis* (*pfor b2*, *pfor c*, *pfor d* y *pfor e*). El alineamiento se hizo solo del extremo carboxilo terminal de cada una de las secuencias codificado por las últimas de 1.1 kb de cada gen (**Fig. 20A**). Los 13 aminoácidos seleccionados fueron: KLVVELLESGEIK. Esta secuencia se localiza entre los residuos 879-892 de la PFOR A, que corresponde a la región más divergente entre las secuencias analizadas (cuadro azul). También se señala (cuadro rosa), que 6 de los 13 aminoácidos son diferentes entre la PFOR A y la PFOR Bs (cuadros pequeños con fondo azul). Esta comparación fue necesaria debido a la alta identidad que hay entre estas secuencias.

El fragmento divergente de 13 aminoácidos, bajo la escala Hoop-Woods (**Fig. 20B**) predice que el 50% del péptido es hidrofílico y que solo será soluble en compuestos como el DMSO al 30% aún cuando se considera hidrofóbico, podría ser inmunogénico. Por ello, tanto la secuencia completa de PFOR A (**Fig. 20B1**) como el extremo carboxilo-terminal codificado el fragmento de 1.1 kb (**Fig. 20B2**) se les realizó un análisis de hidropatía. Este análisis mostró que el péptido

seleccionado se encuentra entre las regiones hidrofílicas de la PFOR A (**Fig. 20B1**) y del extremo carboxilo-terminal de la PFOR A (**Fig. 20B2**), por lo que se considera potencialmente inmunogénico. El análisis de la secuencia del péptido por BLAST en el proyecto genoma de *T. vaginalis* (TIGR) mostró el 100% de identidad solo con PFOR A (**Fig. 20C**). El mismo análisis se realizó en el genoma del ratón y no se encontró identidad ninguna secuencia del ratón. Este análisis sugiere que los anticuerpos que se generen no tendrán reconocimiento cruzado con otras proteínas de *T. vaginalis* o del ratón (**Fig. 20D**).

Por último, para confirmar que el péptido seleccionado en la proteína PFOR A se encontraba conformacionalmente expuesto, se realizó un modelaje teórico del plegamiento tridimensional (3-D) de la proteína PFOR A con el programa PHYRE (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>). Este utilizó proteínas ya cristalizadas, como la PFOR de la bacteria *Desulfovibrio africanus* que tiene un tamaño de 135 kDa (Pieulle y col., 1999) (**Fig. 20E**). Este análisis mostró el péptido divergente (esferas) en la estructura teórica 3-D de PFOR A se encuentra expuesto en la molécula (**Fig. 20F**).

Con el péptido sintético se inmunizaron cinco ratones Balb/c, de acuerdo al esquema de inmunización presentado en la **Tabla 5**. El suero obtenido se utilizó para confirmar la reactividad hacia la proteína recombinante PFOR50 por ensayos de Western blot. El anticuerpo específico para PFOR A que reconoce a la recombinante PFOR50 (**Fig 21, Carril 2**) presentó un título de 1/4,000 en un revelado por quimioluminiscencia.

Figura 20A. Selección de la región divergente del fragmento de 1.1 kb de la
PFOR A. Alineamiento múltiple de la secuencia deducida de aminoácidos del fragmento de 1.1 kb entre los genes homólogos a *pfor a*. Los recuadros muestran la comparación entre las diferentes secuencias (gen *pfor a* y *b* reportado, y los genes homólogos *pfor b*, *pfor c*, *pfor d* y *pfor e* y el gen *pfo* de *E. histolytica*).

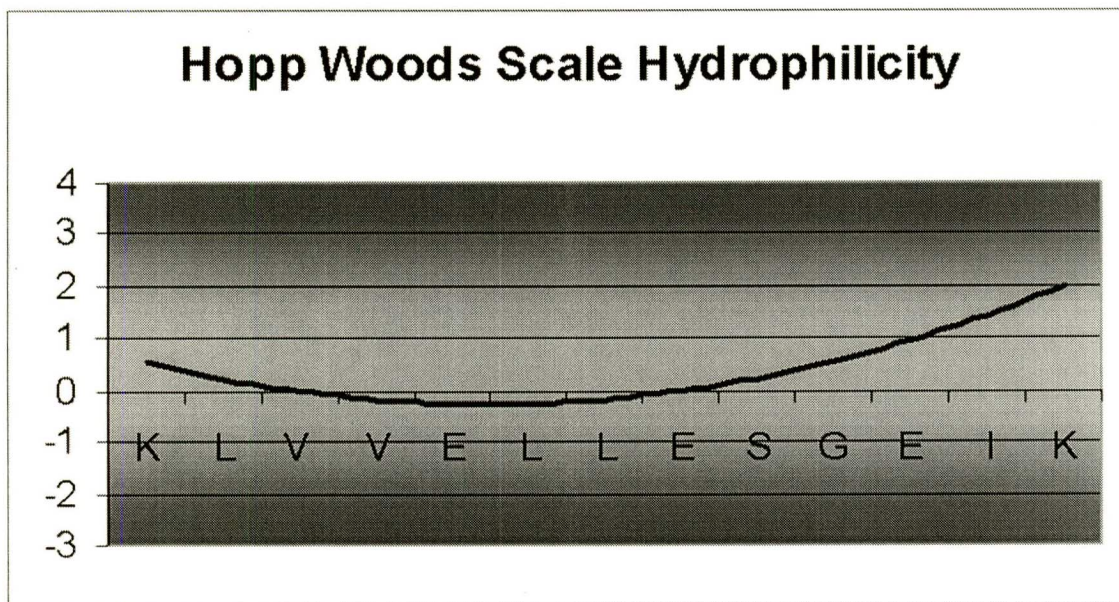
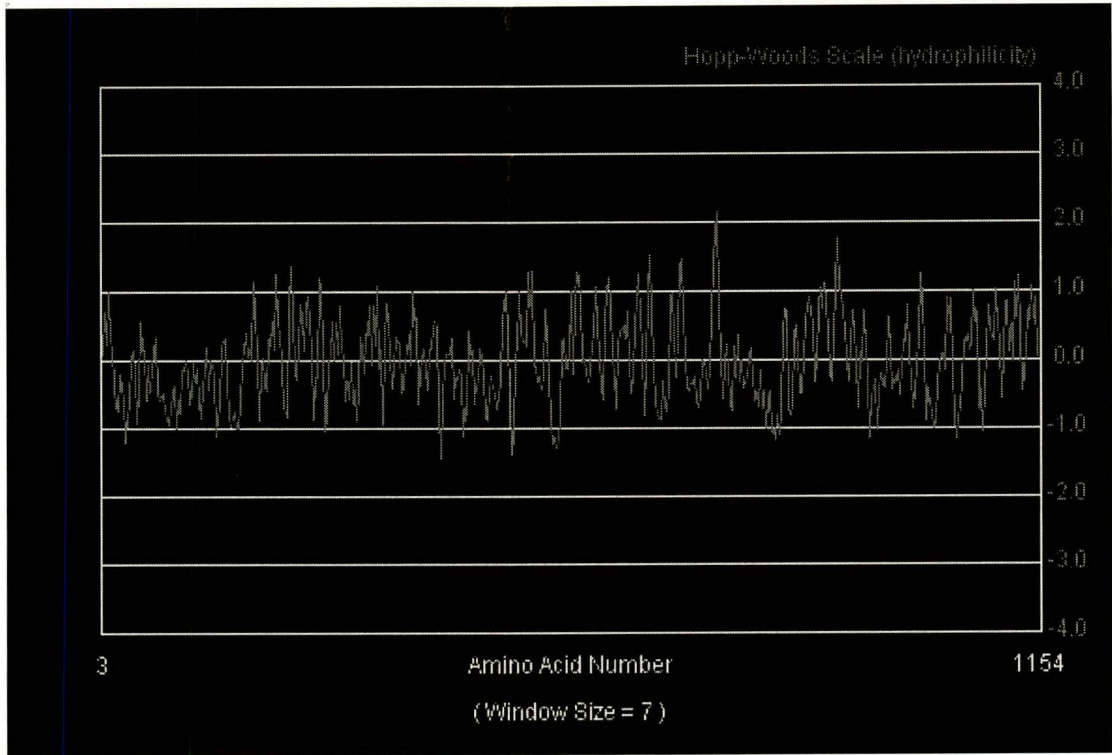


Figura 20B. Análisis de hidropatía del péptido divergente PFOR A seleccionado. Escala Hopp-Woods, los valores por arriba de 0.0 indican que el péptido es hidrofílico.

Figura 20B1. Análisis de hidropatía del péptido divergente en la secuencia completa de PFOR A. Escala Hopp-Woods, los valores por arriba de 0.0 indican que el péptido es hidrofílico. Péptido divergente (rectángulo verde).

Figura 20B2. Análisis de hidropatía del péptido divergente en la región carboxilo-terminal codificada por el fragmento 1.1 kb de PFOR. Escala Hopp-Woods, los valores por arriba de 0.0 indican que el péptido es hidrofílico. Péptido divergente (rectángulo verde).



```

>86827.m00425|pyruvate:ferredoxin oxidoreductase pfoA precursor,
hydrogenosomal, identical|1157|Identical to: TigrScan, GlimmerHMM
gene predictions
Length = 1157

Score = 59 (25.8 bits), Expect = 3.6, P = 0.97
Identities = 13/13 (100%), Positives = 13/13 (100%)

Query:      1 KLVVELLESGEIK 13
            KLVVELLESGEIK
Sbjct:    880 KLVVELLESGEIK 892

```

Figura 20C. Porcentaje de identidad del péptido KLVVELLESGEIK por BLAST en la base de datos de *T. vaginalis*.

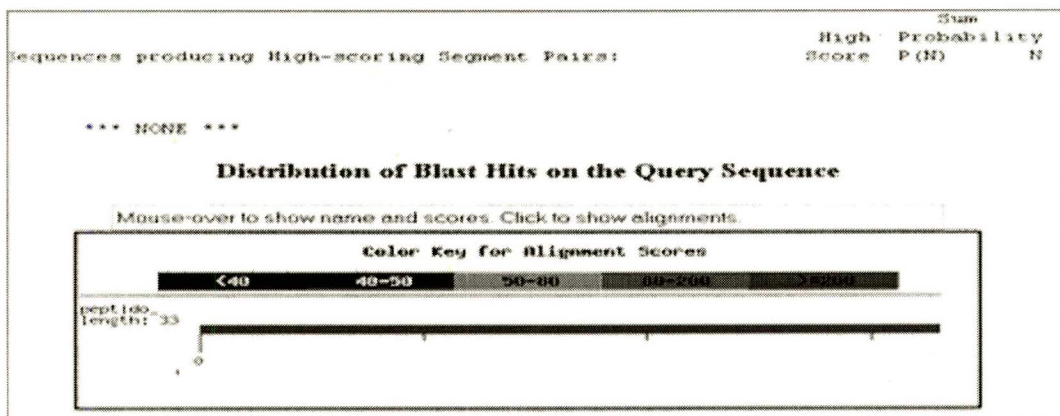


Figura 20D. Porcentaje de identidad del péptido KLVVELLESGEIK por BLAST en la base de datos del genoma del ratón.

Figura 20E. Estructura 3-D de PFOR de *Desulfovibrio africanus* cristalizada.

La secuencia que podría corresponder al péptido divergente se señala con el círculo, el cual se encuentra expuesto en la molécula.

Figura 20F. Estructura teórica en 3-D de PFOR A de *T. vaginalis*. El péptido

divergente se muestra con las esferas color naranja, el cual se encuentra expuesto en la molécula.

