

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO **UACM**

Nada Humano me es ajeno

Maestría en Ciencias Genómicas

Caracterización de un posible inhibidor de TveIF-5A de
Trichomona vaginalis

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A

BIOL. ALMA MARÍA DE LA LUZ VILLALOBOS OSNAYA

DIRECTORA DE TESIS

Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez

MÉXICO, D.F

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.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dra. María Elizabeth Alvarez Sánchez
Profesora Investigadora del posgrado Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

ASESORES

Dra. Rossana Arroyo Verástegui
Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular
Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados CINVESTAV-IPN

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

Dra. Mavil López Casamichana
Profesora investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

El presente proyecto de investigación fue realizado en el laboratorio 1 del posgrado en Ciencias Genómicas de la universidad Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez y bajo la asesoría de Dra. Rossana Arroyo Verástegui, Dra. Minerva Camacho Nuez, Dra. Mavil López Casamichana

El proyecto fue financiado con fondos del posgrado en ciencias genómicas de la universidad Autónoma de la Cuidad de México y del CONACYT con numero de proyecto 83808

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por su apoyo académico y económico y al CONACYT como becario numero 330955

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Dra. María Elizabeth Alvarez Sanchez por haberme brindado la confianza para realizar este trabajo, por el apoyo durante el mismo.

A mis asesores Dra. Rossana Arroyo Verástegui, Dra. Minerva Camacho Nuez, Dra. Mavil López Casamichana por compartir su conocimiento reflejado en los consejos y sugerencias para mejorar este trabajo.

A mis lectores de tesis Elisa Elvira Figueroa Angulo, Dra. María Martha Eugenia Yocupicio Monroy por tomarse el tiempo de leer este trabajo y sus sugerencias.

A Isabel por el apoyo durante todo este proceso, por compartir tus conocimientos, tus consejos, por hacerme saber mis errores, por no dejarme caer, por ser más que eso muchas gracias isita.

A mi familia por el apoyo que siempre recibí de todos ustedes, por enseñarme a luchar por lo que se quiere, gracias por guiar mi camino y estar siempre junto a mí.

A Omar por todos los momentos compartidos, por tu apoyo y cariño, especialmente porque siempre estuviste a mi lado apoyándome y levantándome en los momentos más difíciles.

A mis compañeros de generación Bere, Diana, Ali, Marco, Miguel, Robert, Dani, José Luis por ir siempre de la mano apoyándonos en todo momento, por hacer de momentos malos un buen recuerdo, por confiar en mí por ser parte de mi vida, no sé que hubiera hecho sin ustedes los quiero mucho.

A mis compañeros de laboratorio Laurita, Itzelita y José Luis, por hacer de mi estancia en el laboratorio 1 una linda experiencia, por la confianza y la compañía por hacerme sentir parte de ustedes siempre.

A las personas que me acompañaron durante todo este proceso, por compartir un momento de su vida conmigo: Lety, Olga, Itzel Lopez, Alma, Elba, Jackeline, Claudia, Areli, Helios, Miguel, Marco, Caty, Lulu, Viridiana.

A todos aquellos doctores que intervinieron en mi educación académica gracias por enseñarme Dra. Elizabeth, Dra. Mavil, Dra. Elisa, Dra. Martha, Dra. Selene, Dra. Minerva, Dr. Maximo, Dr. Mauricio, Dr. José, Dr. Cesar.

GRACIAS!!!!!!!!!!!!!!!

ABREVIATURAS

ATP	Adenosin trifosfato
DNA	Ácido Dexosirribonucleico
DNAg	DNA genómico
RNA	Ácido Ribonucleico
cDNA	DNA complementario
CPs	Cisteína Proteinasa
CTP	Citocin trifosfato
DAB	1,4.Diamino-2-butatona dihidroclorido
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTPs	Doexinucleótidos tri-fosfatos
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilén diaminotetra-acético
GTP	Guanosín trifosfato
GST	Glutation S-Transferasa
h	horas
HRP	Enzima Peroxidasa de Rabano
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodaltones
LB	Medio Luria
mM	Milimoles
min.	minutos
μl	microlitros
mg	miligramos
OD	Densidad Óptica
ODC	Ornitina descarboxilasa
ON	Toda la noche
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBS	Amortiguador Fosfato Salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
PSP	Proteína soluble en acido perclórico

RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa retrotranscriptasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TA	Temperatura Ambiente
TAE	Buffer Tris- Acetato-EDTA
TYM	Medio de cultivo tripticasa-extracto de levadura-maltosa
UTP	Uracil trifosfato
VECs	Células del epitelio vaginal

LISTA DE FIGURAS

- Fig.1 Gráfica del número de casos de tricomonosis reportados a nivel estatal
- Fig. 2 Morfología de *Trichomonas vaginalis*
- Fig. 3 Ciclo de vida de *T. vaginalis*
- Fig. 4 Metabolismo de poliaminas en *T. vaginalis*
- Fig. 5. Comparación de la estructura terciaria de IhTveIF-5A con la estructura cristal de *Bacillus subtilis* YabJ
- Fig 6. Mapas genómicos de los genes encontrados en *T. vaginalis*
- Fig. 7. Alineamiento de secuencia de nucleótidos
- Fig.8 Alineamiento de aminoácidos
- Fig. 9 Análisis de IhTveIF-5A.
- Fig.10 Predicción de la estructura terciaria hipotética de la proteína IhTveIF-5A.
- Fig. 11 Alineamiento múltiple de IhTveIF-5A de *T. vaginalis*.
- Fig. 12 Relaciones filogenéticas de proteína ortólogas de IhTveIF-5A.
- Fig13. Expresión del gen *Ihtveif-5A* en presencia y ausencia de poliaminas.
- Fig. 14. Amplificación del gen *Ihteveif-5a*
- Fig. 15. PCR de Colonia
- Fig. 16. Alineamiento de la secuencia de la clona candidata C25 y la secuencia del gen *Ihteveif-5a* de *T. vaginalis*
- Fig.17 Análisis por restricción de las clonas candidatas

- Fig.18. Expresión de la proteína lhTveIF-5A en el vector *pGEX-6P-1*.
- Fig.19. Análisis de la solubilidad de la proteína recombinante lhTveIF-5A.
- Fig. 20 Purificación de la proteína recombinante lhTveIF-5A.
- Fig. 21 Reconocimiento de la proteína lhTveIF-5A en *T. vaginalis*.
- Fig. 21 Ensayo EMSA
- Fig. 22 Ensayo de Pull Down.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de los genes encontrados en Ihteveif-5a en *T. vaginalis*

Tabla 2. Porcentaje de identidad de los posibles inhibidores de *T. vaginalis* vs la secuencia identificada por ESI MS/MS

ÍNDICE

Página

ABREVIATURAS.....	1
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABLAS.....	5
ÍNDICE	6
RESUMEN	9
Antecedentes Generales	10
INTRODUCCIÓN	10
Tricomonosis	10
Diagnóstico.....	13
Tratamiento	14
Epidemiología.....	15
<i>Trichomonas vaginalis</i>	16
Ciclo de vida.....	18
Genoma de <i>T. vaginalis</i>	19
Propiedades y factores de virulencia de <i>T. vaginalis</i>	20
Metabolismo de <i>T. vaginalis</i>	23
Generalidades de las poliaminas	24
Poliaminas en <i>T. vaginalis</i>	25
Generalidades de eIF-5A.	26
Antecedentes Directos	28
Proteínas de la familia YER057c/YJGF o L-PSP	28

III. JUSTIFICACIÓN	31
IV. HIPÓTESIS.....	31
V. OBJETIVOS.....	32
GENERAL	32
PARTICULARES.....	32
VI. METODOLOGIA	33
VII MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
Análisis <i>in silico</i> de <i>IhTveIF-5A</i>	35
Diseño de iniciadores para la amplificación del gen <i>Ihtveif-5a</i>	35
Extracción de ADN de <i>T. vaginalis</i>	35
Extracción de RNA total de <i>T. vaginalis</i>	36
Síntesis de cDNA	37
Amplificación por PCR de <i>Ihtveif-5a</i>	37
Amplificación del gen β - <i>tubulina</i>	38
Preparación de células competentes	39
Clonación en pCR [®] 2.1-TOPO [®] (Invitrogen).	40
Extracción de DNA plásmidico	40
Subclonación en el vector de expresión <i>pGEX6-P-1</i> (GE Life Sciences).....	41
Linealización del vector <i>pGEX6-P-1</i> y restricción del inserto	42
Reacción de Ligación	43
Expresión de la proteína recombinante.....	44
Solubilidad de la proteína recombinante	44
Western Blot de la proteína recombinante	45

Purificación de la proteína	46
Corte con trombina de la etiqueta de GST de la proteína IhTveIF-5Ar.	46
Obtención de Anticuerpos	47
Western blot utilizando los anticuerpos de IhTveIF-5A.	47
Extractos citoplasmáticos de <i>T. vaginalis</i>	48
Ensayo de “Pull Down”	49
Ensayos de transcripción <i>in vitro</i>	49
Ensayos de retardo (EMSA).....	50
VIII. RESULTADOS.....	51
Análisis bioinformático.....	51
Expresión del gen <i>Ihtveif-5a</i> en <i>T. vaginalis</i> en presencia y ausencia de poliaminas.....	71
Clonación del gen <i>Ihtveif-5a</i> de <i>T. vaginalis</i>	74
Ensayo interacción de IhTveIF-5A y TveIF-5A.....	93
IX. DISCUSIÓN.....	99
X. CONCLUSIÓN	105
XI. BIBLIOGRAFIA	106
XII. APENDICE.....	116

RESUMEN

Trichomonas vaginalis es el agente causal de la tricomonosis infección de transmisión sexual que afecta el tracto urogenital. Este parásito depende del hospedero para obtener los nutrientes necesarios para su sobrevivencia, como son las poliaminas. Estos cationes participan en la regulación de propiedades de virulencia como: la adhesión y citotoxicidad.

Una proteína dependiente de poliamina es eIF-5A. En *T. vaginalis* se describieron dos genes *tveif-5a* que codifican para una proteína de 19 kDa, la cual es altamente conservada. Mediante 2D-Western blot utilizando anticuerpos anti-peptido específico anti-TveIF-5A se inmunodetectaron dos manchas con puntos isoeléctricos (pI) de 5.2 y 5.5 de 19 y 20 kDa respectivamente, lo que sugiere la presencia de la TveIF-5A precursora y activa. Para confirmar la identidad de estas proteína se realizó un análisis de espectrometría de masas (ESI MS-MS), de manera interesante en ambas manchas se identificó un posible inhibidor de la traducción que presenta un peso molecular de 13.4 kDa, el cual podría estar regulando la expresión de TveIF-5A, de manera natural en el organismo.

Nuestros resultados muestran que el genoma de *T. vaginalis* presentó tres marcos de lectura abierta (ORF) de genes que codifican para un posible inhibidor de la traducción. El gen localizado en el locus TVAG_035410, codifica para el inhibidor de TveIF-5A al cual denominamos lhTveIF-5A. Este inhibidor presenta una estructura tipo barril conformada por dos α -helices y cinco hojas β plegadas, tiene un dominio endoribonucleasa y posiblemente pertenezca a la familia

YER057c/YjgF o L-PSP. Esta familia de proteínas está muy conservada; sin embargo su función aún se desconoce.

Mediante ensayos de RT-PCR de parásitos crecidos en presencia y ausencia de poliaminas utilizando un inhibidor de la síntesis de poliaminas 1,4 Diamino-2-butatona dihidroclorido (DAB), se observó la expresión del gen lhTveIF-5A, se regula negativamente por poliaminas; debido a que en medio con DAB su expresión se mantiene en condiciones normales. Sin embargo cuando se agrega putrescina exógena al medio se observa una disminución de su expresión ~60%. Sugiriendo una regulación mediada por la vía de poliaminas en *T. vaginalis*. Esta proteína al parecer interacciona con TveIF-5A., por lo que se propone participe en un mecanismo post-transcripcional mediado por poliaminas a través de las secuencias tipo EREs de los RNAm de *T. vaginalis*.

INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes Generales

1. Tricomonosis

La tricomonosis es la infección de transmisión sexual (ETS) no viral más común en humanos causada por el protozoo *Trichomonas vaginalis*. Este parásito afecta principalmente el epitelio del tracto genital y su periodo de incubación es de 4 a 28 días (Petrin, y col., 1998). Los signos y síntomas de la tricomonosis se pueden clasificar en graves, agudos o asintomáticos. La infección aguda se caracteriza por presentar flujo abundante, amarillo-verdoso, espeso, espumoso, con olor fétido, y el signo característico lesiones hemorrágicas puntuales o “cérvix de fresa”, la infección grave se caracteriza por presentar prurito y dispareunia (Petrin y col, 1998), otros síntomas pueden incluir disuria, inflamación ardor vulvo-vaginal e inflamación del cuello uterino (Swygard y col., 2004).

Esta infección es común en mujeres, es altamente prevalente en poblaciones sexualmente activas, asociada a grandes problemas de salud pública (Swapan, 2007).

En mujeres esta infección ha sido asociada con consecuencias tales como: ruptura de las membranas amnióticas ocasionando partos prematuros, neonatos

de bajo peso, infertilidad (Schwebke., 2004), vaginitis, cervicitis, uretritis e inflamación pélvica crónica (Hardy y col., 1984). También con predisposición al desarrollo de cáncer cervical (Boyle y col. 2003) esto se debe a que se ha relacionado la presencia de *T. vaginalis* con el desarrollo de neoplasia cervical, desarrollada debido a que el parásito tiene la capacidad de inducir la supresión de las células CD4, así como la destrucción del epitelio vaginal permitiendo el establecimiento del virus del papiloma humano y su replicación (Mason y col., 1990). Por otro lado se sabe que la tricomonosis incrementa el riesgo en la transmisión y adquisición del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Guenthner y col., 2005). Esto se debe a que *T. vaginalis* contribuye en la destrucción del epitelio vaginal causando citotoxicidad y alteraciones que facilitan el acceso del VIH, e induciendo su replicación a través de las vías de citocinas como TNF- α (Guenthner y col., 2005).

T. vaginalis se ha asociado a problemas respiratorios en neonatos, los cuales contraen la infección aparentemente por una transmisión vertical del tracto urogenital de la madre, cuanto el neonato pasa por el canal vaginal (Carter y col., 2008).

En el hombre la tricomonosis es generalmente asintomática; sin embargo es considerado como portador de la enfermedad. En algunos hombres se puede establecer la infección y llegar a presentar síntomas como: inflamación en el meato uretral, prurito, sensación de ardor después de orinar o eyacular y uretritis nongonococal. Una infección persistente puede producir prostatitis o epididimitis (Krieger y col. 1993), y predisposición a desarrollar cáncer de próstata (Sutcliffe y

col., 2006, Krieger y col., 1993; Swygard y col., 2004), debido a que la infección por *T. vaginalis* regula la expresión de genes proinflamatorios, que pueden causar daño a las células epiteliales provocando una renovación celular mediada por factores de crecimiento para regular la inflamación. Sin embargo, si este proceso no se controla puede llevar a la hiperproliferación de las células prostáticas. *T. vaginalis* también puede regular la expresión de genes anti-apoptóticos y evitar la apoptosis en las células dañadas. Todo esto podría llevar a lesiones precursoras de cáncer de próstata (Sutcliffe y col., 2006).

1.2.Diagnóstico

Las técnicas de diagnóstico que se han empleado para la detección de *T. vaginalis* son diversas. Sin embargo, el diagnóstico de tricomonosis generalmente se realiza mediante el examen de las secreciones vaginales en fresco con una sensibilidad del 30-80 %, comparándolo con el cultivo *in vitro* (Lehker y col., 2000).

El estándar de oro utilizado es el cultivo de Diamond (Lossick y col., 1991) el cual contiene suero, maltosa, extracto de levadura, cisteína, peptona. Este medio confiere un alto grado de sensibilidad (85-95%) y una especificidad del 95% (Heine y col., 1993); sin embargo, la desventaja es que el periodo de incubación es de 2 a 7 días. Además los cultivos son más caros que el diagnóstico de la muestra en fresco. Existen otros métodos diagnósticos menos sensibles como son, tinción de Papanicolaou y técnicas de amplificación de PCR (Swygard y col. 2004) del gen de la β -Tubulina 9/2 y AP65 A/B (Madico y col., 1998).

1.2.1. Tratamiento

La tricomonosis es una enfermedad curable, la cual se trata con una dosis de metronidazol tanto a la mujer como a su pareja. Si la infección persiste el tratamiento se prolonga hasta por una semana (Vélez y col., 2003). Ya se ha observado que *T. vaginalis* puede presentar resistencia al metronidazol (Schwebke, 2004).

El hidrogenosoma juega un papel crítico en la activación del medicamento. La activación del medicamento ocurre cuando un electrón es transferido al más importante grupo-nitro formando un radical-nitro tóxico. El metronidazol entra tanto a la célula y al hidrogenosoma vía difusión pasiva como un pro-medicamento y compete con la enzima terminal hidrogenasa como un aceptor de electrones de ferredoxina (Fd). En organismos como las bacterias los radicales causan ruptura de los cromosomas y muerte celular. El mecanismo de resistencia al metronidazol en *T. vaginalis* a partir de fallas en el tratamiento no es bien entendido, pero se sabe que se debe a disfunción del hidrogenosoma (Dunne y col. 2003).

Las causas que se han descrito para esta resistencia hasta el momento son: la falla en la actividad enzimática de la Piruvato Ferredoxín Óxidoreductasa (PFO), a una conformación alterada del hidrogenosoma, a la ferredoxina (Fd) con un potencial redox excepcional, a una cantidad reducida de ferredoxina intracelular (Vázquez y col., 2001), así como a una mutación puntual en la región que flanquea a el extremo 5' del gen Fd, resultando en una disminución en la transcripción del

gen Fd (Dunne y col. 2003). Para infecciones resistentes a metronidazol, se utiliza el Trinitadazol (Schwebke, 2004).

1.3.Epidemiología

La tricomonosis es una de las infecciones más comúnmente transmitidas por vía sexual, afectando principalmente a las mujeres y representando un problema de salud pública, ya que su prevalencia no decrece con los años.

A nivel nacional, la tricomonosis ha ocupado un lugar relevante entre las primeras causas de morbilidad en los últimos años, los registros de la Secretaria de Salud en México, hasta la semana 14 del presente año ha reportado 29,011 casos, siendo los estados más afectados Veracruz (13.39%), Puebla (10%), Estado de México (7.9%), Chiapas (5.9%), y Oaxaca (6%), los estados con menor incidencia son Querétaro (0.15%), Baja California Sur (0.28%) y Colima (0.41%).

De manera general la enfermedad prevalece principalmente en mujeres representando un 97.63% y tan solo 2.36% de los hombres padecen tricomonosis, esto se debe a que se diagnostica poco por su característica de ser asintomáticos (Fig. 1) (SUIVE).

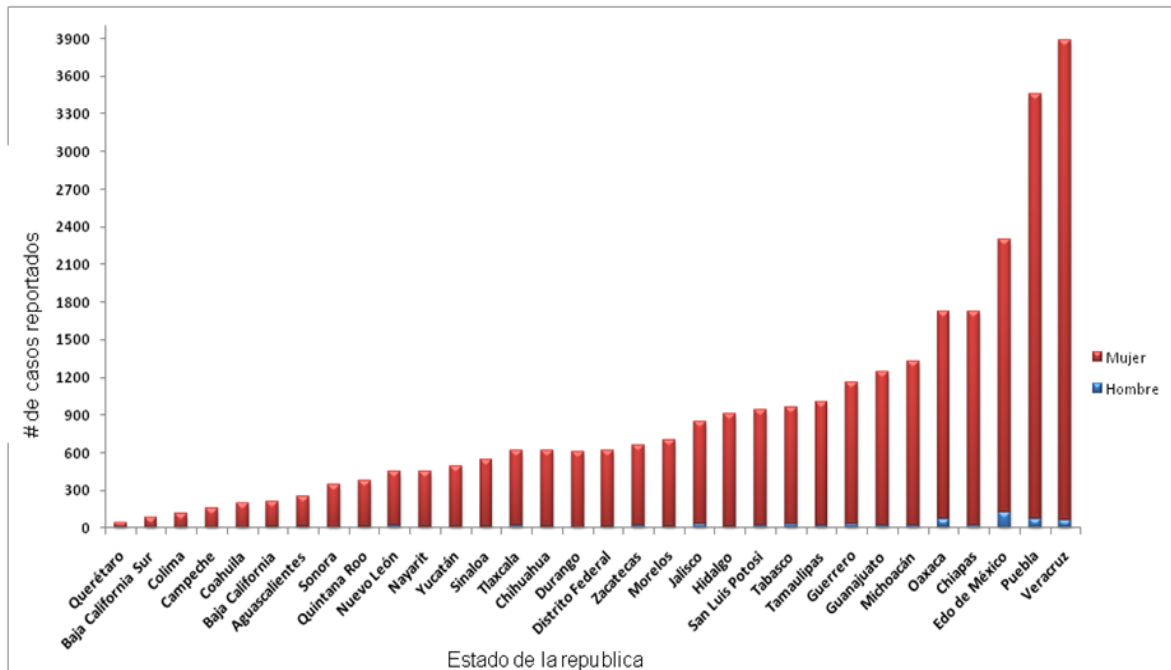


Fig.1 Gráfica representa el número de casos de tricomonosis reportados a nivel estatal

1.3. *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis mide aproximadamente $\sim 10 \mu\text{m}$ de longitud por $\sim 7 \mu\text{m}$ de ancho, posee cinco flagelos de los cuales cuatro se encuentran en la parte anterior del organismo y uno adosado a la membrana ondulante el cual abarca dos terceras partes del parásito. También se encuentra una estructura fibrosa denominada axostilo que atraviesa al parásito. *T. vaginalis* presenta organelos internos como un núcleo prominente, un nucléolo de disposición central o subcentral y la parte externa del parásito presenta un aspecto granuloso y surcado, esto se debe a la presencia de múltiples vacuolas localizadas en el citoplasma. *T. vaginalis* es un organismo amitochondriado por lo que posee organelos llamados hidrogenosomas; este es un organelo que funciona en

condiciones anaerobias para producir hidrógeno molecular mediante la oxidación de piruvato a malato, el cual genera ATP por lo tanto se encarga de abastecer al parásito de energía (Müller. 1993).

