



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

*Título de tesis*

**“Caracterización de la proteína  $\alpha$ -actinina TvACTN3 como una proteína de unión a RNAm que participa en la regulación post-transcripcional por hierro en *Trichomonas vaginalis*”**

*Tesis que presenta:*

**M. en C. Jaeson Santos Calla Choque**

*Para obtener el grado de:*

**Doctor en Ciencias**

*En:*

**Infectómica y Patogénesis Molecular**

*Director de tesis:*

**Dra. Rossana Arroyo Verástegui**

*México, Distrito Federal.*

*Diciembre 6 del 2013*

**ASESORES DE TESIS:**

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**Dra. Rosa María Del Ángel Núñez de Cáceres**

**Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**Dr. Jaime Ortega López**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR**

**Dr. José Manuel Hernández Hernández**

**POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS, UACM**

**Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez**

*El presente trabajo se realizó en el laboratorio N° 11 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN), bajo la dirección de la Dra. Rossana Arroyo Verástegui y con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), donativos: 162123 y 153093 y de apoyo al fortalecimiento a los posgrados PNNPC-2013; así como el apoyo del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyT-DF), donativos ICyT-219 y 186.*

*Agradezco a la Secretaría de Relaciones Exteriores del Gobierno de México (SRE), ICyT-DF y al CINVESTAV-IPN por el apoyo otorgado para la realización de mis estudios de Doctorado.*

## AGRADECIMIENTOS

*A la Dra. Rossana Arroyo Verástegui por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por ser un excelente guía y transmitirme su conocimiento, por impulsarme a hacer todo de una mejor manera, por la disponibilidad de su tiempo, su paciencia, comprensión, gracias por ser mi maestra, por su amistad, por soportarme, apoyarme económicamente y ayudarme siempre. Gracias por darme la oportunidad para mejorar como persona y como investigador. Muchas gracias, jamás encontraré las palabras suficientes para agradecerle todo el cariño y aprecio que siempre me brindó.*

*Al Dr. Jaime Ortega López por su gran apoyo, su disponibilidad y por ser excelente guía en la realización de este proyecto. Gracias por todas sus enseñanzas, comprensión, tiempo y por ser un gran maestro.*

*Al comité de mis asesores de tesis: Dra. Rosa María Del Ángel Núñez de Cáceres, Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez, Dr. José Manuel Hernández Hernández y Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez, por sus invaluable consejos, sugerencias, asesoría y apoyo en todo momento.*

*A la Dra, Mineko Shibayama por su apoyo, consejos, respaldo, comprensión y amistad.*

*A la Q.F.B Letícia Ávila González por su asistencia laboral y por auxiliarme en todo lo necesario en el laboratorio. También le agradezco por el cariño, apoyo y respaldo en todo momento. ¡Mil gracias Leticia!.*

*A la Dra. Elisa Figueroa Angulo, por su apoyo, asesoría, por sus revisiones, punto de vista, apoyo en los experimentos cruciales en el desarrollo de este trabajo, gracias por la disponibilidad de tiempo. Muchas gracias por todo el aprecio.*

*A mis compañeros de laboratorio: **Rosa, Daniel, Diana, Inocente, Jonathan, Mar, Jesus**, por su amistad, compañerismo y por hacerme sentir parte de un gran grupo de amistad. También agradezco a cada uno por el conocimiento transmitido y el apoyo en momentos difíciles para poder superarlos y sus mensajes de estímulo para obtener buenos resultados. ¡Muchas gracias!*

*A los exintegrantes del laboratorio: **Sebastian, Francisco, Patricia Meza y Patricia Cuellar** por dejarme pertenecer a su grupo de amistades y también por cada una de las observaciones hacia mi persona y sugerencias para el presente trabajo.*

*A **Martha Aguilar Romero e Irma Edith Miranda Orea** por su asistencia y apoyo secretarial.*

*Al **M.V.Z. Manuel Flores Cano** por su apoyo técnico en el manejo de animales en las instalaciones de la UPEAL del CINVESTAV-IPN.*

*A **Ivan J. Galván-Mendoza y Magdalena Miranda-Sánchez**, por su apoyo técnico en la captura de imágenes por microscopía confocal.*

*Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN) por las facilidades para realizar mis estudios de posgrado y permitir el uso de sus instalaciones para la realización de los experimentos de mi trabajo de tesis.*

*A los **Dres. Humberto Guerra Allison, Cristina Guerra Giraldez, Patricia García Funegra, Jorge Arévalo y Marina Chiape** de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y a mis amigos: **Carmen Contreras, David Duran, Percy Pinedo, Erick Mercado, Jimy Merino, Beatriz Herrera, Paula Maguiña, Marcela Rangel, Michael Talledo y Ariana Robles** por todos los momentos compartidos, por el gran apoyo, respaldo y el gran aprecio que siempre me brindaron. “Muchas gracias”.*

**Dedicatoria.**

**A mi madre, mi padre y hermanos: Nancy, Cesar y Dandy.**

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
1.1. ABSTRACT.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1. Tricomonosis.....	5
2.2. Tratamiento.....	6
2.3. Epidemiología.....	7
2.4. El agente etiológico: <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	8
2.5. Expresión génica en <i>T. vaginalis</i> .....	24
2.6. Antecedentes particulares.....	25
2.7. Efecto del hierro en <i>T. vaginalis</i> .....	36
2.8. Expresión génica regulada por hierro en <i>T. vaginalis</i> .....	37
3. JUSTIFICACIÓN.....	41
4. HIPÓTESIS.....	41
5. OBJETIVO GENERAL.....	41
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	41
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	42
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
8.1. Cultivo de <i>T. vaginalis</i> y células HeLa.....	45
8.2. Extractos citoplásmicos de células HeLa.....	45
8.3. Extractos citoplásmicos de <i>T. vaginalis</i> .....	46
8.4. Fraccionamiento celular de <i>T. vaginalis</i> .....	46
8.5. Extracción de DNA genómico (DNAg) de <i>T. vaginalis</i> .....	47
8.6. Extracción de RNA total de <i>T. vaginalis</i> .....	47
8.7. Ensayo de RT-PCR semi-cuantitativo.....	48
8.8. Ensayo de PCR en tiempo real (qRT-PCR).....	49
8.9. Análisis estadístico.....	50
8.10. Preparación de células competentes <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ , <i>E. coli</i> BL-21 (DE3) pLysS o <i>E. coli</i> Rosetta-gami™.....	50
8.11. Análisis <i>in silico</i> del gen <i>tvactn3</i> .....	51

8.12.	<i>Clonación y expresión del gen tvactn3 y sus dominios, en un sistema procarionte.</i>	51
8.13.	<i>Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina (Miniprep).</i>	53
8.14.	<i>Secuenciación de DNA.</i>	53
8.15.	<i>Análisis de secuencias.</i>	54
8.16.	<i>Inducción y expresión de las proteínas recombinantes: TvACTN3r, Dlr, Dllr y Dlllr.</i>	54
8.17.	<i>Purificación de las proteínas recombinantes por afinidad a Níquel.</i>	56
8.18.	<i>Purificación de las proteínas recombinantes por afinidad a GST.</i>	56
8.19.	<i>Obtención de anticuerpos policlonales anti-<math>\alpha</math>-actinina recombinante (<math>\alpha</math>-TvACTN3r, <math>\alpha</math>-Dlr, <math>\alpha</math>-Dllr, <math>\alpha</math>-Dlllr), <math>\alpha</math>-hIRP-1r y <math>\alpha</math>-GSTr en conejos.</i>	57
8.20.	<i>Obtención de anticuerpos policlonales <math>\alpha</math>-GSTr recombinante en ratón.</i>	58
8.21.	<i>Anticuerpos.</i>	58
8.22.	<i>Electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa.</i>	59
8.23.	<i>Ensayo de Western blot (WB).</i>	60
8.24.	<i>Ensayo de inmunofluorescencia indirecta.</i>	61
8.25.	<i>Transcripción "in vitro" de secuencias IRE.</i>	61
8.26.	<i>Ensayos de retardo con RNA (REMSA), super-retardo y competencia.</i>	63
8.27.	<i>Ensayo de Northwestern blot (NWB).</i>	64
8.28.	<i>Ensayo de entrecruzamiento por luz ultravioleta (UV).</i>	64
8.29.	<i>Identificación de proteínas de unión a RNA en T. vaginalis.</i>	65
9.	<b>RESULTADOS.</b>	66
9.1.	<i>Proteínas citoplásmicas de T. vaginalis crecidas en bajas concentraciones de hierro interaccionan específicamente con estructuras IREs de RNAm.</i>	66
9.2.	<i>Estructuras tallo-burbuja de mRNA, IRE-fer e IRE-tvcp4, interaccionan específicamente con al menos cuatro bandas de proteínas citoplásmicas de T. vaginalis.</i>	67

9.3. Proteínas $\alpha$ -actininas de <i>T. vaginalis</i> están presentes en los complejos RNA-proteína formados entre los extractos citoplásmicos y las sondas de RNA de humanos (IRE-fer) y de tricomonas (IRE-tvcp4).....	68
9.4. Expresión de los genes: <i>tvactn1</i> , <i>tvactn2</i> , <i>tvactn3</i> , <i>tvactn4</i> y <i>tvactn5</i> de <i>T. vaginalis</i> en diferentes concentraciones de hierro. ....	79
9.5. Búsqueda y análisis de ESTs para los genes <i>tvactn1</i> , <i>tvactn2</i> , <i>tvactn3</i> , <i>tvactn4</i> y <i>tvactn5</i> de <i>T. vaginalis</i> .....	80
9.6. Proteínas $\alpha$ -actininas reportadas en el genoma de <i>T. vaginalis</i> .....	90
9.7. Probables Dominios funcionales presentes en las TvACTNs de <i>T. vaginalis</i> . ....	90
9.8. Análisis <i>in silico</i> del gen <i>tvactn3</i> de <i>T. vaginalis</i> .....	91
9.8.1. Regiones regulatorias 5'.....	91
9.8.2. Regiones regulatorias 3'.....	92
9.8.3. Dominios funcionales en TvACTN3. ....	92
9.9. Clonación del gen completo de la TvACTN3.....	100
9.10. Subclonación, expresión y purificación de la proteína recombinante TvACTN3r. ....	109
9.11. Inducción, expresión y purificación de la hIRP-1r recombinante.....	109
9.12. Obtención de anticuerpos policlonales en contra de las proteínas recombinantes TvACTN3r y h-IRP-1r.....	115
9.13. Reconocimiento cruzado de las proteínas recombinantes TvACTN3r y hIRP-1r.....	115
9.14. Clonación de los fragmentos correspondientes a los Dominios: I, II y III de la TvACTN3.....	120
9.15. Caracterización de clonas candidato (DI, DII y DIII).....	120
9.16. Subclonación y expresión de las proteínas recombinantes correspondientes a los Dominios: I, II y III de la TvACTN3. ....	121
9.17. Producción de anticuerpos policlonales y reconocimiento específico de los dominios (DIr, DIIr y DIIIr) de la proteína TvACTN3r y proteínas citoplásmicas de <i>T. vaginalis</i> por anticuerpos específicos. ....	121

9.18. Los anticuerpos policlonales $\alpha$ -TvACTN3r, $\alpha$ -Dlr, $\alpha$ -DIIr y $\alpha$ -DIIIr super-retardan el complejo I ribonucleoproteico.....	131
9.19. Identificación del posible Dominio de unión a RNA de la TvACTN3r.	132
9.20. El Dominio II de la TvACTN3r presenta posibles dominios de unión a RNA que podrían ser utilizados para la interacción con el RNA (IRE). .....	133
9.21. Localización de la proteína nativa TvACTN3 en <i>T. vaginalis</i> . .....	149
9.22. El hierro afecta la redistribución de TvACTN3 en el parásito. ....	149
10. DISCUSIÓN. ....	160
11. CONCLUSIONES. ....	172
12. PERSPECTIVAS. ....	172
13. BIBLIOGRAFÍA. ....	174
14. APÉNDICE.....	192
15. ANEXOS.....	203
15.1.Artículos.....	203

## LISTA DE FIGURAS.

Fig. 1. Incidencia de tricomonosis en México 2000-2012.....	8
Fig. 2. IRP-1/2 en concentraciones bajas y altas de hierro [1].....	30
Fig. 3. Modelo de regulación de IRP-1 [2].....	31
Fig. 4. Estructura IRE de la ferritina humana (IRE-fer). ....	33
Fig. 5. Proteínas citoplásmicas de células HeLa y <i>T. vaginalis</i> se unen a la estructura IRE-tvcp4 de <i>T. vaginalis</i> . ....	40
Fig. 6. Patrón de proteínas citoplásmicas de <i>T. vaginalis</i> y de células HeLa. ....	69
Fig. 7. Presencia de proteínas de unión a RNA en <i>T. vaginalis</i> crecidas en bajas concentraciones de hierro. ....	71
Fig. 8. Detección de proteínas citoplásmicas de <i>T. vaginalis</i> que interaccionan específicamente con las sondas IRE-fer e IRE-tvcp4, de mRNA.....	73
Fig. 9. Detección de proteínas $\alpha$ -actininas (TvACTN) mediante WB. ....	75
Fig. 10. Las proteínas $\alpha$ -actininas de <i>T. vaginalis</i> están presentes en los complejos RNA-proteína (RNP). ....	77
Fig. 11. Análisis mediante RT-PCR semi-cuantitativa del efecto del hierro en la transcripción de los genes que codifican a las cinco $\alpha$ -actininas ( <i>tvactn</i> ) de <i>T. vaginalis</i> . ....	83
Fig. 12. Análisis densitométrico del ensayo de RT-PCR semi-cuantitativa del efecto del hierro en la transcripción de los genes que codifican a las $\alpha$ -actininas ( <i>tvactn</i> ) de <i>T. vaginalis</i> . ....	85
Fig. 13. Análisis mediante qRT-PCR del efecto del hierro en la transcripción de los genes que codifican a las $\alpha$ -actininas ( <i>tvactn</i> ) de <i>T. vaginalis</i> . ....	87
Fig. 14. Alineamiento múltiple entre las secuencias deducidas de aminoácidos de las cinco $\alpha$ -actininas reportadas en el genoma del aislado G3 ( <a href="http://www.trichdb.org">www.trichdb.org</a> ) y la secuencia de TvACTN3 del aislado CNCD 147 de <i>T. vaginalis</i> . ....	95

<b>Fig. 15. Probables dominios funcionales presentes en las <math>\alpha</math>-actininas de <i>T. vaginalis</i>.</b> .....	<b>96</b>
<b>Fig. 16. Mapa genómico del gen <i>tvactn3</i> y secuencias regulatorias.</b> .....	<b>98</b>
<b>Fig. 17. Amplificación, clonación y secuenciación del gen <i>tvactn3</i>.</b> .....	<b>101</b>
<b>Fig. 18. Secuencia de nucleótidos del gen <i>tvactn3</i>.</b> .....	<b>103</b>
<b>Fig. 19. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína TvACTN3.</b> .....	<b>107</b>
<b>Fig. 20. Expresión y purificación de la proteína recombinante TvACTN3r por cromatografía de afinidad a níquel.</b> .....	<b>111</b>
<b>Fig. 21. Expresión y purificación de la proteína recombinante hIRP-1r.</b> .....	<b>113</b>
<b>Fig. 22. Reactividad cruzada entre los anticuerpos: <math>\alpha</math>-TvACTN y <math>\alpha</math>-hIRP-1.</b> .....	<b>116</b>
<b>Fig. 23. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína h-IRP-1 de humanos y la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína TvACTN3.</b> .....	<b>118</b>
<b>Fig. 24. Amplificación por PCR de los fragmentos de DNA que codifican a los dominios: DI (873 pb), DII (1713 pb) y DIII (1407 pb) de TvACTN3.</b> .....	<b>123</b>
<b>Fig. 25. Caracterización de la clona 6 (DI), clona 2 (DII) y clona 16 (DIII) mediante PCR en colonia y doble restricción enzimática.</b> .....	<b>125</b>
<b>Fig. 26. Expresión de las proteínas recombinantes del Dominio I (35 kDa), Dominio II (64 kDa) y Dominio III (53 kDa) de TvACTN3. Ensayos de WB con los anticuerpos <math>\alpha</math>-histidinas y <math>\alpha</math>-TvACTN3r.</b> .....	<b>127</b>
<b>Fig. 27. Producción de anticuerpos policlonales y reconocimiento de los dominios (DIr, DIIr, DIIIr) de TvACTN3r y proteínas citoplásmicas de <i>T. vaginalis</i> por anticuerpos específicos.</b> .....	<b>129</b>
<b>Fig. 28. Interacción entre TvACTN3r y la estructura IRE-tvcp4 mediante REMSA.</b> .....	<b>135</b>
<b>Fig. 29. Interacción entre TvACTN3r y la estructura IRE-fer de humano mediante REMSA.</b> .....	<b>137</b>
<b>Fig. 30. Interacción entre TvACTN3r y las estructuras IRE-tvcp4 e IRE-fer por ensayos de Northwestern blot.</b> .....	<b>139</b>

<b>Fig. 31. Interacción entre TvACTN3r y las estructuras IRE-tvcp4 e IRE-fer por ensayos de entrecruzamiento por luz UV.....</b>	<b>141</b>
<b>Fig. 32. Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de las proteínas TvACTN3 y TvACTN2 de <i>T. vaginalis</i>.....</b>	<b>143</b>
<b>Fig. 33. Identificación de los posibles motivos de interacción RNA-proteína en las proteínas TvACTN2 y TvACTN3 mediante análisis in silico. ....</b>	<b>146</b>
<b>Fig. 34. Detección de TvACTN3 por fraccionamiento de <i>T. vaginalis</i> crecidas en diferentes concentraciones de hierro (0, 20 y 250 <math>\mu</math>M).....</b>	<b>152</b>
<b>Fig. 35. Localización citoplásmica de la TvACTN3 por inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal.....</b>	<b>154</b>
<b>Fig. 36. Localización perinuclear de TvACTN3 por inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal.....</b>	<b>156</b>
<b>Fig. 37. Localización citoplásmica y re-localización a los pseudópodos de TvACTN3 por inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal. ....</b>	<b>158</b>
<b>Fig. 38. Plegamiento de la región amino de las proteínas IRP-1 de humano y TvACTN3 de <i>T. vaginalis</i>.....</b>	<b>163</b>
<b>Fig. 39. Modelo hipotético de la regulación post-transcripcional por hierro por un sistema paralelo tipo IRE/IRP en <i>T. vaginalis</i>, utilizando el gen <i>tvcp4</i> como modelo. ....</b>	<b>168</b>

## LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Homólogos a IRP en diferentes organismos. ....	32
Tabla 2. Proteínas reguladas positivamente en altas concentraciones de hierro.....	35
Tabla 3. Genes y proteínas reguladas negativamente en bajas concentraciones de hierro. ....	36
Tabla 4. Oligonucleótidos usados en los ensayos de PCR, RT-PCR, qRT-PCR y oligonucleótidos para obtener las secuencias IRE.....	81
Tabla 5. Número de ESTs correspondientes a los <i>genes tvactn1, tvactn2, tvactn3, tvactn4 y tvactn5</i> de <i>T. vaginalis</i> .....	89
Tabla 6. Cambios en la secuencia de nucleótidos del gen <i>tvactn3</i> entre el aislado G3 y el aislado CNCD147 de <i>T. vaginalis</i> y su efecto en la secuencia de aminoácidos de TvACTN3. ....	106
Tabla 7. Identificación de posibles motivos de interacción RNA-proteína en la proteína TvACTN3.....	148
Tabla 8. Características funcionales de las proteínas TvACTN3 de tricomonas y IRP de humanos. ....	171