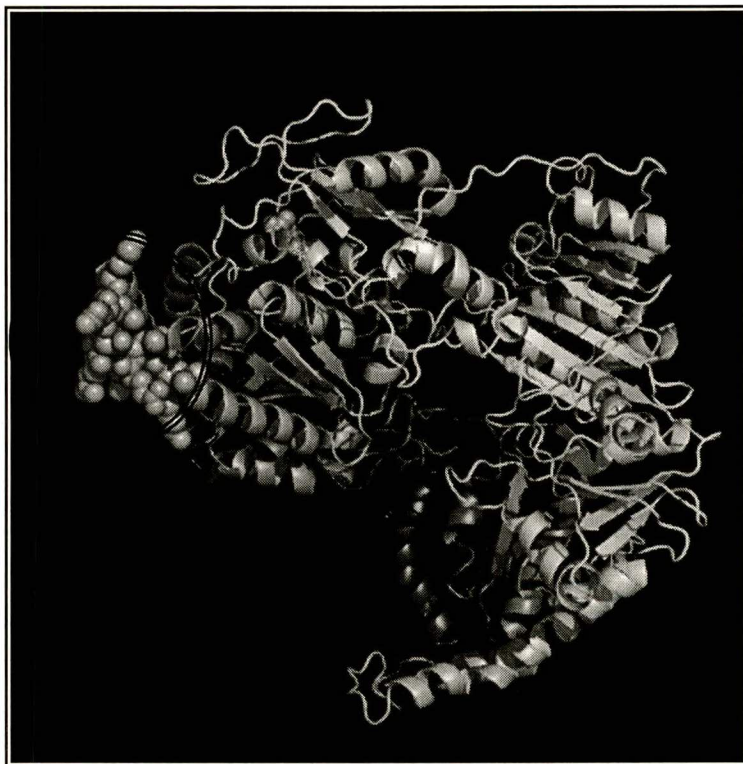
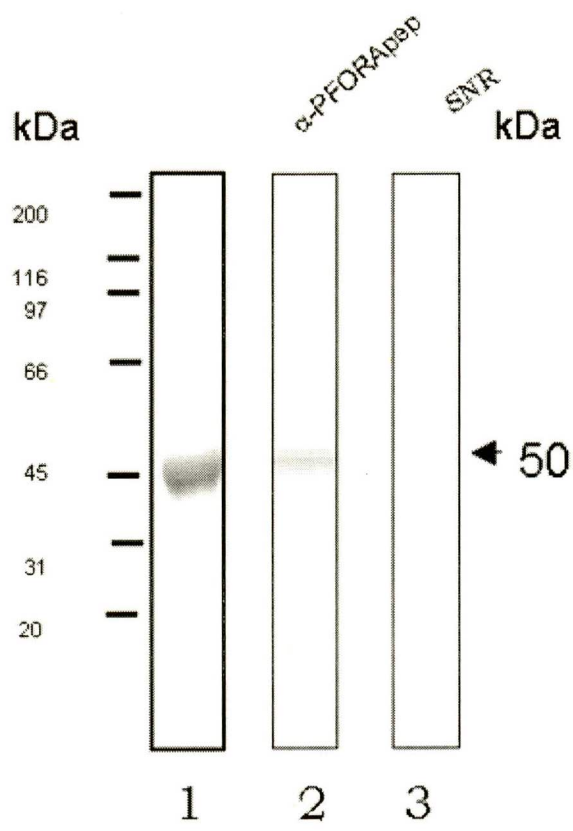


Figura 21. Reconocimiento de la proteína PFOR50 por el anticuerpo generado contra el péptido específico de PFOR A (anti-PFORApep). Ensayos de Western blot en membranas de NC conteniendo a la PFOR50. Gel de poliacrilamida con la PFOR50 teñido con azul de coomassie, carril 1; incubada con el con el anticuerpo anti-PFORApep, carril 2; Como control negativo se incubo con el suero preinmune (SNR), carril 3. Ambos anticuerpos se diluyeron 1:4,000.



9.6.-LOCALIZACIÓN DE PFORs EN EL PARÁSITO CON EL ANTICUERPO anti-PFOR50

Dado que tanto el anticuerpo anti-TvAP120 como el anticuerpo anti-EhPFOR de *Entamoeba histolytica*. mostraron un doble reconocimiento; en la superficie del parásito y en organelos citoplásmicos que podrían ser los hidrogenosomas y que el reconocimiento de superficie fue más intenso en parásitos crecidos en altas concentraciones de Fe^{2+} que en bajas concentraciones de Fe^{2+} (Moreno-Brito y col., 2005). Por ello nos interesó estudiar el reconocimiento en el parásito mediante anticuerpos hechos específicamente para la PFOR A de *T. vaginalis*, el anticuerpo anti-PFOR50 y el anticuerpo anti-PFORApep para localizar a la PFOR A por ensayos de inmunolocalización con oro coloidal e inmunofluorescencia en parásitos crecidos en alto y bajo hierro, fijados y permeabilizados o no permeabilizados.

Los ensayos de inmunomarcaje con oro con el anticuerpo anti-PFOR50 confirmaron la presencia de la PFOR en los hidrogenosomas de *T. vaginalis* crecidos tanto en alto como en bajo hierro, aunque las partículas de oro fueron más abundantes en alto hierro, algunas partículas de oro en citoplasma (**Fig 22**). Sin embargo en estas preparaciones aunque no se observaron partículas en la superficie del parásito. Estos resultados demuestran que PFOR se expresa mayoritariamente en altas concentraciones.

Para confirmar el reconocimiento del anticuerpo anti-PFOR50 en hidrogenosomas y en citoplasma con parásitos crecidos en altas concentraciones de hierro fijados en suspensión y en criocortes semifinos ($1\mu m$), se hicieron

ensayos de inmunolocalización por microscopía de epifluorescencia. En la **figura 23 (panel a)**, se observa el reconocimiento del anticuerpo en la superficie del parásito. En criocortes semifinos (**panel b**) la fluorescencia se observó en la membrana de los hidrogenosomas y en citoplasma, aunque también se observó en la superficie, confirmando así que se tienen reconocimiento en diferentes compartimentos del parásito.

Para los ensayos de inmunofluorescencia indirecta por microscopía confocal de parásitos crecidos en altas concentraciones de hierro, adheridos a laminillas, fijados y no permeabilizados se observó reconocimiento en la superficie del parásito (**Fig. 24, panel a y b**). Cuando se hizo una comparación de la inmunolocalización con los anticuerpos anti-TvAP120, anti-PFOR50 y anti-PFORApep, los tres anticuerpos presentaron una reactividad similar en la superficie de los parásitos (**Fig. 25**), siendo más evidente con el anticuerpo anti-PFOR50 (**paneles B, C y D**). El suero preinmune de ratón utilizado como control negativo no mostró reconocimiento alguno (**Panel A**).

Los anticuerpos anti-PFOR50 y anti-PFORApep mostraron un reconocimiento en la superficie del parásito, con el anticuerpo anti-PFOR50 se observó mayor intensidad (**Panel C**), que con el anticuerpo anti-PFORApep (**Panel D**). Estos datos muestran que la PFOR A de *T. vaginalis* se localiza en la superficie del parásito en altas concentraciones de Fe²⁺.

Por otro lado se realizó una comparación de la localización de la PFOR A entre parásitos crecidos en diferentes condiciones de cultivo, fijados

permeabilizados y no permeabilizados con el anticuerpo anti-PFOR50 (**Fig. 26**). En el **Panel A** se muestran parásitos permeabilizados y contrateñidos con yoduro de propidio que tiñe de rojo los núcleos del parásito. Los parásitos crecidos en altas concentraciones de Fe^{2+} (**Alto**) muestran una fluorescencia más intensa con el anticuerpo anti-PFOR50 que los parásitos crecidos en en bajas concentraciones de hierro (**Bajo**), tanto en la superficie del parásito como en el citoplasma. En el **Panel B** se muestran parásitos no permeabilizados en donde se observa un mayor reconocimiento en la superficie por el anticuerpo anti-PFOR50, en parásitos crecidos en altas concentraciones de Fe^{2+} (**Alto**) con respecto a los crecidos en bajas concentraciones de Fe^{2+} (**Bajo**). Estos resultados muestran que hay un reconocimiento en la por los anticuerpos anti-PFOR50, más intenso en altas concentraciones de Fe^{2+} .

Para confirmar la localización de la PFOR A se utilizó el anticuerpo anti-PFOR Apep (**Fig. 27**) en parásitos permeabilizados (**Panel A**) y no permeabilizados (**Panel B**), crecidos en altas y bajas concentraciones de Fe^{2+} . Esta **figura 27** muestra que en altas concentraciones de Fe^{2+} (**Alto**) y en bajas concentraciones de hierro (**Bajo**), hay diferencia en la intensidad de fluorescencia y el reconocimiento es más disperso, no es localizado como se observa con el anticuerpo anti-PFOR50, sin embargo PFOR A se localiza tanto en la superficie del parásito como en el citoplasma.

Figura 22. Localización de PFOR con oro coloidal de PFOR en criocortes de *T. vaginalis*. Micrografía electrónica de transmisión de parásitos crecidos en concentraciones altas (a) y bajas (b) de hierro, incubados con el anticuerpo anti-PFOR50 (1:200) y con un segundo anticuerpo anti-ratón acoplado a partículas de oro coloidal (1:50). Flechas: localización de partículas de oro en organelos citoplasmáticos y en citoplasma. Aumento de 300 nm.

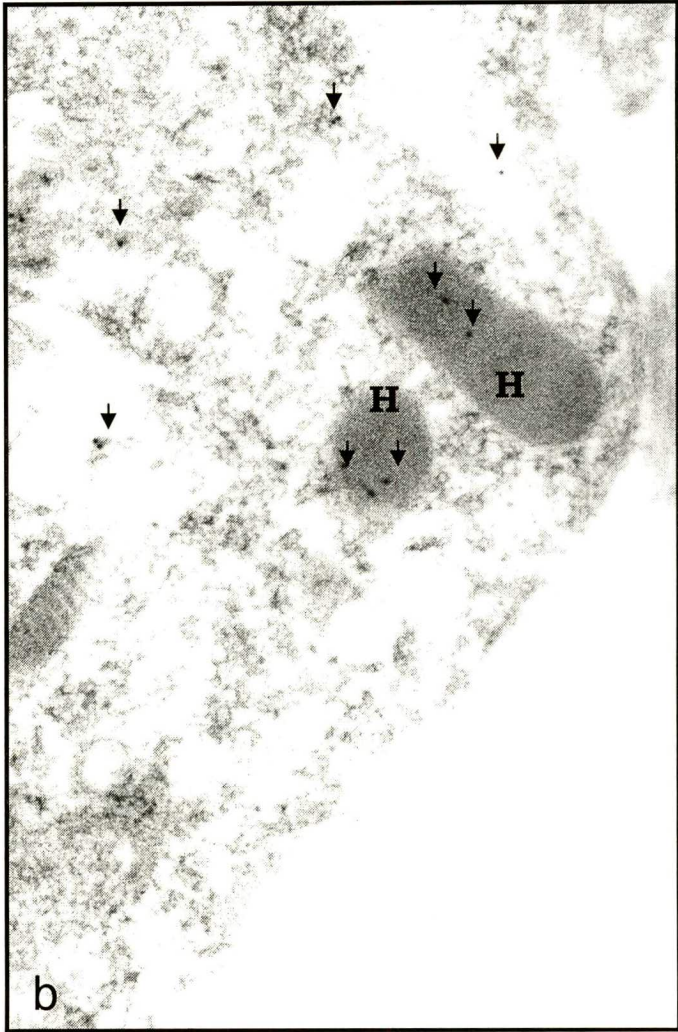
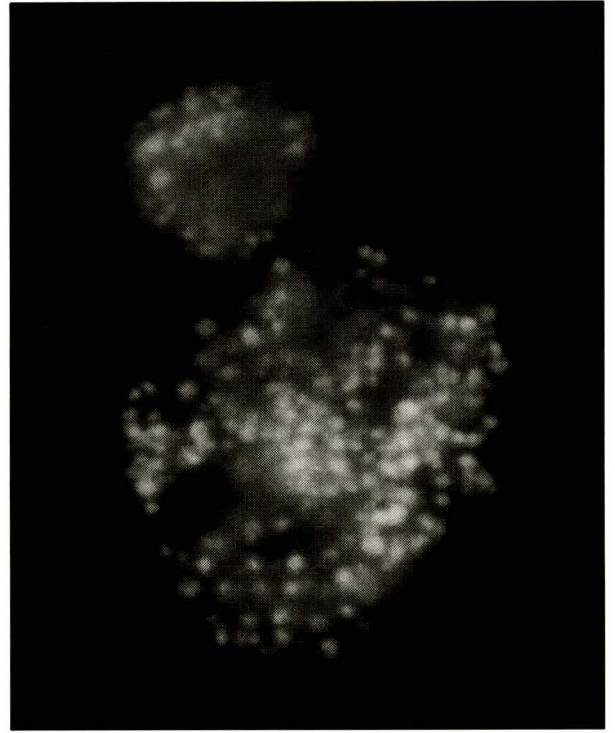