El citoesqueleto del parásito está formado por numerosos microtúbulos orientados en varias direcciones los cuales forman diferentes estructuras que pueden desempeñar diferentes funciones. Por ejemplo los flagelos presentan una organización de microtubulos de nueve pares periféricos y un par central este arreglo es característico de los mismos, se ha observado la presencia de tubulina en flagelos y axostilo (Costamagna y col.,2001) (Fig. 2).

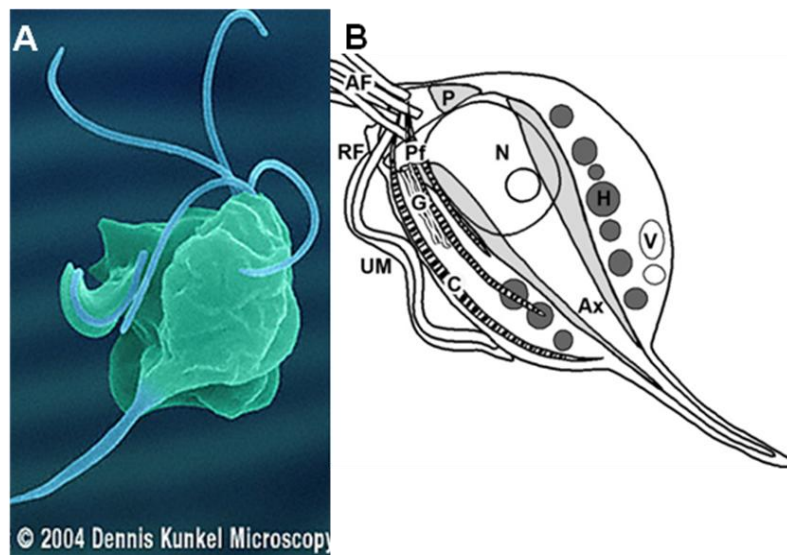


Fig. 2 Morfología de *Trichomonas vaginalis* A) Microscopia de *T. vaginalis* B) Esquema donde se representa Ax, Axostilo; C, Costa; G, Aparato de Golgi; H, hydrogenosoma; N, núcleo; P, pelta; RF, Flagelo recurrente; UM, Membrana ondulante; V, Vacuola.

1.4.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida de este parásito es sencillo, no presenta hospederos intermediarios, el humano es su único huésped, por lo que la transmisión es de persona a persona y solo se transmite por contacto sexual. En algunos casos se ha reportado una infección en neonatos; se adquiere durante el paso del neonato por el canal de parto (Carter y col., 2008).

T. vaginalis presenta una sola forma denominada trofozoito, hasta ahora no se conoce una forma de quiste, se multiplica por fisión binaria generando dos células hijas (Schwebke y col., 2004) (Fig. 3).

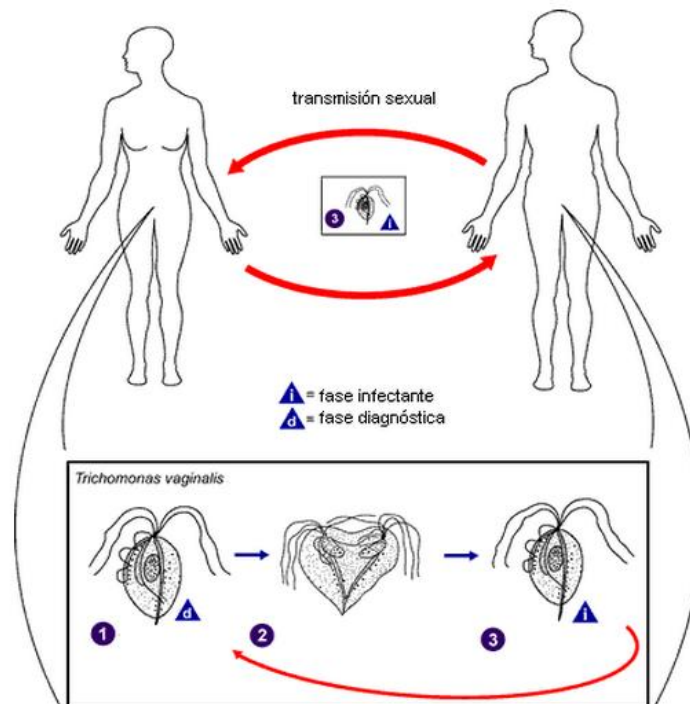


Fig. 3 Ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis*. 1) Trofozoito en secreciones vaginales, prostáticas y orina; 2) División por fisión binaria; 3) Trofozoito en vagina y orificio uretral.

1.4.2 Genoma de *Trichomonas vaginalis*

El genoma de *T. vaginalis* tiene un tamaño aproximado de 160 Mb conteniendo ~60,000 genes que codifican para proteínas, los intrones fueron identificados en 65 genes. El gran tamaño del genoma se debe a que contiene una gran cantidad de secuencias repetidas que pueden ser clasificados como: transposones, retrotransposones, y que representan aproximadamente 39 Mb del genoma.

En los seis cromosomas se distribuyen los genes que codifican para los RNAs de transferencia de los 20 aminoácidos y 250 RNAs ribosomales. Han sido identificados 152 posibles genes de transferencia lateral procarionte-eucarionte. Este parásito presenta un elemento promotor Inr en el 75% de las secuencias, con un papel central en la expresión de los genes. Su maquinaria transcripcional corresponde más a metazoarios que a protistas. Se ha reportado la presencia de RNA de interferencia y se describieron genes “like” para Dicer, dos Argonata y genes helicasa (Carlton y col. 2007).

Contiene genes que codifican para actina y tubulina, proteínas que forman la estructura del parásito y permiten el remodelamiento de su forma ovoide a ameboide. De igual forma presenta genes que participan en la respuesta al daño al ADN como Rad51, Dmc1, XPC/Rad4/mus101/TopBP1, y otros los cuales participan en la ruta de reparación por recombinación homóloga, de escisión de base (BER), por escisión de nucleótidos (NER). También se identificaron 800

proteínas de superficie que pueden estar involucradas en la citoadherencia y citotoxicidad del parásito en las células del hospedero. *T. vaginalis* contiene un amplio degradoma de más de 400 peptidasas haciéndolo uno de los degradomas más complejos. Posee además 138 posibles genes involucrados en el metabolismo energético y vías de transporte de electrones (Carlton y col. 2007).

1.4.3 Propiedades y factores de virulencia de *T. vaginalis*

La citoadherencia es uno de los principales mecanismos para el establecimiento de la infección, en este proceso interaccionan parásito-hospedero. *T. vaginalis* posee componentes específicos en su membrana plasmática que le permite unirse a las células del epitelio vaginal (VECs), las cuales son adhesinas y receptores que participan en la transducción de señales transmembranales ocasionando la transformación morfológica del parásito de una forma ovoide a ameboide, con la formación de filopodios y pseudópodos, seguida de la síntesis de las cinco adhesinas AP65, AP51, AP33, AP23 (Arroyo, y col., 1992) y AP120 (Moreno-Brito, y col. 2005). Además presenta dos cisteín-proteinasas (CPs) involucradas en la adhesión, CP30 (Mendoza-López y col. 2000) y CP62 (Hernández y col., 2004). Ha sido sugerido que el reclutamiento de parásitos hacia el sitio inicial de contacto está mediado por señales transmembranales que propician la unión del parásito al sitio inicial de la infección.

T. vaginalis presenta al menos 23 diferentes CPs cuyos pesos moleculares oscilan entre los 23 y 110kDa y con un punto Isoeléctrico (pI) que varía de 5.7 a 7

(Neale y col., 1989) las cuales pueden estar involucradas en distintas propiedades como la citotoxicidad, hemólisis evasión de la respuesta inmune. Hasta el momento se han descrito dos CPs involucradas en la citotoxicidad CP65 (Álvarez-Sánchez y col. 2000) y CP39 (Hernández-Gutiérrez y col., 2003, 2004).

La CP65 kDa es una proteinasa de superficie que participa en el daño a las VECs. Esta proteína es activa en un rango de pH de 4.5 a 7 y termoestable a una temperatura de 36° a 43.5°C, cabe mencionar que estos rangos se presentan durante la tricomonosis. La CP65 es capaz de degradar sustratos de la matriz extracelular como colágeno IV, fibronectina, pero no laminina y hemoglobina (Álvarez-Sánchez y col. 2000).

La CP39 kDa (CP39), degrada colágeno I, III, IV y V, fibronectina, hemoglobina, e inmunoglobulina A y G. CP39 es una proteína de superficie que es activa en un rango de 4° - 50°C y en un pH de 3.6 a 7, sugiriendo una gran estabilidad a lo largo de la infección. Lo que sugiere que esta proteinasa pudiera estar participando en la adquisición de nutrientes (Hernández-Gutiérrez, y col., 2004); además presenta diferentes niveles de actividad durante el proceso de la infección (Hernández-Gutiérrez, y col., 2003).

Otra propiedad que presenta *T. vaginalis* es la fagocitosis, los tipos celulares que es capaz de fagocitar se encuentran comúnmente en el microambiente de la vagina, ingiere fácilmente bacterias como *Lactobacilli* *Döderlein's*, células del epitelio vaginal, leucocitos y eritrocitos. Estas células son degradadas en vacuolas fagocíticas gracias a la actividad de fosfatasa activa en los fagolisosomas y el aparato de Golgi. La cinética de la fagocitosis está mediada

por la expresión de receptores de superficie del parásito; el mecanismo de fagocitosis se inicia por la extensión de los pseudópodos hacia la célula blanco e involucra directamente la extensión de la membrana (Rendón-Maldonado y col., 1998).

T. vaginalis presenta otras propiedades de virulencia, como la inducción de apoptosis con la unión a neutrófilos de humano y VECs través de un incremento en la actividad de la caspasa-3 (Kang y col., 2006), y la hemólisis se encuentra dada principalmente por la participación de CPs denominadas porinas (Dailey y col. 1990), las cuales se insertan en la bicapa lipídica de las células del hospedero formando canales transmembranales de un diámetro de 1.14 y 1.34nm, conduciendo a la muerte por lisis osmótica (Fiori y col., 1999), esta propiedad es usada principalmente para la obtención de nutrientes, a partir de los eritrocitos como fuente de hierro (Min y col., 1998).

T. vaginalis es capaz de degradar inmunoglobulinas (Igs) IgA, IgG e IgM; esta propiedad es utilizada como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune del huésped, se ha encontrado que en esta propiedad se encuentran involucradas una CP de 60 kDa , específicamente participa, en la degradación de IgA de manera tiempo-dosis dependiente (Provenzano y col., 1995).

Otra manera de evadir la respuesta inmune es mediante la activación de la ruta del complemento, esta ruta es responsable de la lisis del parásito mediada por CD3 y CD8. Para que ocurra la lisis se necesita la unión de CD3 a la membrana del parásito, de esta manera se activa la ruta del complemento clásica o alternativa (Gillin y col., 1981).

1.4.4 Metabolismo de *Trichomonas vaginalis*

T. vaginalis es un parásito obligado debido a que depende de su hospedero para su sobrevivencia. *T. vaginalis* carece de muchas vías metabólicas de *novo*, como la de las purinas, siendo incapaz de sintetizar el anillo de purina (Heyworth y col. 1982) y pirimidinas por lo que es totalmente dependiente de pirimidinas exógenas (Heyworth y col. 1984), las cuales los obtiene directamente del hospedero.

T. vaginalis es incapaz de biosintetizar ácidos grasos y colesterol, los lípidos complejos (fosfolípidos, triglicéridos, esteres) los obtiene del medio, mediante mecanismos como: difusión simple o facilitada, endocitosis de unión no específica y mediada por receptores, dichos movimientos están dados por los lípidos individuales o en complejos. Esta incorporación no altera la estructura de los ácidos grasos provistos del medio los cuales son usados para acetilar fosfoglicéridos y esfingolípidos pero no triglicéridos y colesterol. (Beach y col, 1990).

T. vaginalis carece de una gran variedad de mecanismos enzimáticos necesarios para la síntesis de *novo* de fosfogliceridos complejos y dependen de fuentes ambientales para proveerse de ellos, aparentemente mediados por reacciones de intercambio (Beach y col, 1991). También *T. vaginalis* carece de metabolismo de poliaminas.

1.5. Generalidades de las poliaminas

Las poliaminas son aminas alifáticas de bajo peso molecular que se encuentran en todos los seres vivos. Las más estudiadas son la putrescina, espermidina y espermina, esta última sintetizada únicamente por organismos eucariontes (Ochoa y col., 2001)

Las poliaminas son componentes esenciales de la célula que regulan actividades a nivel de replicación, activación de proteínas, estabilidad de la membrana e intercambio iónico. También participan en procesos como crecimiento celular y proliferación, por lo que estas moléculas son esenciales para el crecimiento y desarrollo del organismo debido a su participación en procesos fisiológicos importantes (Yarlet y col 2010).

En plantas las poliaminas están implicadas en un mecanismos de respuestas al estrés incluyendo deficiencia de nutrientes, salinidad, pH, estrés de temperatura, hipoxia. Su papel principal es la regulación de los genes en rutas de señalización de respuesta al estrés (Pang y col, 2007). En bacterias las poliaminas regulan procesos de ciertas enzimas de procesamiento del RNA como la RNAsa P (Panagiotidis y col, 1992).

La interrupción de la biosíntesis o reducción de captación de poliaminas exógenas a través del sistema de transporte de poliaminas ofrece blancos para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, sobre todo el cáncer (Yatin 2002).

1.6. Poliaminas en *T. vaginalis*

T. vaginalis no sintetiza poliaminas de *novo*, es por ello que necesita de su hospedero para obtener estas moléculas. El metabolismo de poliaminas de *T. vaginalis* es diferente con respecto de otros eucariontes. Este parásito lo realiza mediante un sistema antiporte putrescina/espermina, en el cual se excretan dos moléculas de putrescina para introducir una molécula de espermina. En *T. vaginalis* la putrescina es sintetizada por la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) mediante la vía de la arginina-hidrolasa, mientras que la espermina es procesada dentro de los hidrogenosomas y convertida a espermina vía espermidina N¹ acetiltransferasa (SSAT) acoplado a la vía de la poliamina oxidasa (Yarlett y col., 2000) (Fig. 4).

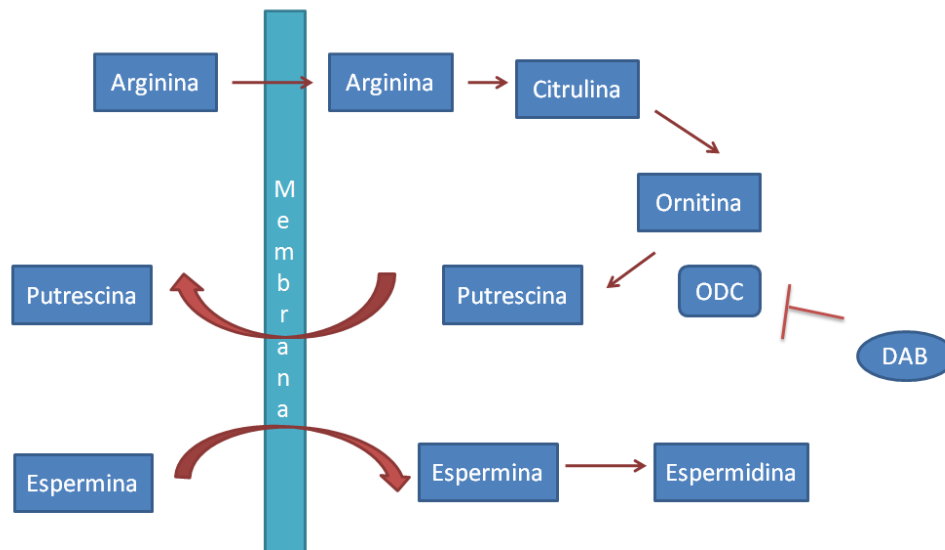


Fig. 4 Metabolismo de poliaminas en *T. vaginalis*

El metabolismo de poliaminas se encuentra ligado a la capacidad de adherencia de *T. vaginalis* a las VECs, la ausencia de poliaminas aumenta la adherencia del parásito a las células VECs; cuando se agrega putrescina exógena disminuye la adhesión a la célula blanco. Estos datos sugieren que el metabolismo de poliaminas, así como la secreción de putrescina interfieren en el reconocimiento y unión del parásito a las VECs (García y col., 2005).

Por otra parte, las poliaminas regulan la expresión del gen *tvcp65* debido a que en ausencia de poliaminas los niveles de expresión de *tvcp65* disminuyen, al igual que la actividad proteolítica y la cantidad de CP65 (Álvarez-Sánchez y col., 2008).

Existe una proteína dependiente de poliaminas llamada factor de inicio de la traducción 5A (TveIF-5A). En *T. vaginalis* esta proteína se encuentra regulada de manera positiva por las poliaminas ya que la expresión del gen *tveif-5a* y la cantidad de la proteína disminuyen en ausencia de poliaminas, los cuales son recuperados cuando se adiciona putrescina exógena al medio (Carvajal-Gómez y col., 2011 (en revisión)).

1.7.Generalidades de eIF-5A.

La proteína eIF-5A es altamente conservada y es la única que posee el aminoácido llamado hipusina, el cual es esencial para que eIF-5A lleve a cabo su función en la proliferación, diferenciación y sobrevivencia de la célula. Esta proteína sufre una modificación post-traducciona llamada hipusinación, y de esta

manera se activa. Esta reacción requiere de dos pasos enzimáticos para formar la proteína activa; en el primer paso, la enzima Deoxihipusina sintetasa (DHS) transfiere un carbono 4-amino-butil de la espermidina a un residuo de lisina específico de eIF-5A. Posteriormente es hidrolizado por la enzima Deoxihipusina hidroxilasa (DOHH) (Park y col., 2000).

No se conoce una función específica de esta proteína; sin embargo, se han descrito mecanismos en los cuales esta proteína puede estar participando. Mediante inmunofluorescencia indirecta se demostró que eIF-5A es una proteína de transporte nucleoplasmático de RNAs (Rosorius y col., 1999). El dominio C-terminal de eIF5A participa de muchas maneras en el ensamble del complejo de inicio de la traducción uniéndose a eIF-4E, favoreciendo la interacción con el complejo NIP1 de eIF3 promoviendo la unión del ribosoma al RNAm (Asano y col, 2001).

Por otra parte, se ha propuesto que eIF-5A madura participa en un mecanismo post-transcripcional en RNAm que presentan secuencias denominadas “secuencias de respuesta a eIF-5A” (EREs) (AAAUGU o UAACCA) las cuales forman una estructura de tallo y burbuja, identificada en el 3'UTR del RNAm de COX-2. (Parker y col., 2002).

En *T. vaginalis* se han descrito dos genes altamente conservados *tveif-5a1* y *tveif-5a2*, ambos codifican para una proteína idéntica de 19 kDa (168 aa). Mediante Western blot (WB) utilizando anticuerpos anti-TveIF-5A, se inmunodetectaron dos manchas con puntos isoeléctricos (pI) y pesos moleculares (PM) diferentes, 5.2 - 5.5 y 19 - 20 kDa, respectivamente. Estos patrones

diferenciales tanto en pl y PM sugieren la presencia de una proteína precursora y una activa (Carvajal-Gamez y col., 2010). Para confirmar la presencia de dicha proteína se realizó la identificación de la proteína TveIF-5A por espectrometría de masas. Sin embargo a la altura de 20 kDa se identificó otra proteína de *T. vaginalis* unida a TveIF-5A que por un análisis *in silico*, podría funcionar como posible inhibidor de un factor de inicio de la traducción, perteneciente a una familia de proteínas muy conservada conocida como YER057c/YjgF o PSP (perchloric acid-soluble protein). Por lo que hemos propuesto como un posible inhibidor natural de TveIF-5A.

1.8. Antecedentes Directos

1.8.1. Proteínas de la familia YER057c/YJGF o L-PSP

Hasta el momento, la familia de las proteínas Yjgf/YER057c no ha sido relacionada con una función determinada; sin embargo las proteínas pertenecientes a esta familia se encuentran muy conservadas. Es por ello, que se considera que pudieran estar participando en procesos celulares básicos (Oka y col., 1999).

Han sido descritos 25 genes pertenecientes a 23 especies incluidas archeobacterias, procariones y eucariones, estos genes codifican proteínas pequeñas de alrededor de 130 aminoácidos (Sinha y col.1999). Los mecanismos en los cuales estas proteínas pudiesen estar participando han sido estudiados previamente, una de las funciones descritas fue su participación en la inhibición de la síntesis de proteínas, esta proteína denominada L-PSP, fue encontrada en

hígado y pulmón de rata, a pesar de que presenta un dominio de endorribonucleasa la función como RNasa no pudo ser probada pero se observó que la presencia de esta proteína favorecía la disgregación de los poliribosomas inhibiendo así la traducción (Oka y col., 1995), en humano se identificó una proteína L-PSP, demostrando que presenta actividad de endorribonucleasa, cortando enlaces fosfodiéster del RNAm de cadena sencilla (Morishita y col., 1999).

En *Drosophila* se encontró una proteína denominada DUK114 perteneciente a la familia Yjgf/YER057c la cual es ortóloga a un activador de calpainas, donde se demostró que la proteína DUK114 presenta una actividad de chaperona (Farkas y col. 2004).

Dos miembros de la familia Yjgf/YER057c están presentes en *Saccharomyces cerevisiae* estas tienen una masa molecular de 14 kDa, presentando un 60% de identidad entre ellas, localizadas en el cromosoma X y V, llamadas Mmf1p y Hmf1p, estas proteínas se localizan en diferentes compartimentos subcelulares mitocondriales y citoplasmáticos respectivamente, ambas participan en el mantenimiento del DNA mitocondrial.

En bacterias miembros de la familia Yjgf/YER057c llamado YjgF se encuentra involucrado en la biosíntesis de isoleucina esto fue descrito en *Salmonella entérica*, en donde se demostró que la presencia de la proteína YjgF, beneficia a la célula proporcionando protección a productos tóxicos (Schmitz y col., 2003).

Las estructuras cristalizadas reportadas para proteínas de la familia YER057cyYjgF indican que estas proteínas son homotriméricas y cada subunidad tiene una estructura de barril rodeada por dos hélices α y 6 hojas β , en un rearrreglo $\beta\beta\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta$, donde $\beta 4$ y $\beta 5$ son paralelas y las demás antiparalelas y las

dos hélices antagonizan con las hojas β (Sinha y col., 1999, Miyakawa y col., 2006) (Fig. 5).