## **GLOSARIO DE ABREVIATURAS.**

<i>aa</i>	<i>Aminoácidos.</i>
<i>Ac</i>	<i>Anticuerpo.</i>
<i>AP</i>	<i>Proteína adhesina.</i>
<i>AC</i>	<i>Amortiguador de colecta.</i>
<i>AE</i>	<i>Amortiguador de extracción.</i>
<i>AL</i>	<i>Amortiguador de lavado.</i>
<i>AM1x</i>	<i>Amortiguador de muestra 1x.</i>
<i>AM2x</i>	<i>Amortiguador de muestra 2x.</i>
<i>AU</i>	<i>Amortiguador de unión.</i>
<i>cDNA</i>	<i>DNA complementario.</i>
<i>CBB</i>	<i>Azul Brillante de Coomassie.</i>
<i>CNCD</i>	<i>Centro Nacional de Clínicas de Displasias del Hospital General de México.</i>
<i>COO-</i>	<i>Carboxilo terminal.</i>
<i>CPs</i>	<i>Cisteína proteinasas.</i>
<i>DEPC</i>	<i>Diethylpirocarbonato.</i>
<i>dNTPs</i>	<i>Deoxinucleótidos trifosfatos.</i>
<i>EDTA</i>	<i>Ácido etilendiaminotetraacético.</i>
<i>EMSA</i>	<i>Ensayo de retardo.</i>
<i>HeLa</i>	<i>Línea celular humana de cáncer cervical.</i>
<i>Inr</i>	<i>Elemento iniciador de la transcripción.</i>
<i>ITS</i>	<i>Infección de Transmisión Sexual.</i>
<i>IRE</i>	<i>Elemento de respuesta al hierro.</i>
<i>IRP</i>	<i>Proteína reguladora de hierro.</i>
<i>mRNA</i>	<i>RNA mensajero.</i>
<i>NC</i>	<i>Nitrocelulosa.</i>
<i>NWB</i>	<i>Northwestern blot.</i>
<i>ORF</i>	<i>Marco abierto de lectura.</i>
<i>PAGE</i>	<i>Electroforesis en geles de poliacrilamida.</i>

PBS	<i>Solución amortiguadora de fosfatos salina.</i>
PBS-T	<i>PBS-Tween 20</i>
PCR	<i>Reacción en cadena de la polimerasa.</i>
PFO	<i>Piruvato ferredoxín oxidoreductasa.</i>
pI	<i>Punto isoeléctrico.</i>
Poli(A)	<i>Cola de poliadeninas.</i>
REMSA	<i>Ensayo de retardo de RNA.</i>
RNA pol II	<i>RNA polimerasa II.</i>
SDS	<i>Dodecil sulfato de sodio.</i>
SPI	<i>Suero Preimmune.</i>
SSC	<i>Amortiguador salino y citrato de sodio.</i>
SN	<i>Sobrenadante.</i>
TAE	<i>Amortiguador de Tris-acetato.</i>
TB	<i>Caldo nutritivo ("Terrific broth").</i>
TE	<i>Amortiguador de Tris-EDTA.</i>
tvactn1	<i>Gen que codifica para la <math>\alpha</math>-actinina 1 de <i>T. vaginalis</i>.</i>
tvactn2	<i>Gen que codifica para la <math>\alpha</math>-actinina 2 de <i>T. vaginalis</i>.</i>
tvactn3	<i>Gen que codifica para la <math>\alpha</math>-actinina 3 de <i>T. vaginalis</i>.</i>
tvactn4	<i>Gen que codifica para la <math>\alpha</math>-actinina 4 de <i>T. vaginalis</i>.</i>
tvactn5	<i>Gen que codifica para la <math>\alpha</math>-actinina 5 de <i>T. vaginalis</i>.</i>
tvcp4	<i>Gen que codifica para la cisteín proteinasa TvCP4 de <i>T. vaginalis</i>.</i>
tvcp12	<i>Gen que codifica para la cisteín proteinasa TvCP12 de <i>T. vaginalis</i>.</i>
tvhsp70	<i>Gen que codifica para la proteína de choque térmico TvHSP70 de <i>T. vaginalis</i>.</i>
tvpfo a	<i>Gen que codifica para la proteína piruvato ferredoxín oxidoreductasa a TvPFO-A de <i>T. vaginalis</i>.</i>
TYM	<i>Medio de tripton-extracto de levadura y maltosa.</i>
UTR	<i>Región no traducida.</i>
WB	<i>Western blot.</i>
$\beta$ -ME	<i>Beta-mercaptoetanol.</i>
1° Ac	<i>Anticuerpo primario.</i>

*2° Ac            Anticuerpo secundario.*  
*2-DE            Electroforesis en Doble dimensión.*  
*[Fe<sup>2+</sup>]           Concentración de hierro.*

## 1. RESUMEN.

*Trichomonas vaginalis* es el protozoo parásito responsable de la tricomonosis, la infección de transmisión sexual no viral más común en el mundo. Este protozoo tiene una alta dependencia a hierro. El hierro regula algunos de sus factores de virulencia a nivel transcripcional y post-transcripcional por mecanismos poco estudiados. En *T. vaginalis* dos estructuras tallo-burbuja parecidas a elementos de respuesta a hierro atípicos (IRE-like) se identificaron y caracterizaron en los mRNA de TvCP4 y TvCP12; dos cisteína proteinasas que se regulan diferencialmente por hierro. Aunque la aconitasa y proteínas reguladoras del hierro (IRPs) no están presentes en *T. vaginalis*, se ha observado que proteínas citoplásmicas de este parásito pueden unirse a IREs de mamíferos. Estos datos sugieren la existencia en *T. vaginalis* de un mecanismo de regulación post-transcripcional alternativo al sistema IRE/IRP de mamíferos. Recientemente, se identificaron dos proteínas  $\alpha$ -actininas de 135 y 110 kDa, una proteína de choque térmico TvHSP70 y una de las actinas de 45 kDa que se unen específicamente a estructuras IRE de tricomonas y de humano. El objetivo de este estudio fue confirmar la presencia de la  $\alpha$ -actinina de 135 kDa en los complejos ribonucleoproteicos entre el IRE-tvcp4 y proteínas de tricomonas y caracterizarla como una proteína de unión a estructuras tallo-burbuja de RNA (IRE-tvcp4 e IRE-fer) que podría participar en un mecanismo de regulación post-transcripcional por hierro mediado por interacciones RNA-proteína. Para investigar si la  $\alpha$ -actinina de 135 kDa tiene la capacidad de unirse a RNA, se clonaron y se expresaron los fragmentos correspondientes al gen tvactn3 que codifica para la proteína completa de 135 kDa (TvACTN3r), así como sus dominios: Dominio de unión a actina (DIr, 35 kDa), Dominio central "Rod" (DIIr, 64 kDa) y Dominio "EF-Hand" (DIIII, 53 kDa) y se obtuvieron anticuerpos policlonales en contra de estas proteínas recombinantes. Mediante fraccionamiento celular y microscopía confocal observamos la localización citoplásmica de la proteína nativa TvACTN3. Finalmente, mediante ensayos de super-retardo, Northwestern blot y entrecruzamiento por luz UV observamos que

*TvACTN3r a través del Dominio II interacciona con las estructuras IRE de tricomonas y de humano. Los resultados obtenidos muestran que la TvACTN3 es una proteína citoplásmica que se une a actina o a las estructuras tallo-burbuja de RNA dependiendo de las concentraciones de hierro. Por lo tanto, la TvACTN3 es otra proteína multifuncional de T. vaginalis que podría participar en la regulación de la expresión de genes mediada por hierro a través de un mecanismo post-transcripcional paralelo al sistema tipo IRE/IRP.*

## 1.1. ABSTRACT.

*Trichomonas vaginalis* is a protozoan parasite responsible of trichomonosis, one of the most common non-viral sexually transmitted disease in the world. This parasite has high iron-dependency. Iron regulates some of its virulence factors at the transcriptional and post-transcriptional levels by poorly known mechanisms. In *T. vaginalis* two atypical Iron-Responsive Element (IRE-like) mRNA stem-loop structures were identified and characterized in the mRNA of TvCP4 and TvCP12; two cysteine proteinases differentially regulated by iron. Although aconitase and iron regulatory proteins (IRP) are not present in *T. vaginalis*, some cytoplasmic proteins can bind to mammalian and trichomonad IREs. Together, these data suggest the existence in *T. vaginalis* of an iron post-transcriptional mechanism alternative to the IRE/IRP system of mammals. Recently, two  $\alpha$ -actinin proteins of 135 and 110 kDa, a 70 kDa heat-shock protein, and a 45 kDa actin protein that specifically bind to trichomonad and human IREs were identified. The goal of this study was to confirm the presence of the 135 kDa protein band in the RNA-protein complexes formed between the IRE-tvcp4 and trichomonad proteins and to characterize it as one of the RNA-binding proteins that interact with RNA stem-loop structures (IRE-tvcp4 and IRE-fer) may participate in a post-transcriptional iron regulatory mechanism mediated by RNA-protein interactions in *T. vaginalis*. To investigate whether the 135 kDa  $\alpha$ -actinin has RNA-binding capability, we cloned and expressed the complete tvactn3 gene encoding a 135 kDa protein  $\alpha$ -actinin (TvACTN3r) and its domains: Actin-binding Domain (DIr, 35 kDa), Central Rod Domain (DIIr, 64 kDa) and EF-hand Domain (DIIIr, 53 kDa), and obtained polyclonal antibodies against each recombinant protein. By cellular fractionation and confocal microscopy the cytoplasmic localization of the native TvACTN3 was observed. Finally, super-shift, Northwestern blot and UV-crosslinking assays showed that TvACTN3r and its Domain II interact with trichomonad and human RNA stem-loop structures. These results show that the TvACTN3 is a cytoplasmic protein that binds to actin or to RNA hairpin structures, depending of the iron concentrations. Thus, TvACTN3 is another moonlighting protein of *T. vaginalis*

*that may participate in gene expression regulation by iron through a post-transcriptional mechanism parallel to the IRE/IRP system.*

## **2. INTRODUCCIÓN.**

*Trichomonas vaginalis* es el protozoario flagelado anaerobio responsable de la tricomonosis humana; infecta la cavidad vaginal y uretral, donde encuentra un ambiente hostil para su permanencia y reproducción, ya que las condiciones favorables para la colonización son 37 °C y un pH de 6.0 [1].

### **2.1. Tricomonosis.**

*La tricomonosis es una infección de transmisión sexual (ITS) crónica no mortal del humano causada por el protozoario parásito T. vaginalis. En la mujer la tricomonosis se ha implicado como causa de resultados adversos en el embarazo (ruptura prematura de las membranas, parto prematuro y nacimiento de infantes con bajo peso). También se ha asociado a mayor riesgo en la infección y transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) [2-8], y la susceptibilidad a adquirir VIH incrementa hasta cinco veces [9]. Además, se ha establecido una relación entre T. vaginalis y el cáncer cérvico-uterino [10,11], el cáncer de próstata [12,13], la enfermedad inflamatoria pélvica atípica (PID) [14-16] y la infertilidad [17].*

*Las principales manifestaciones clínicas de la infección por tricomonas en mujeres son: vaginitis, dolor abdominal, prurito vulvar, secreción espumosa maloliente con leucorrea, colpitis macular “cérvix de fresa”, eritema vulvar y vaginal [4,5] y dispareunia [18]. Estos síntomas se presentan en el 50% de las mujeres infectadas y el resto presentan síntomas leves, que pueden variar cualitativa y cuantitativamente durante el ciclo menstrual, empeorando durante la menstruación y el embarazo [5]. En el hombre, la infección es primariamente asintomática pero algunas veces puede ocasionar disuria, prurito, uretritis con o sin secreción purulenta (uretritis no gonocócica), prostatitis y epididimitis [4,5,19]. Sin embargo, puede ocasionar infertilidad y predisponer al cáncer de prostata*

[12,13,20,21]. Estudios *in vitro* demostraron que factores solubles o metabolitos del parásito disminuyen la movilidad y viabilidad de los espermatozoides [20,22].

También, se ha reportado la presencia de *T. vaginalis* en el tracto urinario [23], tracto respiratorio y vías pulmonares en recién nacidos de madres infectadas con *T. vaginalis* [24-28], así como en personas adultas inmunocomprometidas y positivas a VIH [23,27,29]. A pesar de que los casos de tricomonosis muestran un comportamiento ascendente y de que existen complicaciones graves directamente relacionadas con la infección por *T. vaginalis*, aun no se han implementado las medidas adecuadas para la prevención y control de las tricomonosis en el mundo, incluyendo México.

## **2.2. Tratamiento.**

Existen tratamientos para la tricomonosis basados en el uso de metronidazol y derivados de los 5-nitroimidazoles como el tinidazol. Aunque se ha presentado resistencia a la droga (4% de resistencia en cultivos *in vitro* de muestras de cultivo vaginales) [30], el metronidazol es el único fármaco disponible y aprobado para el tratamiento de la tricomonosis. El régimen recomendado y que ha dado resultados de curación de entre un 90 y 95%, es el de una sola dosis de 2 g vía oral ó el de 2 dosis diarias de 5 mg durante 7 días [31]. En parásitos resistentes, el incremento en la concentración de la droga y extender el tratamiento, en ocasiones ha tenido resultado [14,32,33].

Existen algunas consideraciones especiales en el tratamiento de la tricomonosis, una de ellas es que pueden existir pacientes con alergia al metronidazol [34]. Otro caso es el de las mujeres embarazadas a quienes no se les debe administrar metronidazol debido al posible efecto teratogénico o mutagénico que puede causar este fármaco en el feto. También se ha estimado que cerca del 5% de los aislados clínicos de *T. vaginalis* presentan cierto grado de resistencia a metronidazol [35]. Y al parecer la ocurrencia de la resistencia a este fármaco va

en aumento [36], por lo que se requiere buscar estrategias alternas de quimioterapia.

### **2.3. Epidemiología**

*La tricomonosis es la ITS no viral más común en el mundo con un número estimado de 170 millones de casos nuevos cada año [5,37-40]. En México existen muy pocos antecedentes de estudios que indiquen la prevalencia de la tricomonosis. Según el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud (SS) en el 2012 se reportaron 109,976 nuevos casos de esta infección (Boletín de Epidemiología, semana 1, 2013) (Figura 1). Hasta la semana 45 del 2013 se han registrado 86,647 nuevos casos, de los cuales 84,293 son mujeres y 2,354 son hombres. En esta misma semana en el 2012 se reportaron 96,545 casos [41].*

*En general, estas cifras están subestimadas, debido a que a diferencia de otras ITSs como el SIDA, sífilis y gonorrea, esta infección no es parte de la vigilancia epidemiológica que realizan las Secretarías o Ministerios de Salud de cada país. Aunado a ello, existe un elevado número de casos asintomáticos que no son tratados. Por ejemplo, en Estados Unidos se reportan anualmente más de 8 millones de nuevos casos, con una tasa promedio del 50% de asintomáticos [5]. La importancia de conocer al grupo de individuos asintomáticos radica en que ellos actúan como portadores “sanos” que pueden transmitir al parásito a otras personas por contacto sexual. En México se estima que la tricomonosis ocupa el primer lugar en cuanto al número de casos con respecto a otras ITS como la infección gonocócica, sífilis y candidiasis [41]. Esta infección se encuentra distribuida principalmente en la zona centro y del sur del país, el Estado de México, Puebla y Veracruz registran los más altos número de casos con un porcentaje de 10.99%, 10.68% y 12.58%, respectivamente (con un número total de nuevos casos de 23,204), a diferencia de la zona norte, como en Baja*

California Sur que presenta 0.24%, datos reportados por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la SS en el 2013 [41].



**Fig. 1. Incidencia de tricomonosis en México 2000-2012.**

#### **2.4. El agente etiológico: *Trichomonas vaginalis*.**

##### **2.4.1. Ciclo de vida.**

*T. vaginalis* es un parásito unicelular cosmopolita que tiene al humano como único huésped y que infecta el tracto genitourinario. A diferencia de otros parásitos, las tricomonas solo presentan la forma móvil de trofozoito la cual es ovoide y carece de la fase de quiste. Este parásito se multiplica en forma asexual por fisión binaria longitudinal y se transmite de persona a persona a través del contacto sexual [5,42].

Este parásito se adhiere a la mucosa de la vagina, en forma ameboide y al exocérvix donde permanece a pesar de las condiciones adversas (pH ácido,

*cambios hormonales cíclicos, descamación del epitelio, presencia de lactobacilos y de anticuerpos anti-tricomonas). Durante la infección, la tricomona se alimenta de componentes solubles, células del huésped, bacterias y eritrocitos [43,44]. T. vaginalis vive en la superficie de los epitelios que coloniza, ya que no es un parásito invasivo, se adhiere primeramente a la mucina y después disuelve el moco cervical, lo cual hace posible que los parásitos penetren hacia el tracto urogenital superior causando lesiones inflamatorias y hemorrágicas en el cuello del útero y en las paredes de la vagina [44].*

#### **2.4.2. Morfología.**

*T. vaginalis es un protozoo flagelado microaerófilo, mide de 7-30 µm de longitud y de 5-15 µm de diámetro, su apariencia varía de acuerdo a las condiciones físico-químicas del medio donde se encuentre [5]. En las secreciones o medios de cultivo líquido presenta una forma ovoide o piriforme, pero tiene la capacidad de cambiar a una forma ameboide cuando entra en contacto con medios semi-sólidos o ciertos tipos celulares formando lamelipodios (dedos) y pseudópodos que se interdigitan en diferentes sitios con la membrana plasmática de la célula blanco [45].*

*El trofozoito se caracteriza por presentar cinco flagelos, cuatro flagelos dispuestos en la parte anterior y un quinto unido a una membrana ondulante, que no llega a la parte posterior del cuerpo donde se encuentra el axostilo. Los flagelos libres y la membrana ondulante le confieren al parásito la motilidad espasmódica característica. En condiciones medio-ambientales desfavorables, el parásito puede internalizar los flagelos y el axostilo adoptando una forma semi-redondeada denominada pseudoquiste [5,46].*

*T. vaginalis está rodeada por una membrana plasmática de 9 a 10 nm de grosor muy plástica. La composición lipídica de ésta es de tres tipos de lípidos: 1) neutros (30%), 2) fosfolípidos (65%) y 3) glicolípidos (5%).*

*Con base en la secuencia del genoma se han identificado 8 familias de genes que codifican para proteínas, entre las cuales alrededor de 800 son candidatas a proteínas de superficie [47]. Sin embargo, ninguna de las cuales codifica para las 5 adhesinas identificadas en la superficie del parásito y que participan en la adherencia a las células del epitelio vaginal [48].*

*La membrana está rodeada por un glicocalix constituido por glicoconjugados; cerca del 70 al 80% son del tipo de las glicoproteínas con azúcares N-ligados a asparaginas y el resto son glicolípidos. El principal glicoconjugado es el lipofosfoglicano (LPG,  $3 \times 10^6$  copias), el cual participa en la adherencia a células del epitelio vaginal [47,49,50]. *T. vaginalis* también expresa polímeros de quitina los cuales se piensa que le confieren integridad estructural y provee protección por periodos cortos fuera del ambiente urogenital humano. Además, se ha sugerido su participación como receptor en la superficie para las lectinas de la célula huésped [51].*

*T. vaginalis* presenta un núcleo grande, ovalado, excéntrico y localizado en el extremo anterior. El cariotipo de *T. vaginalis* ha sido descrito como diploide con 6 pares de cromosomas [52]. Su reproducción es por fisión binaria longitudinal, sin desaparición de membrana nuclear (criptopleuromitosis) [53], aunque en su genoma se han encontrado genes que codifican para proteínas involucradas en la meiosis [54].

*Su citoplasma es rico en carbohidratos, con gran número de vacuolas (incluyendo liposomas), también posee un aparato de Golgi, lisosomas, retículo endoplásmico liso y rugoso, ribosomas, acumulación de gránulos de glucógeno, vesículas pinocíticas y vacuolas alimenticias [55].*

*Una característica de *T. vaginalis* es que carece de mitocondrias y peroxisomas, pero tiene hidrogenosomas como organelos generadores de energía. Los hidrogenosomas son organelos sin DNA, los cuales producen hidrógeno*

molecular, al cual deben su nombre, además de que presentan la enzima piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFO), reemplazando al sistema enzimático piruvato deshidrogenasa de organismos aerobios [56]. Para las tricomonas, los carbohidratos son la principal fuente de energía, los requerimientos energéticos los provee la transformación de glucosa a glicerol y a succinato en el citoplasma, seguido por la conversión de piruvato y malato a hidrógeno y acetato, reacciones que ocurren en los hidrogenosomas [55,57].