Figura 23. Reconocimiento de la superficie y de organelos citoplasmicos de *T. vaginalis* por el anticuerpo anti-PFOR50. Parásitos no permeabilizados adheridos en laminillas (panel A) y criocortes semifinos de parásitos fijados en suspensión (panel B). Parásitos crecidos en altas concentraciones de hierro, incubados con el anticuerpo anti-PFOR50 (1:200), con un segundo anticuerpo anti-ratón-FITC (1:100) observados por microscopía de epifluorescencia. Aumento 40× para las imágenes del panel A.

A)



B)

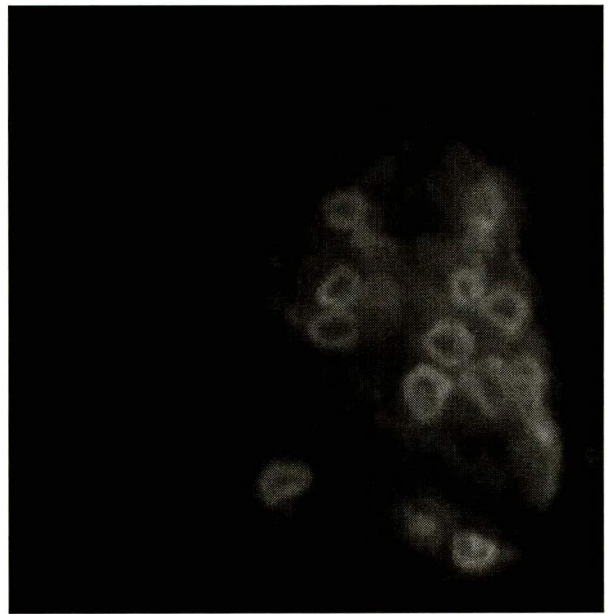
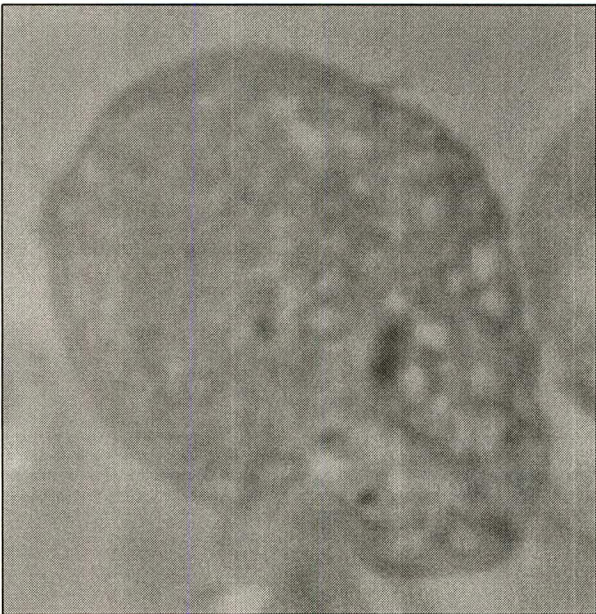


Figura 24. Localización de PFOR en la superficie de *T. vaginalis*. Parásitos crecidos en altas concentraciones de Fe^{2+} , fijados con paraformaldheído al 4%, no permeabilizados observados por Microscopía confocal con el anticuerpo anti-PFOR50. Paneles 1, Microscopía de Nomasky . Paneles 2, Campo obscuro.

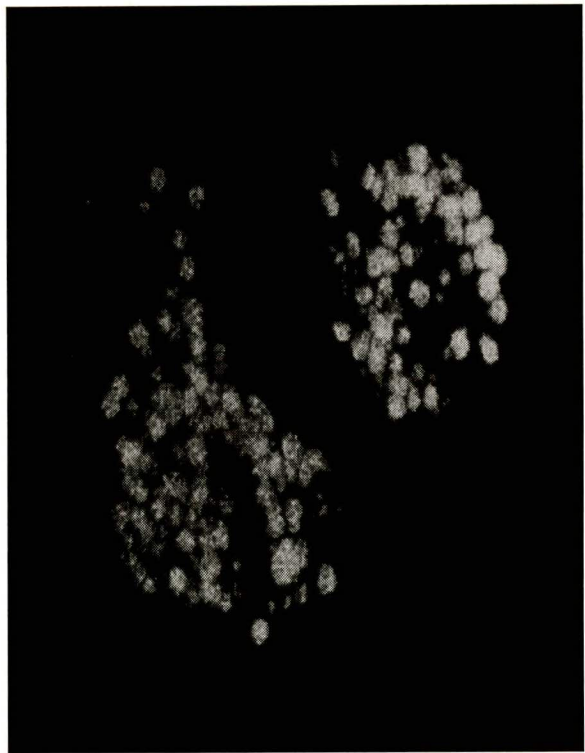
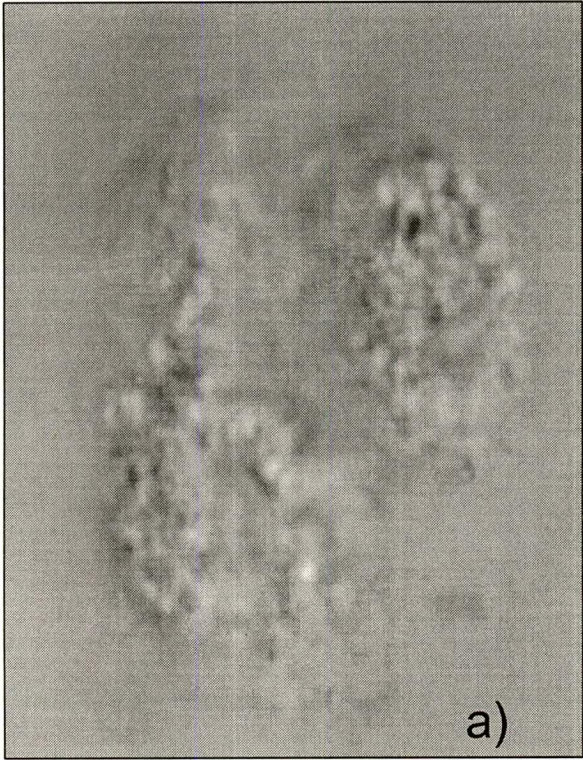


Figura 25. Localización de PFOR en la superficie de *T. vaginalis*. Microscopía confocal con parásitos crecidos en altas concentraciones de Fe^{2+} , fijados con paraformaldheído al 4%, no permeabilizados. Paneles 1: Microscopía de Nomasky. Paneles 2: Microscopía de Nomasky con Fluorescencia. Paneles 3: Campo obscuro. Panel A) Parásitos incubados con un suero preinmune (1:200) (control negativo). Panel B) Parásitos incubados con el anticuerpo anti-TvAP120 (1:50) (control positivo). Panel C) Parásitos incubados con el anti-PFOR50 (1:200). Panel D: Párasitos incubados con el anticuerpo anti-PFORApep (1:80).

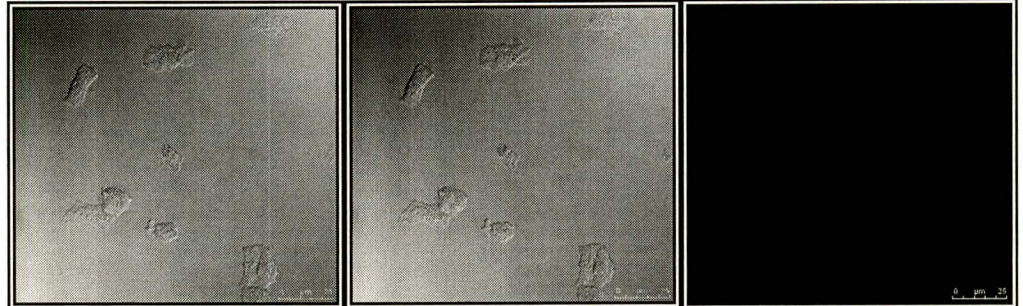
↑[Fe²⁺]