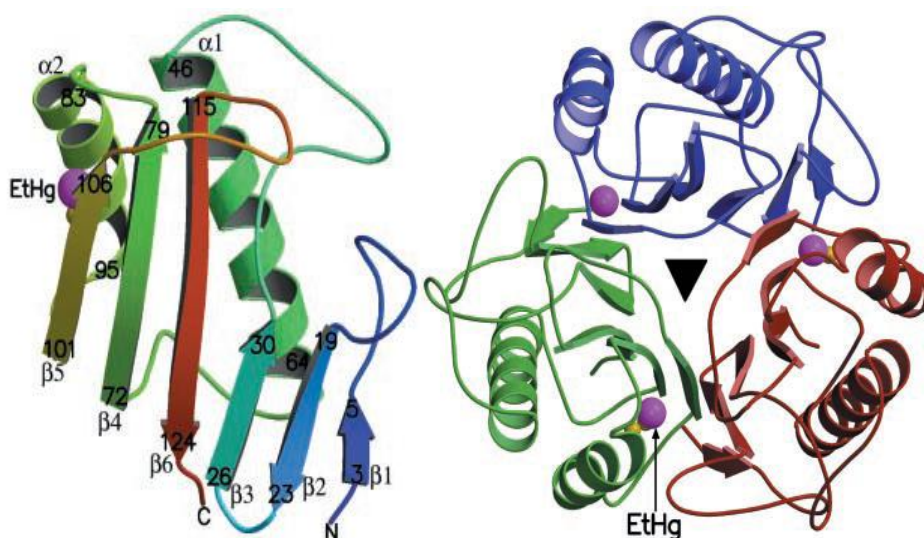


Fig 5. La estructura cristal YabJ, de *Bacillus subtilis*, de lado derecho se observa el rearreglo de una subunidad; del lado izquierdo la estructura cuaternaria de esta proteína (Sinha y col.,1999).

Todo lo anterior ha demostrado que las proteínas de la familia Yjgf/YER057c participan en procesos importantes para la sobrevivencia de los organismo previamente descritos. Es interesante mencionar que hasta el momento no se ha descrito una proteína perteneciente a esta familia en ningún parásito. Nosotros proponemos que lhTveIF-5A puede pertenecer ala familia Yjgf/YER057c, lo cual resulta en un primer reporte de este tipo de proteínas en parásitos, al mismo tiempo proponemos que lhTveIF-5A pudiese estar participando en algún mecanismo de estabilidad de los RNAm, un mecanismo mediado por poliaminas a través de la proteína TveIF-5A.

III. JUSTIFICACIÓN.

Las poliaminas regulan a TveIF-5A a nivel del transcrito, expresión y la cantidad de proteína. Dada la importancia de TveIF-5A como un posible regulador de la estabilidad de mRNA en *T. vaginalis* resulta importante caracterizar algunas otras moléculas que pudieran estar regulando a TveIF-5A, como es el posible inhibidor natural lhTveIF-5A.

IV. HIPÓTESIS.

La proteína lhTveIF-5A interacciona con TveIF-5A de *T. vaginalis*,

V. OBJETIVOS

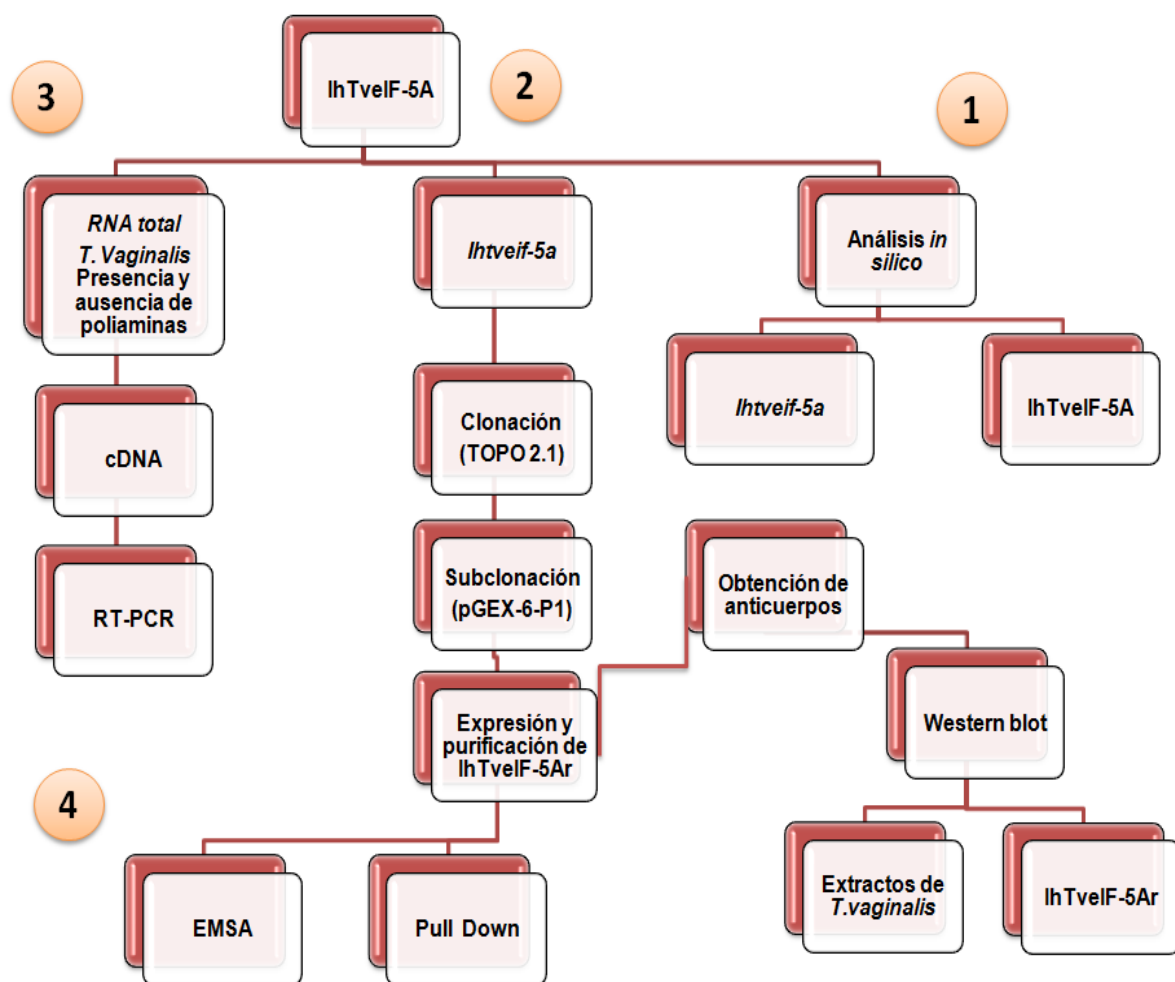
GENERAL

- Identificar y caracterizar a un posible inhibidor de TveIF-5A de *T. vaginalis*.

PARTICULARES

1. Realizar un análisis *in silico* de IhTveIF-5A.
2. Obtener a la proteína recombinante de IhTveIF-5A.
3. Determinar la expresión del transcrito de *Ihtveif-5a* en presencia y ausencia de poliaminas.
4. Estudiar la posible interacción de IhTveIF-5A con TveIF-5A.

VI. METODOLOGIA-



VII MATERIALES Y MÉTODOS.

Análisis *in silico* de IhTveIF-5A.

Mediante el uso de herramientas bioinformáticas se realizó una búsqueda de los péptidos identificados con espectrometría de masas (ESI/ MS/ MS); los cuales se analizaron con el programa MASCOT que identificó una proteína de *T. vaginalis*.

Posteriormente, la secuencia obtenida se analizó en la base de datos TrichDB (<http://trichdb.org/trichdb/>), donde fueron obtenidas las características generales de la proteína así como la secuencia de nucleótidos.

Con la secuencia de aminoácidos se realizó un PSI-BLAST (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/psiblast/>) con parámetros estándar y secuencias no redundantes obteniendo un amplio grupo de organismos como parásitos, mamíferos, peces, plantas, bacterias, anfibios. Con estas secuencias se realizó un alineamiento múltiple con el programa CLUSTAL-W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) y se realizó un análisis filogenético con el programa MEGA 4.0 construido utilizando el método neighbor-joining (NJ), con 1000 réplicas.

Por otra parte, para la secuencia de aminoácidos se analizó en la base de datos ProDom (<http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/home.php>) con el fin de obtener los dominios de la proteína y Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) para clasificarla dentro de alguna familia. La estructura secundaria y terciaria se predijo

utilizando el programa Phyre Server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>), la estructura terciaria se modeló utilizando el programa PyMOL.

Diseño de iniciadores para la amplificación del gen *Ihtveif-5a*.

Para el diseño de los iniciadores se tomó la secuencia de nucleótidos del gen *Ihtveif-5a* con la cual se obtuvo el mapa de restricción del gen, mediante el programa NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>); se eligieron los sitios de restricción para las enzimas *BamHI* y *XhoI* sentido y antisentido, respectivamente.

La temperatura media y el análisis de formación de dímeros fue analizada con el programa integrated DNA technologies (<http://www.idtdna.com/Home/Home.aspx>).

Extracción de ADN de *T. vaginalis*

El aislado CNCD 147 de *T.vaginalis* usado en todos los experimentos fue cultivado por dos semanas en medio TYM (Trypticase extracto de levadura-maltosa) con 10% de suero de caballo inactivado por calor (30 min/ 56°C) crecido durante 24 h/ 37°C (cultivo de dos semanas de pases).

Los parásitos (20×10^6) se centrifugaron a 1800 rpm/ 5 min/ 4°C, posteriormente se agregó amortiguador de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, SDS 0.2%, NaCl 100 mM, EDTA mM) y fenol, se agitó por inversión y se centrifugaron 13,000 rpm/ 5 min/ 4°C, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml,

inmediatamente después se adicionó fenol, se mezcló suavemente, se centrifugó 13,000 rpm/ 5 min/ 4°C, y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml, se agregó fenol-cloroformo, se centrifugó 13,000 rpm/ 5 min/ 4°C, la fase acuosa se transfirió a un tubo de 1.5 y se precipito con etanol (2.5 volumen) y acetato de sodio 3M (0.1 del volumen), se incubó a -20°C por 2 hrs, una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 13,000 rpm / 15 min/ 4°C; posteriormente se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol frío al 70%, se centrifugó a 13,000 rpm/ 15 min/ 4°C, se decantó el sobrenadante y dejó secar la pastilla la cual se resuspendió en agua libre de nucleasas, por último se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y se corrió en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio para observar su integridad.

Extracción de RNA total de *T. vaginalis*.

Los parásitos (20×10^6) se centrifugaron a 1800 rpm /15 min /4°C y se agregó 1 ml de TRIzol frío, se mezcló por inversión e incubó a temperatura ambiente (TA) durante 10 min, posteriormente 30 min a 4°C, después se agregó 200 µl de cloroformo y se mezcló fuertemente a TA, se centrifugó a 10,000 rpm/ 15 min/4°C se recuperó la fase acuosa a la cual se le añadió isopropanol, se mezcló e incubó a TA, para posteriormente centrifugar a 10,000 rpm/ 15 min/ 4°C, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla dos veces con etanol al 75% en agua DEPC. En cada lavado se centrifugaron a 10,000 rpm/ 15 min/ 4°C, una vez finalizados los lavados, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a

TA, la cual se resuspendió en agua DEPC. La cuantificación se realizó por espectrofotometría 260 nm y se corrió en un gel de agarosa al 1% con TBE 1X teñido con Bromuro de etidio para observar la integridad del RNA.

Síntesis de cDNA

Al RNA (1 µg), se le adicionó 1µl de oligo dT y agua DEPC cbp 12 µl, se incubó a 15 min/ 70°C y posteriormente se incubó en hielo durante 5 min, una vez transcurrido el tiempo se agregó dNTPs (2 µl), DTT (2 µl) y amortiguador 5x (4 µl), la mezcla se incubó 2 min/ 42°C, se colocó rápidamente en hielo y se agregó retrotranscriptasa reversa (Superscrip II, Invitrogen), e incubó 50 min/ 42°C y posteriormente 10 min/ 70°C. La cuantificación se realizó por espectrofotometría a 260 nm.

Amplificación por PCR de *Ihtveif-5a* de *T. vaginalis*.

Para la amplificación del gen *Ihtveif-5a* se diseñaron los iniciadores sentido y antisentido; a cada iniciador se le adicionó en los extremos 5' y 3' los sitios de corte para *BamHI* y *XhoI*, respectivamente. Las secuencias de los iniciadores son las siguientes:

5' CCCGGATCCATGTCTAAAGTCATCAGC3'.

BamHI

5' CCCTCGAGTTACTTGTAAGCGATGGC 3'.

XhoI

Para realizar la reacción de PCR se utilizó 10 pmol de los iniciadores sentido y antisentido, 0.2 μ M dNTP, 1.5 μ M $MgCl_2$, cDNA, Taq polimerasa (Invitrogen), y agua inyectable, para obtener un tamaño de amplicón de 391 pb.

Se utilizó el siguiente programa:

94°C 1 min	1 ciclo
94°C 1 min	} 25 ciclos
55°C 30 seg	
72°C 30 seg	
72°C 7 min	1 ciclo

Las reacciones de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con Bromuro de etidio.

Amplificación del gen *β -tubulina*.

Este gen se utilizó como control de carga en el ensayo de expresión del *Ihtveif-5a*, en las condiciones de ausencia y presencia de poliaminas. Para su amplificación se utilizaron los siguientes iniciadores:

BTUB9 (5'-CATTGATAACGAAGCTCCTTTACGAT-3')

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

Para llevar a cabo la reacción de PCR se utilizaron 10 pmol de los iniciadores sentido y antisentido, dNTP [0.2 μ M], $MgCl_2$ [1.5 μ M], cDNA, Taq polimerasa, y agua inyectable, para obtener un amplicón de 112 pb.

Se utilizó el siguiente programa:

94°C 2 min	1 ciclo
94°C 1 min	25 ciclos
48°C 1 min	
72°C 30 seg	
72°C 7 min	1 ciclo

Las reacciones de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con Bromuro de etidio.

Preparación de células competentes

Células *E. coli* DH5α se resembraron en medio LB por 16 h/ 37°C/ ON (Toda la noche). Al día siguiente se resembró en 100 ml de medio LB y crecieron a 37°C/ 200 rpm se midió la densidad óptica (O.D.) a 600 nm hasta alcanzar 0.5 a 0.7, se incubaron en hielo por 5 min, transcurrido el tiempo se centrifugó a 3000 rpm/ 10 min/ 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en $\frac{1}{3}$ de volumen de amortiguador TFB I frío (100 mM RbCl₂, MnCl₂ 50 mM, KC₂H₃ O₂ 30 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol 15%) y se incubó en hielo por 15 min, e inmediatamente después se centrifugó a 3000 rpm/ 10 min/ 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en $\frac{1}{25}$ volumen de amortiguador TFB II (MOPS 10mM, RbCl₂ 10mM, CaCl₂ 75mM, glicerol 15%) e incubó en hielo 15 min, posteriormente se hicieron alícuotas de 50 µl y se guardaron a -80°C.

Clonación en pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen).

Para la clonación de *Ihtvei-5a* en el vector de mantenimiento pCR[®]2.1-TOPO[®] se realizó una RT-PCR utilizando los iniciadores específicos de *Ihtveif-5a*. Del producto de PCR fresco se tomaron 4 µl, 1 µl del vector, 0.5 µl de H₂O y 1 µl de amortiguador de sales, la mezcla se incubó 5 min / TA, posteriormente células DH5α se transformaron por choque térmico (42°C / 30s), e inmediatamente se incubaron 3 min en hielo, después se agregaron 250 µl de medio LB y se incubaron en agitación a 200 rpm / 1 h/ 37°C, se sembraron en cajas con medio LB-ampicilina (100 mg/ ml), utilizando un control con el que se realizó la transformación en DH5α utilizando solo el vector pCR[®]2.1-TOPO[®] sin el producto de PCR. El análisis de las clonas se realizó una PCR de colonia.

Extracción de DNA plásmidico.

Para realizar la extracción de DNA plásmidico (DNAP) se utilizó el kit “High Pure Plasmid Isolation” (ROCHE) de acuerdo al protocolo recomendado. Las clonas candidatas se crecieron en 5 ml de medio LB-ampicilina las cuales se incubaron a 200 rpm/ 37°C/ ON y se centrifugaron a 14,000 rpm/ 5 min/ 4°C se decantó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 250 µl de la solución de resuspensión, posteriormente se agregó 250 µl del amortiguador de lisis, se mezcló por inmersión (4-6 veces) e incubó 5 min a TA, y transcurrido el tiempo se

le agregó 350 µl del amortiguador de unión frío, se mezcló por inmersión (4-6 veces) e incubó por 5 min en hielo, se centrifugó a 14,000 rpm/ 10 min/ 4°C, y el sobrenadante se transfirió a la columna y se centrifugó a 14,000 rpm/ 1 min/ 4°C, posteriormente se agregó 500 µl del amortiguador de lavado I y se centrifugó a 14,000 rpm/ 1 min/ 4°C, se agregó 700 µl del amortiguador de lavado II y se centrifugó a 14,000 rpm/ 1 min/ 4°C. Adicionalmente se centrifugó a 14,000 rpm/ 1 min/ 4°C; posteriormente, se agregó 100 µl de amortiguador de elución, se pasó la columna a un tubo de 1.5 ml y se centrifugó a 14,000 rpm/ 1 min/ 4°C; finalmente se cuantificó por espectrofotometría y se corrió en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio para observar la integridad del DNA.

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

La clona con el vector *pGEX6-P-1* (GE Life Sciences), se sembró en 50 ml de medio LB-ampicilina e incubó a 200 rpm/ 37°C/ ON, el cultivo se centrifugó a 8000 rpm/ 10 min/ 4°C. El DNAp se purificó con el kit comercial QIAfilter Midi, la pastilla se resuspendió en 4 ml de amortiguador P1 (con RNAsa A [100 µg/ml]), posteriormente se mezcló con el vortex hasta resuspender y se adicionó 4 ml de amortiguador P2, se mezcló por inversión de 4-6 veces, e incubó 5 min/ TA. Esta mezcla se transfirió a una columna (sin embolo), se dejó reposar 10 min. Durante esos 10 min se preparó la columna QIAfilter con 5 ml del amortiguador QI, después del tiempo de reposo se introdujo el embolo en la columna y la mezcla se paso a otra columna QIAfilter, se eluyó el DNA con el amortiguador QF,

posteriormente se precipitó con isopropanol y se centrifugó a 13,000 rpm/ 30 min /4°C; se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70% dos veces centrifugando en cada lavado a 13,000 rpm/ 10min, el sobrenadante se decantó y se dejó secar la pastilla para ser resuspendida en agua inyectable. El DNA se cuantificó por espectrofotometría, la muestra se corrió en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para observar su integridad. El mismo proceso descrito anteriormente se siguió para la obtención del DNAp de la clona C25 (pCR®2.1-TOPO®- *Ihtveif-5A*).

Linealización del vector pGEX6-P-1 y restricción del inserto

Para linealizar el vector pGEX6-P-1 se realizó una doble restricción con las enzimas *BamHI* (Invitrogen) y *XhoI* (Invitrogen), incubando por 3 h/ 37°C, se analizó la restricción en un gel de agarosa al 1% teñido con red gel. Para evitar la religación del vector se adiciono 0.5 µl de fosfatasa alcalina (PSA New England Bio-Labs) y se incubó 30 min/ 37°C, la reacción se corrió en un gel de agarosa al 1% teñido con red gel. El vector digerido se purificó siguiendo el protocolo del kit QIAEXII, la banda se corto y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml posteriormente se peso y adicionó el amortiguador QXI en proporción al peso de la banda cortada, se adicionó 10 µl de la resina y la mezcla se incubó a 55°C/ 10 min, se centrifugó a 13,000 rpm/ 1 min, el sobrenadante se decanto y se adicionó 500 µl del amortiguador QXI, la pastilla se resuspendió y centrifugó 13,000 rpm/ 1 min, el sobrenadante se decantó y se adicionaron 500 µl del amortiguador PE, la

pastilla se resuspendió y se centrifugó 13,000 rpm/ 1 min, el sobrenadante se desechó y la pastilla se dejó secar a TA (max. 15 min). Finalmente la pastilla se resuspendió en 20 µl de agua inyectable y se incubó a 60°C/ 5 min, se centrifugó a 13,000 rpm/ 1 min y el sobrenadante se paso a un tubo nuevo, este paso se repitió 2 veces. El mismo procedimiento se siguió para la restricción del inserto a partir de la clona C25 (pCR[®]2.1-TOPO[®]-*lhtveif-5a*).

Reacción de Ligación

Para la reacción de ligación se utilizó una reacción 1:4 (Plásmido-inserto) con T4 ligasa, amortiguador de la T4 ligasa y agua inyectable. La reacción de ligación se llevo a cabo con DNAp- inserto- ligasa T4- Amortiguador ligasa T4, como control de la reacción de ligación se utilizó DNAp- ligasa T4- Amortiguador ligasa T4 y DNAp- Amortiguador ligasa T4.

Las reacciones se incubaron a 16°C/ ON, el producto de la ligación se utilizó para transformar células competentes STBL-2 (*E. coli*), se incubó en hielo 5 min posteriormente se dió un choque térmico 42°C/ 30 seg, inmediatamente se pasaron en hielo e incubaron 5 min, se le adicionó 200 µl de medio LB, se incubaron en agitación a 37°C/ 200rpm/ 1.5 h, y se plaquearon en una caja con LB-ampicilina (50 µg/ml) e incubaron a 30°C/ ON.

Las clonas obtenidas se analizaron por doble restricción usando las enzimas *Bam*HI y *Xho*I, las clonas que liberaron el inserto en el tamaño esperado de 391

pb fueron secuenciados. La clona seleccionada fue STBL2-1 la cual se transformo en las células de expresión BL21-D3 a la cual denominamos BL21-1.

Expresión de la proteína recombinante

Para inducir la expresión de la proteína recombinante lhTveIF-5A-GST (lhTveIF-5Ar) se utilizó el método reportado por Oka, 1995, el cual consiste en crecer la clona BL21-1 en LB-ampicilina a 200 rpm/ 30°C /ON y posteriormente se resembró en medio LB-ampicilina (50 µg/ ml) y se creció a 200 rpm/ 30°C hasta alcanzar una O.D. de 0.7-0.8. La proteína se indujo con 1 µg/ml isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a 200 rpm/ 37°C/ 4 h una vez transcurrido ese tiempo se centrifugaron a 8,000 rpm/ 10 min/ 4°C se decantó el sobrenadante y se adicionó amortiguador de carga 1x para SDS-PAGE. La expresión de la proteína recombinante se analizó por electroforesis en geles SDS-PAGE al 12%, teñidos con azul de Coomassie.