### **2.4.3. Citoesqueleto de *T. vaginalis*.**

El citoesqueleto de *T. vaginalis* es un complicado sistema de microtúbulos clasificados de acuerdo a su posición: axostilares, flagelares o mitóticos. Estos forman una serie de especializaciones como la costa, la pelta y el axostilo que atraviesa el parásito longitudinalmente y termina en una espícula. Los microtúbulos están compuestos por polímeros de alfa-beta tubulinas. En el genoma se han descrito la mayoría de los componentes del citoesqueleto que se relacionan o interaccionan con tubulina y actina, a excepción de los homólogos a miosina [47,49].

La actina es una de las proteínas más abundantes del parásito, constituye cerca del 10% de las proteínas totales de *T. vaginalis*; se concentra principalmente en la región cortical en donde se emiten los pseudópodos. Esta proteína presenta propiedades bioquímicas y biofísicas diferentes a las de las actinas musculares. Dentro del genoma de *T. vaginalis* se han descrito un gran número de proteínas que interaccionan con la actina, pero sólo algunas se han demostrado experimentalmente. Entre estas se encuentra la coronina, la cual se encuentra unida a la actina polimerizada (F-actina) existente en el parásito durante la polimerización de la actina [58].

Además, en el genoma de *T. vaginalis* se han reportado cinco genes que codifican para proteínas homólogas a  $\alpha$ -actininas con diferentes tamaños (1271,

1137, 1129, 931 y 609 aa) [47], con puntos isoeléctrico y pesos moleculares (pI/PM) teóricos esperados de 5.27/144.32, 5.24/128.72, 4.90/127.87, 4.93/106.25 y 4.83/68.99 kDa, respectivamente [59], de las cuales, la proteína de 931 aa se encuentra caracterizada, como una proteína de 110 kDa y un pI de 5.5), que presenta 3 dominios: un dominio de unión a actina en la región amino-terminal conectada por un dominio central “Rod”, compuesto de repetidos de espectrina (SRs) (región central rica en estructuras  $\alpha$ -hélices) y un dominio de unión a calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) denominado “brazos EF” en el extremo carboxilo-terminal [60-62]. Sin embargo, a pesar de que las regiones amino- y carboxilo-terminal son muy conservadas en comparación a otras proteínas  $\alpha$ -actininas, la región central presenta una distribución de cinco SRs por lo que se denominó como una  $\alpha$ -actinina atípica. En *T. vaginalis* la secuencia de los SRs no muestra homología con los dominios “Rod” de otras  $\alpha$ -actininas, a excepción del primer SR. Por lo que se postuló que los cuatro SRs no conservados en *T. vaginalis* son resultado de eventos de duplicación intragénica [61].

#### **2.4.4. Mecanismos y factores de virulencia.**

La patogénesis de *T. vaginalis* es un proceso multifactorial que comienza con la unión y degradación de la mucina del moco vaginal y la matriz extracelular (ECM), antes de la adhesión del parásito a la célula huésped (células epiteliales y eritrocitos) [63-68], seguido por la producción de un efecto citotóxico sobre la célula blanco [68-70] que finaliza con la fagocitosis de la misma [71,72]. Sin embargo, eventos como la hemólisis [72,73], la transducción de señales transmembranales al contacto del parásito con la célula blanco [45], la secreción de proteinasas [74], la evasión de la respuesta inmune del huésped [75], la inducción de la apoptosis de la célula blanco [76,77] y la adquisición de nutrientes [67], desempeñan un papel relevante en el mecanismo de agresión de *T. vaginalis* hacia la célula blanco.

#### **2.4.4.1. Citoadherencia de *T. vaginalis*.**

*El mecanismo de citoadherencia de *T. vaginalis* es complejo y multifactorial, involucra la unión específica del parásito a las células epiteliales de la vagina (VECs) y del cérvix (HeLa) o a células prostáticas (DU145), a través de adhesinas y gliconjugados, las cuales interactúan con moléculas de la superficie de la célula hospedera (receptores para proteínas de la matriz extracelular como laminina, fibronectina y colágena) [64,78]. El hierro y el contacto celular regulan positivamente los niveles de adherencia a través de un aumento directo en la síntesis de adhesinas [45,64,65,79-81]; pero también regulan negativamente la expresión de varias proteínas antigénicas tales como P270 [82] (Tabla 3).*

*Al menos cinco adhesinas de diferente peso molecular designadas como AP120, AP65, AP51, AP33 y AP23 localizadas en la superficie de *T. vaginalis* presentan alta afinidad a la superficie de las células HeLa y VECs [64,78,80]. Cuatro de ellas son enzimas metabólicas: Piruvato ferredoxín oxidoreductasa (PFO) [80], enzima málica descarboxilasa [83,84] y las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la succinil coenzima A sintetasa, respectivamente ( $\beta$  y  $\alpha$ -SCS) [85,86]. Estas enzimas residen dentro del hidrogenosoma y están involucradas en la descarboxilación oxidativa del piruvato [87]. Solo la adhesina AP23 no ha sido identificada como enzima metabólica, aunque podría ser la triosafosfato isomerasa que se reportó recientemente [88]. Estas adhesinas se han identificado y caracterizado como proteínas multifuncionales que muestran diferentes funciones dependiendo de su localización la cual es regulada por hierro; actuando como enzimas metabólicas en los hidrogenosomas y el citoplasma o como adhesinas en la superficie del parásito. Estas adhesinas también participan en el mimetismo molecular, un mecanismo involucrado en la evasión de la respuesta inmune, utilizando la homología que existe entre las adhesinas y algunas enzimas metabólicas del huésped [89]. Estas adhesinas también participan como receptores de hemoglobina (Hb) y hemo [90].*

*Estas enzimas hidrogenosomales pierden la actividad enzimática cuando se localizan en la superficie del parásito, para realizar tareas adicionales como factores de virulencia en la adherencia [79,80]. Una explicación para su relocalización a la superficie del parásito es el proceso relacionado a la autofagia hidrogenosomal [79,80], y se muestra al menos para uno de ellos, la adhesina AP120/PFO [79]. Esta conclusión se apoya en la identificación reciente de genes que codifican a varias proteínas ATG conservadas que participan en la autofagia, en el genoma de *T. vaginalis* [47,48].*

*La identificación de proteínas hidrogenosomales como adhesinas ha sido controversial debido a que: a) estas moléculas se detectaron sólo en los hidrogenosomas mediante el uso de diferentes anticuerpos; b) estas moléculas se unen a la superficie de diferentes células, y c) estas enzimas no poseen dominios transmembrana (TMD), que expliquen su posible localización en la superficie. Sin embargo, este comportamiento no es un fenómeno aislado en este protista. Existe mucha información alrededor de este tema en la bibliografía para muchas y diferentes células y parásitos.*

*El término bien conocido de proteínas “multifuncionales” fue calificado inicialmente para dar cabida a las proteínas multifuncionales que incluyen a proteínas de superficie con funciones no-enzimáticas a pesar de ser enzimas del metabolismo de carbohidratos [91]. La multifuncionalidad de estas proteínas se explica como parte de la divergencia funcional, después de la duplicación de genes que pueden dar lugar a dos destinos evolutivos alternativos, una copia adquiere una nueva función (neofuncionalidad) o cada copia adopta parte de las tareas de su gen parental (subfuncionalidad) [92].*

*Además, se han identificado y caracterizado a otras moléculas involucradas en la citoadherencia como la cisteína proteasas (CP) de 30 kDa (TvCP30) [93-95], CP de 62 kDa (TvCP62) [96], CP de tipo legumina TvLEGU-1 [97], lipofosfoglicanos de superficie (TvLPG) [50] y receptores de la matriz extracelular (ECM) en*

procesos de citoadherencia a células VECs y HeLa. La TvCP30 también es una proteína inmunogénica y está presente en secreciones de pacientes con tricomonosis. Además, es activa a pH y temperaturas de la vagina durante la infección. Estas CPs degradan proteínas del ambiente vaginal tales como: colágena (Coll) IV, fibronectina (Fn) y hemoglobina (Hb) [93-95].

Otras proteínas metabólicas con función alternativa no-enzimática en la membrana del parásito son: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (TvGAPDH) y una  $\alpha$ -enolasa (TvENO-1). Estas proteínas también se encuentran en la superficie de *T. vaginalis*, pero sus secuencias carecen de TMD y péptido señal (SP). Estas enzimas presentan actividad de unión a ligando, una función no-enzimática que podría desempeñar un rol importante en la colonización y en la invasión, probablemente bajo distintas condiciones del hospedero. La expresión y localización en la superficie de TvGAPDH, una proteína de unión a fibronectina de *T. vaginalis*, también es regulada positivamente por hierro [89,98]. La TvENO-1 localizada en la superficie se une a plasminógeno y su síntesis se incrementa luego del contacto celular de tricomonas con VECs [89,99]. Tanto la GAPDH como la enolasa, son conocidas por ser proteínas multifuncionales en otros patógenos.

La búsqueda de proteínas de superficie en el genoma *T. vaginalis* por comparación de secuencias con las moléculas de superficie de patógenos procariones y eucariotes para descubrir nuevos factores de virulencia ha conducido a la identificación de 10 familias diferentes de proteínas que son consideradas candidatos para proteínas de superficie. Varios ejemplos de estas proteínas se muestran en la Tabla 2.

Una de estas familias, son las proteínas tipo BspA, las cuales presentan repetidos ricos en lisina tipo específicos (TpLRR). BspAs bacterianos son capaces de mediar la unión a las células epitelio del huésped, proteínas ECM y agregación celular. Esta familia multigénica de tricomonas TvBspA, con 911 miembros

hipotéticos, tiene 178 proteínas tipo TvBspA con TMD, consistente con una función de unión en la superficie celular [48,100]. Teniendo en cuenta el origen bacteriano de esta proteína y el contacto permanente entre *T. vaginalis* y bacterias vaginales, se sugirió que la adquisición de estos genes puede haber ocurrido a través de un mecanismo de transferencia lateral. De hecho en el genoma de *T. vaginalis*, se han descrito 152 casos de posible transferencia lateral de genes procariote-eucariote [47]. Las diferencias entre los miembros de la familia BspA se encuentran en el número de TpLRRs (que van de 3 a más de 30 repetidos), la presencia de distintas secuencias repetitivas y las diferencias en la cola o tallo citoplásmico.

También se sugirió que las proteínas TvBspA desempeñan roles diversos y fundamentales en la patobiología de *T. vaginalis*, contribuyendo a la invasión y a las infecciones por largos periodos del tracto urogenital humano. Las proteínas tipo TvBspA son candidatos fuertes a ser proteínas que median la interacción con varios puntos destacados de la mucosa incluyendo el moco, VEC, células epiteliales de la uretra y otras células del huésped, las proteínas de ECM y la microflora vaginal o parásitos que proliferan durante la adhesión célula-célula. TvBspA también podría mediar la endocitosis de diferentes proteínas del hospedero y virus, así como apoyar la fagocitosis de bacterias y diversas células del hospedero. Finalmente, las proteínas TvBspA podrían orquestar la modulación del sistema inmune innato a través de la señalización por TLRs, durante la infección y mediar la evasión de la respuesta inmune a través de la expresión diferencial [101].

El denso glicocalix de *T. vaginalis* corresponde a la capa externa de su membrana celular formada por diferentes moléculas asociadas a carbohidratos, tales como lipofosfoglicanos (LPG), glicoproteínas y glicolípidos. El TvLPG es uno de los componentes más abundantes del glicocalix de *T. vaginalis* y es un importante factor de virulencia que parece mediar la interacción celular hospedero-parásito a través de la unión a la galectina-1 de VECs [98,102]. El

*glicoconjugado TvLPG llamado ahora como lipoglicano de T. vaginalis (TvLG), difiere notablemente del LPG de Leishmania major y el lipofosfoglicano de Entamoeba histolytica (LPPG) y además carece de repetidos de fosfosacáridos. TvLG está compuesto de poliramnosa con ramas de xilosa, poli-N-acetilactosamina y a veces de lacto-N-biosa (poli-LacNAc/LNB). Se ha demostrado que las cadenas laterales del poli-LacNAc están involucrados en la interacción hospedero-parásito [103].*

*En T. vaginalis mutantes, deficientes en glicosilación de TvLPG, se observó una reducción de la adherencia y citotoxicidad a células cervicales humanas. Como se activa la transformación morfológica de trofozoitos ovoides en las formas ameboides después de la unión a VECs y ECM [45], la unión de TvLPG a la galectina-1 humana podría ser importante en los cambios morfológicos de este parásito [100]. Además, se han identificado los genes que codifican a enzimas involucradas en la síntesis de TvLPG en el genoma de tricomonas. La ramnosa es un desoxiazúcar ausente en humanos, por lo que la ruta biosintética es una atractiva diana terapéutica [47,103].*

*Otro miembro de las posibles proteínas de superficie de T. vaginalis es la familia GP63. Hay 48 miembros de la familia de las proteasas GP63, 37 de los cuales se prevé que son proteínas transmembranales, que posiblemente estén involucradas en las interacciones hospedero-parásito durante la infección. La GP63 de T. vaginalis (TvGP63), está involucrada en citotoxicidad pero no en citoadherencia en dos aislados que la expresan de manera abundante [104]. Será interesante determinar su localización, función y las condiciones ambientales que modulan su expresión y posible participación en el proceso de citopatogenicidad de T. vaginalis.*

#### **2.4.4.2. Citotoxicidad de *T. vaginalis*.**

*El mecanismo de citotoxicidad de T. vaginalis es complejo y multifactorial. T. vaginalis es capaz de causar daño en ausencia de contacto directo entre el parásito y las células del huésped por medio de la secreción de moléculas citoactivas entre las que se encuentran: el factor de 250 kDa que altera la morfología de ciertas células [105]; hemolisinas [73,106], el factor de desprendimiento celular (CDF), una glicoproteína de 200 kDa [107] y las fosfolipasas A1 y A2 [108]. Además, en el mecanismo de citotoxicidad se ha involucrado la participación de diversas proteinasas [94]. A la fecha, se han identificado y caracterizado a las cisteín proteinasas de 65 kDa (TvCP65) y de 39 kDa (TvCP39) que degradan a sustratos como la hemoglobina e inmunoglobulinas. Ambas degradan componentes de la matriz extracelular como fibronectina y colágeno IV en un amplio rango de pH y son inmunogénicas en mujeres infectadas. Estas CPs se encuentran en la superficie de T. vaginalis, se unen a la superficie de las células del epitelio cérvico-vaginal y se encuentran involucradas en la citotoxicidad [109-112]. La actividad proteolítica de estas dos CPs se regula negativamente por hierro [112,113]. También se han involucrado a las CP2, CP3, CP4 y CPT en la inducción de la apoptosis de las células epiteliales, la cual se modula negativamente por el hierro presente en el medio de cultivo para este parásito [76,77] (Tabla 3). Además se ha reportado que la CP60 kDa está involucrado en la degradación de la inmunoglobulina A (Ig A) y hemoglobina [114].*

#### **2.4.4.3. Fagocitosis.**

*Los estudios de microscopía óptica y electrónica han ayudado a demostrar que T. vaginalis es una célula fagocítica que tiene la capacidad de ingerir de manera eficiente y degradar lactobacilos Döderlein's, células del epitelio vaginal y cervical, leucocitos, eritrocitos, levaduras, espermatozoides y células prostáticas [71,115-118]. Aunque el mecanismo de fagocitosis no ha sido completamente*

*elucidado, al menos se han descrito dos vías diferentes: a) la vía utilizada por los fagocitos profesionales en los cuales los pseudópodos se extienden hacia la célula blanco; y b) un proceso de hundimiento sin extensión de la membrana. Se ha sugerido que diferentes proteínas están involucradas en este proceso. Se han descrito dos proteínas de superficie como posibles adhesinas para eritrocitos [67], mientras que un receptor de manosa en la superficie del parásito se ha sugerido para la fagocitosis de levaduras. También se ha reportado un reordenamiento y cambios dramáticos en la distribución del citoesqueleto de actina, lo que puede facilitar la transformación morfológica ameboide observada durante la fagocitosis [71,118]. Por lo tanto, la fagocitosis podría ser un mecanismo de virulencia involucrado en la adquisición de hierro, lípidos, nucleótidos y otros nutrientes esenciales para este parásito.*

*Aunque las moléculas específicas que participan en la fagocitosis aún no se han identificado. Un análisis in silico mostró que existe una gran diversidad de proteínas involucradas en la maquinaria del tráfico vesicular, al parecer codificado en el genoma de *T. vaginalis*, se identificaron componentes homólogos bien establecidos en la maquinaria de formación de vesículas incluyendo cuerpos multivesiculares (MVBs) y GTPasas, junto con diversos elementos de la maquinaria de fusión vesicular incluyendo SNAREs, Rab GTPasas y proteínas SM. Además, se identificaron a la dinamina y miembros del complejo de “sorting” endosomal requeridos para el transporte (ESCRT) [47,119]. Esta información será útil para dirigir los futuros estudios de conexión entre la fagocitosis y la virulencia y también en la identificación de complejos moleculares involucrados en este proceso.*

#### **2.4.4.4. Hemólisis.**

*Para las tricomonas, los eritrocitos son una importante fuente de nutrientes, tales como lípidos y hierro; su lisis es dependiente del contacto y puede ocurrir in vivo [120-122]. El nivel de actividad beta-hemolítica en aislados frescos de *T. vaginalis**

correlaciona con la virulencia clínica. Entre las moléculas involucradas en la hemólisis por *T. vaginalis* se encuentran, CPs de superficie, proteínas formadoras de poros y proteínas tipo fosfolipasa A, identificadas como factores citolíticos [121,123-126]. Una triacilglicerol lipasa (TvLIP) fue identificada en una librería de expresión de cDNA, como el posible factor hemolítico en *T. vaginalis*. La expresión de TvLIP es regulada positivamente por hierro (Tabla 2) [127].

Por otra parte, varias CPs juegan roles en la hemólisis, lo que implica un mecanismo dependiente del contacto [121,128]. Una CP de 30 kDa no secretada que tiene una alta especificidad por la espectrina, se piensa que es la principal responsable para la alteración del citoesqueleto asociado con el mecanismo citolítico de *T. vaginalis* [123]. La degradación de la espectrina ocurre antes de la lisis de los eritrocitos. También, una CP de tipo catepsina L, TvCP4 regulada positivamente por hierro, se ha involucrado en la hemólisis [129].

La hemólisis es dependiente de las concentraciones de calcio ( $Ca^{2+}$ ), temperatura (37 °C) y pH; un pH ácido ( $\leq 6.5$ ) se requiere para la secreción y actividad de proteínas formadoras de poros (PFPs) [123]. Otros protistas parásitos como *Entamoeba histolytica* y *Naegleria fowleri* producen PFPs (amebaporos y naegliaporos, respectivamente) que son secretadas. Estas PFPs pertenecen a una familia conservada de proteínas tipo-Saposinas (SAPLIPs) que fueron halladas en organismos filogenéticamente distantes (por ejemplo protistas y mamíferos). Miembros de la familia SAPLIP tienen las funciones más diversas. Sin embargo, comparten una característica común: la interacción con lípidos.

En *T. vaginalis* se han identificado por análisis genómico doce genes predichos SAPLIP (TvSaplip 1-12). Todas las características mostradas por las TvSaplips provienen de análisis de proteínas predichas de esta nueva familia, llamadas tricoporos, las cuales son buenos candidatos como efectores contribuyendo en los efectos citolíticos de *T. vaginalis*. Sin embargo, debido a la naturaleza heterogénea de las funciones SAPLIP, parece poco probable que todas las

*TvSaplips* estén directamente involucradas en la citopatogenicidad de este parásito. Además, es bien conocido que las SAPLIPs pueden tener otras funciones diferentes a la actividad citolítica en diferentes sistemas biológicos [130].