1

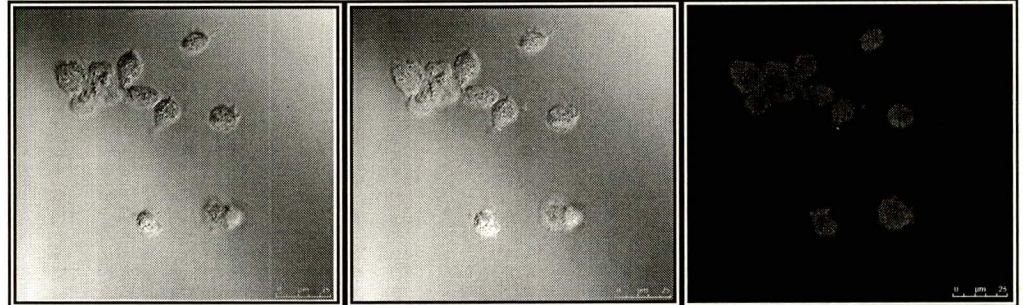
2

3

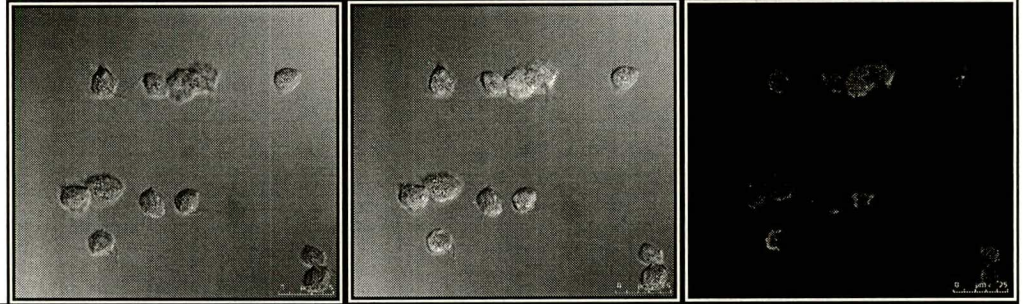
A) suero preimmune



B) anti-TvAP120



C) anti-PFOR50r



D) anti-PFORApep

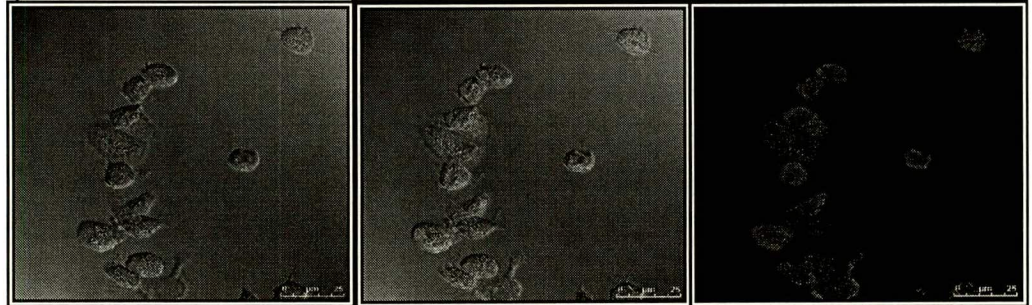


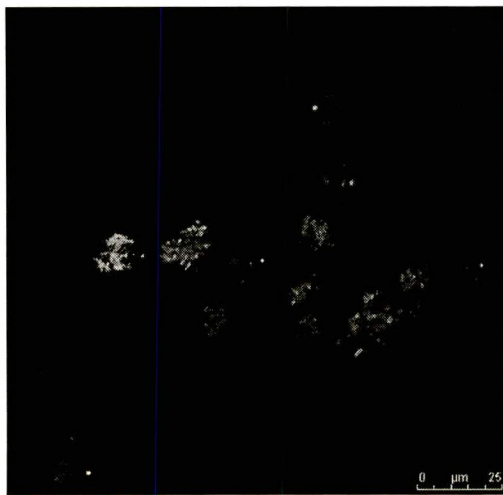
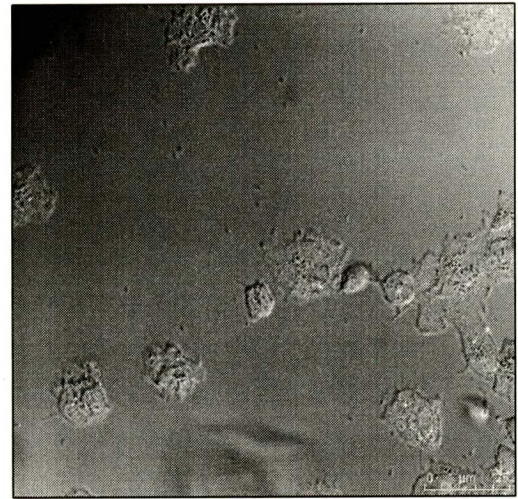
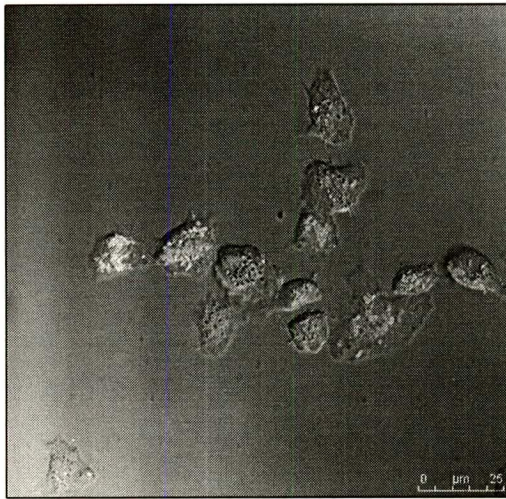
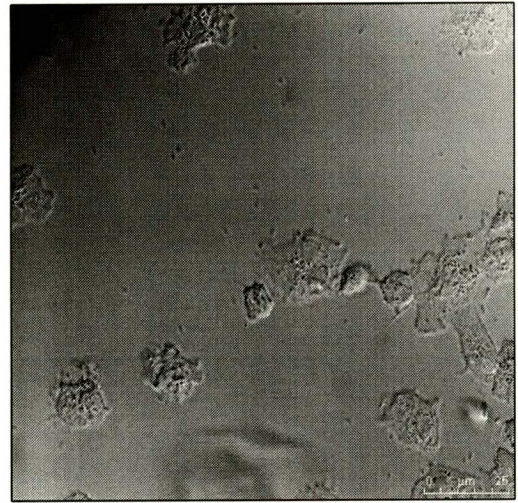
Figura 26. Localización de PFOR en la superficie del parásito. Por ensayos de inmunofluorescencia indirecta se hizo la comparación entre parásitos permeabilizados y no permeabilizados así como también entre condiciones de cultivo, incubados con el anticuerpo anti-PFOR50. Paneles 1: Microscopía de Nomasky. Paneles 2: Microscopía de Nomasky con Fluorescencia. Paneles 3: Campo Oscuro. A) Parásitos permeabilizados, teñidos con yoduro de propidio. B) Parásitos no permeabilizados. a) Parásitos cultivados en altas concentraciones de Fe^{2+} . b) Parásitos cultivados en condiciones bajas hierro.

A)

a) $\uparrow[\text{Fe}^{2+}]$

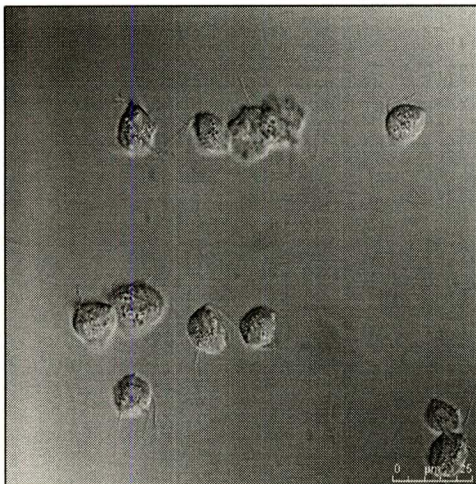


b) $\downarrow[\text{Fe}^{2+}]$



B)

a) $\uparrow[\text{Fe}^{2+}]$



b) $\downarrow[\text{Fe}^{2+}]$

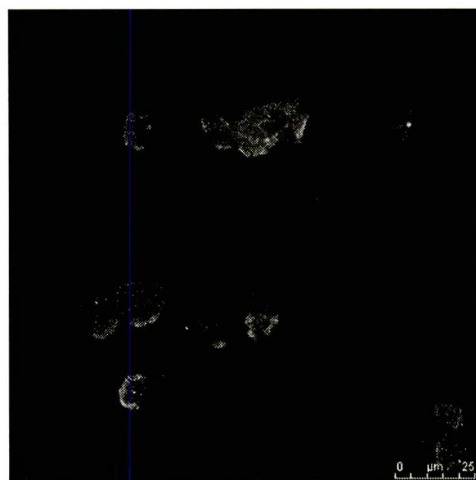
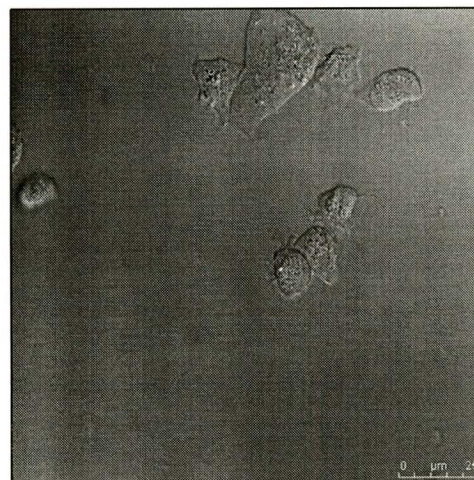
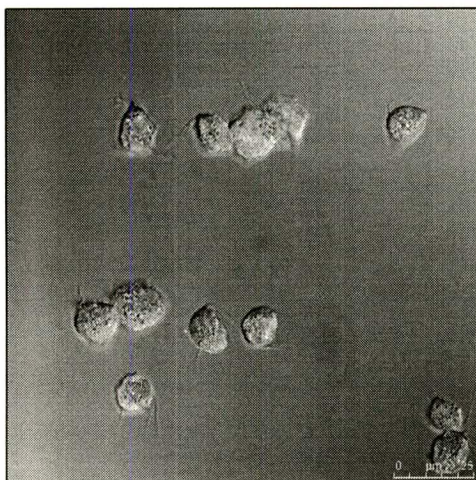
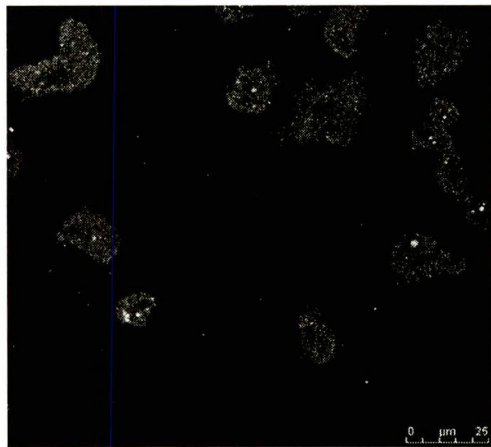
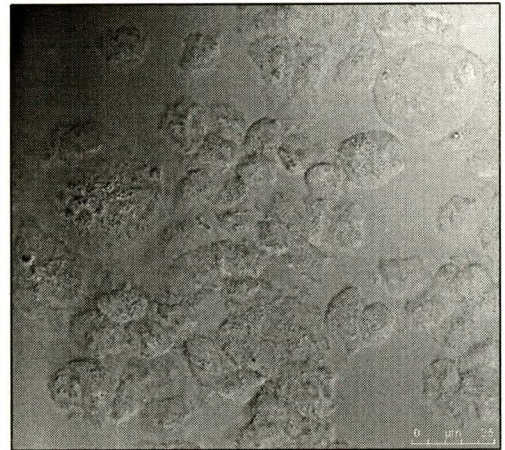
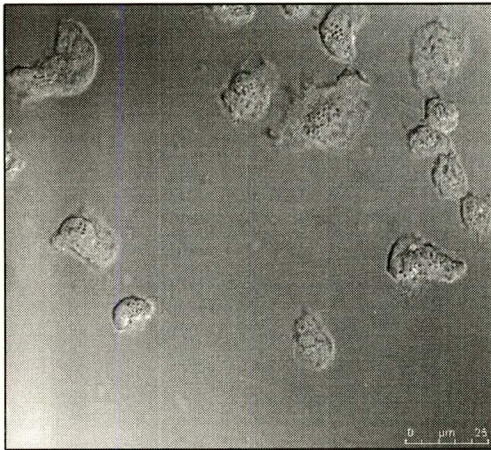
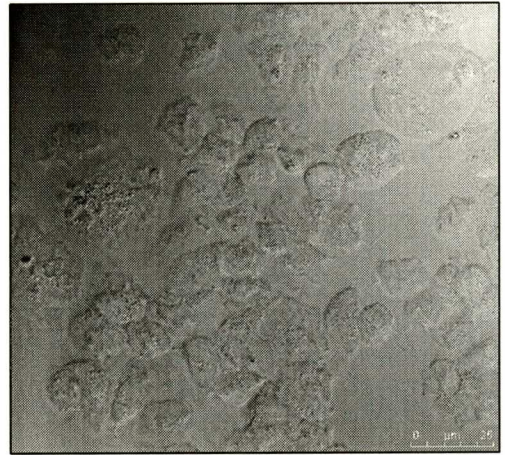


Figura 27. Localización de PFOR A en la superficie del parásito. Por ensayos de inmunofluorescencia indirecta se hizo la comparación entre parásitos permeabilizados y no permeabilizados crecidos en altas y bajas concentraciones de hierro, incubados con el anticuerpo anti-PFORApep (1:80). Paneles 1: Microscopía de Nomasky. Paneles 2: Microscopía de Nomasky con Fluorescencia. Paneles: Campo Oscuro. A) Parásitos permeabilizados, teñidos con yoduro de propidio. B) Parásitos no permeabilizados. a) Parásitos cultivados en altas concentraciones de Fe^{2+} . b) Parásitos crecidos en bajas concentraciones de Fe^{2+} .