Solubilidad de la proteína recombinante

Para el análisis de solubilidad, la pastilla del cultivo BL21-1 inducido se resuspendió en PBS pH 7.0, y posteriormente se agregó lisozima (SIGMA) (100 µg/ml) y se incubó 30 min/ TA, se sónico en frío con sonicador de punta (Ultrasonic processor) por 3 min/ pulsos de 20s con una amplitud del 80%, la muestra se centrifugó 13,000rpm/ 10 min y se analizó el sobrenadante y la pastilla

por separado, adicionándoles amortiguador de carga 1x. Las muestras se hirvieron por 5 min y después se analizaron en geles SDS-PAGE al 12% teñidos con azul de Coomassie.

Western Blot de la proteína recombinante

La proteína recombinante se corrió en un gel de acrilamida al 12% el cual se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, utilizando el amortiguador de transferencia (Tris-base 25 mM, glicina 40 mM, SDS 0.05%, metanol 20%) la transferencia se realizó a 20V/ 20 min, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau y se destiñó con PBS pH 7.0 y después se bloqueó con PBS pH 7.0- Tween 20 al 0.1% con 5% de leche a 4°C/ ON. Al día siguiente se lavó con PBS pH 7.0 y se incubó con el anticuerpo primario de cabra anti-GST (Santa Cruz) en una dilución 1:200, se dejó a 4°C/ ON , posteriormente se lavó 5 veces con PBS pH 7.0-Tween 20 al 0.1% y se incubó 2 h con el anticuerpo secundario de ratón anti-cabra acoplado a enzima peroxidasa de rábano (HRP) en una dilución 1:3000 (ZYMED, Invitrogen), se le dió 5 lavados de 5 min y 5 lavados de 10 min con PBS pH 7.0-Tween-20 al 0.1%, se reveló por quimioluminiscencia utilizando placas autoradiográficas (KODAK) y por método colorimétrico (Carbazol).

Purificación de la proteína

La proteína se purificó utilizando una columna de afinidad a GST (GE Life Sciences), primero se lavó la columna con 20 volúmenes de agua filtrada, posteriormente se equilibró con 20 volúmenes de PBS pH 7.0, se pasó la fracción soluble del extracto bacteriano inducido (al menos 2 veces), posteriormente se lavó la columna con 30 volúmenes de PBS pH 7.0 y 5 eluciones con el amortiguador de glutatión reducido (10 mM). De cada lavado así como de las eluciones se tomó una muestra la cual se analizó en geles SDS-PAGE al 12%, teñidos con azul de Coomassie. Un gel duplicado se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, la cual se bloqueó con PBS pH 7.0- Tween 20 al 0.1% con 5% de leche /4°C/ ON, y se continuó con el proceso de incubación para Western blot descrito para la proteína recombinante.

Corte con trombina de la etiqueta de GST de la proteína IhTveIF-5Ar.

Para cortar la etiqueta de GST a la proteína IhTveIF-5Ar se obtuvo la proteína purificada, se realizó una diálisis con una membrana de diálisis (Spectra. Diámetro 29.0 mm). Previamente la membrana se hirvió en amortiguador de Carbonatos (EDTA, Bicarbonato de sodio) durante 10 min, posteriormente la muestra se introdujo en la membrana, y se dializó con el amortiguador de diálisis (Tris base 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM), a 4°C/ ON. La diálisis se realizó por 2 días/ 4°C haciendo recambio de amortiguador tres veces al día,

posteriormente se agregó la enzima de corte PPS, trombina (Protease Plus) en una concentración de 20 μ l / ml a 4°C/ ON el sobrenadante fue recuperado y se analizó en geles SDS-PAGE al 15% y se tiñó con azul de Coomassie.

Obtención de Anticuerpos

Para la obtención de anticuerpos contra la proteína lhTveIF-5Ar se inmunizaron ratones con genotipo Balb/c. La proteína sin la etiqueta de GST (50 μ g) fue usada para las inmunizaciones por vía intraperitoneal e intravenosa con el adyuvante de Titer Max Gold, en una relación 1:1, se realizaron dos inmunizaciones con un intervalo de 20 días.

Los sangrados se realizaron cada semana y se analizaron en membranas de nitrocelulosa con la proteína recombinante y extractos de *T. vaginalis*.

Western blot utilizando los anticuerpos de lhTveIF-5A.

Para preparar los extractos totales se usaron 20×10^6 parásitos los cuales se centrifugaron a 1800 rpm/ 5 min/ 4°C, la pastilla se lavó 3 veces con PBS pH 7.0, posteriormente se le agregó 900 μ l de PBS y 100 μ l de Acido Tricloroacético al 100% (TCA), se incubó a 4°C/ ON, al día siguiente se centrifugaron a 1800 rpm/ 5 min/ 4°C y se decantó el sobrenadante, la pastilla se lavó 5 veces con PBS pH 7.0 (todo el tiempo secan cuidadosamente las paredes del tubo) y agregaron 400 μ l de amortiguador de carga 1x, se hirvieron 3 min, y se pusieron rápidamente en

hielo, después se centrifugaron a 1800/ 5 min/ 4°C. Las proteínas se corrieron en dos geles SDS-PAGE al 15%, uno de ellos teñido con azul de comassie y el otro se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para realizar el Western blot, de la manera previamente descrita para la proteína recombinante. El anticuerpo primario se utilizó en una dilución 1:100 y 1:500, y el anticuerpo secundario cabra anti-ratón 1:3000, como control se utilizó el suero pre-inmune utilizando las mismas diluciones, el revelado se realizó por método colorimétrico 4-chloro-1-naphthol.

Extractos citoplasmáticos de *T. vaginalis*.

Para realizar los ensayos de pull down, se extrajeron extractos citoplasmáticos los cuales se obtuvieron a partir de un cultivo de 50×10^6 parásitos se centrifugaron a 1800 rpm/5 min/4°C, posteriormente se agregó 1 ml de PBS-1x y se resuspendieron, posteriormente se centrifugaron a 1800 rpm/ 5 min/ 4°C, se lavaron dos veces agregando 40 ml de PBS-1x pH 7.0, centrifugando en cada lavado a 1800 rpm/ 5 min/ 4°C, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1 ml PBS-1x pH 7.0, se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 nuevo y se centrifugó a 1800 rpm/ 5 min/ 4°C. A cada tubo se le agregó los volúmenes correspondientes de inhibidores: leupeptin a una concentración final de 1.6 mM y TLCK 7.5 mM y amortiguador BB5x (Hepes 1 M, $MgCl_2$ 1 M, DTT 10 mM, KCL 3 M y Glicerol 20%) se agitaron con vortex 20 seg y se centrifugó 13,000 rpm/ 5min/ 4°C, los sobrenadantes se alicuotaron en tubos nuevos y se guardaron a -70°C.

Ensayo de “Pull Down”

A partir de un cultivo de 50 ml de bacterias que expresan las proteínas recombinantes lhTveIF-5Ar y TveIF-5Ar inducidas se lisaron y centrifugaron, el sobrenadante se incubó con 500 µl de resina de glutatión-sefarosa durante 4 h a 4°C, las cuentas se lavaron 12 veces con 4 ml de amortiguador de diálisis, posteriormente se agregó la proteína TveIF-5A, así como extractos totales de *T. vaginalis*, se incubó 4°C/ ON. Al día siguiente la resina se lavó 7 veces, posteriormente se agregó amortiguador de elución con glutatión reducido () los productos de la elución, se analizaron en geles PAGE al 7% teñido con azul de Coomassie. Como control se realizó el mismo procedimiento pero se utilizó solo la proteína GST.

Ensayos de transcripción *in vitro*

Para realizar la transcripción *in vitro* se utilizaron los nucleótidos ATP, CTP, GTP, UTP (biotina), amortiguador 10X (kit Ambion) y productos de PCR respectivos (DNA), se mezclaron y agregó, enzima T7 Mix, una vez mezclado se incubó durante 4h/ 37°C, transcurrido el tiempo se agregó DNAsa y se incubó a 20 min/ 37°C, posteriormente se agregó acetato de sodio, H₂O inyectable, y etanol se mezcló por inversión y se dejó precipitando a -70 °C/ ON. Al día siguiente se centrifugó 13,000 rpm/ 30 min/ 4°C y el sobrenadante se desechó y la pastilla se

resuspendió en agua DEPC. El producto final de la transcripción *in vitro* se analizó en un gel de agarosa al 3% teñido con red gel.

Ensayos de retardo (EMSA)

Las proteínas recombinantes IhTveIF-5A y TveIF-5A se incubaron 10 min/TA y se agregó 2.25 µl del producto de la transcripción *in vitro*, se incubó a 4°C/ 25 min y se adicionó heparina a cada muestra para incubarla 10 min TA, se agregaron 2 µl de “loading” amortiguador del kit Ambion, se corrieron en geles de agarosa al 1.2% (TBE 0.5x), corrió a 100 V durante 1 h en TBE 1X. Los geles se tiñeron a 4°C con Syber Green sin agitación ON. Como controles se utilizó la interacción sin el inhibidor y la interacción con una proteína no relacionada.

VIII. RESULTADOS

Análisis bioinformático

Con la secuencia de los péptidos identificados por ESI/ MS/MS, se realizó un BLAST en la base de datos TrichDB (<http://trichdb.org/trichdb/>) donde se encontró la secuencia de aminoácidos de tres proteínas hipotéticas las cuales presentan una posible función de inhibidores de la traducción. Después se obtuvo la secuencia de nucleótidos de cada una de ella y se buscó su ubicación dentro del genoma de *T. vaginalis*. Los tres genes se encontraron en marcos de lectura abierta localizados en *loci* diferentes.

En el *locus* TVAG_035410 se localiza un gen con un tamaño de 375 pb, este gen presenta un 100% de identidad con la secuencia obtenida en el análisis por ESI MS/MS (Tabla 2), se encuentra flaqueado río arriba del codón de inicio, por un gen que codifica para una proteína hipotética, y río abajo del codón de paro por un gen que codifica para una proteína con repetidos Anquirina (Fig. 6). Este gen codifica para una proteína de 127 aminoácidos (aa) su peso molecular (PM) teórico es de 13.41 kDa y un punto Isoeléctrico (pI) teórico de 6.4(Tabla 1)

En el *locus* TVAG_193660 se localiza un gen al cual denominamos “lh2Tvelf-5A”, se encuentra un marco de lectura abierta con un tamaño de 378 pb., esta secuencia presenta un 77% de identidad con la secuencia identificada por ESI MS/MS (Tabla 2) y su transcripción es en antisentido ya que se encuentra en la hebra complementaria (Fig. 6). Este gen se encuentra flanqueado río arriba del codón de paro por la secuencia de un gen que codifican para una proteína de

unión al ADN y río abajo del codón de inicio por un gen que codifica para una proteína hipotética a la cual no se le ha descrito una función. Este gen codifica para una proteína de 128 aa, con un PM teórico de 13.48 kDa, y un pI teórico de 4.8 (Tabla 1).

Finalmente, en el *locus* TVAG_197820 se localiza un gen al cual denominamos “lh3TveIF-5A” se encuentra un marco de lectura abierta con un tamaño de 375 pb presenta un 54% de identidad con respecto a la secuencia obtenida por ESI MS/MS (Tabla 2). Este gen se encuentra flanqueado río arriba del codón de inicio y río abajo del codón de paro por genes que codifican para proteínas hipotéticas a las cuales no se les han descrito una función (Fig. 6). Este gen codifica para una proteína de 127 aa, con un PM de 13.42 kDa y un pI de 5.8 teóricos (Tabla 1).

Con base al porcentaje de identidad que presentan las secuencias se sigue que el gen que codifica para la proteína identificada por ESI MS/MS es el que se localiza en el *locus* TVAG_035410, al cual denominamos como *lhtveif-5a* y presenta una función como posible inhibidor.

Fig. 6. Mapas genómicos de los genes encontrados en *T. vaginalis*

A) Mapa del gen *Ihtveif-5a* mostrando su orientación en el genoma B) Mapa del gen “lh2Tvelf-5A” C) Mapa del gen “lh3Tvelf-5A”

Ihtveif-5a



Ih2tveif-5a



Ih3tveif-5a

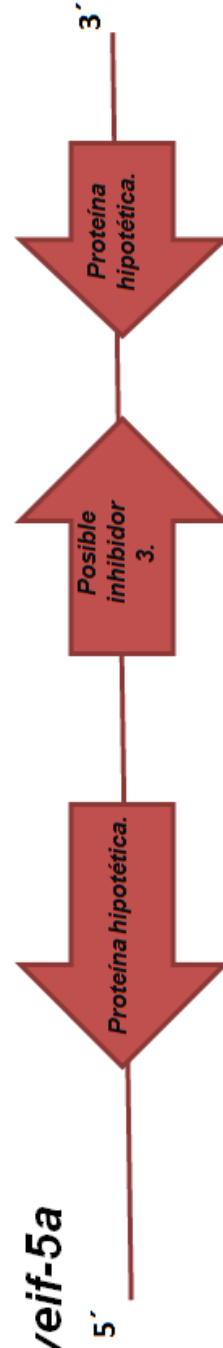


Tabla 1. Características de los genes encontrados en *lhtveIF-5A* en *T. vaginalis*.

Nombre	Gene ID	Conting	Nucleótidos (pb)	Aminoácidos	Peso Molecular (kDa)	PI
lhtveIF-5A	TVAG_035410	DS113183	375	125	13.41	6.4
2	TVAG_193660	DS113509	378	126	13.48	4.8
3	TVAG_197820	DS113406	375	125	13.42	5.8

Tabla 2. Porcentaje de identidad de los posibles inhibidores de *T. vaginalis* vs la secuencia identificada por ESI MS/MS

	ESI MS/MS	2	3
lhTveIF-5A	100%	77%	54%
2	77%	100%	50%
3	54%	50%	100%

Con la secuencia de nucleótidos de los tres marcos de lectura abierta que codifican para proteínas con posible función de inhibidores, se realizó un alineamiento con Clustal W donde se muestra que existen al menos 32 cambios de codón de los cuales 8 codifican para el mismo aminoácido, 8 codifican para aminoácidos completamente diferentes, el resto de los cambios de los aminoácidos se comparte en al menos dos de las tres proteínas (Fig. 7).

Después se realizó la traducción de nucleótidos hacia aminoácidos con las secuencias de los tres posibles inhibidores (Fig. 8A); se realizó un alineamiento múltiple encontrando que la proteína lhTveIF-5A presenta 13 aminoácidos diferentes (Fig. 8B). Cabe mencionar que la proteína identificada por ESI/EM/EM presentó una cobertura del 67% con una lectura de 8 péptidos que corresponden a la secuencia de lhTveIF-5A.

También se analizó la secuencia de aminoácidos con el programa Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) para clasificar dentro de alguna familia a la proteína, lhTveIF-5A la cual se encontró agrupada dentro de la familia YER057c/YjgF/ o L-PSP donde la secuencia de reconocimiento abarca del aminoácido 3 al 120 (Fig. 9A). De igual forma, para tener una idea más clara de su función y determinar los posibles dominios que pudiese presentar la proteína se analizó con la base de datos ProDom (<http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/home.php>), obteniendo como resultado la presencia de un dominio de endoribonucleasa que abarca del aminoácido 7 al 124 (Fig. 9B), este dominio ya ha sido descrito en otras proteínas de esta familia (Oka y col., 1999, Schmiedeknecht y col., 1996).

Para determinar la estructura secundaria y terciaria hipotética de la proteína lhTveIF-5A, se realizó un análisis utilizando el programa Phyre Server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>), la estructura secundaria mostró seis hojas β plegadas y tres hélices α y la presencia de 6 “loops” a lo largo de la secuencia. En cuanto a la estructura terciaria se comparó con la proteína de *pyrococcus* con la cual presenta 47% de identidad con un “score” de 3.13, perteneciente a la familia YER057c/YjgF. Posteriormente se modeló utilizando el programa PyMOL (Fig. 10).

Por otra parte para conocer el origen evolutivo de la proteína lhTveI-F-5A, se diseñó un árbol filogenético. Para ello se realizó un BLAST con la secuencia de con diversos organismos de la base de datos PSI-BLAST (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/psiblast/>), comparándolo con parásitos (*Entamoeba dispar*, *E. histolytica*), mamíferos (*Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Bos Taurus*, *Capra hircus*), peces (*Anaplopoma fimbria*, *Ictalurus punctatus*), plantas (*Oryza sativa* subsp. Lyrata, *Arabidopsis thailiana*, *Arabidopsis lyrata* subsp Lyrata), bacterias (*Aeromonas salmonicida*, *Anaerostipes caccae*), anfibios (*Xenopus leavis*, *Xenopus tropicalis*). Con estas secuencias se realizó un alineamiento múltiple, utilizando el programa CLUSTAL-W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (Fig.11). El árbol filogenético mostró que lhTveI-F-5A se agrupó con *E. dispar*, *E. histolytica*. También se encontró que el origen evolutivo de estos tres genes es producto de dos duplicaciones que se dieron a lo largo del tiempo (Fig. 12).

Fig. 7. **Alineamiento de secuencia de nucleótidos.** Alineamiento de los tres marcos de lectura abiertos localizados en el genoma de *T. vaginalis* gen 2 (DS113509), lhTveIF-5A (DS113183) y gen 3 (DS113406), utilizando el programa Clustal W. Los cuadros negros representan los nucleótidos conservados. La proteína lhTveIF-5A se encuentra enmarcada en rojo.

l h2Tvel F- 5A ATGTCT GTT GTT AGT ACT CCAGAT GCT CCAGCT GTT ATTT GGACCATA TTGCCAAGCA
 l hTvel F- 5A ATGTCT AAA GT CAT CAGCACAC CCAGAC GCT CCAGCAGC CATC GGCCCATAC TTGCCAGGCT
 l h3Tvel F- 5A ATGTCT GTT GT CAT CAACCTC CCAGAT GCT CCACCAACCAATTT GGCCCATAC TTGCCCTCGC

 l h2Tvel F- 5A CGTAT CTGT GGT AATTTC CTTT ATACATCA GGAATTTAT CGGAATGATCCACAT GGAGGT
 l hTvel F- 5A CGTCT TTGCGAT CGCACACTCTT ACACATCCGGCATCAT CGGAACGACCCACACGGCGGA
 l h3Tvel F- 5A CGCCT TTGT GGCAACACACTT TACACATCA GGCAATGT AGCT - - CAGTCTGC TGATGGC

 l h2Tvel F- 5A CCAAATCCAGAGACATTTGAAGGTCAAGCT ACATTAATCATGAAATCTGTTGATGCTGAA
 l hTvel F- 5A CCAAACCCGGAAACAGTTCGAAGGCCAGGCTGAATTTGATCATGAAAGTCCCTCGACGCCATG
 l h3Tvel F- 5A ACAGTTCCAAAGACAATTCGGAGAGCAGACAACCTTTCTCTTCAGAACATGGAAAGGTC

 l h2Tvel F- 5A CTTAAGGCCGCAGGTTATACAAGACTGATGTTGTCAAGATTACTGTTTTCCTCGCAAGT
 l hTvel F- 5A CTCGAAGGCTGCTGGCTACGAAAGACAGATGTTGTCAAGTGCAACTGCTAACCTTGCTGAT
 l h3Tvel F- 5A ATCAAGGCTGCAGGCTATGGAC AAGACAACGTTGTCAAGTGCAACTGCTAACCTCGCCAAC

 l h2Tvel F- 5A ATGGATGATTTCCAGAAATTTAATAAGATTATATGTCGACTATTTGGCGAGCACAAAGCCA
 l hTvel F- 5A ATCGCTGACTTCCAGAAAGTTCAACAAGATCTACGCTGACTACTTTGGCGACACAAAGCCA
 l h3Tvel F- 5A ATGGATGACTTCGCTGAATGAAACAAGGCC TACTCTGCTTCTCGCGATT CACAAGCCA

 l h2Tvel F- 5A TGT TGT ACATGCATAGAAAGCA GGAAAGCTTCCAGCTAACAAATTTGGTTGAATGATGTT
 l hTvel F- 5A TGCCGCTGCTGCATCCAGGCTGGCAAGCTCCAGCTGGCAAGCTTGTCCGAACCTGATGCC
 l h3Tvel F- 5A TGCCGCTGCTGCGTCCAGGCTGGCAAGCTCTGCGACCCATTCTTCTTGAGGTTGAGTGC

 l h2Tvel F- 5A ATTGCTTAT AAGCCATAA
 l hTvel F- 5A ATCGCTTAC AAGTAA - -
 l h3Tvel F- 5A ATCTGCTAC AAGGCTTAA

Fig. 8 Alineamiento de aminoácidos. A) Alineamiento de aminoácidos de las tres posibles proteínas inhibidoras. En los recuadros negros se muestran los aminoácidos idénticos. La proteína lhTveIF-5A se encuentra enmarcada en rojo.

B) Secuencia de aminoácidos de lhTveIF-5A, en naranja se muestran los péptidos identificados por espectrometría de masas, en azul los aminoácidos específicos de lhTveIF-5A y marcados con asterisco (*) los aminoácidos exclusivos de lhTveIF-5A y que se encuentran en los péptidos identificados por espectrometría de masas.

lh2TveIF-5A MSVVVSTPDAPAAI GPYCQARI CGNF LYTSGI I GNDPHGGPNPEDI EGQAT LI MKSVDAE
 lhTveiF-5A MSKVI STPDAPAAI GPYCQARLCDRTL YTSGL YTSGL I GNDPHGGPNPETVEGQAE LI MKSLDAM
 lh3TveIF-5A MSVVI NL PDAPPPI GPYCLARLCGNT L YTSGNVAQSADG- TVPKTI GEQTTL SLQNMEKV
 lh2TveIF-5A LKAAGYT KT DVVKI TVFLASMDDF QKF NKI YVDYFGEHKPCCTCI EAGRLPANKL VEI DV
 lhTveiF-5A LKAAGYE KT DVVKCNCYLADI ADF QKF NKI YADYFGDHKPCRCCI QAGKL P AGKL VELDA
 lh3TveIF-5A LKAAGM DKTNVVKCNCYL ANMDDFAE MNKAYSAFFGDHKPCRCCVQAGKL CDPFL FEVEC
 lh2TveIF-5A AYKP
 lhTveiF-5A AYK-
 lh3TveIF-5A CYKA

***T. vaginalis* (lhTveIF-5A)**

MSKVISTPDAPAAIGPYCQAR**LC**DR**TL**YTS**GI**GN**DP**HGGPN**PET**VE**GQAE**LIM**KS**L**DAM**L**KA**

AGYEKTD **VVK**CNCY**LA**DIAD**FQ**KFN**KI**Y**AD**Y**F**GD**HK**PC**RC**CI**QAG**KL**PAG**KL**VEL**DA**IAYK**
 * * *

Fig. 9 **Análisis de lhTveIF-5A.** A) Esquema representativo del dominio de la familia a la que pertenece lhTveIF-5A. En la parte inferior se presenta la secuencia de aminoácidos que representa a la familia L-PSP marcados con color rojo B) Esquema representativo del dominio de endoribonucleasa que presenta lhTveIF-5A. En la parte inferior con color naranja se presentan los aminoácidos que abarca el dominio.