#### **2.4.5. Evasión de la respuesta inmune.**

Probablemente debido a las infecciones vaginales crónicas causadas por *T. vaginalis* y a los cambios constantes del microambiente durante el ciclo menstrual, este parásito ha desarrollado defensas contra la mayoría de las respuestas inmunitarias del huésped, utilizando una variedad de mecanismos de evasión inmune:

- a) *Proteinasas de T. vaginalis* degradan las inmunoglobulinas humanas (IgG, IgM y IgA) para evadir la respuesta inmune local del hospedero [131]. Una CP de 60 kDa de *T. vaginalis* cumple un doble rol para la supervivencia del parásito, degrada las inmunoglobulinas y suministra nutrientes al parásito mediante la degradación de hemoglobina [9]. Además, se ha reportado que TvCP39 degrada las moléculas: IgA, IgG y IgM [110].
- b) En ausencia de anticuerpos específicos, el complemento presente en la sangre menstrual humana, mata al parásito. La resistencia al complemento en concentraciones altas de hierro contribuye a la patogénesis microbiana. Una CP regulada positivamente por hierro degrada C3b en la superficie de tricomonas, la cual es responsable para este mecanismo [9,89] aunque aún no se ha identificado.
- c) Dos inmunógenos de superficie (P270 y P230) están involucrados en la variación fenotípica. Para P230, la variación fenotípica se basa en cambios en la accesibilidad del epítipo de unión de anticuerpos, aunque la molécula se localizan en la superficie del parásito en todo momento. En contraste, la expresión en la superficie de P270 se relaciona con la presencia de un virus de RNA de doble cadena (dsRNA), la concentración

de hierro y la fosforilación. P270 muestra la organización estructural de proteínas transmembrana clásicas de eucariotes [9,82] y mediante un enfoque proteómico recientemente se han identificado entre las proteínas de superficie [132].

- d) El mimetismo molecular también se presenta en *T. vaginalis*, por la decoración de la membrana del parásito con moléculas homólogas a proteínas del hospedero, tales como varias de las adhesinas del parásito (AP65, AP51 y AP33) que son homólogos a enzimas metabólicas del hospedero (enzima málica y las succinil-coA sintetasa, subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente) [89].
- e) *T. vaginalis* también puede cubrirse con proteínas del plasma del hospedero para evitar ser reconocida como extraña por parte del sistema inmune del hospedero [9].
- f) La secreción continua de grandes cantidades de proteínas solubles altamente inmunogénicas en la vagina, puede neutralizar anticuerpos y linfocitos T citotóxicos, evita así mecanismos de defensa específicos anti-*T. vaginalis* [9] y facilita la persistencia del parásito.
- g) *T. vaginalis* induce el reclutamiento de neutrófilos mediante la vía de la IL-8 en respuesta a la activación por *T. vaginalis* [133]. Sin embargo, *T. vaginalis* también inducen a la apoptosis de neutrófilos a través de la activación de la caspasa-3 dependiente de ROS y la reducción de la expresión de Mcl-1 [134], lo que contribuye a la disminución de la inflamación pero no a la enfermedad. Por otra parte, *T. vaginalis* también inducen la apoptosis de macrófagos mediante la activación de la vía citocromo-c/caspasa-3/MAPK p38, causando anergia de la respuesta inmune local. Sin embargo, aún se desconoce si el contacto directo con el parásito o la liberación de un factor, están involucrados. El rol de la p38 como un ejecutor final de la apoptosis de macrófagos por *T. vaginalis* es única. Estos nuevos mecanismos de señalización podrían sugerir una idea del posible mecanismo molecular para la evasión inmune por *T. vaginalis* y así como blancos quimioterapéuticos posibles [135].

#### **2.4.6. Metabolismo.**

*T. vaginalis* necesita para su crecimiento de un gran número de nutrientes y metabolitos preformados como carbohidratos, aminoácidos, purinas, pirimidinas, ácidos grasos y esteroides, ya que carecen de citocromos y de las rutas metabólicas de los ácidos tricarboxílicos y de la fosforilación oxidativa. Los carbohidratos son la principal fuente de energía y son indispensables para la multiplicación de este parásito [136], los requerimientos energéticos los provee la transformación de glucosa a glicerol y a succinato seguido de la conversión a piruvato en el citoplasma por la vía de Embden-Meyerhoff. El piruvato se metaboliza en el hidrogenosoma a hidrógeno y acetato [55,57]. Sin embargo, bajo condiciones limitantes de carbohidratos, se ha visto que algunos aminoácidos, especialmente arginina, treonina y leucina, en ausencia de maltosa, ayudan al crecimiento y sobrevivencia del parásito [5].

En el genoma de este parásito se encuentran genes que codifican para las aminotransferasas y glutamato deshidrogenosas y aunque estas enzimas participan en vías son catabólicas, podrían ser reversibles para permitir que el parásito sintetice glutamato, aspartato, alanina, glutamina y glicina. También se identificaron genes requeridos para la síntesis de prolina y para el metabolismo de la treonina. Además, de una vía biosintética para cisteína, así como genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo de metionina [47]. Este parásito aprovecha al máximo los nutrientes contenidos en las secreciones vaginales como lípidos, hierro, y DNA de las células epiteliales como una fuente directa de nucleótidos tales como la timidina [137].

El hierro es un nutriente esencial para *T. vaginalis*, debido a que favorece su crecimiento y multiplicación y participa en la regulación de la expresión de algunas moléculas involucradas en la virulencia. Los parásitos crecidos *in vitro* en medio enriquecido con hierro (250  $\mu$ M) tienen un tiempo de generación de 4 h y contienen concentraciones elevadas de proteínas con grupos hierro-azufre como

la ferredoxina y la PFO. El incremento en constituyentes hidrogenosomales se correlaciona con el incremento in vivo del metabolismo hidrogenosomal. Mientras que cuando el hierro se elimina del medio, el parásito aunque crece muy lentamente (tiempo de generación de 12-24 h) [133,138], induce la expresión de algunos genes (Tabla 3).

## 2.5. Expresión génica en *T. vaginalis*.

El tamaño del genoma de *T. vaginalis* es de ~160 Mb, de las cuales 39 Mb están constituidas por 59 familias de repetidos y se clasifican en “virus-like”, “transposon-like”, “retrotransposon-like” y no clasificados. Se ha identificado que ~60,000 genes codifican a proteínas. Aunque el genoma de este parásito presenta un contenido rico en A+T (36%), las regiones codificantes son secuencias ricas en GC (64%) [47,139]. Además, las regiones regulatorias en los extremos río arriba (5´UTR) y río abajo (3´UTR) son muy cortas.

La transcripción basal de los genes que codifican para proteínas en este parásito es muy simple, ya que el *Inr* (elemento iniciador) es la única secuencia regulatoria de la transcripción descrito hasta la fecha en este parásito y es estructural y funcionalmente equivalente al de eucariotes superiores [140]. El *Inr* presenta una secuencia muy conservada **TCA<sub>+1</sub> T/CT/A** que comparte gran similitud con el *Inr* de metazoarios y que se encuentra a una distancia de entre 6 y 20 nucleótidos río arriba del codón de inicio de la traducción (AUG). En el genoma, este elemento se encontró en un 75% de las regiones 5´río arriba de los genes codificantes, lo que apoya su papel central en la expresión génica [47]. El elemento *Inr* es reconocido por la proteína IBP39 (proteína de unión al *Inr* de 39 kDa). La proteína IBP39 interactúa con el dominio C-terminal de la RNA polimerasa II (resistente a la  $\alpha$ -amanitina), enzima responsable de la transcripción de los genes codificantes para proteínas [141-143].

Además, no se han identificado, en los genes de *T. vaginalis*, la presencia de la caja TATA y otros elementos regulatorios, usados comúnmente en eucariotes superiores para la transcripción basal de los RNA mensajeros (RNAm). Sin embargo, si se han encontrado genes con homología a factores de transcripción de otros eucariotes [47]. Se ha reportado la presencia de una caja tipo TATA en uno de los dos genes 5S RNA identificados en este parásito, las cuales se transcriben por la RNA polimerasa III [144]. Aunque el genoma de *T. vaginalis* contiene un gran número de genes codificantes (60,000), los cuales se han reducido a ~45,000 (TrichDB), solo ~65 de estos contienen intrones que se podrían remover, ya que el parásito tiene la maquinaria necesaria para realizar el “splicing” [47,145,146].

En relación al procesamiento de los transcritos de *T. vaginalis*, los RNAm poseen la clásica estructura 5´ “cap”, a excepción de los RNA pequeños nucleares (snRNAs), que en su lugar poseen un “cap” formado por 2,7-dimetilguanosina (DMG) [142,146-148]. Con respecto a la poliadenilación, se ha propuesto a la secuencia **UAAA** como la señal de poliadenilación de los precursores de RNAm de *T. vaginalis*, donde el codón de paro (**UAA**) casi siempre es parte de esta señal; la secuencia **Py↓(A)<sub>0-3</sub> AAUU** como el sitio de corte para la poliadenilación, la cual necesita de elementos ricos en U río abajo del sitio de corte [149].

## **2.6. Antecedentes particulares.**

### **2.6.1. Hierro.**

El hierro es indispensable en una amplia variedad de funciones metabólicas en eucariontes y procariontes, incluyendo enzimas que están involucradas en procesos como la respiración, fotosíntesis, síntesis de DNA, fijación de nitrógeno, transporte de oxígeno y electrones [150,151]. El hierro tiene dos estados de oxidación relevantes para sus funciones biológicas: ferroso ( $Fe^{2+}$ ) y ferrico ( $Fe^{3+}$ ); al paso reversible de uno al otro se debe a su capacidad de participar en reacciones de transferencia de electrones. El hierro es indispensable para la

sobrevivencia de la mayoría de organismos vivos, con excepción de *Borrelia burgdorferi* y algunos miembros de la familia *Lactobacillaceae*, que utilizan Mn en lugar de Fe. Sin embargo, debido a su insolubilidad y a su poder tóxico por la formación de radicales de oxígeno (a través de la reacción de Fenton) puede llegar a tener efectos dañinos o perjudiciales en la célula [150,151]. En vertebrados la homeostasis del hierro se mantiene a través de la regulación coordinada de captura, almacenaje y excreción del mismo. Los tres procesos son regulados por mecanismos que actúan a los niveles transcripcional y post-transcripcional por proteínas que responden a cambios en la disponibilidad de hierro [152,153].

### **2.6.2. Regulación transcripcional.**

El hierro ferroso ( $Fe^{2+}$ ) fue uno de los primeros cofactores metálicos existentes en la atmósfera primitiva. La oxigenación del ambiente desafió a las bacterias a adquirir el hierro ferrico insoluble ( $Fe^{3+}$ ) y posteriormente a defenderse de las especies reactivas de oxígeno (ROS) generados por la reacción de Fenton. Para adquirir  $Fe^{3+}$ , las bacterias producen compuestos de bajo peso molecular, conocidas como sideróforos, que tienen alta afinidad por  $Fe^{3+}$ .

Las bacterias patógenas deben adquirir los nutrientes necesarios del hospedero que están colonizando. Entre los nutrientes más importantes se encuentra el hierro, el cual es necesario para casi todas las formas de vida. Sin embargo, durante la infección el hospedero restringe de hierro a los patógenos mediante: a) la producción de proteínas quelantes de sideróforos y hierro; b) por la exportación del hierro de compartimentos intracelulares que contienen a los patógenos; y c) por la limitación de la absorción de hierro en la dieta. El regulador de captura de hierro (*Fur*) presente en bacterias es un factor transcripcional que utiliza  $Fe^{2+}$  como un co-represor, reprime la síntesis de sideróforos en patógenos. *Fur* controla directa o indirectamente la expresión de enzimas que protegen del daño causado por ROS. Por lo tanto, la homeostasis de hierro y la defensa contra ROS

son dirigidas por Fur. Aunque el rol de Fur como represor está bien documentado, existe evidencia que demuestra que Fur puede ser un activador. La regulación positiva de Fur se lleva a cabo a través de tres mecanismos distintos: 1) indirectamente, a través de pequeños RNAs; 2) mediante la unión a elementos regulatorios en cis que mejoran el reclutamiento de la holoenzima RNA-polimerasa (RNAP); y 3) como una anti-represor, bloqueando la unión de un represor transcripcional al DNA [154-157].

Además, existen homólogos de Fur que controlan la defensa, contra el estrés por peróxido (PerP) y la absorción de otros metales como el zinc (Zur) y manganeso (Mur) en bacterias patógenas. Los miembros de la familia de Fur también son importantes en la virulencia de bacterias patógenas. Diversos estudios demuestran que mutantes en los genes fur, perp o zur presentan una reducción en la virulencia en varios modelos de infección en animales y plantas [157].

### **2.6.3. Regulación post-transcripcional. Sistema de regulación IRE/IRP.**

Los mecanismos de regulación post-transcripcionales del metabolismo del hierro intracelular en eucariotes están mediados por el sistema IRE/IRP [158]. Este sistema de regulación post-transcripcional está mediado por la interacción de proteínas citosólicas regulatorias de hierro (IRP, IRE-BP, IRF, FRP, P90 o también llamadas IRP-1 y IRP-2) con los elementos de respuesta al hierro (IREs), que son estructuras de tallo-burbuja en las regiones no traducidas (UTR's) del RNA mensajero (RNAm) que coordinan la síntesis de varias proteínas importantes relacionadas con el almacenaje (a través de la proteína ferritina), captura (a través del receptor de transferrina, TfR) [153] o el consumo del hierro [153]. En vertebrados, la homeostasis del hierro celular es mediada por la regulación coordinada de la expresión del TfR y la ferritina [152,159].

Las células mantienen los niveles de hierro en parte por la regulación de la entrada del hierro en la célula a través del TfR y por la regulación del almacenaje

*del hierro en la ferritina. El TfR es una proteína de membrana de 85 kDa, la cual media la captura de la holotransferrina (conteniendo hierro) a través de la endocitosis mediada por el receptor. La ferritina, una proteína de 450 kDa (conformado de 24 subunidades; de cadena ligera y pesada, de 19 y 21 kDa, respectivamente) es la mayor proteína de almacenaje de hierro en la célula [159].*

*El RNAm que codifica a la ferritina, contiene un IRE en el extremo 5'-UTR. Cuando los niveles de hierro intracelular decaen, la IRP-1 e IRP-2 se unen al IRE, bloquean la traducción del RNAm de la ferritina y se reduce la cantidad de ferritina y por lo tanto del hierro secuestrado por la ferritina [152]. En cambio el RNAm que codifica al TfR contiene un sitio de reconocimiento para una endonucleasa y 5 copias de IREs en la región 3'-UTR. Cuando las concentraciones de hierro intracelular decaen, las IRPs se unen a los IREs del RNAm del receptor de la transferrina, se enmascara el sitio de reconocimiento de la endonucleasa y se protege al RNAm de la degradación. Esta protección conduce a un incremento en el número de receptores y a una elevación en la concentración intracelular de hierro [152]. Cuando las concentraciones intracelulares de hierro aumentan las proteínas IRP pierden su afinidad hacia las estructuras IRE, la proteína IRP-1 cumple la función de aconitasa y la IRP-2 es degradada a través del proteosoma [160].*

#### **2.6.4. Proteínas regulatorias de hierro (IRPs).**

*Hasta el momento, en vertebrados se han identificado dos tipos de IRPs (IRP-1 y IRP-2) estrechamente involucradas en el reconocimiento de IREs en el RNAm dependiente de la concentración de hierro [160]. La disponibilidad de estas isoformas varía según el tipo celular. Por ejemplo, en células de hígado, riñón, intestino y cerebro la IRP-1 es más abundante que la IRP-2; mientras que en células de glándula pituitaria, corazón, músculo y de línea linfocitaria pro-B Ba/F3, la más abundante es la IRP-2 [161-163].*

Las proteínas IRP-1 (98 kDa-889 aminoácidos) [164] y IRP-2 (105 kDa-963 aminoácidos) [165] comparten un 57% de identidad y 79% de similitud en sus secuencias de aminoácidos (aa), pero la regulación de sus actividades de unión al RNA ocurre por diferentes mecanismos [165-167].

La IRP-1, es una proteína bifuncional inusual: en células con gran contenido de hierro, la IRP-1 forma “clusters” cúbicos de hierro azufre [4Fe-4S] (“Iron Sulfur Cluster” - ISC) y exhibe una actividad de aconitasa citosólica (Figura 2B), mientras que en células sin hierro o estrés oxidativo prevalece como apoproteína (apo-IRP) y la proteína adquiere la propiedad de unirse a estructuras secundarias de RNA (estructuras tallo-burbuja). Es decir, se une a los IREs localizados en las regiones no traducidas de los RNAm de proteínas involucradas en el metabolismo del hierro (tales como la ferritina y el receptor de transferrina) [168] (Figura 2A). Esta dualidad funcional de IRP-1 permite el control traduccional de proteínas del metabolismo del hierro. Las recientes estructuras cristalizadas de la IRP-1 en ambos estados funcionales revelan la gran escala de cambios conformacionales requeridos para estas funciones mutuamente excluyentes, proveyendo nuevos hallazgos dentro de los mecanismos de interconversión de IRP-1 y unión al ligando [160,169].

En estudios *in vitro* se ha visto que en condiciones de alto hierro se puede desensamblar al grupo hierro-azufre (vía ISC) con agentes reductores y oxidantes (beta-mercaptoetanol, ditionitritol [DTT], peróxido de hidrógeno, óxido nítrico) con lo cual pueden presentar afinidad por el IRE, aún en presencia de hierro [170]. También se demostró, mediante sustitución de la serina por ácido glutámico en la posición 138 (S138E), que no se puede unir el grupo hierro-azufre y esta IRP-1 se vuelve sensible a la degradación a través de la vía proteosoma-ubiquitina (Figura 3) [169].

En contraste, la actividad de unión de la IRP-2 no está regulada por el ensamblaje y desensamblaje del grupo hierro-azufre, sino que contiene una

secuencia única de 73 aa que se ha propuesto como blanco para la degradación mediada por el proteosoma en condiciones de alto hierro [171].

Algunos homólogos a la IRP se han reportado en mamíferos [170], aves, vertebrados [152,172], ciertos invertebrados y bacterias [164,173,174]. También las interacciones IRE/IRP se han documentado en rana (*Xenopus laevis*), trucha (*Salmo gairdneri*) y langosta (*Pacifastacus leniusculus*) [175]. Además, recientemente se han hallado proteínas tipo IRP en protozoarios como *Plasmodium falciparum* [176,177], *Leishmania tarentolae* y *Trypanosoma brucei* que interactúan específicamente con IREs de mamíferos (Tabla 1) [178,179].

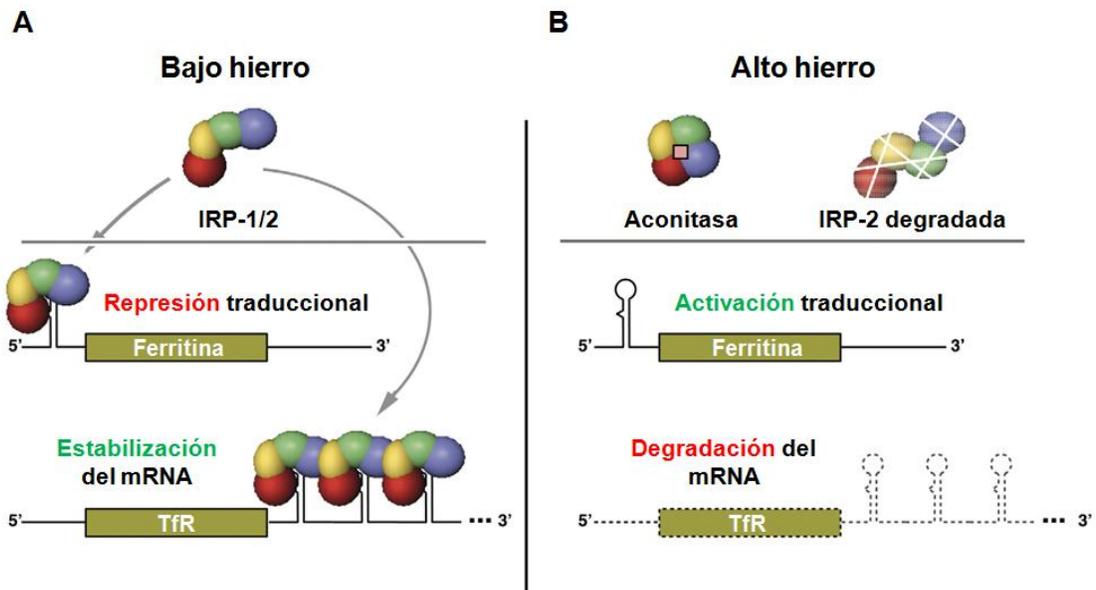
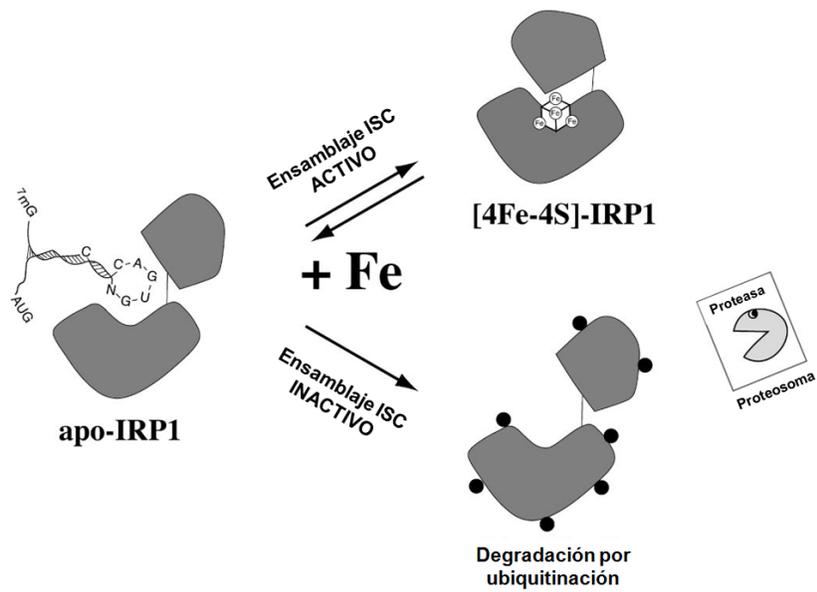


Fig. 2. IRP-1/2 en concentraciones bajas y altas de hierro [1].