A)

a) $\uparrow[\text{Fe}^{2+}]$

b) $\downarrow[\text{Fe}^{2+}]$

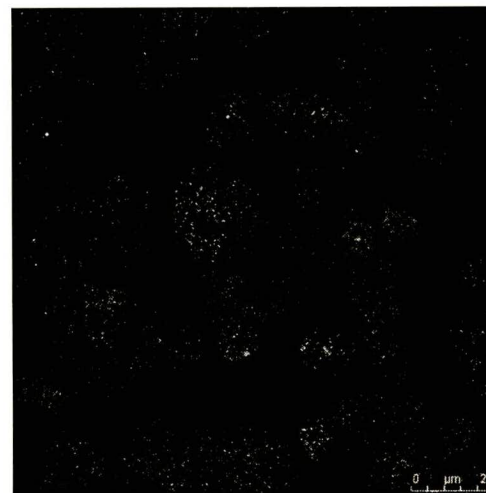
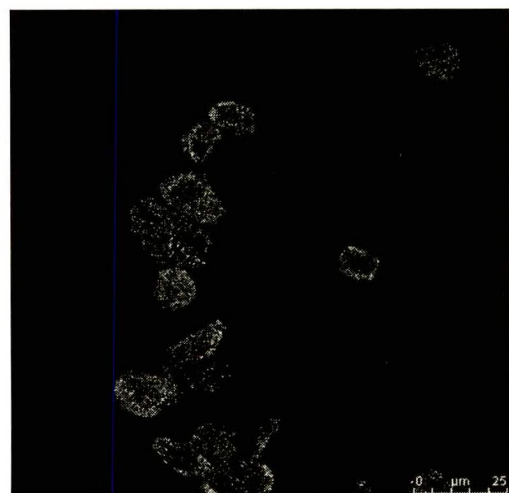
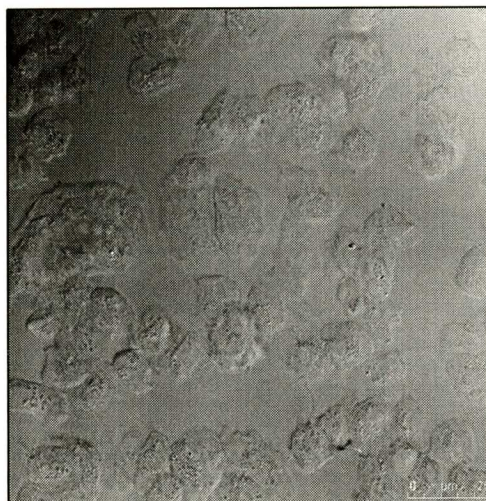


B)

a) $\uparrow[\text{Fe}^{2+}]$



b) $\downarrow[\text{Fe}^{2+}]$



9.- DISCUSIÓN

El fenómeno de adhesión es uno de los primeros pasos necesarios para que *T. vaginalis* colonice al huésped (Alderete y Garza 1985; 1988). La adherencia de *T. vaginalis* a la célula blanco, es un evento multifactorial en el cual participan proteinasas (Arroyo y Alderete, 1989; Mendoza-López y col., 2000; Hernández y col., 2004) y proteínas de superficie como las adhesinas (AP65, AP51, AP33 y AP23) que median la interacción de *T. vaginalis* con células epiteliales de la vagina y del cérvix humano (García y col., 2003). La adhesión también se modula por altas concentraciones de hierro y por contacto con las células blanco (Arroyo y col., 1993), debido al incremento en la expresión de las adhesinas (Lehker y col., 1991; García y col., 2003).

Al caracterizar a las adhesinas que se encuentran en la superficie del parásito, se demostró que están codificadas por familias multigénicas, constituidas por al menos tres genes (Engbring y Alderete, 1998), en los casos de AP33 (Engbring y Alderete, 1998), la AP51 (Alderete y col., 1998) y AP65 (Alderete, 1995a). Además, la diversidad funcional de las adhesinas debido a su homología con las enzimas metabólicas hidrogenosomales del parásito y mitocondriales del huésped las cuales tienen funciones indispensables en la producción de energía concretamente en el hidrogenosoma; pero también pudieran participar en el mimetismo molecular de *T. vaginalis* como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune de huésped (Engbring y col., 1996).

Al realizar estudios en seis aislados mexicanos de *T. vaginalis* sobre la expresión de las adhesinas en diferentes concentraciones de Fe^{2+} y por ensayos de ligando, se observó la inducción de una proteína de 120 kDa solo en altas concentraciones de Fe^{2+} y que además se une a células HeLa; se sugirió que esta molécula podría participar en adhesión como una nueva adhesina inducible por hierro, (Yañez-Gómez, 1998). Posteriormente, se confirmó que la AP120 es una nueva adhesina que se induce en altas concentraciones de hierro (Yañez-Gómez, 1999). Al continuar con su caracterización y por electroforesis en doble dimensión de extractos de parásitos crecidos en diferentes concentraciones de hierro, se observó que la banda de 120 kDa en bajas concentraciones de hierro está constituida por dos manchas; mientras que en altas concentraciones de hierro está constituida por tres manchas. La mancha no.1 solo se observó en altas concentraciones de Fe^{2+} y fue reconocida por el anticuerpo anti-TvAP120 que inhibe la adhesión de *T. vaginalis* a células HeLa. A la mancha no. 1 expresada en altas concentraciones de Fe^{2+} se le hizo un mapeo triptico y por un análisis de MALDI-TOF se identificaron algunos péptidos con masas idénticas de péptidos de PFOR A de *T. vaginalis*. Esta homología entre la adhesina y AP120 y la PFOR A se confirmó con el anticuerpo anti-EhPFOR en ensayos de Western blot e inmunofluorescencia indirecta. Como parte de la caracterización de la AP120 se realizaron estudios de inmunolocalización demostrando que hay una doble localización tanto en superficie como en citoplasma al utilizar el anticuerpo anti-TvAP120 que solo tendría que reconocer a la adhesina en superficie, de manera similar esta doble localización se da con el anticuerpo anti-EhPFO a tomando en cuenta que la PFOR de *E. histolytica* tiene un 45% de identidad con respecto a PFOR A de *T. vaginalis*. Estos resultados sugieren fuertemente que la

PFOR A podría tener una doble función. Con estos resultados se demostró una vez más la homología que existe entre una molécula de superficie, la AP120 que participa en adhesión y una enzima metabólica, PFOR A que aparentemente se encuentra en organelos citoplásmicos como son los hidrogenosomas (Moreno-Brito y col., 2005).

Con todo ello se sugiere que la adhesina AP120 podría mostrar una diversidad funcional. Una misma molécula que al localizarse en distintas partes del parásito realice diferentes funciones: a) en el hidrogenosoma como enzima metabólica y b) en la membrana plasmática como adhesina.

Por todo lo anterior, en este trabajo se propuso que el hierro influye en la relocalización de la proteína PFOR A hacia la superficie del parásito y de esta manera participar en la adhesión de *T. vaginalis* a células epiteliales. Por lo que el objetivo de este trabajo fue demostrar la relocalización de PFOR A, de los hidrogenosomas hacia la membrana del parásito por altas concentraciones de hierro durante el crecimiento. Durante mi tesis de licenciatura se amplificó, se clonó y se secuenció el gen *pfor a* del aislado CNCD 188 de *T. vaginalis* a partir de la secuencia ya reportada en el GENEBank (Hrdy y Muller, 1995). Además, por ensayos de RT-PCR la presencia del transcrito de PFOR A se observó solo en altas concentraciones de Fe^{2+} . El fragmento amplificado correspondiente al extremo carboxilo-terminal de la PFOR A (Meza- Cervantez, 2005). Es importante mencionar que en este fragmento que comprende los últimos 367 residuos del extremo carboxilo de la PFOR A se ubicaron 11 de los 22 péptidos identificados de la mancha no. 1 observada en altas concentraciones de Fe^{2+} , de la banda de

120 kDa involucrada en la adhesión de *T. vaginalis*, los péptidos mostraron identidad con masas de péptidos de PFOR A (Moreno-Brito y cols., 2005).

Con la secuencia de DNA que codifica el extremo carboxilo-terminal de la PFOR A (1.1 kb) se realizó una búsqueda en el genoma de *T. vaginalis* encontrándose además de *pfor a* y *pfor b*, tres genes con menor homología a PFOR A (*pfor c*: 86%, *pfor d*: 63% y *pfor e*: 61%), las cuales poseen características típicas de una PFOR (TTP, cluster Fe-S), aunque así como también se encontraron diferencias marcadas entre cada una de ellas, como el tamaño y cambios en algunas modificaciones postraduccionales (Meza-Cervantez, 2005). Por lo que surgió la duda sobre cual de estos genes podría codificar a la adhesina AP120, *pfor a* o alguno de los otros genes tipo *pfor* encontrados.

Recientemente, mediante ensayos Southern blot se reportó que los genes encontrados en el genoma con homología a PFOR A corresponden a copias de PFOR B, los cuales se denominaron *pfor c* (86%), *pfor d* (63%) y *pfor e* (61%) (Upcroft y col., 2006). Por ello, en este trabajo fue importante determinar si algún otro gen tipo PFOR pudiera expresarse en altas concentraciones de Fe^{2+} y que pudiera codificar a la adhesina AP120 y que descartara la hipótesis de la doble funcionalidad de PFOR A. Los resultados mostraron que aunque con DNA genómico se amplificaron las regiones divergentes y específicas de cada gen tipo PFOR, los ensayos de RT-PCR mostraron que los genes *pfor c*, *pfor d* o *pfor e* no se transcriben en ninguna de las concentraciones de Fe^{2+} analizadas, mientras el gen *pfor a* solo se transcribe en altas concentraciones de Fe^{2+} . Aunque con estos resultados no podemos descartar que estos genes puedan transcribirse bajo

otras condiciones no estudiadas en este trabajo. Lo que demuestran estos datos es que el gen *pfor a* es el único que se transcribe en altas concentraciones de hierro, la condición de la inducción de la expresión de la AP120 a nivel de proteína (Moreno-Brito y col., 2005). Estos datos apoyan la posible bifuncionalidad de la PFOR A en altas concentraciones de hierro. Aunque sería interesante buscar las condiciones de expresión de cada uno de los genes tipo PFOR y determinar su posible función, no se descarta que estas secuencias parecidas a PFOR A carezcan de función en el parásito.