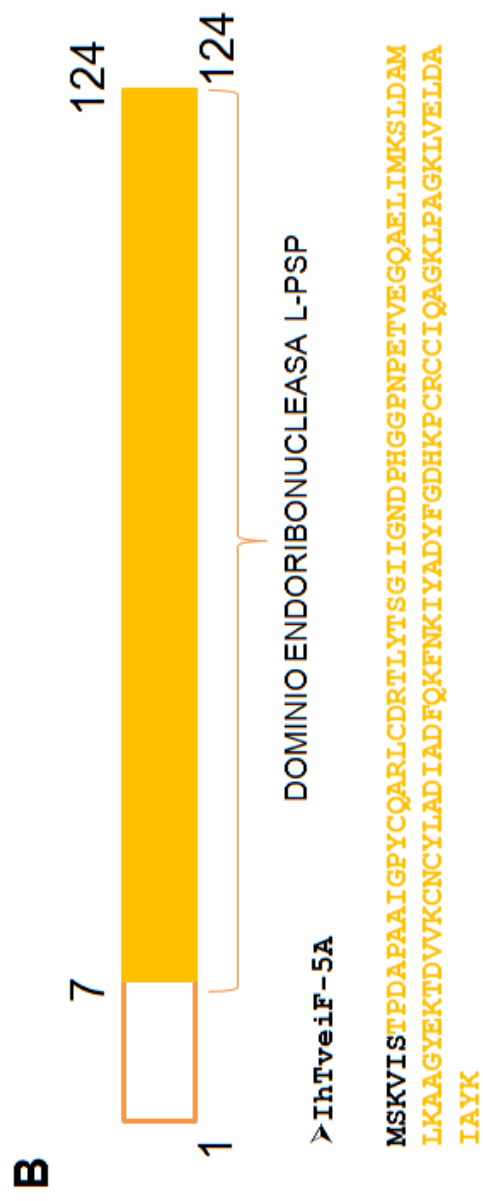


Fig.10 Predicción de la estructura terciaria hipotética de la proteína IhTveIF-5A A) Predicción de la estructura terciaria de la proteína IhTveIF-5A. B) Estructura del cristal de *Pyrococcus* YER057c/YjgF/ la cual presenta un 47% de identidad con la proteína IhTveIF-5A. En el recuadro se representa una de las subunidades de la proteína de *Pyrococcus* la cual presenta una estructura cuaternaria. C) Alineamiento de una de las subunidades de *Pyrococcus* en azul y la proteína IhTveIF-5A en verde.

A



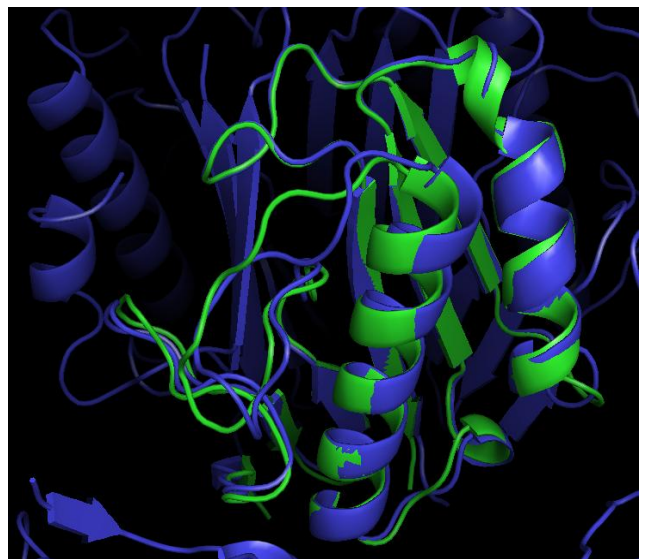
IhTveIF-5A

B



Pyrococcus YER057c/YjgF/

C



IhTveIF-5A y YER057c/YjgF/

Fig. 11 Alineamiento múltiple de IhTveIF-5A de *T. vaginalis*.

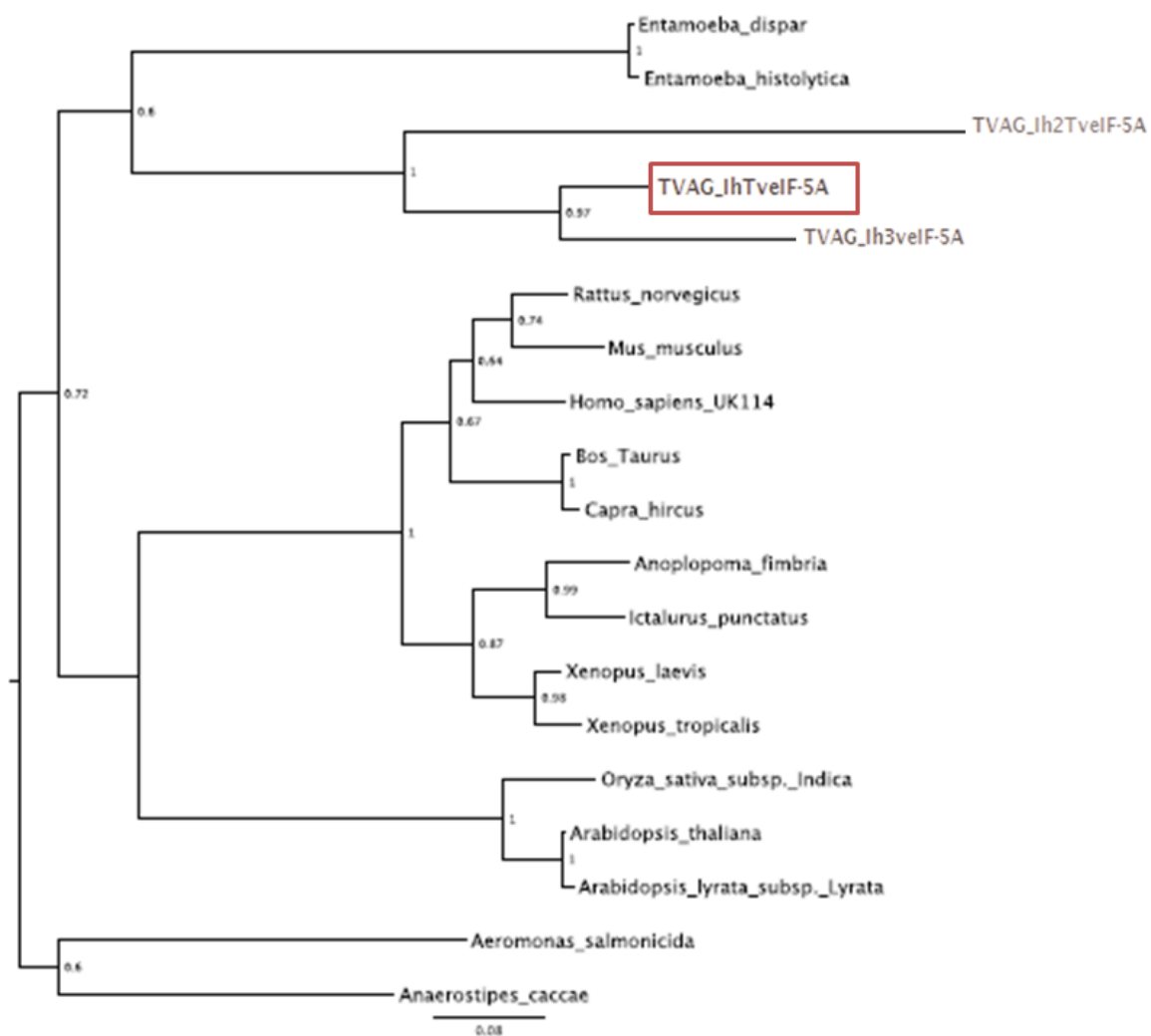
Alineamiento de aminoácidos con el programa CLUSTAL W, con los siguientes organismos: *Entamoeba dispar*, *Entamoeba histoyitica*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Bos Taurus*, *Capra hircus*, *Anaplopoma fimbria*, *Ictalurus puntatus*, *Oryza sativa subsp. Lyrata*, *Arabidopsis thailiana*, *Arabidopsis lyrata subsp Lyrata*, *Aeromonas salmonicida*, *Anaerostipes caccae*, *Xenopus leavis*, *Xenopus tropicali*. En los recuadros negros se muestran los aminoácidos idénticos. La proteína IhTveIF-5A se encuentra enmarcada en rojo.

Entamoeba_dispa	-----	MS
Entamoeba_histo	-----	MS
Mus_musculus	-----	MS
Rattus_norvegicus	-----	MS
Homo_sapiens_UK	-----	MS
Capra_hircus	-----	MS
Bos_taurus	-----	MS
Anoploporoma_fimbr	-----	MS
Ichtaurus_punct	-----	MS
Xenopus_laevi	-----	MA
Xenopus_tropica	-----	MA
Arabiopsis_tha	-----	MS
Arabiopsis_lyr	-----	MS
Oryza_sativa_su	MTWSVFRSI NSPTLDLSTALRSTRTPLVAAAGVGCATFAGVSLFRMS	MS
Anaerostipes_ca	MAWTAAAAAT--VTRAAATPAAE LRLPLAAG- LGRASFVGTG--	MS
Aeromonas_salmo	MDAGHS L CYNS DTKKLYEPNYFLESEES	MS
h2TveIF-5A	-----	MS
h1TveIF-5A	-----	MS
h3TveIF-5A	-----	MS

Entamoeba_dispa	KLT--VVASPLAPEAVGAYSQAIICNGMVYCSGQI GLDRKTGDFAGKTI EEQS KQVMTNL
Entamoeba_histo	KLT--VVASPLAPEAVGAYSQAIICNGMVYCSGQI GLDRKTGDFAGKTI EEQS KQVMTNL
Mus_musculus	SII RKVI STTKAPAAI GPYS QAVQVDRTI YI SGGQVGLDPSSGGOLVPGGVVEEAKQALKNL
Rattus_norvegicus	SII RKVI STSKAPAAI GPYS QAVLVDRTI YI SGGQI GMDPSSGGOLVPGGVVEEAKQALKNL
Homo_sapiens_UK	SLI RRVI STAKAPAAI GPYS QAVLVDRTI YI SGGQI GMDPSSGGOLVPGGVVEEAKQALKNM
Capra_hircus	SLVRRII STAKAPAAI GPYS QAVLVDRTI YI SGGQL GMDPASGGOLVPGGVVEEAKQALTNI
Bos_taurus	SLVRKII STAKAPAAI GPYS QAVLVDRTI YI SGGQL GMDPASGGOLVPGGVVEEAKQALTNI
Anoploporoma_fimbr	VLKRKII VNTPSAPAAI GPYS QSVVVDRTMYI SGGQL GMDVASGGOLVDGGVQAQAKQALVNM
Ichtaurus_punct	AFI RRII INTAAAPAAI GPYS QAVVVDRTMYI SGGQL GMDTATGGOLVAGGVQAQAKQALI NM
Xenopus_laevi	AI VRRII STAKAPAAI GPYS QAVVVDKTMV SGGQL GMDPSSGGOLVAGGVKNEAKQALVNM
Xenopus_tropica	SVVRRII STAKAPAAI GPYS QAVVVDKTMV SGGQL GMDPSSGGOLVAGGVKNEAKQALVNM
Arabiopsis_tha	SVKKEVVSTEKAPAAI GPYS QAI KANNLVFL SGGVL GLI PETGKFVSESVEDQTEQVLKNM
Arabiopsis_lyr	SVKKEVVATEKAPAAI GPYS QAI KANNLVFL SGGVL GLI PETGKFVSESVEDQTEQVLKNM
Oryza_sativa_su	AVKKEAVQTEKAPAAI GPYS QAI KANNMV FV SGGVL GLNPETGKFVSESVEEQTEQVMKNM
Anaerostipes_ca	AMTCETI NAQKAPAAV GPY CHAVKAGELVFT SGGQL GLDPENGTL PDG- VEAQADQALS NL
Aeromonas_salmo	-MAKEVI ATDKAPAAI GPY VQATKL GELVFT SGGQI PLDPATMEI VAGGVEAQAEQVMKNL
h2TveIF-5A	--MSVVVSTPDAPAAI GPY COARI CGNFLT SGI I GNDP- HGGPNPEDI EGQATLI MKSV
h1TveIF-5A	--MSKVI STPDAPAAI GPY COARLC DRTLYT SGI I GNDP- HGGPNPETVEGQAEI MKSL
h3TveIF-5A	--MSVVI NLPDAPPI GPY CLARLC GNTLYT SGNVAQSA- DG- TVPKTI GEQTTL SLQNM

Entamoeba_dispa	KYVLEEAGSSMDKVVTTCLLADI KDFGVFNGI YAEAFGDHKPARACFAAAALPKGALVF
Entamoeba_histo	KYVLEEAGSSMDKVVTTCLLADI KDFGVFNGI YAEAFGNHKKPARACFAAAALPKGALVF
Mus_musculus	GEI LKAAAGCDFNNTTTLVLLADIMNDFTGVNEI YKTYTQGS LPARAAYQVAALPRGSRVF
Rattus_norvegicus	GEI LKAAAGCDFNNTTTLVLLADINDFTGVNEI YKTYTQGNLPARAAYQVAALPKGSRVF
Homo_sapiens_UK	GEI LKAAAGCDFNNTTTLVLLADINDFTVNEI YKQYTKSNFPARAAYQVAALPKGSRVF
Capra_hircus	GEI LKAAAGCDFNNTATVLLADI NDFTSAVNDVYKQYQSSFPARAAYQVAALPKGGRVF
Bos_taurus	GEI LKAAAGCDFNNTATVLLADI NDFTSTVNDVYKQYQSSFPARAAYQVAALPKGGRVF
Anoploporoma_fimbr	GEI LKAAAGCDYNTTTLVLLADI NDFTNSVNEVYKTFSSNFPARAAYQVAALPRGGLVF
Ichtaurus_punct	GEI LKAAAGCGYENTTTLVLLADI NDFTNNVNDVYKQFSSNFPARAAYQVAALPRGGLVF
Xenopus_laevi	GEI LKAAAGCDYSNTTTLVLLADI NDFTNDVNEI YKQFTQTNFPARAAYQVAALPRGGKVF
Xenopus_tropica	GEI LKAAAGCDYSNTTTLVLLADI NDFTNDVNEVYKQFTRCNFPARAAYQVAALPRGGRVF
Arabiopsis_tha	GEI LKASGADYSSVTTI M ADLADFTKVNEI YAKYTPAPSPARSTYQVAALPLNAKIF
Arabiopsis_lyr	GEI LKASGADYSSVTTI M ADLADFTKVNEI YAKYTPAPSPARSTYQVAALPLNAKIF
Oryza_sativa_su	GEI LKASGASYSSVTTI M ADLQDFTKKVNEI YAKYTPAPAPARSTYQVAALPLNARIF
Anaerostipes_ca	DEVLEAGLSLSDVKTTFVLLDDI NDFAAI NAI YEKRFGDNKPARSCVEVAALPKGALVF
Aeromonas_salmo	VAVL KAAAGADTSKVLTTCTFSLDMNNVFAFNQVYARYGDSAPARSCVEVAALPKDVLVF
h2TveIF-5A	DAEL KAAAGYTKTDVKTTFVLLASMDFTQKFNKI YVDYFGEHKPCCTCI EAGRLPANKLVF
h1TveIF-5A	DAML KAAAGYEKTDVKTTFVLLADADFTQKFNKI YADYFGEHKPCRCCLQAGKLPAKGLVF
h3TveIF-5A	EKVI KAAAGVMDKTNVKTTFVLLANMDDFAEMNKAYSAF FGDHKKPCRCCLQAGKLCDPFLVF

Fig. 12 Relaciones filogenéticas de proteína ortólogas de IhTveIF-5A. El árbol filogenético se realizó con el programa Mega 4.0, tomando los siguientes organismos: *Entamoeba dispar*, *Entamoeba histoyitica*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Bos Taurus*, *Capra hircus*, *Anaplopoma fimbria*, *Ictalurus punctatus*, *Oryza sativa subsp. Lyrata*, *Arabidopsis thailiana*, *Arabidopsis lyrata subsp Lyrata*, *Aeromonas salmonicida*, *Anaerostipes caccae*, *Xenopus leavis*, *Xenopus tropicali*. La proteína IhTveIF-5A se encuentra enmarcada en rojo.



Expresión del gen *Ihtveif-5a* en *T. vaginalis* en presencia y ausencia de poliaminas.

Para determinar el efecto de las poliaminas en la expresión de *Ihtveif-5a*, se realizó una RT-PCR de parásitos crecidos en presencia y ausencia de poliaminas utilizando un inhibidor de la biosíntesis de poliaminas 1,4-Diamino-2-butanona dihidroclorido (DAB). Como control se utilizó el amplicón de 112 pb del gen de la *β-tubulina* en las diferentes condiciones de presencia y ausencia de poliaminas.

El análisis de expresión mostró que el gen de *Ihtveif-5a*, no disminuye cuando la síntesis de poliaminas es inhibida, la expresión del gen *Ihtveif-5a* no presenta diferencias significativas cuando se compara con las condiciones normal o basal. De manera interesante los parásitos crecidos en un medio con putrescina exógena mostraron que la expresión de *Ihtveif-5a* disminuyó ~60% con respecto a los parásitos crecidos en DAB. En los parásitos crecidos en medio normal y transferidos a un medio con putrescina exógena mostró el mismo efecto de disminución en el transcrito de *Ihtveif-5a* (Fig. 13). Estos resultados sugieren que *IhTveIF-5a* es regulado negativamente por poliaminas.

Las diferentes condiciones de poliaminas no afectaron la expresión del gen *β-tubulina*. Por lo tanto se considera que el efecto negativo de la biosíntesis de poliaminas en la expresión de *Ihtveif-5a* es específico.

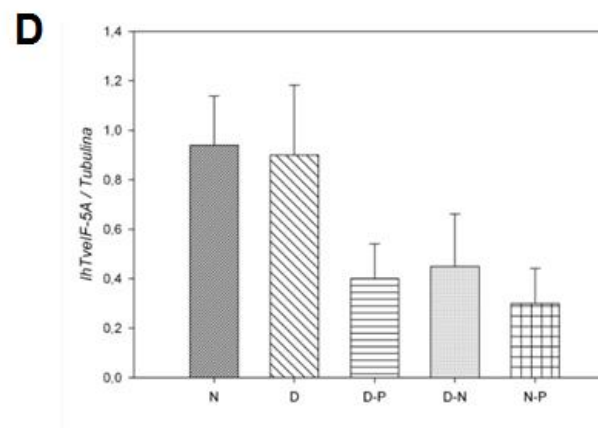
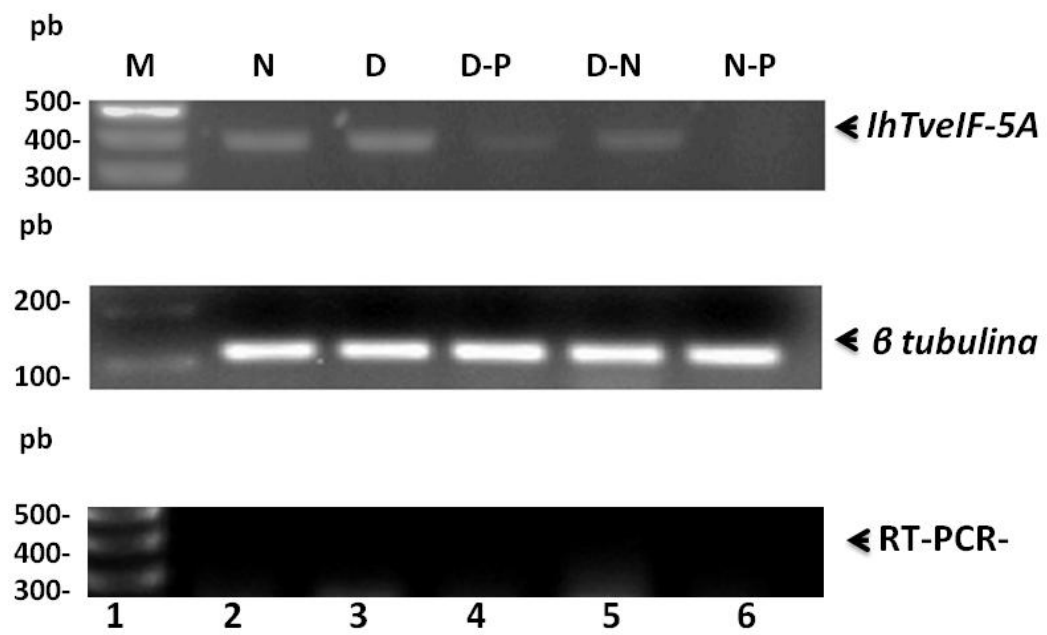
Fig. 13. Expresión del gen *lhtveif-5a* en presencia y ausencia de poliaminas.

A) Gel de agarosa al 1.5% muestra la expresión del gen *lhtveif-5a* de parásitos.

carril 1 crecidos en medio normal (N); carril 2, medio con DAB (D); carril 3, crecidos en DAB y transferidos a un medio con putrescina exógena (D-P); carril 4, crecidos en DAB transferidos a un medio normal (D-N); carril 5, crecidos en medio normal transferidos a medio con putrescina exógena (N-P).

B) Control de carga, gen *β -tubulina* en las diferentes condiciones N, D, D-P, D-N, N-P.

C) RT-PCR (-). D) Densitometría de la expresión de *lhtveif-5a*.



Clonación del gen *lhtveif-5a* de *T. vaginalis*.

Mediante PCR a partir de DNA, se obtuvo el amplicón de *lhtveif-5a* con un tamaño esperado de 391 pb (Fig.14A), también se amplificó a partir de cDNA (Fig. 14B) estos productos fueron analizados en geles de agarosa al 1.5%. El producto de PCR amplificado a partir de cDNA se clonó en el vector pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen). Las clonas candidatas se obtuvieron por PCR de colonia obteniendo un total de 25 clonas positivas para este gen (Fig. 15).