**Fig. 3. Modelo de regulación de IRP-1 [2].**

**Tabla 1. Homólogos a IRP en diferentes organismos.**

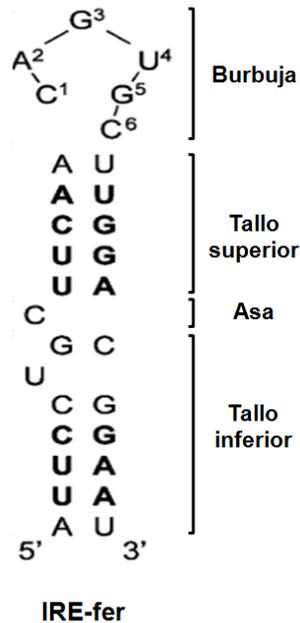
<b>Organismo</b>	<b>Tipo de IRP</b>
<i>Mamíferos</i>	<i>IRP-1 e IRP-2 [152,167]</i>
<i>Aves</i>	<i>IRP-1 e IRP-2</i>
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>IRP-1A e IRP1-B [173]</i>
<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>IRP-1 [173]</i>
<i>Anopheles gambiae</i>	<i>IRP-1 [180]</i>
<i>Aedes aegypti</i>	<i>IRP-1 [180]</i>
<i>Trypanosoma brucei, T. cruzi</i>	<i>IRP-1 [178,179]</i>
<i>Plasmodium falciparum, P. berguei, P. yoelii, P. chabaudi.</i>	<i>IRP-1 [176,177]</i>
<i>Leishmania tarentolae, L. major, L. infantum, L. braziliensis</i>	<i>IRP-1 [179]</i>
<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>IRP-1 [181]</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>IRP-1 [174]</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>IRP-1 (Acon. A y B) [182,183]</i>

### **2.6.5. Elementos de respuesta al hierro (IREs).**

*Los IREs se definen como una secuencia compuesta de 28 nucleótidos arreglados en una estructura de tallo-burbuja en las regiones no traducidas de algunos RNAm. La burbuja está conformada por 6 nucleótidos, 5 de los cuales están filogenéticamente conservados: CAGUGN (C<sub>1</sub>G<sub>5</sub>), donde N es cualquier nucleótido excepto guanina y la secuencia menos común: UAGUAN (U<sub>1</sub>A<sub>5</sub>) [184,185].*

*El tallo está separado en dos partes: la parte superior posee 5 nucleótidos perfectamente apareados y está separado hacia el extremo 5' de la parte inferior por la presencia de una citosina que no está apareada y que en ocasiones está*

acompañada por dos nucleótidos más sin aparear, lo que da como resultado la formación de una pequeña asa que sobresale del tallo [184,186] (Figura 4).



**Fig. 4. Estructura IRE de la ferritina humana (IRE-fer).**

Las regiones IREs se han identificado en diversos RNAm de muchos organismos [187]. En el 5'-UTR del RNAm de ferritina, aconitasa mitocondrial, sintetasa del ácido aminolevulínico eritroide y en la subunidad b de la succinato deshidrogenasa de *Drosophila melanogaster* [186,188]. Además, muchos IREs se encuentran en el 3'-UTR de RNAm que codifican el receptor de la transferrina (TfR1), transportador de metales divalentes (DMT1) [189], proteína del ciclo de división celular 14A (CDC14A) y la cinasa de unión a Cdc42 relacionada con la distrofia miotónica (MRCK $\alpha$ ) [190]. El RNAm del TfR1 es el único que presenta cinco IREs, además de poseer un elemento rico en A-U en la región de los IREs relacionada con un corte endonucleolítico [191].

*También se han reportado IREs con secuencias no consenso (IREs atípicos), los cuales son capaces de interactuar con las proteínas IRP de manera específica. Aunque la gran mayoría de este tipo de secuencias son mutantes de la secuencia canónica [192,193], se han identificado varios IREs atípicos en RNAs de manera natural. Algunos de estos solo presentan cambios en relación a la secuencia consenso de la burbuja, como por ejemplo la estructura tipo IRE identificada en la región 5'-UTR del RNAm de la subunidad de 75 kDa del complejo mitocondrial I [194]. Estos IREs atípicos también se han identificado en RNAm que codifican para la glicolato oxidasa [195], ferririna de langosta [196], proteína precursora del amiloide ligada a Alzheimer [197], proteínas humanas CDC14A y MRCK $\alpha$  [151,198]. También se han identificado IREs atípicos en RNAm de organismos procariotes [174,199,200].*

*Además, se han encontrado tres posibles secuencias para formar IREs en el genoma de Plasmodium falciparum [177]. También se ha identificado estructuras que divergen fuertemente con respecto a la secuencia consenso de la burbuja, tal como la secuencia de la región 3' del genoma del Virus de la Hepatitis Murina (VHM). Estos datos sugieren que el mecanismo para la regulación de la homeostasis del hierro se seleccionó y se ha conservado durante la evolución de las especies.*

**Tabla 2. Proteínas reguladas positivamente en altas concentraciones de hierro.**

<b>Proteínas</b>	<b>Función o actividad que realiza</b>	<b>Referencias</b>
<i>AP120</i>	<i>Citoadherencia</i>	<i>[64,79,80]</i>
<i>AP65-1</i>	<i>Citoadherencia</i>	<i>[64,65,81,115]</i>
<i>AP51</i>	<i>Citoadherencia</i>	<i>[64,65,81]</i>
<i>AP33</i>	<i>Citoadherencia</i>	<i>[64,65,81,115]</i>
<i>AP23</i>	<i>Citoadherencia</i>	<i>[64,65]</i>
<i>Ferredoxina, Succinil CoA sintetasa, Piruvato Ferredoxín Óxido-Reductasa (PFO), enzima málica</i>	<i>Metabolismo de carbohidratos</i>	<i>[138]</i>
<i>Cisteín proteinasa de tipo legumaína TvLEGU-1</i>	<i>Citoadherencia</i>	<i>[97]</i>
<i>TvGAPDH</i>	<i>Citoadherencia</i>	<i>[89,98]</i>
<i>Cisteín proteinasa de tipo catepsina L, TvCP4.</i>	<i>Hemólisis</i>	<i>[129]</i>
<i>Triacil glicerol lipasa, TvLIP</i>	<i>Hemólisis</i>	<i>[201]</i>
<i>Ecto-ATPasa, ecto-fosfatasa</i>	<i>Actividad ATPasa y fosfatasa</i>	<i>[202]</i>
<i>44 kDa (Tv44)</i>	<i>Receptor para IgA</i>	<i>[203]</i>

**Tabla 3. Genes y proteínas reguladas negativamente en bajas concentraciones de hierro.**

<b>Genes y/o proteínas</b>	<b>Mecanismos involucrados</b>	<b>Referencias</b>
<i>Genes flp-1 y flp-2</i>	ND	[204]
<i>TvCP12</i>	Citotoxicidad	[205-207]
<i>TvCP39</i>	Citotoxicidad y degradación de anticuerpos	[110,112,115,207]
<i>TvCP65</i>	Citotoxicidad	[109,111,113,208]
<i>TvCP30</i>	Citoaderencia	[93-95]
<i>CP2, CP3, CP4 y CPT</i>	Inducción de apoptosis	[76,77]
<i>P270</i>	Nivel de fosforilación del inmunógeno/variación fenotípica	[9,48,82,209]
<i>Receptor de lactoferrina de 136 kDa</i>	Captura de lactoferrina	[210,211]

\*ND = No descrita

### **2.7. Efecto del hierro en *T. vaginalis*.**

*T. vaginalis* se caracteriza por tener una alta dependencia al hierro para un metabolismo adecuado. El hierro es esencial para su establecimiento crónico en la vagina donde las concentraciones del hierro fluctúan a través del ciclo menstrual. Este catión favorece el crecimiento, multiplicación y metabolismo de tricomonas en cultivo; mientras las bacterias requieren de 0.2  $\mu\text{M}$ , las tricomonas necesitan hasta 250  $\mu\text{M}$  [138].

*T. vaginalis* presenta diversos mecanismos específicos para captar y utilizar el hierro presente en los componentes del huésped mediados por receptores para

*lactoferrina (136 kDa) [211], ferritina, citocromo C, grupo hemo, hemoglobina, incluso eritrocitos y células epiteliales, las cuales también actúan como fuentes de hierro para este protozoario [67,90,212].*

## **2.8. Expresión génica regulada por hierro en *T. vaginalis*.**

*La expresión génica inducida por hierro en *T. vaginalis* es regulada a través de mecanismos muy poco entendidos. Hasta la fecha se ha descrito un mecanismo de regulación positivo por hierro al nivel transcripcional en *T. vaginalis*, el cual involucra la presencia de elementos promotores de respuesta a hierro en el gen que codifica para la AP65-1. Esta secuencia es 5'-AGTGAAGTGA-3' (-130 a -121 pb) y se ha observado también la presencia de elementos de reconocimiento "MRE" que presentan una secuencia consenso (c/tAACG/t) en el extremo 3' de este dominio que en conjunto con una secuencia cercana rica en T y la interacción de proteínas de unión a DNA, como MYB1, MYB2 y MYB3, entre otros, modulan el inicio de la transcripción en presencia de hierro [213-217].*

*Sin embargo, estos elementos promotores de regulación por hierro no están presentes en todos los genes conocidos de proteínas reguladas positivamente por hierro, por lo que se piensa que *T. vaginalis* podría tener otros mecanismos de regulación por hierro, posiblemente al nivel post-transcripcional.*

*En *T. vaginalis* se identificó una estructura tipo IRE en la región 5' del transcrito de la cisteín proteinasa TvCP4 (IRE-tvcp4) que se regula positivamente por hierro al nivel post-transcripcional. Este IRE puede unirse a la IRP-1 recombinante de humano y proteínas IRP de células HeLa [218]. Un segundo IRE atípico se identificó en la región 3' no traducida del transcrito de la cisteín proteinasa TvCP12 (IRE-tvcp12), que se regula negativamente por hierro, también al nivel post-transcripcional [205]. Este IRE también se une específicamente a las proteínas IRP de humano y de tricomonas [219].*

Las cisteína proteinasas TvCP4 y TvCP12, son reguladas diferencialmente por hierro, ambas CPs están asociadas a procesos de virulencia como hemólisis [129] y citotoxicidad [205-207], respectivamente en *T. vaginalis*.

Además, en los extractos citoplásmicos de *T. vaginalis* crecidos en bajas concentraciones de hierro se encuentran proteínas que se unen al IRE de ferritina humana (IRE-fer) formando dos complejos ribonucleoproteicos (RNA-proteína) específicos en condiciones reductoras y no reductoras, pero esta unión no está presente en altas concentraciones de hierro, lo que sugiere que *T. vaginalis* posee proteínas tipo IRP similares a la IRP-2 [219,220]. Sin embargo, en el genoma de *T. vaginalis* no se encontró una secuencia consenso que codifique para proteínas tipo IRP, ni tipo aconitasa ya que este parásito carece de la vía del ciclo de Krebs y por lo tanto no presenta la actividad enzimática de aconitasa [138,221,222].

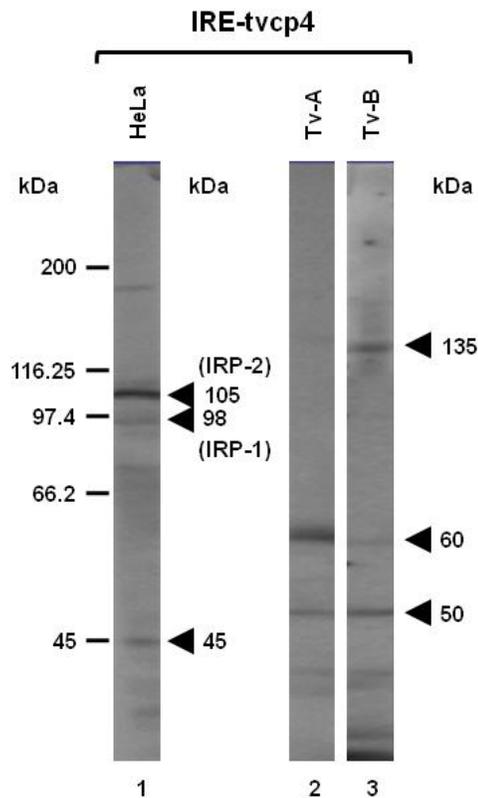
En *T. vaginalis* se detectaron proteínas tipo IRP mediante ensayos de Western blot con anticuerpos anti-IRP-2. Además, mediante ensayos de interacción RNA-proteína tales como EMSA, competencia, entrecruzamiento y Northwestern blot, utilizando las estructuras IRE-fer y IRE-tvc4, en *T. vaginalis* se detectaron al menos 4 proteínas de unión a RNA con pesos de 135-, 110-, 70- y 45 kDa, las cuales difieren en peso a las previamente reportadas para proteínas IRP en mamíferos (98- y 105-kDa), sugiriendo que las proteínas de unión a IREs también son atípicas, como atípicas son las estructuras tipo IRE de *T. vaginalis* [206]. Estos datos sugieren la presencia de un mecanismo paralelo al sistema IRE/IRP en *T. vaginalis*.

Las proteínas de 135 y 110 kDa fueron identificadas como  $\alpha$ -actininas, la proteína de 70 kDa fue identificada como la HSP70 y la proteína de 45 kDa fue identificada como la actina. Tres de las proteínas candidatos a proteína de unión a RNA son proteínas del citoesqueleto ( $\alpha$ -actininas y actina). Sin embargo, solo la proteína de 70 kDa fue identificada a partir de geles de doble dimensión como la proteína

de choque térmico HSP70 (TvHSP70), la cual fue caracterizada como proteína de unión a RNA mediante ensayos funcionales de interacción RNA-proteínas [223].

La identificación por espectrometría de masas de las proteínas de unión a RNA de 135- y 110-kDa (p135 y p110) de *T. vaginalis* que tienen la capacidad de unir estructuras IRE de RNAm de tricomonas (IRE-tvcp4) y de humano (IRE-fer) mostró que estas proteínas tienen homología a dos de las cinco  $\alpha$ -actininas de tricomonas, de 1130 aa y 932 aa, respectivamente [206]. La mayoría de las proteínas  $\alpha$ -actinina presentan tres dominios: 1) Dominio amino (NH<sub>2</sub>) de unión a actina homólogo a calponina; 2) el dominio central con repetidos de espectrinas y 3) el dominio COOH tipo calmodulina que presenta una estructura similar a los brazos EF para la interacción con calcio. Los brazos EF pertenecen a la familia de las estructuras de dedos de zinc.

Estos antecedentes sugieren el posible papel bifuncional de las proteínas de 135 y 110 kDa como proteínas de unión a RNA en *T. vaginalis* que de acuerdo a la identificación respectiva puedan comportarse como  $\alpha$ -actininas. La identificación de las proteínas de 135 y 110 kDa como  $\alpha$ -actininas fue mostrado previamente de manera indirecta [206], como resultado de identificar a las bandas proteicas que reaccionaron por Western blot con los anticuerpos policlonales: anti-IRP-1 y anti IRP-2 (anticuerpos recombinantes comerciales). Además, mediante ensayos de Northwestern blot donde se interaccionaron proteínas citoplásmicas de *T. vaginalis* crecidas en bajas concentraciones de hierro con la estructura IRE-tvcp4 de tricomonas, se observó una la interacción específica de una proteína citoplásmica de 135-kDa de *T. vaginalis* (Figura 5, carril 3), el peso molecular que corresponder a la  $\alpha$ -actinina de 135 kDa.



**Fig. 5. Proteínas citoplásmicas de células HeLa y *T. vaginalis* se unen a la estructura IRE-tvc4 de *T. vaginalis*.**

*Ensayo de Northwestern blot de las proteínas recombinantes citoplásmicas de células HeLa (carril 1) (como control positivo) y proteínas citoplásmicas de T. vaginalis crecidas en concentraciones de alto (carril 2) y bajo (carril 3) hierro con la sonda de RNA marcada con biotina IRE-tvc4. kDa. Pesos moleculares estándar en kilodaltones.*

### **3. JUSTIFICACIÓN.**

*Debido a la identificación de estructuras secundarias tipo IRE en RNAm de proteinasas reguladas diferencialmente por hierro y  $\alpha$ -actininas como una de las proteínas de unión a RNA, se hace necesario determinar si la proteína  $\alpha$ -actinina de 135 kDa es capaz de unirse a RNAm y conocer su posible participación en el mecanismo de regulación post-transcripcional por hierro en *T. vaginalis*.*

### **4. HIPÓTESIS.**

*La proteína  $\alpha$ -actinina de 135 kDa de *T. vaginalis* actúa como proteína de unión a estructuras tallo-burbuja de RNAm en genes regulados diferencialmente por hierro, a través de un mecanismo de regulación post-transcripcional en este parásito.*

### **5. OBJETIVO GENERAL.**

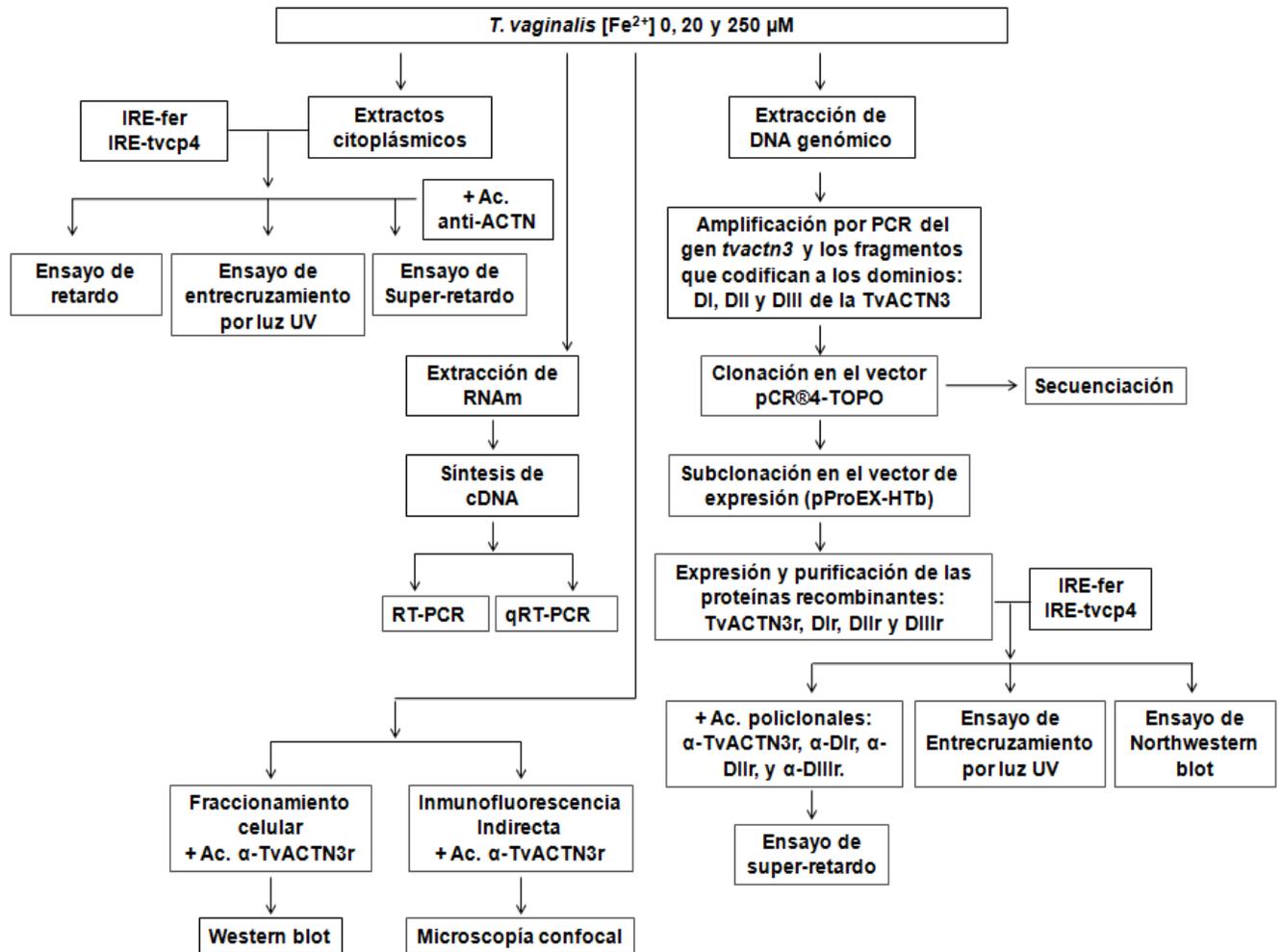
*Caracterizar a la proteína  $\alpha$ -actinina de 135 kDa TvACTN3 de *T. vaginalis* como proteína de unión a RNA modulada por hierro.*