De ahí que para confirmar, la doble localización de la AP120 y de la PFOR A observada tanto con el anticuerpo *anti-TvAP120* como con el anticuerpo *anti-EhPFOR* fue necesario generar anticuerpos contra la PFOR A de *T. vaginalis* y así confirmar la relación entre PFOR y la AP120. Para ello, primeramente se expresaron dos fragmentos del extremo carboxilo-terminal de 367 aa (1.1 kb) y de 633 aa (1.9 kb) de la PFOR A. Este último corresponde al fragmento de la PFOR de *E. histolytica* contra la que se hizo el anticuerpo *anti-EhPFOR* que detectó proteínas tanto en la superficie como en el citoplasma de tricomonas (Moreno-Brito y col., 2005). Por lo que se asumió que estos fragmentos de la PFOR A de *T. vaginalis* deben encontrarse expuestos en la superficie del parásito. En un futuro, estas proteínas recombinantes también se utilizarán para identificar el sitio de unión a células HeLa, en caso de que se demuestre que la PFOR A participa en la adhesión.

A pesar de que logramos expresar y purificar las proteínas recombinantes de 50 y 70 kDa de la region carboxilo-terminal de la PFOR A de *T. vaginalis*, solo

se generaron anticuerpos contra la proteína de 50 kDa, PFOR50, ya que en este fragmento se encuentran 11 de los 22 péptidos de la AP120 con identidad a PFOR A. El hecho de que los anticuerpos anti-PFOR50 reconocieron por ensayos de Western blot, a las dos proteínas recombinantes y a la proteína de 120 kDa en parásitos crecidos en altas concentraciones de Fe^{2+} , junto con el reconocimiento del anticuerpo anti-TvAP120 hacia las dos proteínas recombinantes de 50 y 70 kDa confirman la relación entre PFOR A y la AP120.

Además, dado que el anticuerpo contra la región carboxilo-terminal de la PFOR A de *T. vaginalis*, esta dirigido contra una región conservada entre PFOR A y PFOR B, en los ensayos de inmunolocalización se podría localizar a cualquiera de las dos PFORs en el parásito, por lo que, fue necesario tener un anticuerpo específico para PFOR A. Esto se logró seleccionando un péptido de la región más divergente entre PFOR A y PFOR B, para generar anticuerpos policlonales monoespecíficos en ratón que reconocerían específicamente a PFOR A.

La localización de la PFOR A por inmunofluorescencia indirecta, en epifluorescencia, microscopía electrónica y microscopía confocal con los anticuerpos generados se muestra que la PFOR A en parásitos crecidos en altas concentraciones de hierro se localiza en la membrana y en el interior de los hidrogenosomas y que además se encuentra en la superficie del parásito. Estos resultados confirman que la PFOR es una proteína que se encuentra en la membrana del hidrogenosoma (Williams y col., 1987) que se relocaliza en altas concentraciones de hierro hacia la superficie del parásito. Esto sorprende, ya que

en otros estudios se demostró que anticuerpos generados contra enzimas hidrogenosomales como la málica y las subunidades α y β de la succinil-CoA sintetasa, que tienen homología con las adhesinas AP65, AP33 y AP51; solo localizan moléculas en el hidrogenosoma pero no en la superficie del parásito. Una posibilidad es que el anticuerpo que ellos utilizaron es un anticuerpo monoclonal y probablemente el epítopo contra el que fue hecho no es común entre la enzima hidrogenosomal y las adhesinas, por ello la localización es limitada y específica para hidrogenosomas (Brugerolle y col., 2000). Otra posibilidad es que aunque sea un epítopo compartido entre la enzima y adhesina, este no quede expuesto en la superficie del parásito. Estos resultados se pueden corroborar con lo obtenido en este trabajo, el cual muestra que el reconocimiento de PFORs con el anticuerpo anti-PFOR50 comparada con el reconocimiento con el anticuerpo anti-PFORApep es diferencial, ya que reconoce proteínas en la membrana y en el citoplasma más que en hidrogenosomas.

Es importante mencionar que la PFOR en otros parásitos se puede ubicar en diferentes compartimentos del parásito. Un ejemplo de ello es lo que reportan Rodríguez y col., (1998), para la PFOR de *E. histolytica*. El anticuerpo anti-EhPFOR muestra un reconocimiento tanto en organelos citoplásmicos (Ehko) como en la membrana plasmática de *E. histolytica*, lo que muestra que no solo en *T. vaginalis*, la PFOR se localiza en dos diferentes sitios. Además también en *T. vaginalis* la enzima málica que normalmente se encuentra en el hidrogenosoma también que se puede encontrar en el citosol, posiblemente realizando diferentes funciones (Dolezal y col., 2004).

Además por ensayos de inmunofluorescencia e inmunocitoquímica, que con parásitos crecidos en altas concentraciones de hierro coexpresan adhesinas como la AP65 tanto en la superficie como en el citoplasma de *T. vaginalis*, lo que no sucede en parásitos crecidos en bajas concentraciones de hierro. (García y col., 2003).

Con todos estos estudios y los resultados presentados en este trabajo si PFOR A participara también en adhesión representaría un ejemplo muy claro de moléculas que tienen varias funciones llamadas proteínas multifuncionales o “*moonlighting proteins*”, en las cuales la diversidad funcional que poseen se debe a las condiciones medio ambientales, referido a condiciones extra e intra celulares, en la cual se expresa la proteína (Boonacker y Noorden, 2003). Los primeros estudios acerca de diversidad funcional de enzimas metabólicas empezó con una de las enzimas de mamíferos más importante, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada (Pancholi y Fischetti, 1992; 1993) clasificada como una “*moonlighting protein*” en la naturaleza debido a sus múltiples funciones (Jeffery, 1999).

10.- CONCLUSIONES

Este trabajo demuestra que PFOR A se encuentra en los hidrogenosomas y se relocaliza hacia la superficie del parásito en altas concentraciones de hierro. Dado que hasta ahora no se ha encontrado otro gen homólogo a PFOR A que se transcriba en altas concentraciones de Fe^{2+} , los datos aquí presentados sugieren que PFOR A y la AP120 están codificadas por el mismo gen. Por lo que PFOR A podría participar en la adhesión de *T. vaginalis* hacia las células del epitelio vaginal.

11.- PERSPECTIVAS

- Determinar si la PFOR A participa en adhesión.
- Identificar el dominio de unión a células si es que esta molécula participara en adhesión.
- Identificar el receptor del PFOR A/AP120 en las células HeLa.
- Co-localizar a PFOR A y AP120, para demostrar que se trata de una misma molécula.
- Investigar el mecanismo por el cual PFOR, una proteína hidrogenosomal puede relocalizarse a la superficie del parásito.
- Determinar el efecto knockout del gen *pfor a*.

12.- BIBLIOGRAFÍA

ALDERETE, J.F., AND GARZA, G. E. 1985. Specific nature of *Trichomonas vaginalis* parasitism of host cell surface. Infect. Immun. 50: 701-708.

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

ALDERETE, J.F., AND GARZA, G.E. 1988. Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence. Infect. Immun. 56: 28-33.

ALDERETE, J.F., NEWTON, E., DENNIS, C., ENGBRING, J., AND NEALE, K.A. 1991. Vaginal antibody of patients with trichomoniasis is to a prominent surface immunogen of *Trichomonas vaginalis*. Genitourin. Med. 67: 220-225.

ALDERETE J.F., O'BRIEN J.L., ARROYO R., ENGBRING J.A., MUSATOVVOVA O., LÓPEZ O., LAURIANO C. AND NGUYEN J. 1995a. Cloning and molecular characterization of two genes encoding adhesion proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. Mol Microbiol. 1995 17(1):69-83.

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

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

- ALDERETE J.F., ENGBRING J.A., LAURIANO C. AND O'BRIEN J. L. 1998. Only two of the *Trichomonas vaginalis* triplet AP51 adhesins are regulated by iron. *Microb Pathog.* 24:1-16.
- ALDERETE J.F. 1999. Iron modulates phenotypic variation and phosphorylation of p270 in double-stranded RNA virus-infected *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.* 67: 4298-302.
- ALDERETE J.F., MILLSAP K.W., LEHKER M.W. AND BENCHIMOL M. 2001. Enzymes on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry and functional diversity. *Cel. Microbiol.* 3: 359-370.
- ÁLVAREZ-SÁNCHEZ M.E., AVILA-GONZÁLEZ L., BECERRIL-GARCÍA C., FATTEL-FACENDA L.V., ORTEGA-LÓPEZ J. AND ARROYO R. (2000). A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microb. Pathog.* 28:193-202.
- ANORLU R.I., FAGBENRO-BEYIOKU A.F., FAGORALA T. 2001 Prevalence of *Trichomonas vaginalis* in patients with vaginal discharge in Lagos Nigeria. *Nigerian Postgrad. Med. J.* 8: 183-186.
- ANDERSSON S.G.E., KURLAND C.G. 1999. Origins of mitochondria and hydrogenosome. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 535-541.
- ARROYO R, ENGBRING J. AND ALDERETE J.F. 1992. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol* 6:853-62.
- ARROYO R., GONZÁLEZ-ROBLES, MARTÍNEZ PALOMO A. AND ALDERETE, J.F. 1993. Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence. *Mol. Microbiol.* 7: 299 – 309.

ARROYO R. 2000. Biología Molecular de la Trichomonosis. Genética y Biomedicina Molecular. Edit. Noriega-Limusa. Colección de Textos Politécnicos. México D.F. Cap. 19, 287-304.

BLAMEY, J.M. AND ADAMS , M.W.W. 1993. Purification and characterization of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Biochim. Biophys. Acta 1161, 19-27.

BLAMEY, J.M. AND ADAMS , M.W.W. 1994. Purification and characterization of an ancestral type of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic bacterium, *Thermotoga maritima*. Biochem. 33: 1000-1007.

BOONACKER E. AND VAN NOORDEN C. J. 2003. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. Eur. J. Cell Biol. 82:53-73.

BOZNER, P. AND DEMES, P.V.(1991). Proteinases in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas mobilensis* are not exclusively of cysteine type. Parasitol. 102:113-115.

BOZNER P, GOMBOSOVA A, VALENT M, DEMES P, ALDERETE J.F. 1992. Proteinases of *Trichomonas vaginalis*: antibody response in patients with urogenital trichomoniasis. Parasitol. 105 :387-391.

BRUGEROLLE, G. 1975. Etude de la cryptopleuromitose et de la morphogenese de division chez *Trichomonas vaginalis* et chez plusieurs genres de trichomonadines primitives. Parasitologica 11: 457-468.

BRUGEROLLE G., BRICHEUX G. AND COFFE G. 2000. Immunolocalization of two hydrogenosomal enzymes of *Trichomonas vaginalis*. Parasitol. Res. 86:30-35.

BURROLA BARRAZA E. 2001. ¿Existen proteínas tipo IRPs en *Trichomonas vaginalis*? Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en la especialidad de Patología Experimental. Cinvestav-IPN, México.

CAVALIER-SMITH T. 1987. The simultaneous symbiotic origin of mitochondria, chloroplasts and microbodies. *Ann. New York Academy of Science* 503:55-72.

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-x_L, but not Bcl-2. *Parasite Immun.* 26: 141-150.

CHOU, C.F., TAI, J.H. 1996. Simultaneous extraction of DNA and RNA from nuclease-rich pathogenic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Biotechniques.* 20: 790-791.

DAILEY, D.C., CHANG T. AND ALDERETE J.F. 1990. Characterisation of *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Parasitol.*, 101: 171-178.

DOLEZAL P., VANACOVA S., TACHEZY J. AND HRDÝ I. 2004. Malic enzymes of *Trichomonas vaginalis*: two enzyme families two distinct origins. *Gene* 329:81-92.