El DNAp de la clona C25 se secuenció para verificar la integridad en la secuencia del gen *lhtveif-5a*. En el alineamiento de la secuencia de la clona 25 con el gen *lhtveif-5a* obtenida de TrichoDB (Fig. 16) se observa que la secuencia de la clona C25 no presenta cambios en la secuencia de nucleótidos. Esta clona se creció en medio LB-ampicilina y se purificó el DNA plasmídico y posteriormente se restringió con las enzimas *BamHI* y *XhoI*, se observó la liberación del inserto de 391 pb en un gel de agarosa al 1.5%. El inserto se purificó directamente del gel y se cuantificó para realizar la subclonación en el vector de expresión *pGEX-6-P1*. Este vector tiene un tamaño de 4900 pb, contiene una etiqueta de GST y un promotor inducible con IPTG, así como un gen de resistencia a ampicilina y un sitio de restricción para las enzimas *BamHI* y *XhoI*.

El vector *pGEX-6-P1* previamente linealizado se utilizó para la reacción de ligación del inserto *lhtveif-5a* en una relación 1:4 (plásmido:inserto) y se transformó en células STBL2 donde se obtuvieron cuatro clonas, de las cuales se extrajo el DNAp, posteriormente se realizó una doble restricción con las enzimas

BamHI y *XhoI*. La restricción se analizó en un gel de agarosa al 1.5%, y comparó con el vector linealizado, el resultado mostró que solo dos clonas liberaron un inserto del tamaño esperado de 391 pb (Fig. 17).

Para determinar que el gen se encontraba en marco de lectura abierta las dos clonas positivas fueron secuenciadas. El análisis de la secuencia no mostró cambio en ninguno de los nucleótidos de las dos clonas (STBL2-1, STBL2-2), por lo que estaban en marco de lectura abierta fusionados a la etiqueta de GST.

El DNA plasmídico de la clona STBL-1 se seleccionó para su transformación en las células de expresión BL21 a la cual denominamos BL21-1. Para realizar la expresión de la proteína recombinante se utilizó el método reportado por Oka, y col., 1995 (descrito en materiales y métodos). El producto de la inducción se corrió en un gel SDS-PAGE al 12% por duplicado un gel teñido con azul de Coomassie observándose la sobreexpresión de una proteína de 39 kDa, correspondiente a la proteína Ihtvelf-5A (13 kDa) fusionada al GST (26kDa) (Fig. 18A). El segundo gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para realizar un WB utilizando anticuerpos anti-GST (Santa Cruz) revelado por Carbazol (Fig. 18B). El resultado mostró la inmunodetección de banda en el peso de 39 kDa, perteneciente a la proteína recombinante Ihtvelf-5A-GST y una de 26 kDa que corresponde a la etiqueta de GST.

Posteriormente, se analizó la solubilidad de la proteína Ihtvelf-5A. El extracto bacteriano inducido se fraccionó utilizando lisozima (1 mg/ml) y se sonicó la pastilla, se centrifugó y se separó la fracción soluble (sobrenadante) y la fracción insoluble (pastilla), se verificó en un gel SDS-PAGE al 13%. La proteína

recombinante se encontró en la fracción soluble (Fig. 19). La purificación de la proteína a partir de la fracción soluble se realizó utilizando una columna de afinidad a GST; obteniéndose una proteína recombinante de 39 kDa correspondiente a IhTveIF-5A-GST (Fig. 20).

Una vez obtenida IhTveIF-5Ar, se cortó la etiqueta de GST, para realizar la inmunización en ratones Balb/c/1 se realizaron dos inmunizaciones en un intervalo de 20 días, se inmunodetectó a la proteína IhTveIF-5A en extractos de *T. vaginalis*, así como en la proteína recombinante, en una dilución de 1:500 por método colorimétrico con 4-chloro-1-naphthol (Fig. 21).

Fig. 14. **Amplificación del gen *Ihtveif-5a*.** Geles de agarosa al 1.5% A) Amplificación *Ihtveif-5a* a partir de DNA; carril 1, Marcador DNA 100 pb; carril 2, Amplicón de 391 pb tamaño esperado para *Ihtveif-5a*. B) Amplificación *Ihtveif-5a* a partir cDNA; carril 1, Marcador DNA 100 pb; carril 2, Amplicón de 391 pb tamaño esperado para *Ihtveif-5a*; carril 3,) Control negativo de RT-PCR.

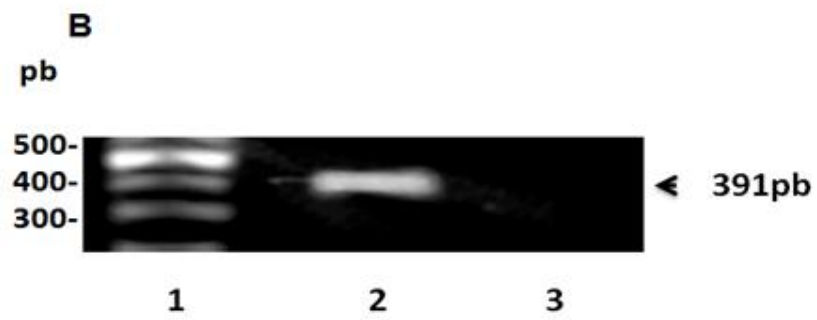
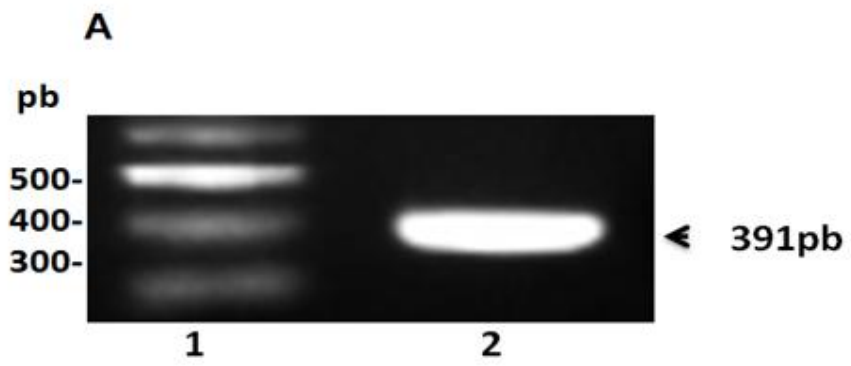


Fig. 15. PCR de Colonia. Gel de agarosa al 1.5%; carril 1, Marcador DNA 100 pb; carriles 2-6, Amplicón de *Ihtveif-5a* usando los iniciadores específicos del gen, amplicón del gen de 391 pb en las clonas positivas; carril 7, Control vector pCR[®]2.1-TOPO[®] vacío.

pb

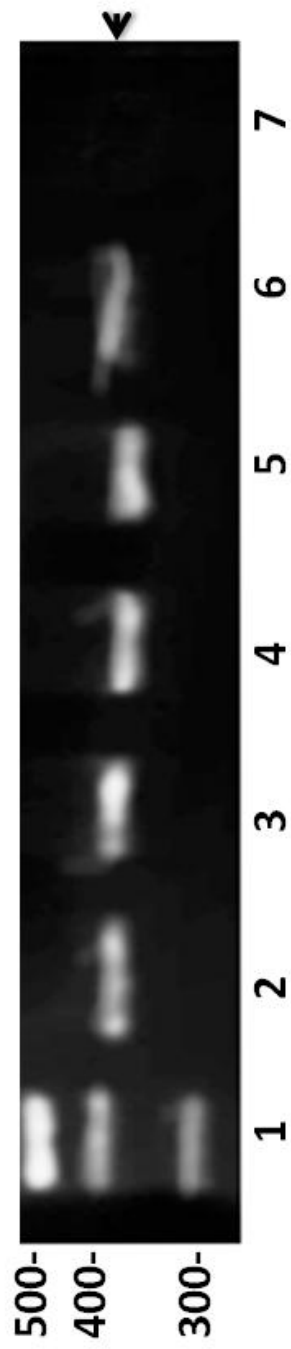


Fig. 16. **Alineamiento de la secuencia de la clona candidata C25 y la secuencia del gen *lhtveif-5a* de *T. vaginalis*.** Con asterisco (*) se muestran los aminoácidos idénticos.

C25	TATCTGCAGAATTTCGCCCTTCCGGATCCATGTCTAAAGTCATCAGCACACCAGACGCTCC
<i>T. Vaginalis</i>	-----ATGTCTAAAGTCATCAGCACACCAGACGCTCC *****
C25	AGCAGCCATCGGCCCATACTGCCAGGCTCGTCTTTGCGATCGCACACTCTACACATCCGG
<i>T. Vaginalis</i>	AGCAGCCATCGGCCCATACTGCCAGGCTCGTCTTTGCGATCGCACACTCTACACATCCGG *****
C25	CATCATCGGAAACGACCCACACGGCGGACCAAACCCGGAAACAGTCGAAGGCCAGGCTGA
<i>T. Vaginalis</i>	CATCATCGGAAACGACCCACACGGCGGACCAAACCCGGAAACAGTCGAAGGCCAGGCTGA *****
C25	ATTGATCATGAAGTCCCTCGACGC CATGCTCAAGGCTGCTGGCTACGAAAAGACAGATGT
<i>T. Vaginalis</i>	ATTGATCATGAAGTCCCTCGACGC CATGCTCAAGGCTGCTGGCTACGAAAAGACAGATGT *****
C25	TGTCAAGTGCAACTGCTACCTTGCTGATATCGCTGACTTCCAGAAGTTCAACAAGATCTA
<i>T. Vaginalis</i>	TGTCAAGTGCAACTGCTACCTTGCTGATATCGCTGACTTCCAGAAGTTCAACAAGATCTA *****
C25	CGCTGACTACTTCGGCGAC CACAAGCCATGCCGCTGCTGCATCCAGGCTGGCAAGCTCCC
<i>T. Vaginalis</i>	CGCTGACTACTTCGGCGAC CACAAGCCATGCCGCTGCTGCATCCAGGCTGGCAAGCTCCC *****
C25	AGCTGGCAAGCTTGTGGAACCTTGATGCCATCGCTTACAAGTAACTCGAGGGAAGGGCGAA
<i>T. vaginalis</i>	AGCTGGCAAGCTTGTGGAACCTTGATGCCATCGCTTACAAGTAA----- *****

Fig.17 Análisis por restricción de las clonas candidatas. DNA plasmídico de las clonas candidatas de *pGEX6-P-1-Ihtveif-5a* en células STBL2 digeridas con las enzimas *BamHI* y *XhoI*. Los productos liberados se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio; carril, 1 Marcador DNA 1 kb; carriles 2-3 Clonas que liberaron inserto de 391 pb (la cabeza de flecha indica los tamaños de los insertos); carril 4-5, clonas candidatas que no liberaron inserto; carril 6, vector linealizado (control).

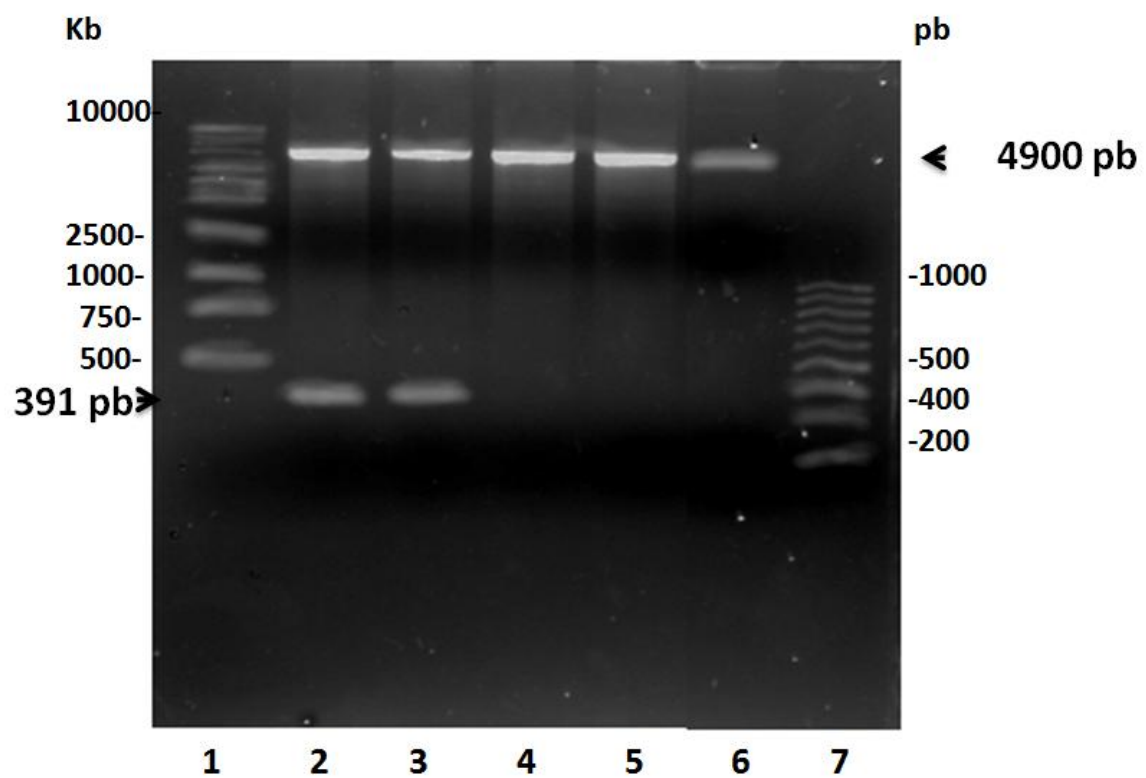


Fig.18. Expresión de la proteína IhTveIF-5A en el vector *pGEX-6P-1*.

A) Análisis de extractos bacterianos de la clona BL21-1 (*pGEX-6P-1-Ihtveif-5a*) inducida con IPTG. Gel SDS-PAGE al 13%; carril 1, marcador kDa; carril 2, vector *pGEX-6P-1* vacío sin inducir; carril 3, vector *pGEX-6P-1* vacío inducido; carril 4, BL21-1 (*pGEX-6P-1-Ihtveif-5a*) sin inducir; carril 5, BL21-1 (*pGEX-6P-1-Ihtveif-5a*) 4h de inducción.

B) Análisis por Western blot con anticuerpo anti-GST de un duplicado del gel de la parte A carril 1 marcador kDa; carril 2, vector *pGEX-6P-1* vacío sin inducir; carril 3, vector *pGEX-6P-1* vacío inducido; carril 4, BL21-1 sin inducir; carril 5, BL21-1 4h de inducción.

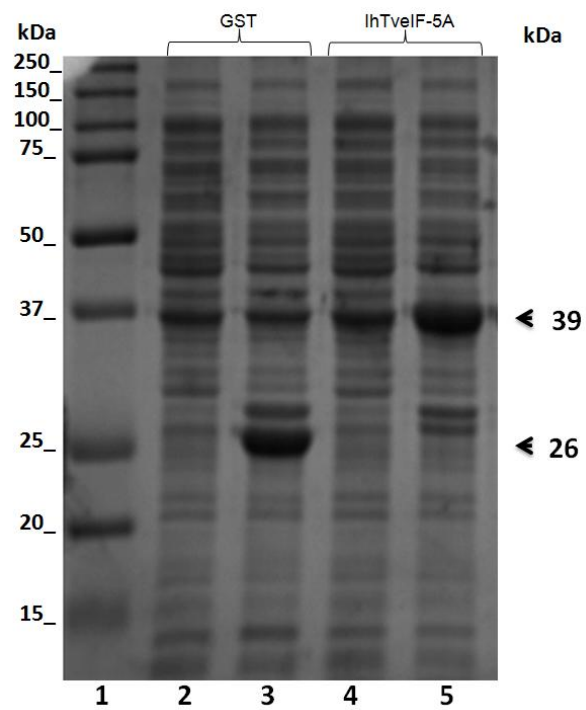
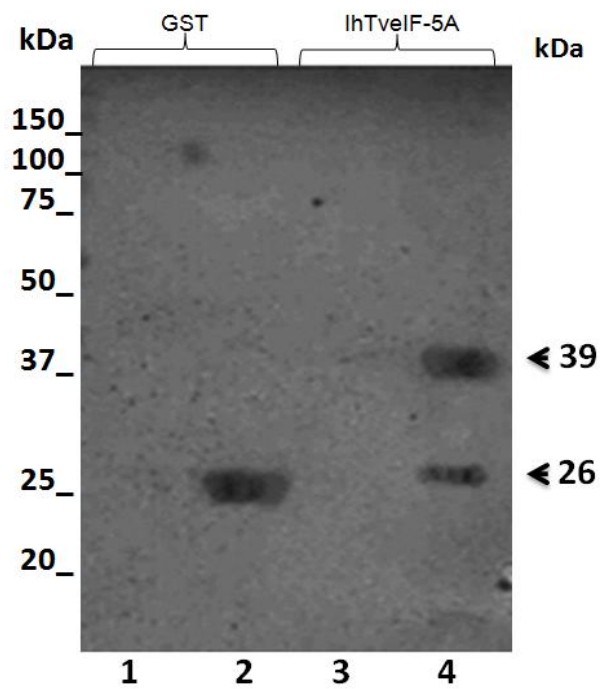
A**B**

Fig.19. Análisis de la solubilidad de la proteína recombinante IhTveIF-5A. Gel SDS-PAGE al 13%; carril 1, Marcador kDa, carril 2, vector vacío sin inducir fracción insoluble; carril 3, vector vacío sin inducir fracción soluble; carril 4, vector vacío inducido con IPTG fracción insoluble; carril 5, vector *vacío* inducido con IPTG fracción soluble; carril 6, BL21-1 sin inducir fracción insoluble; carril 7, BL21-1 sin inducir fracción soluble; carril 8, BL21-1 inducido con IPTG fracción insoluble; carril 9, BL21-1 inducido con IPTG fracción soluble. La cabeza de flecha indica los tamaños de las proteínas.

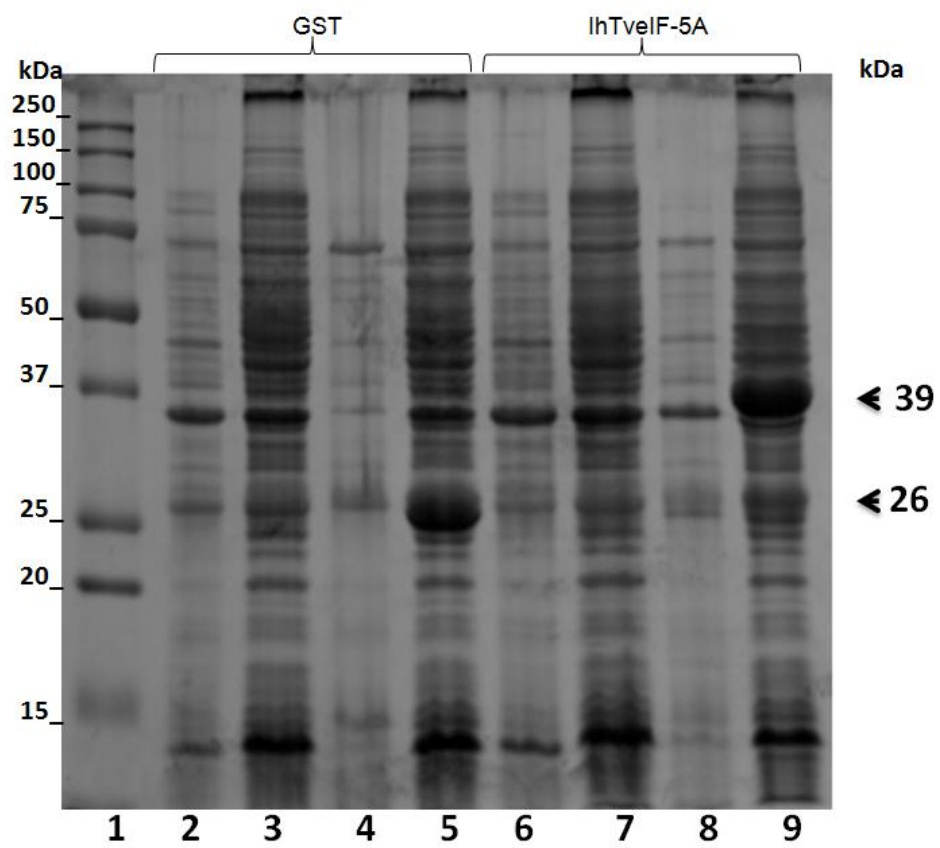


Fig. 20 **Purificación de la proteína recombinante lhTveIF-5A.** Análisis de la proteína recombinante en gel SDS-PAGE al 15%; carril 1, Marcador kDa; carril 2, fracción no pegada a la columna; carril 3 primer lavado de la resina; carril 4, elución 1 de la proteína lhTveIF-5A, carril 5, elución 2 de la proteína lhTveIF-5A. La cabeza de flecha indica el peso en kDa de las proteínas.