### **6. OBJETIVOS PARTICULARES.**

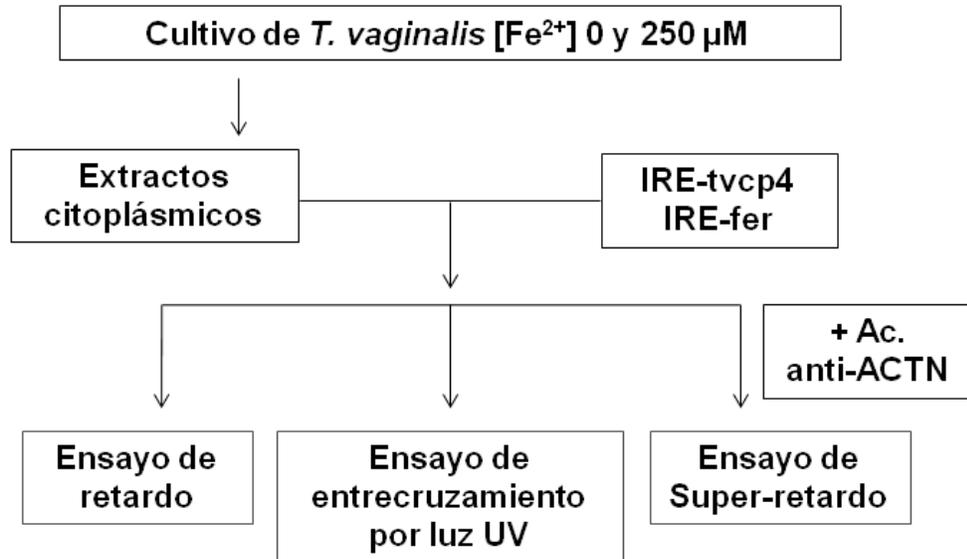
- 1. Confirmar la presencia de la  $\alpha$ -actinina de *T. vaginalis* en los complejos RNA-proteína formados con regiones tipo IRE.*
- 2. Evaluar el efecto del hierro sobre la expresión de los genes que codifican a las  $\alpha$ -actininas en *T. vaginalis*.*
- 3. Demostrar que la proteína TvACTN3r se comporta como proteína de unión a RNA e identificar el o los dominios involucrados en tal interacción.*
- 4. Localizar a la proteína TvACTN3 en *T. vaginalis*.*

## 7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

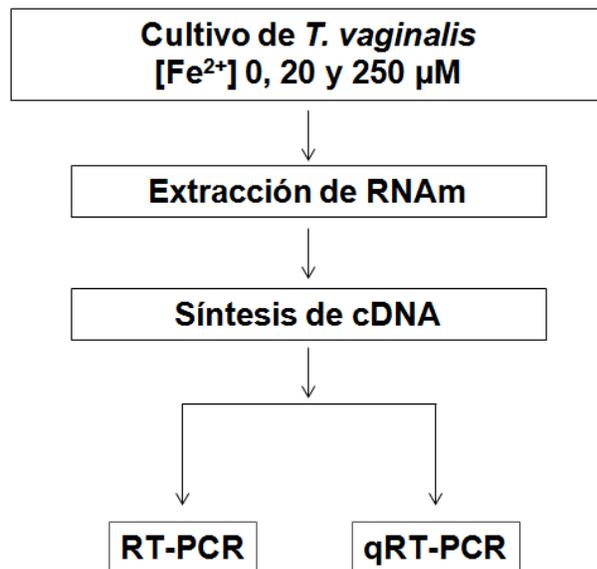
### Estrategia general:



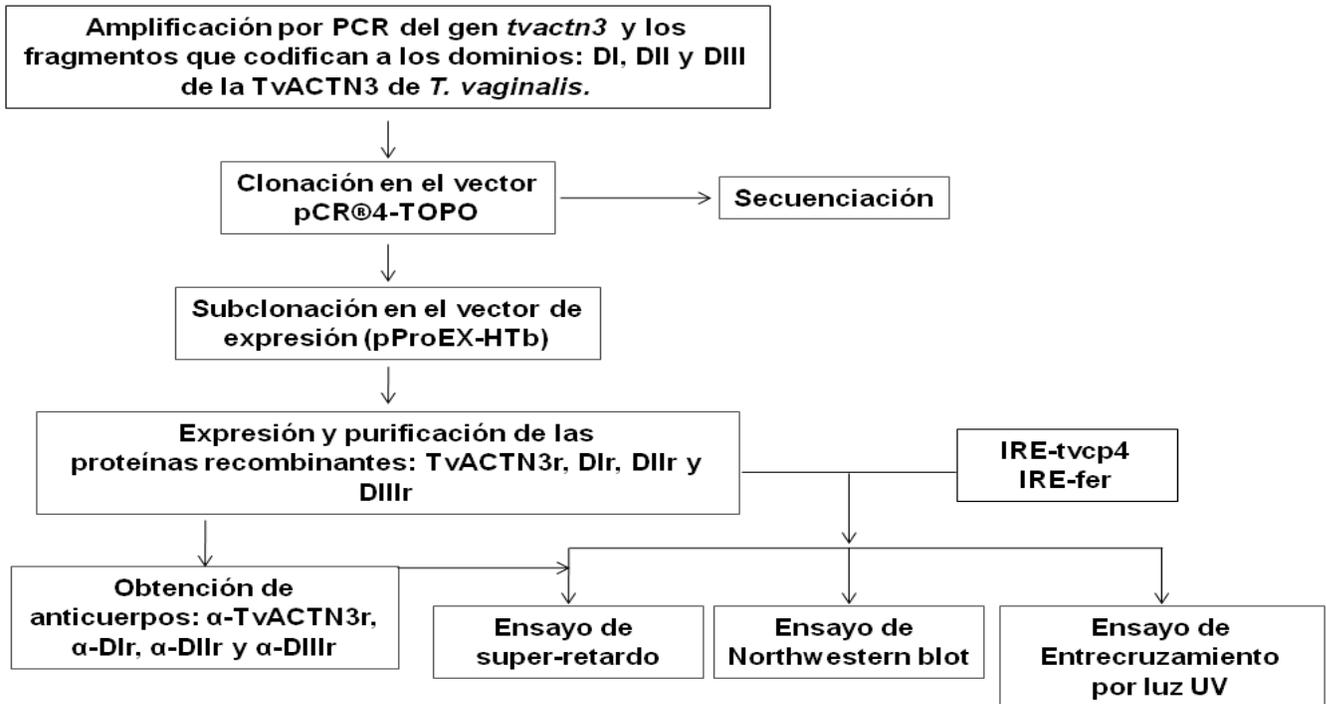
1. Confirmar la presencia de la  $\alpha$ -actinina de *T. vaginalis* en los complejos RNA-proteína formados con regiones tipo IRE.



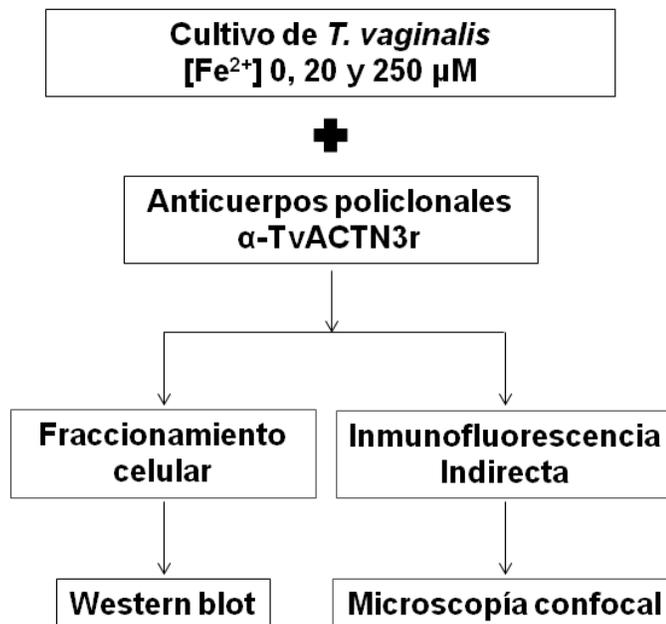
2. Evaluar el efecto del hierro sobre la expresión de los genes que codifican a las  $\alpha$ -actininas en *T. vaginalis*.



3. Demostrar que la proteína TvACTN3r se comporta como proteína de unión a RNA e identificar el o los dominios involucrados en tal interacción.



4. Localizar a la proteína TvACTN3 en *T. vaginalis*.



## **8. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **8.1. Cultivo de *T. vaginalis* y células HeLa.**

*Para los diferentes experimentos se utilizó el aislado CNCD 147 de *T. vaginalis* [224] cultivado axénicamente en medio TYM (Tryptona-Extracto de levadura-Maltosa) suplementado con 10% (v/v) de suero de caballo (Gibco) inactivado por calor, con una concentración de hierro de ~20  $\mu\text{M}$  [138] a 37 °C por 24 h en botellas de cultivo de 25  $\text{cm}^2$  y 75  $\text{cm}^2$ . Los parásitos se cosecharon en la fase logarítmica de crecimiento. Para las condiciones de bajo hierro, el medio TYM se queló con 2,2 dipirilo (Sigma Co., St Louis, MO, USA) a una concentración de 150  $\mu\text{M}$  y para las condiciones de alto hierro se agregó al medio sulfato ferroso amoniacal (Sigma) a una concentración de 250  $\mu\text{M}$  [113,205,218].*

*Las células HeLa provenientes de una línea celular de cáncer cervical humano [111], se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero de caballo inactivado por calor conteniendo penicilina 63.7  $\mu\text{M}$  y estreptomicina 33.3  $\mu\text{g/ml}$ , a 37 °C y 5% de  $\text{CO}_2$  en botellas de 75  $\text{cm}^2$  hasta alcanzar confluencia (~95%) [64].*

### **8.2. Extractos citoplásmicos de células HeLa.**

*Los extractos citoplásmicos de células HeLa se prepararon a partir de  $40 \times 10^6$  células, se despegaron con PBS-EDTA al 0.2% a 37 °C por 10 min, se colectaron en tubos cónicos de 50 ml; se lavaron dos veces con PBS frío, pH 7.0 y se centrifugaron a 5,500 x g durante 5 min a 4 °C. La pastilla celular se resuspendió en 200  $\mu\text{l}$  del amortiguador de lisis A (HEPES 10 mM, pH 7.6,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, KCl 40 mM) frío. La mezcla se colocó en un homogenizador de tipo Dounce y se aplicó entre 40 a 60 golpes hasta observar la ruptura de las células, dejando los núcleos enteros (se observó por microscopía óptica). La mezcla se colocó en un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 ml y se centrifugó a 10,000 x g por 30 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante (extractos citoplásmicos) y se almacenó a -70 °C por*

dos semanas, en alícuotas de 50  $\mu$ l (10  $\mu$ g/ $\mu$ l). La concentración de proteínas en los extractos citoplásmicos se cuantificó por el método de Bradford (Bio-Rad®) [218].

### **8.3. Extractos citoplásmicos de *T. vaginalis*.**

Parásitos crecidos en condiciones de bajo, normal y alto hierro ( $1 \times 10^8$ ) se lavaron dos veces con PBS frío, pH 7.0, la pastilla se resuspendió en 250  $\mu$ l de amortiguador de extracción (AE) (Hepes 10 mM, pH 7.6, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, KCl 40 mM, Nonidet P40 0.5% y glicerol 5%) frío, adicionando los inhibidores de proteasas TLCK (N- $\alpha$ -p-tosil-L-lisina-clorometil-cetona) 7.5 mM y leupeptín 1.6 mM. La mezcla se homogenizó con el vórtex por 15 s y se incubó 10 min a 4 °C, repitiendo esto una vez más, se agregó a un tubo Eppendorf de 1.5 ml nuevo y se centrifugó a 13,000 x g por 5 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante (extractos citoplásmicos) y se almacenaron a -70 °C por una semana, en alícuotas de 50  $\mu$ l. La concentración de proteínas en los extractos citoplásmicos se cuantificó por el método de Bradford (Bio-Rad®) [218].

### **8.4. Fraccionamiento celular de *T. vaginalis*.**

El fraccionamiento celular de *T. vaginalis* se realizó con el método previamente descrito [225], con algunas modificaciones: parásitos crecidos en condiciones de bajo, normal y alto hierro ( $5 \times 10^8$ ) se empastillaron por centrifugación a 750 x g durante 5 min a 4 °C y se lavaron dos veces con PBS frío, pH 7.0. Los parásitos empastillados se resuspendieron en 1 ml de amortiguador de extracción (AE) con TLCK 7.5 mM y Leupeptin 1.6 mM, se trataron con vórtex y se incubaron durante 20 min en hielo (4 °C). El lisado se centrifugó por 10 min a 1,000 x g. La pastilla (P1: núcleos y débris) se descartó. El sobrenadante (SN1) se centrifugó por 10 min a 10,000 x g y el nuevo sobrenadante (SN2: extractos citoplásmicos) se almacenó a -70 °C por 2 semanas hasta su uso en los ensayos de REMSA, super-retardo y Northwestern blot. La pastilla (P2: extractos membranales) se

resuspendió en 750  $\mu$ l del amortiguador R (HEPES 20 mM, pH 7.6, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 1 mM EDTA) y se almacenó a -70 °C por dos semanas.

#### **8.5. Extracción de DNA genómico (DNAg) de *T. vaginalis*.**

Los cultivos de 30 ml de *T. vaginalis* ( $1.2 \times 10^8$  parásitos) crecidos en cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, se centrifugaron a  $195 \times g$  durante 10 min a 4 °C y se lavaron tres veces con 30 ml de PBS (pH 7.0). La pastilla de parásitos se resuspendió en 2 ml de PBS y se transfirió a dos tubos de 1.5 ml. Posteriormente, a cada tubo se agregaron 300  $\mu$ l de amortiguador de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8 con SDS 0.2%, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM) y 300  $\mu$ l de fenol, se mezcló por inversión suave por 30 s y se centrifugó a  $13,000 \times g$  durante 3 min a 4 °C. La fase acuosa superior se recuperó en otro tubo Eppendorf, se agregaron 300  $\mu$ l de fenol y 300  $\mu$ l de cloroformo, se mezcló suavemente y se centrifugó a  $13,000 \times g$  5 min. La fase acuosa superior se recuperó en otro tubo Eppendorf y los ácidos nucleicos se precipitaron con etanol absoluto y acetato de sodio 3 M pH 8.0 (2.5 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de acetato de sodio), se incubó a -20 °C durante 2 h, se centrifugó a  $13,000 \times g$  durante 15 min para obtener los ácidos nucleicos, se retiró el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol al 70% frío. La pastilla se secó durante 10 min, se resuspendió en 50  $\mu$ l de amortiguador TE (Tris 10 mM, EDTA 0.2 mM, pH 8.0), se agregó 0.5  $\mu$ l de RNAsa A (20  $\mu$ g/ml) y se incubó a 37 °C durante 30 min. El DNA genómico se almacenó a 4 °C. La cuantificación del DNAg obtenido, se realizó en el Nanodrop (100  $\mu$ l de DNAg, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l).

#### **8.6. Extracción de RNA total de *T. vaginalis*.**

La extracción del RNA total se realizó a partir de  $1.2 \times 10^8$  parásitos crecidos en concentraciones de bajo, normal y alto de hierro (0, 20 y 250  $\mu$ M de Fe<sup>2+</sup>, respectivamente), se cosecharon en tubos nuevos, se lavaron tres veces con PBS, pH 7 y se centrifugaron a  $195 \times g$  por 5 min a 4 °C. A la pastilla se le agregaron 6 ml de TRizol (Sigma) lisando las células por inversión. La muestra

se incubó 10 min a temperatura ambiente y 30 min a 4 °C, se agregaron 1.2 ml de cloroformo, se mezcló por inversión por 15 s, se incubó 15 min a TA y se centrifugó a 8,600 × g por 15 min a 4 °C. La fase acuosa se recuperó (400 µl) y se precipitó con 3 volúmenes de isopropanol al 100%, se mezcló, se incubó a TA por 15 min, se centrifugó a 8,600 × g por 15 min, se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con dos volúmenes de etanol al 70% diluido en agua tratada con dietil pirocarbonato (agua-DEPC). La pastilla de RNA se resuspendió en 50 µl de agua-DEPC y se almacenó a -70 °C en alícuotas de 15 µl. El RNA se analizó en geles de agarosa y se cuantificó en el Nanodrop a una absorbancia de 260 nm.

### **8.7. Ensayo de RT-PCR semi-cuantitativo.**

Para este análisis se utilizaron 5 µg de RNA total de *T. vaginalis* ( $10^7$  parásitos) crecidos en concentraciones de bajo, normal y alto hierro (0, 20 y 250 µM de  $Fe^{2+}$ , respectivamente) extraídos mediante el método de TRizol (Sigma), se disolvieron en 10 µl de agua-DEPC estéril y se les adicionó 1 µl de oligo dT (dT18) (1µg/ µl) (Invitrogen) y 2 µl de mezcla de dNTPs 10 µM, se incubaron por 5 min a 65 °C, luego en hielo (4 °C) por 2 min, se centrifugaron brevemente y a cada tubo se adicionaron 4 µl del amortiguador (“first strand” 5x; Invitrogen), 2 µl de DTT 0.1 M y 1 µl de “RNasa out” (40 U/µl; Invitrogen), se mezcló suavemente y se incubó a 42 °C por 2 min, se agregó 1 µl de la enzima retrotranscriptasa SuperScript II (Invitrogen) y se incubaron a 42 °C por 50 min. Para inhibir a la enzima, la mezcla se calentó a 70 °C por 15 min, se agregó 1 µl de RNasa H (Invitrogen) y se incubó a 37 °C por 20 min (para eliminar el RNA molde). Los cDNAs obtenidos se cuantificaron en el Nanodrop y se almacenaron en alícuotas a -20 °C. Para los ensayos de PCR se usó 0.5 µg de cada cDNA como molde [205] y los oligonucleótidos específicos (Tabla 4) para amplificar fragmentos correspondientes de cada gen *tvactn1*, *tvactn2*, *tvactn3*, *tvactn4* y *tvactn5* reportado en la base de datos del genoma de *T. vaginalis* [47]. Las condiciones de amplificación fueron: 2 min a 94 °C de desnaturalización inicial; 1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de alineamiento a 55 °C y 1 min de extensión a

72 °C durante 35 ciclos de amplificación. Finalmente, un ciclo de extensión final a 72 °C durante 7 min. Como control interno se amplificó un fragmento de 112 pb del gen  $\beta$ -tubulina utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla 4) [205]. Como controles adicionales para evaluar la regulación diferencial por hierro: se amplificó un fragmento del gen *tvpfoa* (regulado positivamente por hierro) [79] y un fragmento del gen *tvcp12* (regulado negativamente por hierro) [205], utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla 4). Como control negativo se realizó la reacción de PCR con RNA sometido a la reacción de retrotranscripción sin la enzima retrotranscriptasa SuperScript II (Invitrogen), RNA como molde (para descartar contaminación de DNAg).