DUK-YOUNG M., KEUN-HEE H., JAE-SOOK R., MYOUNG-HEE A., MYUNG-HWAN C. 1998. Degradations of human immunoglobulins and hemoglobin by a 60 kDa cysteine proteinase of *Trichomonas vaginalis*. *The Korean J. of Parasitol.* 4: 261-268.

DUNNE R.L., DUNN L.A., UPCROFT P., DONOGHUE P.J. AND UPCROFT J. 2003. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Research* 13: 239-249.

DUREL P., COUTURE J. AND BASSOULLET M.T. 1967. The rapid detection of metronidazole in urine. *Br. J. Vener Dis.* 43:111-113.

ELLIS, J.E., WILLIAMS, R., COLE, D., CAMMACK, R. AND LLOYD, D. 1993. Electron transport components of the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. *FEBS Lett.* 325, 196-200.

ENGBRING, J., O'BRIEN, J., AND ALDERETE, J. 1996. *Trichomonas vaginalis* adhesin proteins display molecular mimicry to metabolic enzymes. Adv. Exp. Med. Biol. 408: 207-223.

ENGBRING, J., O'BRIEN, J., AND ALDERETE, J. 1998. Three genes encode distinct AP33 proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. Mol Microbiol. 28:305-313.

ESTADÍSTICAS DE LAS ETS A NIVEL MUNDIAL SEGÚN LA OMS. Se pueden encontrar en:

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

FIORI P.L., RAPPELLI P., ROCCHIGIANI A.M. AND CAPPUCCINELLI P. 1993. *Trichomonas vaginalis* haemolysis : Evidence of functional pores formation on red cell membranes. FEMS Microbiol Lett. 109:13-18.

GARCIA F.A., CHANG T., BENCHIMOL M., KLUMPP J.D., LEHKER AND ALDERETE J.F. 2003. Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on the surface of *Trichomonas vaginalis*. Mol. Microbiol. 47: 1207-1224.

GILLIN F.D. AND SHER A. 1981. Activation of the alternative complement pathway by *Trichomonas vaginalis*. Infect Immun. 34: 268-273.

GILBERT R.O., ELIA G., BEACH D.H., KLAESSIG S. AND SINGH B.N. 2000. Cytopathogenic effect of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultured in vitro. 68:4200-4206.

GORRELL T. E. 1985. Effect of Culture Medium Iron Content on the Biochemical Composition and Metabolism of *Trichomonas vaginalis*. J. of Bacteriol. 1228-1230.

HERNÁNDEZ-GUTIERREZ R, ORTEGA-LOPEZ J. AND ARROYO R. 2003. A 39-kDa cysteine proteinase CP39 from *Trichomonas vaginalis*, which is negatively affected by iron may be involved in trichomonal cytotoxicity. *J Eukaryot Microbiol.*50:696-698.

HERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ R., ÁVILA-GONZÁLEZ L., ORTEGA-LÓPEZ J., CRUZ-TALONIA F., GÓMEZ-GUTIÉRREZ G. AND ARROYO R. 2004. *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Exp Parasitol.*107:125-135.

HERNÁNDEZ H., SARRACENT J. 2004. Monoclonal antibodies against a 62 kDa proteinase of *Trichomonas vaginalis* decrease parasite cytoadherence to epithelial cells and confer protection in mice. *Parasite Immun.* 26:119-125.

HONIGBERG, 1990. *Trichomonads parasitic in humans.* Springer-Verlag, New York, N.Y.

HRDÝ, I and MÜLLER, M. 1995. Primary structure and eubacterial relationships of the pyruvate: ferredoxin oxidoreductase of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *J. Mol. Evol.* 41: 388-396.

JEFFERY C. J. 1999. Moonlighting proteins. *Trends Biochem. Sci.* 24: 8-11.

JEFFERY C. J. 2003. Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. *Trends Genet.* 19: 415-417.

JOHNSON, J. P., LATHI J. C. AND BRADLEY J. P. 1993. Biogenesis of the hydrogenosome in the anaerobic protist *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitol.* 79: 664-670.

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

KIRKWOOD, M.L.D., DELGADILLO C. M., TACHEZY J., VANACOVA S. HSIEH C.L., SUTAK R. AND JOHNSON P. 2004. Targeted gene replacement of a ferredoxin gene in *Trichomonas vaginalis* does not lead to metronidazole resistance. *Mol. Microbiol.* 5: 115-122.

KIRKWOOD, M.L.D., DELGADILLO M.G. AND JOHNSON P. 2002. In vivo expression of ferredoxin in a drug resistant trichomonad increases metronidazole susceptibility. *Mol. Biochem. Parasitol.* 121:153-157.

KRESCHER, L. AND OESTRHELT, D. 1981. Purification and properties of two 2-oxoacid: ferredoxin oxidoreductases from *Halobacterium halobium*. *Eur. J. Biochem.* 166: 587-584.

KRESCHER, L. AND OESTRHELT, D. 1982. Pyruvate: ferredoxin oxidoreductase new findings on an ancient enzyme. *Trends Biochem. Sci.* 7: 371-374.

KRIEGER J.N., POISSON M.A. AND REIN M.F. 1983. Beta-haemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* correlates with virulence. *Infect Immun.* 41:1291-1295.

KULDA J. 1999. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *Int. J. Parasitol.* 29:199-212.

KUNOW, J., LINDER, D. AND THAUER. R.K. 1995. Pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from the sulfate-reducing *Archaeoglobus fulgidus*: molecular composition, catalytic properties and sequence alignments. *Arch. Microbiol.* 163: 21-28.

KUCKNOOR A. S., MUNDODI V. AND ALDERETE J. F. 2005. Adherence to human vaginal epithelial cells signals for increased expression of *Trichomonas vaginalis* Genes. Infec. Immun 73: 6472-6478.

KUCKNOOR A. S., MUNDODI V. AND ALDERETE J. F. 2005. Heterologous expression in *Tritrichomonas foetus* of functional *Trichomonas vaginalis* AP65 adhesin. BMC Mol Biol. 4.

LAEMMLI UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 277: 680-685.

LEHKER, M.W., CHANG, T.H. AND ALDERETE, J.F. 1990. Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for *Trichomonas vaginalis*. *J. Exp. Med.* 171:2165-2170.

LEHKER, M., ARROYO, R., AND ALDERETE, J. 1991. The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *J. Exp. Med.* 174, 311-318.

LEÓN-ÁVILA G., TOVAR J. 2004. Mitosomes of *Entamoeba histolytica* are abundant mitochondrial related remnant organelles that lack a detectable organellar genome. *Microbiol.* 150:1245-1250.

LEÓN-SICAIROS C.R., LEÓN-FÉLIX J. AND ARROYO R. 2004. *tvcp12*: a novel *Trichomonas vaginalis* cathepsin L-like cysteine proteinase-encoding gene. *Microbiol.* 150:1131-1138.

LINDMARK D.G., MÜLLER M. 1975. Hydrogenosomes in *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitol.* 61:552-2.

MADICO G., QUINN T. C., ROMPALO A., MCKEE KT. JR., GAYDOS. C.A. 1998. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swab samples. *J Clin Microbiol.* 36:3205-3210.

MARTIN W. AND MULLER M. 1998. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 392: 37-41.

MARTINEZ V. CAUMES E. 2001. Metronidazole. *Ann. Dermatol. Venereol.* 128: 903-909.

MENDOZA-LOPEZ M.R., BACERRIL-GARCÍA C., FATTEL-FACENDA L.V., AVILA-GONZÁLEZ L., RUIZ-TACHIQUIN M.E., ORTEGA-LOPEZ J. AND ARROYO R. 2000. CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Infect Immun.* 68: 4907-4912.

MEZA CERVANTEZ P. 2005. Clonación y expresión del tercer gen de la Piruvato-ferredoxin oxido reductasa (PFOR A) de *Trichomonas vaginalis*. Tesis de Licenciatura. Para obtener el título de Bióloga. FES-Iztacala, UNAM. México D.F.

MORENO BRITO V., YÁÑEZ-GÓMEZ C., MEZA-CERVANTEZ P., ÁVILA-GONZÁLEZ L., RODRÍGUEZ M.A. ORTEGA-LÓPEZ J., GONZÁLEZ-ROBLES A. AND ARROYO R. 2005. A *Trichomonas vaginalis* 120-kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate: ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. *Cel. Microbiol.* 7: 245-258.

MÜLLER M. 1988. Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Ann. Rev. of Microbiol.* 42: 465-488.

MÜLLER, M. 1993. The hydrogenosome. *J. Gen. Microbiol.* 139: 2879-2889.

MÜLLER, M., AND LINDMARK, D.G. 1976. Uptake of metronidazole and its effect on viability in trichomonads and *Entamoeba invadens* under anaerobic and aerobic conditions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 9: 696-700.

MUSATOVOVA O. AND ALDERETE J. F. 1999. The *Trichomonas vaginalis* phenotypically varying P270 immunogen is highly conserved except for numbers of repeated elements. *Microb Pathog.* 28:191.

NORTH, M.J. 1991. Proteinases of Trichomonads and Giardia. In *Biochemical protozoology*, pp. 234-244. Edited by G.H. Coombs y M.J. North, London: Taylor and Francis.

OROZCO E., GHARAIBEH R., RIVERON A. M., DELGADILLO D. M., MERCADO M., GÓMEZ CONDE E., VARGAS M. A., LÓPEZ-REVILLA R. 1997. A novel cytoplasmic structure containing DNA networks in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Mol. Gen Genet.* 16: 250-257.

PANCHOLI V. AND FISCHETTI V.A. 1992. A major surface protein on group A *streptococci* is a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with multiple binding activity. *J. Exp. Med.* 176: 415-426.

PANCHOLI V. AND FISCHETTI V.A. 1993. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on the surface of group A *streptococci* is also an ADP- ribosylating enzyme. *Proc. Natl Acad Sci. USA.* 90: 8154-8158.

PETRIN, D., DELGATY, K., BHATT, R.y GARBER, G. 1998. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin. Microb.* 11: 300 – 317.

QUON, D., DELGADILLO, M., KHACHI, A., SMALE, S., AND JOHNSON, P. 1994. Similarity between a ubiquitous promoter element in an ancient eukaryote and mammalian initiator elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 4579-4583.

RIBEIRO K. C. MARIANTE R.M, COUTINHO L. L, BENCHIMOL M. 2002. Nucleus behavior during the closed mitosis of *Tritrichomonas foetus*. *Biol. Cell.* 49:15-19.

RODRÍGUEZ M. A, HIDALGO M. E., SÁNCHEZ T. OROZCO E. 1996. Cloning and characterization of the *Entamoeba histolytica* pyruvate: ferredoxin oxidoreductase gene. *Microb Pathog.* 78: 273-277.

RODRÍGUEZ MA, GARCIA-PEREZ RM, MENDOZA L, SANCHEZ T, GUILLEN N, OROZCO E. 1998. The pyruvate:ferredoxin oxidoreductase enzyme is located in the plasma membrane and in a cytoplasmic structure in *Entamoeba*. *Microb Pathog.* 25:1-10.

ROTTE C., HENZE K., MULLER M. AND MARTIN W. 2000. Origins of hydrogenosomes and mitochondria. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 481-486.

SANGER F., NICKLEN S., COULSON A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.

SCHONHEIT, P. AND SCHAFFER, T. 1995. Metabolism of hyperthermophiles. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11, 26-57.

SILVA FILHO, F.C., DE SOUZA, W. AND LOPEZ O. 1988. Presence of laminin-binding proteins in trichomonads and their role in adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8042-8046.

SISTEMA ÚNICO DE INFORMACIÓN PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA SSA. 2006.