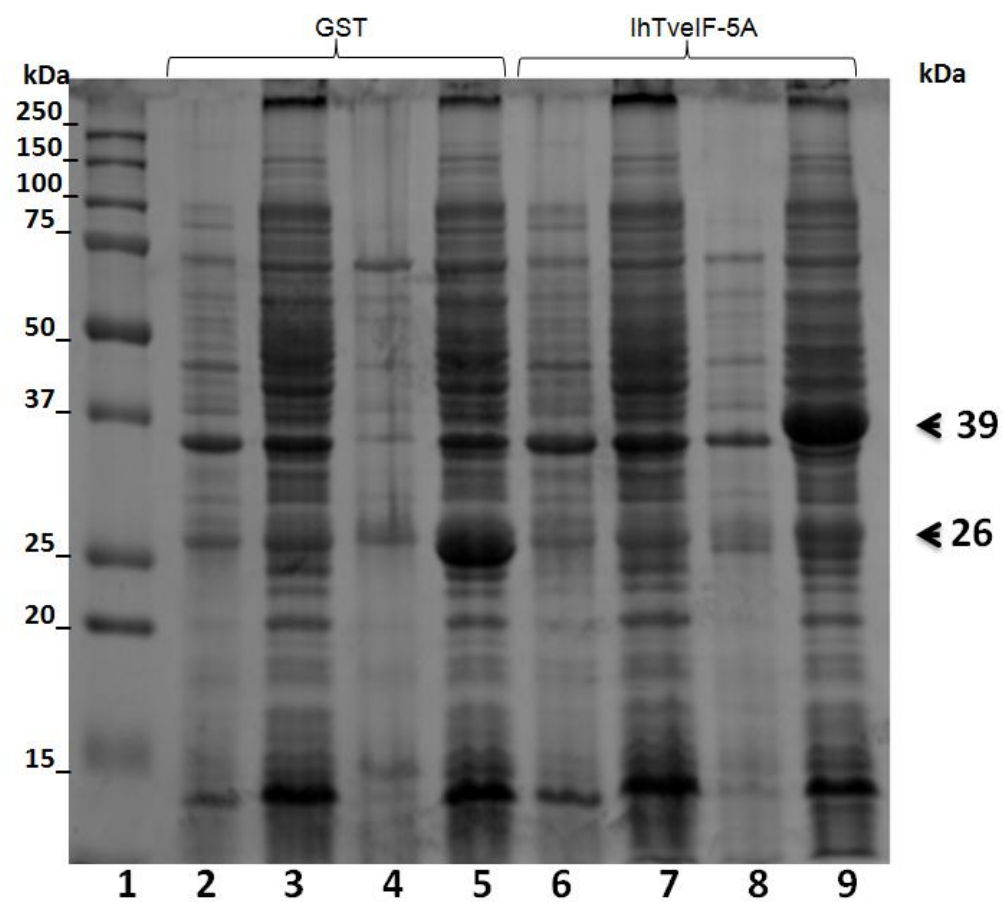
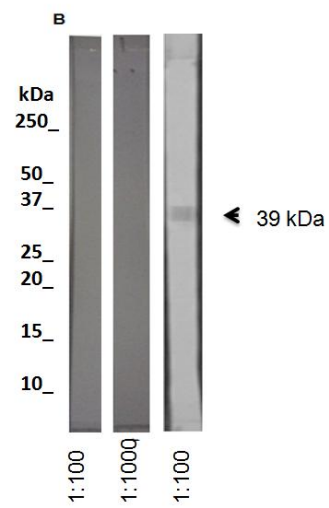
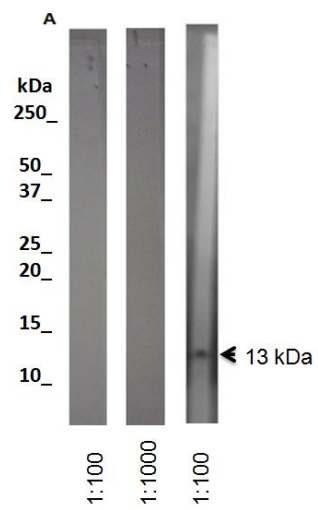


Fig. 21 Reconocimiento de la proteína IhTveIF-5A en *T. vaginalis*. A)

Ensayo de Western blot en membrana de nitrocelulosa extractos de *T. vaginalis* incubados; carril 1, suero preinmune 1:100 (SPI); carril 2, suero preinmune 1:1000 (SPI); carril 3, suero anti-IhTveIF-5A 1:100.

B) Ensayo de Western blot en membrana de nitrocelulosa con la proteína recombinante IhTveIF-5A incubado con; carril 1, suero preinmune 1:100 (SPI); carril 2, suero preinmune 1:1000 (SPI); carril 3, suero anti-IhTveIF-5A 1:100, revelado por color con 4-cloro-1naphtol.



Ensayo de interacción de lhTveIF-5A y TveIF-5A.

Previamente el grupo de trabajo demostró que la proteína TveIF-5Ar madura forma un complejo con una estructura tallo y burbuja que presenta una secuencia tipo ERE localizada en el extremo 3'UTR del RNAm de *tvcp39* el codifica para la proteína CP39 que participa en la citotoxicidad de *T. vaginalis*. Para analizar la interacción de la proteína lhTveIF-5Ar se realizó un ensayo de movilidad electroforética (EMSA), para ello primero se interacciono a la proteína TveIF-5A madura con lhTveIF-5Ar a diferentes concentraciones partiendo de una relación 1 M hasta 20 M. El resultado de la interacción se analizó en un gel de agarosa al 1.2% en donde se observo la formación de tres complejos (I, II, III), el complejo II correspondio a la interacción de TveIF-5Ar madura y ERE de 3'UTR RNAm de *tvcp39*, el complejo I podría corresponder a la interacción de lhTveIF-5Ar- TveIF-5Ar madura y ERE de 3'UTR RNAm de *tvcp39*, el complejo III a la interacción de lhTveIF-5Ar y ERE de 3'UTR RNAm de *tvcp39* (Fig. 21).

Por otra parte para confirmar la interacción entre lhTveif-5A y TveIF-5A se realizó un ensayo de "Pull Down" en donde se fijaron las proteínas recombinantes lhTveif-5Ar y TveIF-5Ar en una columna con afinada a GST, TveIF-5Ar e lhTveIF-5Ar a una columna de afinidad a GST, utilizando como control a la proteína GST.

Se realizaron las siguientes interacciones: 1) lhTveIF-5Ar- TveIF-5Ar, 2) lhTveIF-5Ar-Extractos citoplasmáticos de *T. vaginalis*, 3) TveIF-5Ar- lhTveIF-5Ar (sin la etiqueta de GST), 4) TveIF-5Ar-Extractos citoplasmáticos de *T. vaginalis*, 5) GST- TveIF-5Ar, 6) GST-Extractos citoplasmáticos de *T. vaginalis*.

El resultado de la interacción se corrió en un gel PAGE (no desnaturalizante), y se tiñó con plata. En la Fig. 22, se puede observar la formación de al menos siete complejos (I, II, III, IV, V, VI, VII). De los cuales el complejo I fue observado en las primeras cuatro interacciones, el complejo II, III, IV, se encontró en la interacción de TveIF-5A con extractos citoplasmáticos de *T. vaginalis*. La proteína GST no formó ningún complejo, mientras que los complejos V, VI, VII correspondieron a la proteína IhTveIF-5A, TveIF-5A y a GST respectivamente. Por lo tanto se considera que existe una posible interacción entre IhTveif-5A y TveIF-5A.

Fig. 21 **Ensayo EMSA.** Se corrió en un gel de agarosa teñido con Siber green; carril 1, sonda 3'UTR del RNAm del gen *tvcp3*; carril 2, TveIF-5Ar precursora- *EREs del RNAm del 3'UTR de tvcp39*; carril 3, TveIF-5Ar madura- *ERE del RNAm del 3'UTR de tvcp39*; carril 4, TveIF-5Ar madura - *ERE del RNAm del 3'UTR de tvcp39*- lhTveIF-5Ar 1 M; carril 5, TveIF-5Ar madura- *ERE del RNAm del 3'UTR de tvcp39*- lhTveIF-5Ar 2.5 M; carril 6, TveIF-5Ar madura - *ERE del RNAm del 3'UTR de tvcp39*- lhTveIF-5Ar 5 M; carril 7, TveIF-5Ar madura - *ERE del RNAm del 3'UTR de tvcp39*- lhTveIF-5Ar 10M; carril 8, TveIF-5Ar madura - *ERE del RNAm del 3'UTR de tvcp39*- lhTveIF-5Ar 20M; carril 9, TveIF-5Ar madura - *ERE del RNAm del 3'UTR de tvcp39*- lhTveIF-5Ar 1M- anticuerpo anti-TveIF-5A; carril 10, Proteína no relacionada (GST)- *ERE del RNAm del 3'UTR de tvcp39*.

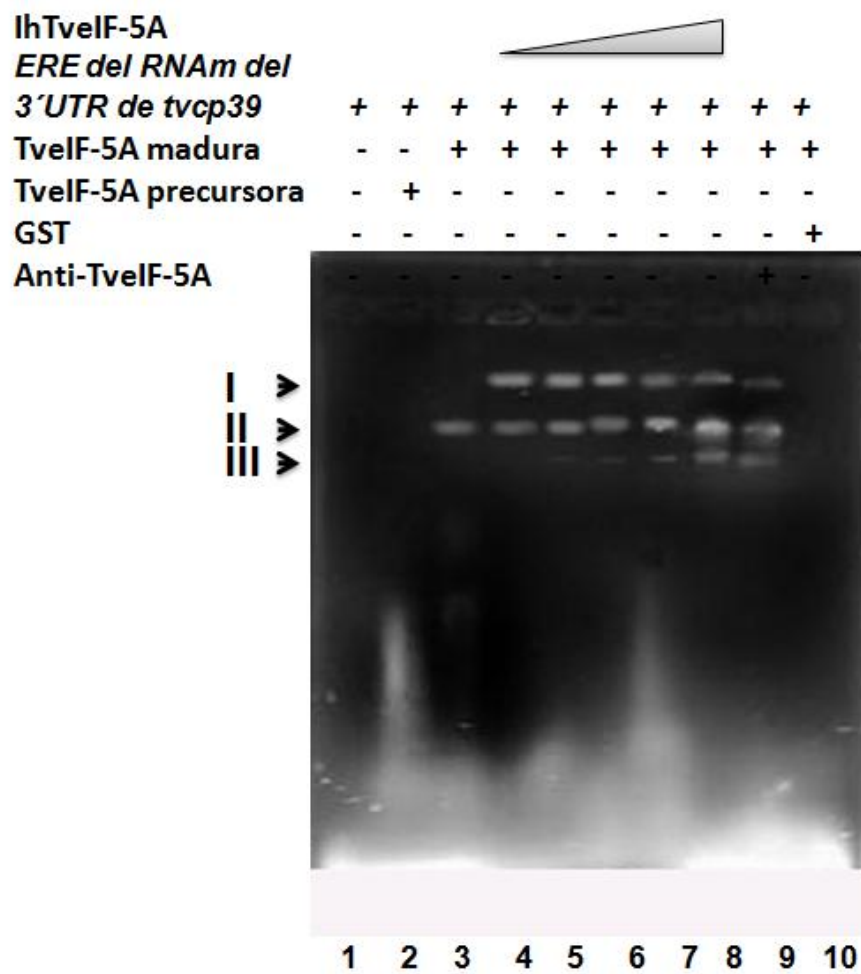
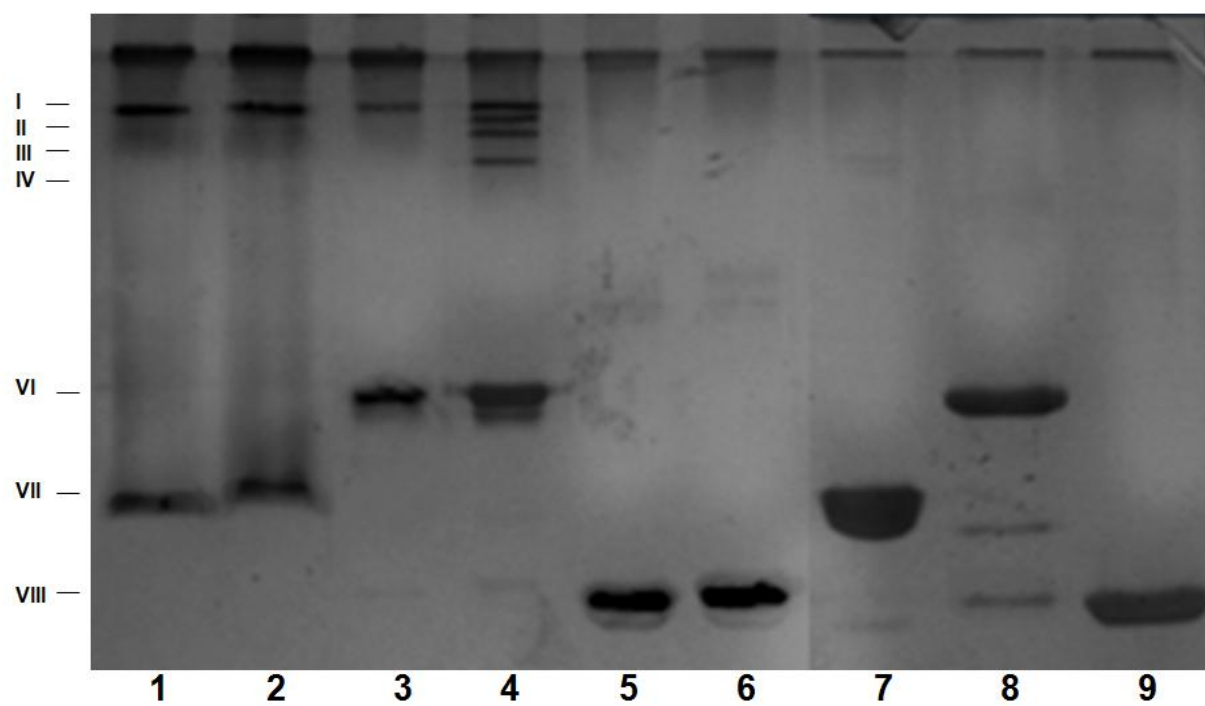


Fig. 22 **Ensayo de Pull Down.** Gel PAGE (no desnaturalizante) 7%; carril 1, lhTveIF-5Ar-TveIF-5Ar madura; carril 2, lhTveIF-5Ar- extractos de *T. vaginalis*; carril 3, TveIF-5Ar- lhTveIF-5A; carril 4, TveIF-5Ar -extractos de *T. vaginalis*; carril 5, GST-extractos de *T. vaginalis*; carril 6, GST-TveIF-5A madura; carril 7, lhTveIF-5Ar; carril 8, TveIF-5Ar; carril 9; GST.



IX. Discusión.

El análisis *in silico* en la base de datos TrichDB mostró que el gen *Ihtveif-5a* se ubica en el locus TVAG_035410. Sin embargo, se encontraron dos genes más que podrían estar codificando para una proteína del tipo LPS o YER057c/YJGF, la presencia de estos tres genes podría ser el resultado de una posibles duplicacion que se dió en el parásito. *T. vaginalis* presenta una gran cantidad de secuencias repetidas en su genoma. La duplicación génica se presenta en el 44% de los genes *Mycoplasma pneumoniae*, *Archaeoglobus fulgidis* 30%, *Sacharomyses cerevisiae* 30%, *Caenorhabditis elegans* 46% (Zhang, 2003). Muchas de estas duplicaciones, en ocasiones dan origen a pseudogenes, o a un gen con otra función o pueden presentar la misma función pero la proteína actúa en condiciones diferentes, por ejemplo: en monos colobinos se describió la duplicación de RNAsa1 en RNAsa A y RNAsaB. Esta duplicación se llevó a cabo cuando el mono colobino se separó de otros monos. La RNAsa1 B presenta cambios no sinónimos y prevaleció por una selección positiva. Lo importante de esta duplicación es que estas enzimas son producto de una adaptación al medio ambiente, esto fue determinado ya que trabajan a un pH diferente y la RNAsa B presenta una mayor eficiencia de degradación del RNAm (Zhang, 2003). Esto podría sugerir que *T. vaginalis* adquirió estas duplicaciones de genes para adaptarse a diferentes condiciones ambientales

T. vaginalis no es el único organismo el cual presenta más de un gen perteneciente a esta familia ya que previamente en *Saccharomyses cerevisiae* se

describió la expresión de dos proteínas homologas pertenecientes a la familia LPS o YER057c/YJGF. Se ha sugerido que la función de estas dos proteínas está involucrada en el mantenimiento del DNA mitocondrial, sin embargo, la localización celular no es la misma, ya que uno está presente en la membrana mitocondrial y otro en citoplasma (Oxelmark, 2000).

Por lo que podemos sugerir que las otras dos proteínas tipo lhTveIF-5A presentes se expresen en alguna otra condición ambiental bajo la cual se encuentre el parásito como son condiciones de alto o bajo hierro, poliaminas o Zn^{2+} , o de igual forma podrían presentar función diferente.

El alineamiento de las secuencias de nucleótidos de los tres marcos de lectura abierta que codifican para un posible inhibidor, así como de la secuencia de aminoácidos, mostró que los genes y las proteínas de *T. vaginalis* se encuentran altamente conservados entre ellos. En el alineamiento múltiple se observa que lhTveIF-5A conserva los aminoácidos de la secuencia consenso de la familia Yjgf/YER057c.

La predicción de la estructura terciaria de la proteína lhTveIF-5A mostró que es altamente ya que presenta una estructura en forma de barril, constituida por cinco hojas β plegada y dos helices α . De manera interesante, la estructura de la proteína lhTveIF-5A tiene mayor identidad con respecto a bacterias como *Pyrococcus*, *Bacillus subtilis* que con mamíferos como el humano. Este resultado no es de sorprender debido a que *T. vaginalis* tiene 152 posibles genes que han sido adquiridos por transferencia horizontal de bacterias probablemente por su capacidad de fagocitar a estos microorganismos (Carton y col., 2007).

Con respecto a la regulación que se presenta mediado por poliaminas se conoce que estos cationes regulan actividades de muchas enzimas involucradas en la degradación de RNA (Zhang, 2003). Reportes previos muestran que las proteínas de tipo endoribonucleasa se encuentran reguladas por poliaminas y se propone que la presencia de estos cationes favorece la estabilidad del RNAm a través de un complejo poliamina- polinucleótido, evitando la degradación del mismo (Kasperski y col., 1977).

Resultó interesante conocer que la expresión del gen *Ihtveif-5a* se encontró regulado negativamente por las poliaminas. Esto fue observado cuando los parásitos crecidos en presencia de putrescina exógena presentaron una disminución del transcrito en un ~ 60%. Este resultado concuerda con la disminución en la expresión del RNAm del gen *Ihtveif-5a* en parásitos crecidos en medio normal y transferidos a putrescina exógena. De manera interesante en parásitos crecidos en un medio con DAB y transferidos a medio normal disminuye la expresión de *Ihtveif-5a*. Esto podría deberse a que el medio normal presenta trazas de poliaminas y podría estar afectando la expresión del gen. Este efecto no se observa en los parásitos crecidos 24 h en un medio normal, sugiriendo que podría ser por el agotamiento de nutrientes en el medio.

Las poliaminas disminuyen la actividad de las enzimas como algunas ribonucleasas y se propone que particularmente la espermidina, interviene en su actividad y especificidad (kasperski y col, 1977). Esto resulta interesante ya que la espermidina es el producto final de la biosíntesis de poliaminas en *T. vaginalis*.

Es conocido que la RNAsa A disminuye su actividad en presencia de espermidina, de una manera dosis dependiente (Kasperski y col., 1977). Este resultado sugiere que esta inhibición podría estar dada a través de los cambios inducidos por la espermidina en la carga y estructura sobre el RNAm (Skewis y col., 2007). Adicionalmente es importante mencionar que no se han realizado estudios de expresión génica de genes tipo ribonucleasas, sin embargo se ha propuesto que la inhibición en la función de las enzimas las hace más susceptibles a degradación y por lo tanto afecta la presencia de la enzima funcional. Por lo ya reportado de la disminución en la actividad de proteínas de tipo ribonucleasas en presencia de poliaminas, se podría ver reflejado en la expresión del transcrito.

En *T. vaginalis* se han descrito algunas moléculas que se encuentran reguladas positivamente por poliaminas, como CP65, CP39 y TveIF-5A, esta regulación se da a nivel proteína, localización y transcrito, la inhibición de estas moléculas es restaurada mediante la adición de putrescina exógena, lo que sugieren que la síntesis de putrescina es importante para la expresión y actividad de las mismas, estos resultados sugieren que podrían estar reguladas por un mecanismo mediado por poliaminas (Álvarez-Sanchez y col., 2008).

De manera interesante los cambios en los niveles de expresión de *tveif-5a* reportado previamente presentan una regulación opuesta a lo que se observa para *lhtveif-5a* por lo que podría estar participando en algún mecanismo de regulación de TveIF-5A, mediado por poliaminas, actuando como un inhibidor natural de TveIF-5A.

Los tres complejos encontrados que corresponden: el complejo II, a la interacción de TveIF-5A madura con *ERE del RNAm del 3'UTR de tvcp39*. De manera interesante, cuando se agregan cantidades equimolares de lhTveIF-5A al complejo TveIF-5A- *ERE del RNAm del 3'UTR de tvcp39*, se forman dos complejos mas (I, III) los cuales podrían corresponder a la interacción lhTveIF-5A- *ERE del RNAm del 3'UTR de tvcp39* (II), el cual se forma a partir de un exceso molar de lhTveIF-5A, esto resulta interesante, se ha descrito que las enzimas de tipo endoribonucleasas reconocen el loop de la estructura secundaria de los RNAm para iniciar la degradación de los mismos (Tomecki y col., 2010). La interacción entre lhTveIF-5A- TveIF-5A madura- *ERE del RNAm del 3'UTR de tvcp39*, fue confirmada cuando se realizo un ensayo de superretardo usando el anticuerpo especifico anti-TveIF-5A, al disminuir la interacción TveIF-5A- *ERE del RNAm del 3'UTR de tvcp39* dicha interacción aumenta el complejo lhTveIF-5A- *ERE del RNAm del 3'UTR de tvcp39*, lo que sugiere que puede deberse a que la interacción con el anticuerpo permite que lhTveIF-5A se encuentre libre y pueda reconocer la secuencia *ERE del RNAm del 3'UTR de tvcp39*.

Los resultados de esta interacción correlacionan con lo encontrado en el ensayo de Pull Down, en el que se observa la formación del complejo I que podría corresponder a la interacción lhTveIF-5Ar- TveIF-5A madura, de manera interesante cuando TveIF-5Ar interacciona con los extractos citoplasmáticos de *T. vaginalis* se observa la formación de tres complejos mas (II, III, IV), esto es algo que se esperaba ya que en eIF-5A de humano se ha descrito su interacción con otras proteínas como NIP1, así como factores de inicio de la traducción como eIF-

4F, eIF-1 como parte del complejo de inicio de la traducción (Asano y col., 2001); sin embargo en *T. vaginalis* esta función no ha sido caracterizada, pero se ha propuesto que su función está relacionada con la estabilidad de los RNAm. Los mecanismos post-transcripcionales que se presentan en el proceso del RNAm se encuentra asociada a la unión de otras proteínas. (Dreyfuss y col., 2002). De manera interesante los complejos de TveIF-5A con otras proteínas de *T. vaginalis* sugieren la posibilidad de la participación de las mismas en un mecanismo de estabilidad a través de las estructuras EREs y la presencia de poliaminas en el medio.

Con estos resultados se propone que lhTveIF-5A se encuentra participando en algún mecanismo de regulación el cual se encuentra mediado por poliaminas, debido a que la presencia de poliaminas inhibe la actividad y la expresión del inhibidor lhTveIF-5A.