#### **8.8. Ensayo de PCR en tiempo real (qRT-PCR).**

El ensayo de PCR en tiempo real o PCR cuantitativo se realizó para evaluar la expresión de los genes de las 5  $\alpha$ -actininas en parásitos crecidos en diferentes concentraciones de hierro (0, 20 y 250  $\mu$ M de  $Fe^{2+}$ , respectivamente), con el apoyo de la Dra. Maria Elizabeth Álvarez Sánchez. Para ello se utilizó el equipo: ABIPRISM 7300 Sequence Detector (Applied Biosystems). En resumen, las mezclas de qRT-PCR (25  $\mu$ l), se prepararon con 0.5  $\mu$ g de cDNA de parásitos crecidos en diferentes concentraciones de hierro, 10 pmol de oligonucleótidos específicos para amplificar los genes: *tvactn1*, *tvactn2*, *tvactn3*, *tvactn4* y *tvactn5* (Tabla 4) [47] y 12.5  $\mu$ l de amortiguador 2x SYBR Green 1 PCR Master Mix (Applied Biosystems). Como control interno se amplificó un fragmento de 112 pb del gen  $\beta$ -tubulina con los oligonucleótidos específicos (Tabla 4). Las condiciones de amplificación para todos los fragmentos correspondientes a los genes que codifican a *tvactn3*, sus fragmentos y la  $\beta$ -tubulina fueron: 10 min a 95 °C para la activación de la polimerasa ("hot start"), seguida de 25 ciclos de: 20 s de desnaturalización a 95 °C, 30 s de alineamiento a 55 °C y 30 s de extensión a 72 °C. Finalmente, un ciclo de: 15 s de desnaturalización a 95 °C, 30 s de alineamiento a 60 °C y 15 s de desnaturalización a 95 °C.

Cada ensayo se realizó por triplicado, incluyendo una curva estándar de 8 diluciones seriales de 1/10 del cDNA de  $\beta$ -tubulina (0.5  $\mu$ g de cada cDNA evaluado). La eficiencia de todos los ensayos de PCR fue mayor al 95%. Los resultados se obtuvieron mediante el software de detección de secuencia (versión 1.3; Applied Biosystem) y se exportaron a Microsoft Excel y el programa SigmaPlot versión 11.0 para su análisis. Para confirmar la especificidad de la amplificación, los productos de PCR se analizaron mediante una curva estándar. Los niveles de mRNA de los genes *tvactn1*, *tvactn2*, *tvactn3*, *tvactn4* y *tvactn5* se cuantificaron mediante el análisis de PCR en tiempo real (qRT-PCR) utilizando como un control interno el mRNA de  $\beta$ -tubulina.

### **8.9. Análisis estadístico.**

Los experimentos de PCR en tiempo real (qRT-PCR) se realizaron por triplicado. Todos los datos se expresaron con los promedios de la desviación estándar ( $\pm$  S.D.) del análisis por triplicado. Las diferencias significativas entre los promedios se determinaron mediante ANOVA utilizando el software del programa SigmaPlot v. 11. Los niveles de diferencia significativa se determinaron también por el método de Bonferroni mediante la comparación de todos los grupos con el grupo control ( $P < 0.001$ ) (Figura 13).

### **8.10. Preparación de células competentes *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* BL-21 (DE3) pLysS o *E. coli* Rosetta-gami™.**

Las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* BL-21 (DE3) pLysS o *E. coli* Rosetta-gami™, se sembraron en cajas de agar LB (para el cultivo de la cepa *E. coli* Rosetta-gami™ fue necesario agregar antibiótico cloranfenicol, para evitar la pérdida del plásmido F) por 12 horas a 37°C. A partir de esta caja se resembraron 10 a 12 colonias en 5 ml de medio LB (ver apéndice) y se incubaron a 37 °C por 12 h a 200 rpm. Un inóculo de 1 ml del cultivo anterior se resembró en 100 ml de medio LB y se incubó a 18 °C, hasta que las bacterias alcanzaron a una densidad

óptica  $OD_{600}$  de 0.6. El cultivo se incubó a 4 °C por 10 min, se empastilló a 3,000 rpm por 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 9.6 ml del amortiguador TB (10 mM Pipes, 55 mM  $MnCl_2$ , 15 mM  $CaCl_2$  y 250 mM KCl) pre-enfriado a 4 °C por cada 30 ml de cultivo, el cultivo se incubó a 4 °C por 10 min. El cultivo se centrifugó a 3,000 rpm por 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 2.4 ml del amortiguador TB por cada 30 ml de medio. Se agregó DMSO estéril a una concentración final de 7% y se incubó a 4 °C por 10 min. Se realizaron alícuotas de 100  $\mu$ l en tubos eppendorf de 1.5 ml pre-enfriados. Las alícuotas se congelaron sumergiéndolas en hielo seco con etanol y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

### **8.11. Análisis *in silico* del gen *tvactn3*.**

El análisis *in silico* se realizó mediante alineamiento múltiple con el programa ClustalW (<http://www.clustal.org/>). Las secuencias de nucleótidos de todos los genes *tvactn* se obtuvieron a través de la base de datos del proyecto del genoma de *T. vaginalis* ([www.trichdb.org](http://www.trichdb.org)). Para identificar los dominios funcionales de unión a RNA, analizamos la secuencia deducida de proteínas, utilizando los programas: SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) [226,227], Motif Scan (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>) y PROSITE (<http://prosite.expasy.org/prosite.html>) [228,229].

### **8.12. Clonación y expresión del gen *tvactn3* y sus dominios, en un sistema procarionte.**

Para la obtención de las proteínas recombinantes TvACTN3 y sus dominios se utilizó un sistema de expresión procarionte. El gen completo que codifica para la proteína  $\alpha$  actinina 3 (*tvactn3*, TVAG\_239310; 3390 pb) se obtuvo por amplificación mediante PCR utilizando DNA genómico (DNAg) de *T. vaginalis* del aislado CNCD 147 como molde, un oligonucleótido sentido con un sitio para BamHI (*tvactn3*-BamHI) y el codón de inicio ATG; y un oligonucleótido antisentido

con un sitio para NotI (tvactn3-NotI) y el codón de terminación TAA, respectivamente (Tabla 4). Las condiciones de PCR fueron: 1 ciclo de 95 °C por 2 min y 30 ciclos de: desnaturalización a 95 °C por 1 min, hibridación a 55 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 4.5 min y 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 7 min.

Los fragmentos del gen tvactn3 que codifican al Dominio I (873 pb, aminoácido 1 al 291), Dominio II (1713 pb, aminoácido 230 al 800) y Dominio III (1407 pb, aminoácido 662 al 1129) se amplificaron por PCR utilizando el DNA plasmídico (del gen completo tvactn3) como molde, con oligonucleótidos específicos para cada fragmento (Tabla 4). Las condiciones de PCR fueron: 1 ciclo de 95 °C por 2 min y 30 ciclos de: desnaturalización a 95 °C por 1 min, hibridación a 55 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 2 min y 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 7 min.

Los amplicones obtenidos se clonaron en el vector de transición pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen), utilizando una proporción molar 1:5 (vector:inserto): 0.5 µl del vector pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>, 4 µl del DNA inserto (producto de PCR), 1 µl de sales del kit y agua inyectable para completar un volumen final de 20 µl. La mezcla se incubó a 4 °C (en hielo) por 5 min. Enseguida, 4 µl de la mezcla de ligación (L1) se utilizó para transformar por choque térmico células competentes de E. coli DH5α (50 µl) por 40 s a 42 °C, e inmediatamente se incubó en hielo (4 °C) y se le agregaron 300 µl de medio LB sin antibiótico (en un tubo eppendorf de 1.5 ml) y se incubó a 37 °C por 1 h en agitación (200 rpm), e inmediatamente se sembraron 360 µl sobre las placas con LB-agar con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron a 37 °C por 18 h, hasta la aparición de colonias. Las clonas candidatas se seleccionaron por: PCR de colonia, se les extrajo el DNA plasmídico y se analizaron por doble restricción enzimática. Las clonas seleccionadas se almacenaron con glicerol al 5% a -72 °C y también se enviaron a secuenciar para asegurar que no habieran modificaciones en la secuencia del gen tvactn3 amplificado, la secuencia del gen completo se depositó en la base de datos del GenBank con el siguiente número de acceso: KF280188.

### **8.13. Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina (Miniprep).**

*El cultivo de bacterias conteniendo el plásmido de interés se creció en 5 ml de medio LB-ampicilina (100 µg/ml) (ver apéndice) en agitación a 200 rpm, a 37 °C toda la noche, Las bacterias se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y se centrifugaron a 8,600 x g por 30 s a 4 °C, el sobrenadante se decantó, a la pastilla se le adicionaron 100 µl de la solución I fría (ver apéndice), se resuspendió por homogenización utilizando una pipeta, se le adicionaron 200 µl de la solución II (ver apéndice) recién preparada, se mezcló por inversión y se dejó en hielo por 5 min, se le agregaron 150 µl de la solución III fría (ver apéndice) y se mezcló suavemente por 10 s, se incubó en hielo por 5 min y se centrifugó a 13,000 x g por 5 min a 4 °C. La fracción acuosa se transfirió a otro tubo limpio y se extrajeron los ácidos nucleicos con un volumen igual de fenol-cloroformo (1:1,500 µl de cada reactivo), se mezcló por inversión (primera extracción) y se centrifugó a 13,000 x g por 5 min a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a otro tubo limpio y se extrajeron los ácidos nucleicos con 1 volumen de cloroformo (500 µl) (segunda extracción) y se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 min a 4 °C. Los ácidos nucleicos presentes en la fase acuosa se precipitaron con 2 volúmenes de etanol frío al 100% por 30 min a -70 °C y se centrifugó a 13,000 x g durante 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 1 ml etanol al 70%, se descartó el sobrenadante y la pastilla se secó a temperatura ambiente. Los ácidos nucleicos se resuspendieron en 50 µl de agua inyectable y se le adicionó RNAsa A (20 µg/ml) por 1 h a 37 °C. Para aislar el DNA plasmídico por “midiprep” se partió de un cultivo de 50 ml y las soluciones se usaron en volúmenes proporcionales (diez veces más) [230].*

### **8.14. Secuenciación de DNA.**

*La secuenciación de DNA plasmídico se realizó por el método de Sanger en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, Laboratorio de Biología Molecular. La persona encargada es la M. en C. Laura Márquez Valdelamar.*

### **8.15. Análisis de secuencias.**

*Para el análisis de las secuencias se utilizaron los programas: Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Expasy (<http://www.expasy.org/>) y BIOLOGY WORKBENCH (<http://workbench.sdsc.edu/index.html>).*

### **8.16. Inducción y expresión de las proteínas recombinantes: TvACTN3r, Dlr, Dllr y Dlllr.**

*Los insertos clonados en el vector de transición se liberaron por doble restricción enzimática y se subclonaron en el vector de expresión pProEX-HTb (Invitrogen) con una etiqueta de histidinas. Los fragmentos liberados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% y el DNA se purificó mediante el kit de purificación de DNA (Fermentas). Enseguida, se realizó la reacción de ligación (L2) con una proporción molar 1:5 (vector:inserto) utilizando: 1 µl del vector pProEX-HTb linearizado por doble restricción enzimática y purificado por Kit (Fermentas), 4 µl (100 ng/µl) del DNA inserto (liberado por doble restricción y purificado por Kit (Fermentas), 1 µl de la T4 DNA ligasa 40,000 U (Fermentas) y 14 µl de H<sub>2</sub>O inyectable, se incubó a 25 °C por 16 h y se transformaron en células competentes de E. coli DH5α (50 µl) con 10 µl del producto de ligación (por choque térmico a 42 °C por 40 s). Enseguida, la mezcla se incubó en hielo (4 °C). A la mezcla de “células transformadas” se le agregaron 300 µl de medio LB sin antibiótico (en un tubo Eppendorf de 1.5 ml), se incubaron a 37 °C por 1 h en agitación (200 rpm), se sembraron 360 µl en las placas con LB-agar con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron a 37 °C por 18 h. Las clonas candidatas se seleccionaron mediante: PCR en colonia, se les extrajo el DNA plasmídico y se analizaron por doble restricción enzimática.*

*Con la finalidad de inducir y expresar la proteína recombinante de interés, se extrajo DNAP de las clonas positivas con el inserto correspondiente y el DNAP se purificó por kit (Fermentas) y con 1 µl del DNA plasmídico purificado (pProEX-*

*HTb + tvacnt3* o conteniendo los otros insertos), se transformaron células competentes de la cepa *E. coli* BL-21 (DE3) pLysS. La expresión de las diferentes proteínas recombinantes: TvACTN3r, Dlr, DIIr y DIIIr se realizó inoculando matraces de 250 ml conteniendo 50 ml de medio “terrific broth” (TB) (ver apéndice) conteniendo ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron a 37 °C con agitación a 200 rpm, hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.8 a 600 nm y la inducción de las proteínas recombinantes se hizo con 1 mM de isopropil β-D tiogalacto-piranosido (IPTG) (Sigma) durante 16 h a 16 °C en agitación constante (200 rpm). Las proteínas recombinantes se purificaron a partir de la fracción soluble mediante cromatografía de afinidad a níquel utilizando la resina de sefarosa-Ni-NTA (General Electric). Las proteínas recombinantes purificadas se dializaron dos veces en PBS pH 7.0 a 4 °C en agitación constante (16 h) y se cuantificaron por el método de Bradford (BioRad).

El análisis de expresión de la proteína recombinante se realizó por electroforesis en SDS-PAGE, se preparó bajo condiciones desnaturalizantes, resuspendiendo la pastilla de 1 ml de bacterias en 200 µl de amortiguador de muestra 1x (AM1x), con β-mercaptoetanol (β-ME) (5%) y azul de bromofenol (0.1%) (ver apéndice). Para el análisis de la solubilidad, la pastilla de bacterias de un cultivo de 50 ml se resuspendió en 5 ml de amortiguador de lisis (Tris-HCl pH 7.5, 25 mM; NaCl 250 mM; PMSF 1 mM; imidazol 20 mM) (ver apéndice), se agitó en vórtex y para romper las células se aplicó ultrasonido en frío (4 °C) con un sonicador de punta (Sonics Vibra Cell™) por 5 ciclos de 30 s, a 50% de amplitud. El lisado celular se centrifugó a 35,000 x g, 30 min a 4 °C (Centrífuga Beckman Coulter, Modelo Avanti® J-26CP, rotor JA-20), para separar la fracción insoluble. Para el análisis electroforético se tomaron 15 µl de la fracción soluble (sobrenadante) más 15 µl de amortiguador de muestra 2x (AM2x), con β-ME 5% y azul de bromofenol (ver apéndice). De la misma manera, se preparó una muestra de la fracción insoluble (pastilla) adicionando 200 µl de AM1x para solubilizar la pastilla.

### **8.17. Purificación de las proteínas recombinantes por afinidad a Níquel.**

*Para la cromatografía de afinidad a níquel se utilizó una columna de 1 cm de diámetro por 10 cm de altura empacada con 3 ml de la resina de sefarosa Ni-NTA (General Electric), equilibrada con el amortiguador de unión (AU) (Tris-HCl 25 mM pH 7.5; NaCl 250 mM; PMSF 1 mM; imidazol 20 mM) (ver apéndice). Se agregó la fracción soluble (5 ml, 0.5 µg de proteína soluble/ml) a la resina empacada en la columna, se colectó la fracción de las proteínas no unidas (PNU), se realizaron lavados con 10 ml del amortiguador de lavado (AL) (Tris-HCl 25 mM pH 7.5; NaCl 250 mM; PMSF 1 mM; imidazol 40 mM) (ver apéndice), se colectaron fracciones de 1 ml correspondientes a las proteínas no específicas (fracciones rotuladas como: AL1 al AL10). Las proteínas recombinantes se eluyeron con el amortiguador de colecta (AC) (Tris-HCl 25 mM pH 7.5; NaCl 250 mM; PMSF 1 mM; imidazol 500 mM) en fracciones de 1 ml (fracciones rotuladas como: AC-1 al AC-10). Las diferentes fracciones se evaluaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).*

### **8.18. Purificación de las proteínas recombinantes por afinidad a GST.**

*El cDNA total que codifica para la proteína reguladora de hierro 1 en humano (hIRP-1r) se encuentra clonado en el vector de expresión pGEX-2T, nombrado pGEX-hIRP (este plásmido contiene las secuencias de la proteína IRP-1 de humano fusionada a una etiqueta de GST; donado por el Dr. Kühn del "Swiss Institute for Experimental Cancer Research" - ISREC). La expresión de la proteína hIRP-1r, se realizó en E. coli Rosetta-gami™ transformada con el plásmido-hIRP-1r que se cultivó en 10 ml de medio LB-ampicilina (100 µg/ml) a 37 °C, en agitación (200 rpm) por 18 h. El cultivo se resembró en 500 ml de medio TB con ampicilina (100 µg/ml), se creció en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600 nm. La expresión de la hIRP-1 recombinante se indujo con IPTG 1 mM a 26 °C en agitación (200 rpm) por 16 h. Enseguida, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 8, 000 x g por 20 min a 4 °C, el*

sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 10 ml de amortiguador de lisis (PBS 1x, pH 7.0, Tritón X-100 al 1%; Sigma). Se agitó en vórtex y se sonicó 4 veces por 40 s (40 s on, 40 s off) a 50% de amplitud (Sonics Vibra Cell™), se centrifugó a 12, 000 x g por 40 min a 4 °C. La pastilla que contiene la proteína recombinante en cuerpos de inclusión, se separó del sobrenadante que contiene a la proteína recombinante soluble. Posteriormente, la fracción soluble (hIRP-1r) (5 ml, 0.5 µg de proteína soluble/ml) se filtró por 0.22 µm y se interaccionó con 2.5 ml de la resina de Glutación-sefarosa 4B (GE Healthcare) (previamente equilibrado con PBS, durante 1.5 h a 4 °C en agitación suave) a 4 °C, por 16 h en agitación suave. Enseguida, la resina se empacó en una columna de vidrio (15 cm de largo x 1 cm de diámetro), donde se lavó cinco veces con PBS. Finalmente la proteína hIRP-1r recombinante se eluyó con 10 ml de glutatión reducido 10 mM (Sigma) en TrisHCl 50 mM, pH 8.0. La proteína eluida se dializó con dos cambios de PBS pH 7.0 por 16 h a 4 °C en agitación suave y se analizó por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 8% y se tiñó con Azul Brillante de Coomassie R-250 al 0.05%. La concentración de la proteína recombinante se cuantificó en el Nanodrop (Thermo Scientific) y se guardó en alícuotas a 4 °C para su uso en un tiempo menor a 1 mes.

Este mismo protocolo se utilizó para obtener a la proteína recombinante GSTr, con la diferencia de que la proteína GSTr se expresó a partir del vector “vacío” pGEX-6T, que expresa solo a la GSTr de 26 kDa.