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

SZARKA K, TEMESVARI P., KEREKES A., TEGE A. Y REPKENY A. 2002. Neonatal pneumonia causada por *Trichomonas vaginalis*. *Acta Microbiol. Inmunol. Hung.* 49: 15-19.

TAY, Z. J. 1995. Microbiología y Parasitología Medicas. Edit. Méndez. México DF. 3.46-3.50.

TEMESVARI P., KEREKES A., TEGE A. Y SZARKA K. 2002. Demonstration of *Trichomonas vaginalis* in tracheal aspirates in infants with early respiratory failure. J. Matern Fetal Neonatal Med. 11: 347-349.

TACHEZY, J., AND KULDA, J. (1991). Metronidazole resistance test *in vitro* in strains of *Trichomonas vaginalis* isolated from clinical material. 1. Test conditions. Cesk Epidemiol. Microbiol. Immunol. 40: 89-96.

TOWNSON, S.M., UPCROFT, J.A. AND UPCROFT, P. 1996. Characterisation and purification of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from *Giardia duodenalis*. Mol. Biochem. Parasitol. 79: 183-193.

UPCROFT P., AND UPCROFT J. A. 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. Clin. Microbiol. Rev. 14:150-164.

UPCROFT J. A., DELGADILLO-CORREA M. G., DUNNE R. L., STURM A.W., JOHNSON P.J. AND UPCROFT P. 2006. Genotyping *Trichomonas vaginalis*. Int J Parasitol. 36:821-828.

WEILAND, O.H. 1983. The mammalian pyruvate dehydrogenase complex: structure and regulation. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 96: 123-170.

WILLIAMS K., LOWE N. P. AND LEADLAY F. P. 1987. Purification and characterization of Pyruvate: ferredoxin oxido reductase from the anaerobic protozoon *Trichomonas vaginalis*. Biochem. J. 246: 529-536.

YÁÑEZ GÓMEZ C. 1998. Caracterización de la adhesión y la cantidad de adhesinas de seis aislados Mexicanos de *Trichomonas vaginalis*. Tesis de Licenciatura. Para obtener el título de QFB. Esc. Nacional de Ciencias Biológicas. IPN. México D.F.

YAÑEZ GÓMEZ C. 1999. Caracterización de una proteína de 120 kDa de *Trichomonas vaginalis*. Tesis de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular Programa Interinstitucional de IPN (PIBIOM) CICATA- IPN. México D.F.

13.-APÉNDICE

SOLUCIONES

Gel de Agarosa al 1%

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

Amortiguador TAE 50× (pH ~ 8.5)

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

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

Bromuro de Etidio (0.5 mg/ml)

Bromuro de Etidio (Sigma)	0.5 mg
H ₂ O destilada	1 ml

EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

PBS 1×

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

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

Amortiguador de Lisis

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

Etanol al 70%

Para 50 ml	
Etanol al 100%	35 ml
H ₂ O destilada	15 ml

Amortiguador TE

Tris-HCl	10 mM
EDTA	0.2 mM

Se ajusta el pH 7.6. Se esteriliza por autoclave.

EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

Solución I (Estéril)

Glucosa 50 mM
Tris-HCl 25 mM, pH 8.0
EDTA 10 mM, pH 8.0

Solución II (recién preparada)

NaOH 0.2 M
SDS (Dodecil sulfato de Sodio) 1%

Solución III

Acetato de sodio 5M 60 ml
Ácido acético glacial 11.5 ml
H₂O destilada 28.5 ml

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

X-Gal Stock 40mg/ml

Disolver 400 mg X-GAL en 10 ml de dimetilformamida (filtrar por 0.22 μ m). Se protege de la luz y se almacena a -20° C, se pipetea 40 μ l del stock a cada caja y se espátula.

MEDIOS DE CULTIVO

Medio Luria Bertani (LB)

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

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

Ampicilina (100 µg/ml)

Se filtra por 0.22 µm, para esterilizarla y se protege de la luz.

Placas LB-Ampicilina

El LB se prepara como se describió, además se agregan 20 g de agar bacteriológico, después de haberlo esterilizado por autoclave y a una temperatura de 45°C se adiciona ampicilina (100 µg/ml) y se transfiere a cajas Petri en esterilidad.

MEDIO “Terrific Broth” (TB)

Bactotriptona 12 g

Extracto de Levadura 24 g

Glicerol 4 ml

Se afora a 900 ml con agua bidestilada, posteriormente se esteriliza en autoclave.

MEDIO SOC

Para 1 litro

H₂O destilada 950 ml

Bactotriptona 20 g

Extracto de Levadura 5 g

NaCl 0.5 g

Antes de agregar la glucosa se esteriliza por autoclave

Glucosa 1M 20 ml (previamente esterilizada por filtración 0.22 µM).

Amortiguador de Fosfatos

KH_2PO_4 2.31 g

K_2HPO_4 12.54 g

Se afora a 100 ml con agua bidestilada. Se esteriliza en autoclave.

NOTA: Para maxiprep se agrega 45 ml de medio TB y se mezcla con 5 ml de amortiguador de Fosfatos.

EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Solución de Fe^{2+}

La solución stock se prepara a una concentración de 25 mM, se pesan 0.09803 g de Sulfato Ferroso Amoniacal (MERCK) y se disuelve en Ácido sulfosalicílico (Sigma) 50 mM. Se esteriliza en autoclave y se almacena a 4 °C protegido de la luz, por no más de una semana.

Solución de Ácido Sulfosalicílico

La solución stock se prepara a una concentración 25 mM. Se pesan 0.1271 gr de Acido sulfosalicílico (Sigma) y se disuelven en 10 ml de H_2O .

Solución 2-2', Dipyridyl

La solución stock se prepara a una concentración 15 mM. Se pesan 0.0234 gr de 2-2'. dipiridyl (Sigma) y se disuelven en 10 ml de H_2O . Se esteriliza por filtración en una membrana de 0.22 μm . Se almacena a 4°C por no más de una semana.

PBS 1×

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

Se ajusta el pH a 7.4 con NaOH o HCl se afora a 1 litro con H₂O-DEPC y se esteriliza por autoclave.

H₂O DEPC

Para 1 litro

H₂O 1000 ml

Dietil Pirocarbonato (Sigma) 1 ml se agrega al agua destilada y se deja en agitación por 24 h y después se esteriliza por autoclave.

Etanol al 70%

Etanol absoluto 700 ml

H₂O-DEPC 300 ml

SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS SDS PAGE

Acrilamida al 30%/bisacrilamida al 0.8%

Acrilamida 29.2 g

Bisacrilamida 0.8 g

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

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

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

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

Trizma-base (Sigma) 9.08 g

SDS (Sigma) 0.2 g

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 4×, pH 6.8 (0.5 M Tris-Cl, 0.4% SDS)

Trizma-base (Sigma) 3.025 g

SDS (Sigma) 0.2 g

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%

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

TEMED (bio-Rad)

0.01 ml (10µl)

SDS-amortiguador 2×

Trizma-base 1.52 g

SDS 2 g

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 1× (BM 1×)

SDS amortiguador 2×	500µl
B-mercaptoetanol 5%	50µl
Azul de bromofenol (stock 10mg/ml)	50µl
Agua desionizada	400µl

Amortiguador de muestra 2× (BM 2×)

SDS amortiguador 2×	400µl
B-mercaptoetanol 5%	50µl
Azul de bromofenol (stock 10mg/ml)	50µl

Amortiguador de electroforesis 5× (stock)

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

Aforar con agua destilada a 1 litro

Amortiguador de electroforesis 1×

Amortiguador de electroforesis 5×	100 ml
Agua destilada	400 ml

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

Metanol	500 ml
Ácido acético glacial	100 ml
Agua destilada	400 ml
Azul de Coomassie	0.5 g

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.

SOLUCIONES PARA PURIFICAR POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

Amortiguador de lisis (amortiguador de equilibrio para columna de Níquel)

Tris-HCl pH 7.5	25 mM
NaCl	250 mM
PMSF (Sigma)	1mM

PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride) se disuelve en Etanol 100%

Amortiguador de Lavado 1

Tris-HCl pH 7.5	25 mM
NaCl	250 mM
PMSF	1mM
Imidazole (Sigma)	20 mM

Amortiguador de Lavado 2

Tris-HCl pH 7.5	25 mM
NaCl	250 mM
PMSF	1mM
Imidazole	40 mM

Amortiguador de Elución

Tris-HCl	pH 7.5	25 mM
NaCl		250 mM
PMSF		1 mM
Imidazole		500 mM

SOLUCIONES PARA BLOTS

Amotiguador de Transferencia

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

Disolver primero el Trizma y Glicina. Una vez disuelto agregar el metanol y finalmente, aforar a un litro con agua destilada. Enfriar a 4°C, hasta su uso.

Solución de TBS 1× a pH 7.5

Trizma-base	20 mM	2.42 g
NaCl	500 mM	29.22 g

Disolver en 800 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.5 y aforar a un litro. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución reveladora HRP (para blot por color)

Solución A		Solución B	
HRP	Metanol Frío	TBS 1× a pH 7.5	H ₂ O ₂
7.5 mg	2.5 ml	12.5 ml	7.5µl

Mezclar el HRP (Bio-Rad) en el metanol (Solución A) y por separado el TBS con el H₂O₂ (Solución B). La mezcla se prepara en el momento de usarse.

LISIS PARA OBTENER ADHESINAS

Amortiguador NET pH 7.4

Trizma- Cl	0.05 M	0.606 g
NaCl	0.15 M	0.877 g
EDTA	0.005M	0.168 g

Disolver en 60 ml de agua destilada y ajustar el pH a 7.4. Aforar a 100 ml y almacenar a temperatura ambiente.

Inhibidor TLCK 10 mM

Disolver 0.003693 g en 1 ml de agua destilada

Inhibidor Leupeptin 0.2 mM

Disolver 0.001 g en 1 ml de agua destilada.

Los inhibidores se preparan hasta su uso.

DOC 10%

Disolver 10 g en 100 ml de agua bidestilada.

TDSET

Para 500 ml de solución a las concentraciones finales:

Stock	$C_1V_1=C_2 V_2$	Concentraciones finales
Trizma-Cl 1M pH 7.8 (6.05 gr/ 50 ml)	5 ml	0.01 M
DOC al 10% 10 gr/ 100 ml	10 ml	0.2%
SDS al 20% 2 gr/10 ml	2.5 ml	0.1%
EDTA 0.5 M, pH 8.0 3.722 gr/20 ml	10 ml	0.01M
Triton-X-100 al 100%	5 ml	1%

Finalmente aforar el volumen obtenido a 500 ml con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente

SOLUCIONES PARA ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA

Paraformaldehído al 4%

Paraformaldeído 4 gr en 100 ml

Se disuelve en PBS 1× a 55°C. Se guarda a 4°C y se cubre de la luz.

PBS 1×

NaCl (MERCK) 8 g

KCl 8 g

Na₂HPO₄ 0.65 g

KH₂PO₄ 0.2 g

Se ajusta el pH a 7.4 con NaOH o HCl se afora a 1 litro con agua destilada y se esteriliza por autoclave. Después se filtra por 0.22 µm.

NH₄Cl / PBS 1× pH 7.0 50mM

HCl IN / PBS 1× pH 7.0 1N

4.25 ml/50 ml

GLICINA 0.5 M/ PBS 1× PH 7.0

SUERO FETAL BOVINO 1% / PBS 1× PH 7.0

Albumina 1% / / PBS 1× PH 7.0