Es por ello que sería interesante determinar que otras proteínas a demás de TveIF-5A podrían estar participando en el mecanismo de estabilidad de los RNAm, mediados por poliaminas y por las estructuras tipo EREs, así como determinar el papel que presente lhTveIF-5A en este mecanismo de regulación post-transcripcional.

X. CONCLUSIÓN

- Las poliaminas regulan la expresión de *lhtveif-5a*. Esto puede sugerir que lhTveIF-5A podría estar participando en un mecanismo de regulación post-transcripcional mediado por poliaminas a través de las estructuras tipo ERE de los RNAm.
- lhTveIF-5A interacciona con TveIF-5A, podría estar regulando la función de TveIF-5A y su interacción con otras proteínas.

XI. BIBLIOGRAFIA

- Álvarez-Sánchez, M., Ávila-González, L., Becerril-García, C., Fattel-Facenda, L., Ortega-López, J., and Arroyo, R. (2000). **A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity.** Microbial Pathogenesis. Vol. 28, p. 193-202.
- Álvarez-Sánchez, ME., Carvajal-Gamez, BE., Solano-González, E., Martinez-Benitez, M., García, AF., Alderete, JF, and Arroyo, R. (2008). **Polyamine depletion down-regulates expression of the *Trichomonas vaginalis* cytotoxic CP65, a 65-kDa cysteine proteinase involved in cellular damage.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. Vol. 40, p. 2442-2451.
- Arroyo, R, Engbring, J., Alderete, F. (1992). **Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*.** Molecular Microbiology, 6{7). 853-862.
- Asano, K., Shaket, A., Phan, L., Nielsen, K., Clayton, J., Valasek, L., Donahue, T.F., Hinnebusch, G. A., (2001). **Multiple roles for the C-Terminal domain of eIF5 in translation initiation complex assembly and GTPase activation.** The EMBO Jorunal Vol. 20 No. 9 pp. 2326-2337.
- Beach D. H., Holz Jr G. G., Sing, B. N., Lindmark, D. G., (1990). **Fatty acid and sterol metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas fetus*.** Molecular and biochemical Parasitology Vol. 38 pp. 175-190.

- Beach D. H., Holz Jr G. G., Sing, B. N., Lindmark, D. G.,(1991).
Phospholipid metabolism of cultered *Trichomonas vaginalis* and *trichomonas featus*. Mol. Biochem. Parasitol. pp. 44-97.
- Boyle, M.C.D., Barton, S.E., Uthayakumar, S, Hays,P. E., Pollock J. W., Steer, P. J., Smith, J. R. (2003) **Is bacterial vaginosis associated with cervical intraepithelial neoplasia?** Int. J. Gynecol Cancer Vol. 13 p. 159-163.
- Carlton, J., Hirt, R., Silva, J., Delcher, A., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J., Bidwell, S., Alsmark, C., Besteiro, S., Sicheritz-Ponten, T., Noel, C., Dacks, J., Foster, P., Simillion, C., Van de Peer, Y., Miranda-Saavedra, D., Barton, G., Westrop, G., Müller, S., Dessi, D., Luigi Fiori, P., Ren, Q., Paulsen, I., Zhang, H., Bastida-Corcuera, F., Simoes-Barbosa, A., Brown, M., Hayes, R., Mukherjee, M., Okumura, C., Schneider, R., Smith, A., Vanacova, S., Villalvazo, M., Haas, B., Perte, M., Feldblyum, T., Utterback, T., Shu, Ch-L., Osoegawa, K., de Jong, P., Hrdy, I., Horvathova, L., Zubacova, Z., Dolezal, P., Malik, Sh-B., Logsdon, J., Henze, K., Gupta, A., Wang, Ch., Dunne, R., Upcroft, J., Upcroft, P., White, O., Salzberg, S., Tang, P., Chiu, Ch-H., Lee, Y-Sh., Embley, M., Coombs, G., Mottram, J., Tachezy, J., Fraser-Liggett, C., and Johnson, P. (2007). **Draft Genome Sequence of the Sexually Transmitted Pathogen *Trichomonas vaginalis*.** Science. Vol. 315. 12, p. 207-212.
- Carter, J.E. and Whithaus K. C.(2008). **Neonatal Respiratory Tract Involvement by *Trichomonas vaginalis*: A Case Report and Review of**

the Literature. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 78(1), pp. 17–19.

- Carvajal-Gamez, B, Arroyo, R, Lira R, López-Camarillo C, Alvarez-Sánchez. M.E. (2010). **Identification of two novel *Trichomonas vaginalis* eif-5a genes.** Genetics and Evolution 10 284–29.
- Christopherson M. R., Schmitz, G. E., Downs, M. D., (2008). **YjgF Is Required for Isoleucine biosynthesis when *Salmonella enterica* Is Grown on Pyruvate Medium.** Journal of Bacteriology Vol. 190, No. 8 pp. 3057-3062.
- Costamagna, S. R., PRADO FIGUEROA, M. **On the ultrastructure of *Trichomonas vaginalis*: cytoskeleton, endocytosis and hydrogenosomes.** *Parasitol.*, vol.25, n.3-4 pp. 100-108 .
- Dailey,D.C., Chang, Te-Hung, Alderete, J.F.(1990).**Characterization of *Trichomonas vaginalis* hemolysis.** Parasitology Vol. 101 p. 117-175.
- Dailey,D.C.,Chang, Te-Hung, Alderete, J.F. (1990) **Characterization of *Trichomonas vaginalis* hemolysis.** Parasitology Vol. 101 p. 117-175.
- Dunne R.L., Dunn, L.A., Upcroft, P., O’donoghue, P., Upcroft, J.A. (2003). **Drugs resisistence in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*.** Cell Research Vol 13 No. 4 pp. 239-349.
- Farkas, A, Nardai, G., Csermely,P.,Tompa, P., Friedrich, P.(2004). **DUK114, the Drosophila orthologue of bovine brain calpain activator .protein, is a molecular chaperone.** Biochem. J. 383, 165–170

- Fiori, PL., Rappelli, P., Addis, MF. (1999). **The flagellated parasite *Trichomonas vaginalis*: new insights into cytopathogenicity mechanisms.** Microbes and Infection. Review. Vol. 2, pp. 149-156.
- Garcia, AF., Benchimol, M., and Alderete, J. (2005). ***Trichomonas vaginalis* Polyamine Metabolism Is Linked to Host Cell Adherence and Cytotoxicity.** Infect Immun. Vol. 73. No. 5, p. 2602-2610.
- Gillin, F. D., Sher, A.(1981) **Activation of the Alternative Complement Pathway by *Trichomonas vaginalis*.** Infection and Immunity, vol. 31 No. 1 pp. 268-273.
- Guenthner, P.C., Secor, E.W., Dezzutti, C.S. (2005) ***Trichomonas vaginalis*. induced Epithelial Monolayer Disruption and Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Replication: implications for the sexual transmission of HIV-1.** Infection and Immunity Vol. 73 No. 7 p.4155-4160
- Heine P, Mc Gregor JA.(1993) ***Trichomonas vaginalis*: a reemerging pathogen.** Clin Obstet Gynecol; Vol 36 p. 137-44.
- Hernández, H., Sariego, I., Garber, G., Delgado, R., López, O. 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 Immunology Vol 26 p.119-125.
- Hernández-Gutiérrez, R., Ortega-López, 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. Vol. 50, p. 696-698.

- Heyworth, PG., Gutteridge, WE., and Ginger, CD. (1982). **Purine Metabolism in *Trichomonas vaginalis***. Vol. 141. No. 1. FEBS Letters, pp. 106-110.
- Heyworth, PG., Gutteridge, WE., and Ginger, CD. (1984). **Pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis***. Vol. 176. No. 1 FEBS, pp. 55-60.
- Kang, JH., Song, HO., Ryu, JS., Shin, MH., Kim, JM., Cho, YS., Alderete, JF., Ahn, MH., and Min, DY. (2006). ***Trichomonas vaginalis* promotes apoptosis of human neutrophils by activating caspase-3 and reducing Mcl-1 expression**. Parasite Immunol. Vol. 28. No. 9, pp. 439-446.
- Karpetski, P. T., Shriver, K. K., Levy, C.C., (1981). **The effect of polyamines on the poly (adenylic acid)- induced inhibition of ribonuclease activity**. Biochem. J. 193 pp. 325-337.
- Kim, J-M, Yoshikawa, H., Shirahige K., (2001) **A member of the YER057c/yjgf/Uk114 family links isoleucine biosynthesis and intact mitochondria maintenance in *Saccharomyces cerevisiae***. *Genes to Cells* Volumen 6, 507-517.
- Krieger, JN., Jenny, C., Verdón, M., Siegel, N. (1993). **Clinical Manifestations of Trichomoniasis in Men**. Annals of Internal Medicine. Vol. 118. No. 11, p. 844-849.
- Leher, MW., and Alderete, JF. (2000). **Biology of trichomonosis**. Current Opinion in Infectious Diseases. Vol. 13. No. 1, p. 37-45.
- Lossick, J.G., Kent, H.L. (1991) **Trichomoniasis: trends in diagnosis and management**. Am. J. Obstet Gynecol 165 (4 Pt 2) p. 1217-1222.

- Madico, G., Quinn, T.C., Rompalo, A., Mckee, K.T., Gaydos, A. (1998).
Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* Infrction by PCR Using Vaginal Swab Samples.Journal of clinical Microbiology, Vol. 36 No.11 pp.3205-3210
- Mason P. R., Gwanzura L. (1990) **Reduced lymphocyte responses to mitogens in natural and experimental trichomoniasis.** Infect Invmm vol. 58 pp. 3553-3557.
- Melloni, E., Michetti, M., Salamino, F., Pontremoli S. (1998) **Molecular and Functional Properties of a Calpain Activator Protein Specific for μ -Isoforms** journal of biological chemistry Vol. 273, No. 21, Issue of May 22, pp. 12827–12831.
- Mendoza-López, M.R., Becerril-García, C., Fattel-Facenda L.V.,Avila-Gonzalez, L., Ruíz-Tachiquin M.E., Ortega-López J.,Arroyo, R. (2000) **CP30, a Cysteine Proteinase Involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence** Infection and Immuntty Vol. 68, p. 4907-4913.
- Min, DY., Hyun, KH., Ryu, JS., Ahn, MH., and Cho, MH. (1998).
Degradations of human immunoglobulins and hemoglobin by a 60 kDa cysteine proteinase of *Trichomonas vaginalis*. Korean J Parasitol. Vol. 36. No 4, pp. 261-268.
- Miyakawa T., Lee, W. C., Hatano, K., Kato, Y., Sawano, Y., Miyazono, K. N., Tonakura, M., (2006). **Crystal Structure of the YjgF/YER057c/Uk114 Family Protein from the Hyperthermophilic Archaeon *Solfolobus***

***tokodaii* Strain 7. PROTEINS: structure, Function, and bioinformatics** Vol. 62 pp. 557-561.

- Moreno-Brito, V., Yáñez-Gómez, C., Meza-Cervantez, P., Ávila-González, L., Alberto Rodríguez, M., Ortega-López, J., González-Robles, A., and Arroyo, R. (2005). **A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to genosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron.** Cellular Microbiology. Vol. 7. No. 2, p. 245-258.
- Müller, M. (1993) **The hydrogenosome.** *Journal of General Microbiology*, **139**, 2879-2889.
- Ochoa Rojas M. C., Leal Guadarrama I.I. Mendez, J.D. (2002) **Papel de las poliaminas en la inmunosupresión.** Vol. 40 No. 1 pp. 77-83.
- Oka, T., Tsuji, H., Noda, C., Sakai, k., Hong, Y., Suzuki, I., Muñoz, S., Natori, Y. (1995). **Isolation and Characterization of a Novel Perchloric Acid-soluble Protein Inhibiting Cell-free Protein Synthesis,** The journal of biological chemistry Vol. 270, No. 50, 30060–30067, 1995
- Oxelmark E, Marchini A, Malanchi I, Magherini F, Jaquet L, Hajibagheri MA, Blight KJ, Jauniaux JC, Tommasino M. (2000) **Mmf1p, a novel yeast mitochondrial protein conserved throughout evolution and involved in maintenance of the mitochondrial genome.** Mol Cell Biol. 20 7784-97.
- Oxelmark, A., Marchini, A., Malanchi, I., Magherini, F., Jaquet, L., Nasser Hajibagheri, M. A., Blight K. J., Jauniaux, J-C., Tommasino, M., (2000). **Mmf1p, a novel Yeast Mitochondrial protein Conserve throughout**

Evolution and Involved in Maintenance of the Mitochondrial Genome.

Molecular and Cellular Biology Vol. 20 No. 20 pp. 7784-7797.

- Panagiotidis C. A., Drainas, D., Huang, S-C., (1992). **Modulation of ribonuclease P expression in *Escherichia coli* by polyamines.** Int. J. Biochem. Vol. 24, No. 1 pp. 1625-1631.
- Pang, M. X., Zhang Z., Wen, X., Ban, Y., Moriguchi, T. (2007). **Polyamines, All-Purpose Players in Response to Environment Stresses in Plants.** Plants Stress 1(2), pp. 173-188.
- Parker, M. T., Gerner, E. W. (2002). **Polyamine- mediated post-transcriptional regulation of COX-2.** Biochemie 84 pp. 815-819.
- Pereira-Neves A., Benchimol, M. (2007) **Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights.** Biol. Cell Vol. 99 p. 87-101.
- Provenzano D., and Alderete J.F. 1995. **Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*.** Infect. Immun. Vol. 63, p. 3388-3395.
- Rendón-Maldonado, J.G., Espinosa-Cantellano M., González- Robles , Martínez- Palomo A. (1998) ***Trichomonas vaginalis*: In Vitro Phagocytosis of Lactobacilli, vaginal epithelial Cells, leukocytes and erythrocytes.** Experimental parasitology Vol. 89 Issue 2 pp. 241-250.
- Rosorius, O., Reichart, B., Krätzer, F., Heger, P., Dabauvalle, M., (1999). **Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1.** Journal of Cell Science 112 pp. 2369-2380.

- Schmiedeknecht', G., Kerkhoff, C., Orso, E., Stohr, E., Aslanidis ,C., Nagy, G., Knuechel, R., Schmitz, G. , (1996). **Isolation and characterization of a 14.5-kDa trichloroacetic-acid-soluble translational inhibitor protein from human monocytes that is upregulated upon cellular differentiation** Eur. J. Biochem. 242, 339-351
- Schwebke, JR., and Burgess, D. (2004). **Trichomoniasis**. Clinical Microbiology Reviews. Vol. 17. No. 4, p. 794-803.
- Shina S., Rapuu, P., Lange, S. C., Mäntasälä, P., Zarkin, H., Smith, J. L., (1999). **Crystal structure of *Bacillus subtilis* Yabj, a purine regulatory protein and member of the highly conserved YjgF Family**. PNAS Vol. 96 No. 23 pp. 13074-13079.
- Sutcliffe, S., Giovannucci, E., Alderete, JF., Chang, T-H., Gaydos, CA., Zenilman, JM., De Marzo, AM., Willett, WC., and Platz, EA. (2006). **Plasma Antibodies against *Trichomonas vaginalis* and Subsequent Risk of Prostate Cancer**. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. Vol. 15. No. 5, p. 939-945.
- Swapan, K. N., Sanjay, G.R. (2007) **Problem-based Microbiology**. Editorial Elsevier Science Health Science Div pp.524.
- Swygard, H., Seña, AC., Hobbs, MM., and Cohen, MS. (2004). **Trichomoniasis: clinical manifestations, diagnosis and management**. Sex Transm Infect. Vol. 80, p. 91-95.

- Swygard, H., Seña, AC., Hobbs, MM., and Cohen, MS. (2004).
Trichomoniasis: clinical manifestations, diagnosis and management.
Sex Transm Infect. Vol. 80, p. 91-95.
- Tomecki, R-, Dziembowski, A. (2010). **Novel endoribonucleases as central players in various pathways of eukaryotic RNA metabolism.**
RNA Vol. 16: pp. 1692-1724.
- Vázquez, F. M., García, J., Pérez, F., y Palacio, V. (2001). ***Trichomonas vaginalis*: tratamiento y resistencia a nitroimidazoles.** *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 19: pp. 114-124.
- Yarlett, N., Martinez, MP., Goldberg, B., Kramer, DL., and Porter, CW. (2000). **Dependence of *Trichomonas vaginalis* upon polyamine backconversion.** Microbiology. Vol. 146, p. 2715-2722.
- Yatin, M., (2002). **Polyamines in living organism.** Journal of Cell and Molecular Biology 1:57-67.
- Zang, J., (2003). **Evolution by gene duplication: an update.** TRENDS in Ecology and Evolution Vol. 18 No. 6 pp. 292-298.

XII. APENDICE

Gel de agarosa al 1.5%

Agarosa (Gibco BRL)	0.30 gr
TAE 1X	20 ml
Bromuro de Etidio	4 μ l (0.5 mg/ml)

Amortiguador 50X

Trizma base	242gr
Acido acético glacial	57.1 ml
EDTA	37.2 gr

Se afora a 1 litro de H₂O y se ajusta el pH a 8.5

Extracción de DNA genómico

PBS 1X pH 7.0

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

Se ajusta el pH a 7.0 y se afora a 1 litro de agua destilada.

Amortiguador de lisis

SDS 0.2%

NaCl 100 mM

Tris-HCl 10 mM

EDTA 10 mM

Etanol al 70%

Para 100 ml

Etanol al 100% 70 ml

H₂O destilada 30 ml

Extracción DNA plasmídico

Amortiguador P1

Tris base 3.03 gr

EDTA 1.860 gr

Sea justa el pH 8.0 se afora a 50 ml y esteriliza

Amortiguador de lisis P2

NaOH 200 mM

SDS 10%

Se prepara al momento de la extracción

Amortiguador de Neutralización P3

Acetato de potasio 29.45 gr

Se ajusta el pH 5.5 con ácido acético glacial y disuelve en 50 ml se esteriliza por autoclave y guarda a 4°C

Medio de cultivo

Medio Luria Broth

Luria Broth (LB) 20 gr

Se disuelve en 1000 ml y esteriliza por autoclave

Ampicilina (100 µg/ml)

Se pesan 0.1 gr y disuelve en 1ml de agua inyectable, se filtra 0.22 µm, para esterilizar se cubre de la luz y almacena a -20°C.

Placas LB- Ampicilina

Se pesa 1.5 gr de agar y disuelve en 100 ml se esteriliza por autoclave, a una temperatura de ~45°C se adiciona Ampicilina (100 µg/ml) y se transfiere a cajas petrí en un ambiente estéril.

Células competentes

Amortiguador TFB1

RbCl ₂	0.6046 gr
MnCl ₂	0.3270 gr
KC ₂ H ₃ O ₂	0.147 gr
CaCl ₂	0.055gr
Glicerol	15%

Se ajusta el pH a 5.8 se afora a 50 ml, esteriliza por autoclave y guarda a 4°C

Amortiguador TFB II

MOPS	0.1046 gr
RbCl ₂	0.0604 gr
CaCl ₂	0.4162 gr
Glicerol	15%

Se ajusta el pH a 6.8, se esteriliza por autoclave.

Extracción de RNA total

Etanol al 75%

Para 100 ml

Etanol al 100%	75 ml
H ₂ O- DEPC	30 ml

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

DAB .35012 gr

Se disuelve en 2 ml de medio TYM frío y se filtra por 22 μ m, esta solución se agrega a 90 ml de medio TYM y guarda a 4°C/ ON.

Preparación de putrescina 40 mM

Putrescina 0.4025 gr

Se disuelve en 2 ml de medio TYM frío y se esteriliza con filtro 0.22 μ m, se agrega a 54 ml de medio TYM y almacena a 4°C/ ON

Geles SDS-PAGE

Acrilamida al 30%/ bisacrilamida al 0.8%

Acrilamida 29.2 gr

Bisacrilamida 0.8 gr

Se disuelve en 40 ml de agua destilada para disolver, una vez disuelto se afora a 100 ml, se filtra con papel filtro "Whatman" No.1 se almacena a 4°C protegido de la luz.

4X Tris-Cl/ SDS pH 6.8

Tris base 6.055 gr

SDS 0.4 gr

Se disuelve en 60 ml de H₂O destilada se ajusta el pH a 6.8 y se lleva a 100 ml.

4X Tris-Cl/ SDS pH 8.8

Tris base 18.165 gr

SDS 0.4 gr

Se disuelve en 60 ml de H₂O destilada se ajusta el pH a 8.8 y se lleva a 100 ml.

Persulfato de amonio al 10% (PSA)

Se pesa 10 mg (0.01gr) de PSA en un mililitro de agua destilada

Solución colorante de proteínas

Metanol 500 ml

Acido acético glacial 100 ml

Agua destilada 400 ml

Azul de Coomassie 0.5gr

Disolver toda la noche, filtrar con papel filtro "Whatman" no. 1. Almacenar a temperatura ambiente

Solución decolorante de geles de poliagrilamida

Metanol 165 ml

Acido acético glacial 50 ml

Agua destilada 785 ml

Disolver y almacenar a temperatura ambiente.

Geles PAGE (No desnaturalizantes)

4X Tris-Cl/ SDS pH 6.8

Tris base 6.055 gr

Se disuelve en 60 ml de H₂O destilada se ajusta el pH a 6.8 y se lleva a 100 ml.

4X Tris-Cl/ SDS pH 8.8

Tris base 18.165 gr

Se disuelve en 60 ml de H₂O destilada se ajusta el pH a 8.8 y se lleva a 100 ml.

Western blot

Amortiguador de transferencia

Trizma-base 25 mM

Glicina 190 mM

Metanol 20 %

Disolver primero el Trizma y Glicina. Posteriormente se agrega metanol, se afora con 1 litro de H₂O destilada. Enfriar a 4°C hasta su uso.

Solución reveladora HRP (por color Bio- Rad)

Solución A:

HRP 7.5 mg

Metanol frío 2.5 ml

Solución B:

TBS 1X pH 7.5 12.5 ml

H₂ O₂ 7.5 ml

Se preparan las soluciones por separado y se mezclan.

Diálisis**Amortiguador de carbonatos**

EDTA 26 gr

Bicarbonato de sodio 8 gr

Se disuelve en 500ml y guarda a 4°C

Amortiguados de diálisis

Tris base 50 mM

NaCl 150 mM

EDTA 1mM

DTT 1mM

Se ajusta el pH 7.5 y se afora a 1litro se guarda a 4°C

COMITÉ EVALUADOR

Dra. María Elizabeth Alvarez Sánchez _____

Dra. Rossana Arroyo Verástegui _____

Dra. Mavil López Casamichana _____

Dra. Minerva Camacho Nuez _____