#### **8.19. Obtención de anticuerpos policlonales anti- $\alpha$ -actinina recombinante ( $\alpha$ -TvACTN3r, $\alpha$ -Dlr, $\alpha$ -DIIr, $\alpha$ -DIIIr), $\alpha$ -hIRP-1r y $\alpha$ -GSTr en conejos.**

Para la producción de anticuerpos policlonales contra las proteínas recombinantes: TvACTN3r, Dlr, DIIr y DIIIr, hIRP-1r y GSTr, se inmunizaron conejos blancos New Zealand hembras de dos meses de edad y 3.0 Kg de peso, proporcionados por el bioterio del CINVESTAV-IPN. Antes de la inmunización de

*cada conejo, se realizó el primer sangrado, para obtener el suero preinmune (SPI) el cual se usó como control negativo para todos los ensayos con anticuerpos. Las inmunizaciones se realizaron por vía intramuscular con 300 µg de las proteínas purificadas (dos veces con un intervalo de 15 días entre cada una) con el adyuvante TiterMax® Gold (Sigma) (20 µl del adyuvante por cada 100 µg de proteína recombinante). Los conejos inmunizados se sangraron semanalmente y los sueros se evaluaron mediante Western blot (titulación de sueros) utilizando como antígenos a cada una de las proteínas recombinantes (TvACTN3r, Dlr, DIIr, DIIIr, hIRP-1r y GSTr) y extractos citoplásmicos de T. vaginalis crecidos en condiciones normales de hierro normales.*

#### **8.20. Obtención de anticuerpos policlonales α-GSTr recombinante en ratón.**

*Para la producción de anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante GSTr se inmunizaron diez ratones Balb/c machos de cuatro semanas de edad, proporcionados por el bioterio del CINVESTAV. Se realizaron dos inmunizaciones por vía intraperitoneal con concentraciones de 50 µg de proteína purificada. Las dos inmunizaciones se realizaron con el adyuvante TiterMax® Gold (Sigma) (20 µl del adyuvante por cada 100 µg de proteína recombinante). Los ratones se sangraron semanalmente y los sueros se evaluaron mediante WB (titulación de sueros), utilizando como antígeno la proteína recombinante GSTr, extractos citoplásmicos y totales de T. vaginalis crecidos en condiciones normales de hierro. Antes de la inmunización de cada ratón, se realizó el primer sangrado, para obtener el SPI el cual se usó como control negativo para todos los ensayos con anticuerpos.*

#### **8.21. Anticuerpos.**

*Con la finalidad de detectar la presencia de una reacción cruzada con proteínas tipo IRP-1 en T. vaginalis, utilizamos el anticuerpo policlonal anti-IRP-1 (IRP-1 de*

rata) obtenido en conejo ( $\alpha$ -rIRP-1, AB15506, Millipore). También se utilizó un anticuerpo policlonal en contra de la proteína  $\alpha$ -actinina de pollo ( $\alpha$ -ACTN de pollo) obtenido en conejo ( $\alpha$ -chACTN, PA1-28036, Thermo Scientific) y un anticuerpo monoclonal en contra de la proteína  $\alpha$ -actinina de vaca ( $\alpha$ -ACTN de vaca) obtenido en ratón ( $\alpha$ -bACTN, BM 75.2, Abcam). Además, utilizamos los anticuerpos policlonales (suero) de conejo, generados en este trabajo ( $\alpha$ -TvACTN3r,  $\alpha$ -Dlr,  $\alpha$ -DIIr, and  $\alpha$ -DIIIr respectivamente). Como sueros controles para los ensayos de WB de las diferentes fracciones celulares de tricomonas, utilizamos un anticuerpo policlonal de ratón contra la proteína de PFO A de tricomonas ( $\alpha$ -TvPFO Ar) para la fracción membranal [79], anticuerpo policlonal contra la proteína citoplásmica HSP70 de tricomonas ( $\alpha$ -TvHSP70r) para la fracción citoplásmica (Producida por Torres-Romero y col., manuscrito en preparación, tesis de doctorado). Como control negativo para los ensayos de super-retardo, utilizamos el anticuerpo policlonal de conejo contra la proteína TIM2r de tricomonas ( $\alpha$ -TvTIM2r) [88].

## **8.22. Electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa.**

En una charola se agregó amortiguador de transferencia (ver apéndice) donde se preparó el "sandwich" (evitando dejar burbujas) en el siguiente orden: lado oscuro de la unidad de transferencia, esponja, papel filtro Whatman® No. 3, gel de poliacrilamida a ser transferido (colocando los marcadores de peso molecular del lado derecho), membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad®) de 0.45  $\mu$ m, papel filtro Whatman® No. 3, esponja y lado transparente de la unidad de transferencia. Enseguida, se colocó el lado negro de la unidad de transferencia coincidiendo con la cara negra de la cámara de transferencia, las cuales se colocaron en el tanque de transferencia junto con la unidad de enfriamiento. La transferencia se realizó en agitación suave en frío a 30 V por 15 min y 110 V por 1 h. Para verificar la transferencia las membranas se tiñeron con la solución de rojo de Ponceau 0.1% (Sigma), se señalaron los marcadores de peso molecular con un lápiz y se destiñeron con PBS pH 7.0. Después, las membranas se bloquearon con leche

(Svelty) al 10% en PBS-Tween 20 (PBS-T) al 0.05% toda la noche en agitación suave a 4 °C [231].

### **8.23. Ensayo de Western blot (WB).**

Después de la electroforesis, las proteínas recombinantes: TvACTN3r, Dlr, DIIr, DIIIr, hIRP-1r, GSTr o extractos citoplásmicos y totales de *T. vaginalis* crecidos en diferentes concentraciones de hierro (0, 20 y 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ ), se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (NC) de 0,45  $\mu\text{M}$  (Bio-Rad®) en cámara húmeda. Las membranas se bloquearon con PBS-T 0.05% y leche al 10% por 18 h a 4 °C, se lavaron cinco veces con PBS-Tween al 0.1% a temperatura ambiente (TA), se incubaron con los anticuerpos primarios policlonales o monoclonales (diluidos en PBS-T 0.05%) respectivos:  $\alpha$ -TvACTN3r (1:150,000),  $\alpha$ -Dlr (1:1,000),  $\alpha$ -DIIr (1:1,000),  $\alpha$ -DIIIr (1:1,000),  $\alpha$ -hIRP-1r (1:1,000) (anticuerpo policlonal preparado en el laboratorio),  $\alpha$ -GSTr (1:50,000), a 4 °C por 18h en agitación constante. Las membranas de NC se lavaron cinco veces con PBS-T al 0.1% a TA, incubadas con los anticuerpos secundarios respectivos: cabra anti-ratón o anti-conejo acoplados a peroxidasa (Bio-Rad®) según el anticuerpo primario, a una dilución de 1:3,000 en leche al 2.5% en PBS-T 0.05% y se incubaron por 2 h a TA cubiertos de la luz, se lavaron cinco veces con PBS-T 0.1% y se reveló por color (sustrato para la enzima peroxidasa de rábano picante-HRP) o por quimioluminiscencia usando el kit ECL-Plus (Amersham ECL™). Los SPI correspondientes a conejos o ratones se usaron como controles negativos. Estos experimentos se realizaron de forma independiente por lo menos tres veces.

#### **8.24. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta.**

*Parásitos* crecidos 24 h en diferentes concentraciones de hierro (0, 20 y 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ ) se fijaron a láminas portaobjetos ( $1 \times 10^5$  por portaobjeto) con paraformaldehído al 2% en PBS por 30 min a 25 °C, se lavaron con PBS pH 7 y se bloquearon con glicina 0.5 M en PBS pH 7 durante 1 h a 37 °C y con suero fetal bovino al 1% por 15 min a 25 °C. Enseguida, los parásitos fijados y permeabilizados se lavaron con PBS, se incubaron con el anticuerpo primario:  $\alpha$ -TvACTN3r o SPI de conejo a diluciones de 1:100 durante 18 h a 4 °C, se lavaron tres veces con PBS pH 7, se incubaron con el anticuerpo secundario cabra anti-conejo acoplado a fluoresceína (IgG-FITC, Pierce) a una dilución 1:100 por 1 h a 25 °C, se lavaron cinco veces con PBS pH 7 y se contra-tiñeron con Faloidina-rodaminada (para visualizar la F-actina, actina polimerizada) a una dilución 1:50 de una solución stock de 200 U/ml (Alexafluor 647 Phalloidin, A22287, Invitrogen) durante 1 h a 25 °C, se lavaron cinco veces con PBS pH 7 y cinco veces con PBS-BSA 1%. El montaje se realizó con la solución de Vectashield con DAPI (Vector Lab. Burlingame, CA, USA). Las muestras se analizaron por microscopía confocal (Carl Zeiss; software Zen 2011) [111]. Estos experimentos se realizaron independientemente al menos tres veces.

#### **8.25. Transcripción “*in vitro*” de secuencias IRE.**

Las sondas de RNA tipo IRE marcadas radioactivamente con  $^{32}\text{P}$  se sintetizaron usando un sistema de transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa T7 (MEGAShortscript Ambion®). El DNA usado para la transcripción incluye: 1) el plásmido pSPT-fer (donado generosamente por el Dr. Lukas Khün, la cual contiene la región del IRE de la ferritina humana (IRE-fer) linearizado con BamHI [184]; 2) dos regiones amplificadas por PCR del gen tvcp4: el amplicón de 31 nt correspondiente a la posición -3 a +28 nt que comprende a la región tipo IRE del gen tvcp4 de *T. vaginalis* y el amplicón de 97 nt correspondientes a la posición +11 a +108, una mutante por delección de la mitad del tallo-burbuja tipo IRE del

gen *tvcp4* [218]. La amplificación se realizó por PCR utilizando los oligonucleótidos sentido (31) y antisentido (31), sentido (97) y antisentido (97) específicos (Tabla 4) y 3) la región de 19 pb del IRE del gen *tvcp12* de *T. vaginalis* utilizando los oligonucleótidos CPIRE-sentido y el CPIRE-antisentido (Tabla 4). Estos cuatro templados contienen la secuencia del promotor T7 y una secuencia adicional CG para mejorar la transcripción. Los productos de PCR se purificaron mediante el Qiaquick kit (Qiagen) y se utilizaron como moldes para la síntesis de RNA utilizando el kit de transcripción *in vitro* (MEGAShortscript Ambion®)

La reacción de transcripción se realizó con 3 µg de DNA, se adicionaron 5 µl del amortiguador de transcripción a una concentración final de 1x más una mezcla de nucleótidos ATP, CTP y GTP a una concentración final de 0.5 mM. Para sintetizar los transcritos de RNA radiomarcados se incluyeron a la reacción de transcripción 20 µCi [<sup>γ</sup>-<sup>32</sup>P]-UTP (800 Ci/mmol; Dupont) a una concentración final de 0.5 mM, más 10 U de RNA polimerasa T7 y 20 U de inhibidor de RNasas (Promega), incubando 4 h a 37 °C. Luego de la transcripción, el DNA molde se removió mediante el tratamiento con DNasa I libre de RNasas (Ambion) y los nucleótidos no incorporados se removieron por precipitación con glicógeno (5 µg), acetato de amonio (100 mM) y etanol absoluto (2 volúmenes). El transcrito IRE-fer que codifica al IRE canónico se utilizó como el control positivo. Un transcrito de RNA no relacionado (RNA de calreticulina, región de 55 pb) se usó como control negativo [232]. Para permitir la formación de las estructuras secundarias, el RNA se incubó a 65 °C por 15 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Enseguida, el RNA se mantuvo en hielo (4 °C) o a -20 °C hasta su uso. La concentración del RNA se determinó por medición de la absorbancia a 260 nm. La integridad del RNA se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 3% usando como amortiguador de corrida TBE 0.5x (Tris Base 44.5 mM, ácido bórico 44.5 mM, EDTA 0.025 M pH 8.0) a 100 V por 10-15 min.

## **8.26. Ensayos de retardo con RNA (REMSA), super-retardo y competencia.**

Los ensayos de REMSA [233] se realizaron para detectar las interacciones RNA-proteína con algunas modificaciones: 200,000 cpm (10-15 ng) de RNA-UTP-marcado con  $^{32}\text{P}$  se incubaron por 30 min a 4 °C con 20 µg de las proteínas de extractos citoplasmáticos de células HeLa o 50 µg de las proteínas de extractos citoplasmáticos de *T. vaginalis* crecidos en condiciones de bajo y alto hierro (0 y 250 µM de  $\text{Fe}^{2+}$ ) en el amortiguador de interacción (HEPES 10 mM, pH 7.6,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, KCl 40 mM y glicerol 5% en agua-DEPC) en presencia de 20 U de RNasin (Roche), 4 µg de tRNA (5 mg/ml) y 2% de β-mercaptoetanol (solo para los ensayos de interacción con extractos citoplasmáticos de células HeLa). Se agregó 20 U de RNasa T1 y RNasa A (5 µg/µl) (Sigma), se incubó a 4 °C por 10 min, se agregó heparina (5 µg/µl), se incubó a 4 °C por 10 min y se agregó amortiguador de carga (loading buffer del kit de Ambion). Los complejos ribonucleoproteicos RNA-proteína (RNPs) se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizantes al 6% durante 3.5 h a 200 voltios (20 mA). El gel se secó a 80 °C por 1 h y los complejos RNA-proteína se detectaron por autoradiografía [184,232] en placas (Fujifilm) o en el equipo Fla 5000 Phosphoimager (Fujifilm) con el software MultiGauge V3.0.

Para los ensayos de super-retardo, 1-2 µl (1 µg/µl) de los anticuerpos comerciales anti-α-actinina recombinante de pollo (α-chACTN), anti-α-actinina recombinante de bovino (α-bACTN) o 5-15 µl de los anticuerpos policlonales α-TvACTN3r, α-D1r, α-D11r, α-D111r, o 10 µl del anticuerpo policlonal anti-triosa fosfato isomerasa 2 (α-TvTIM2r) [88] (suero usado como control negativo), se agregaron a los extractos citoplasmáticos de tricomonas crecidas en bajo hierro, antes de la adición de las sondas marcadas radioactivamente.

Para probar la especificidad de los RNPs se realizaron ensayos de competencia REMSA utilizando transcritos de IRE-fer y IRE-tvcp4 sin marca radioactiva como

competidores homólogos a una concentración 50x y 100x molar. Las sondas de RNA no marcadas se incubaron durante 30 min a 4 °C con la mezcla de reacción antes de adicionar el RNA marcado radioactivamente. Como control negativo se utilizó un RNA no relacionado (UR) como competidor heterólogo. Todos estos experimentos se realizaron independientemente por lo menos tres veces.

### **8.27. Ensayo de Northwestern blot (NWB).**

Este ensayo se realizó para evaluar la interacción de las proteínas recombinantes con las sondas marcadas radioactivamente, basado en métodos descritos previamente [206,225] y con algunas modificaciones. Las proteínas recombinantes (1 µg) se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), se transfirieron a membranas de NC (Bio-Rad®), se bloquearon con leche al 10% (Svelty) en amortiguador AE con tRNA de levadura (20 µg/ml) (AEL) por 18 h a 4 °C, se lavaron tres veces con el amortiguador AEL en agitación suave a 25 °C, se incubaron durante 18 h a 4 °C con el amortiguador AUL conteniendo la sonda marcada radioactivamente: 200,000 cpm (10-15 ng) de RNA, UTP-marcado con <sup>32</sup>P, se lavaron tres veces con el amortiguador AE, seguido de tres lavados con el amortiguador E (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 50 mM) y se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 3% en amortiguador STMT (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 1 M, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Tritón X-100 al 0.05%) por 1 h a 37 °C. Después de cinco lavados con el amortiguador AE, las membranas de NC se secaron y las bandas radioactivas se visualizaron. Estos experimentos se realizaron independientemente al menos tres veces.

### **8.28. Ensayo de entrecruzamiento por luz ultravioleta (UV).**

Extractos citoplásmicos de *T. vaginalis* (50 µg) o de células HeLa (30 µg) o las proteínas recombinantes (0.5-1.0 µg) TvACTN3r y sus dominios (D1r, D11r y D111r), hIRP-1r (utilizado como control positivo) y BSA (1 µg) (utilizado como control

negativo) se incubaron con 200,000 cpm (10-15 ng) de la sonda de RNA marcada radioactivamente con  $^{32}\text{P}$ , durante 30 min a 4 °C, con el amortiguador de entrecruzamiento (1x) (HEPES-KOH 10 mM, pH 7.4,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, Glicerol 5% v/v, KCl 100 mM, 20 U de RNasin y 5  $\mu\text{g}$  de tRNA de levaduras; Invitrogen). Después de la unión de las proteínas con el RNA marcado radioactivamente, la mezcla de reacción se incubó en hielo (4 °C) y se irradió usando luz UV (240 nm) (UVP; 800,000  $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ ) (CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, UVP) durante 15 min con los tubos abiertos. Para digerir el RNA no protegido se adicionaron RNAsas: RNasa A (10  $\mu\text{g}$ ) y RNasa T1 (20 U), se incubó durante 30 min a 25 °C, se agregó heparina (50  $\mu\text{g}$ ) y se incubó 10 min a 4 °C. Los complejos RNA-proteína se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 10%, en el amortiguador de corrida TBE 0.5x [218,232]. Los geles se tiñeron con Azul Brillante de Coomassie (CBB), se secaron y las bandas radioactivas se visualizaron por autoradiografía. Estos experimentos se realizaron independientemente al menos tres veces.

#### **8.29. Identificación de proteínas de unión a RNA en *T. vaginalis*.**

Las bandas correspondientes a las proteínas de alto peso molecular detectadas por los ensayos de entrecruzamiento por luz UV entre las proteínas de los extractos citoplásmicos de tricomonas crecidas en condiciones de bajo hierro (0  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$ ) y la sonda de RNA de IRE-tvcp4 marcada radioactivamente se cortaron de un gel teñido con Azul Brillante de Coomassie (CBB) duplicado y se enviaron para la identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas (MS) a la Unidad de Proteínas de la Universidad de Columbia (New York, USA). Las bandas proteicas se redujeron, se alquilaron, se digirieron con tripsina y se analizaron por espectrometría de masas (“matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight mass spectrometry”; MALDI-TOF-MS), de acuerdo a lo reportado previamente [79,234].

## 9. RESULTADOS.

### 9.1. Proteínas citoplásmicas de *T. vaginalis* crecidas en bajas concentraciones de hierro interactúan específicamente con estructuras IREs de RNAm.

*Previamente se demostró la interacción específica entre una estructura tallo-burbuja atípica en la región 5' de RNAm de tvcp4 (IRE-tvcp4) con la proteína recombinante hIRP-1 de humano y también con extractos citoplásmicos de tricomonas, tales interacciones sugieren la presencia de proteínas de unión a RNA en extractos citoplásmicos de T. vaginalis [218]. Para determinar si T. vaginalis tiene proteínas de unión a RNA que interactúan específicamente con estructuras IRE que podrían participar en la regulación post-transcripcional por hierro, realizamos los ensayos de REMSA con extractos citoplásmicos de T. vaginalis crecidos en concentraciones altas (Tv-A) y bajas de hierro (Tv-B) (250 y 0  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ , respectivamente) y sondas de RNA marcadas radioactivamente de tricomonas (IRE-tvcp4) y de humano (IRE-fer) como control positivo.*

*Se realizó la obtención de extractos citoplásmicos de T. vaginalis crecidos en bajas y altas concentraciones de hierro (de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos) (Figura 6, carriles 2 y 3). También se obtuvieron extractos citoplásmicos de células HeLa (Figura 6, carril 4). Las proteínas citoplásmicas se analizaron por SDS-PAGE y se utilizaron para los ensayos funcionales de interacción RNA-proteína.*

*Primeramente, se realizó ensayos de retardo (REMSA), para corroborar la formación de un complejo ribonucleoproteico (RNA-proteína) (RNP), se incubaron las sondas de RNA (IRE-fer e IRE-tvcp4) (Figura 7, carriles 1 y 4, respectivamente) con proteínas de los extractos citoplásmicos de parásitos crecidos en concentraciones altas (Tv-A) (Figura 7, carriles 2 y 5) y bajas (Tv-B) (Figura 7, carriles 3 y 6) de hierro. Estos resultados sugieren que hay proteínas*

*de unión a RNA en los extractos citoplásmicos de tricomonas que interactúan con las estructuras tallo-burbuja de RNA en condiciones de bajo hierro.*

**9.2. Estructuras tallo-burbuja de mRNA, IRE-fer e IRE-tvcp4, interaccionan específicamente con al menos cuatro bandas de proteínas citoplásmicas de *T. vaginalis*.**

*Para determinar el tamaño de las proteínas en los complejos ribonucleoprotéicos (RNPs), se realizaron ensayos de entrecruzamiento con luz ultravioleta (UV), utilizando proteínas de extractos citoplásmicos de *T. vaginalis* crecidas en concentraciones bajas de hierro y sondas de mRNA: IRE-fer e IRE-tvcp4 marcadas radioactivamente.*

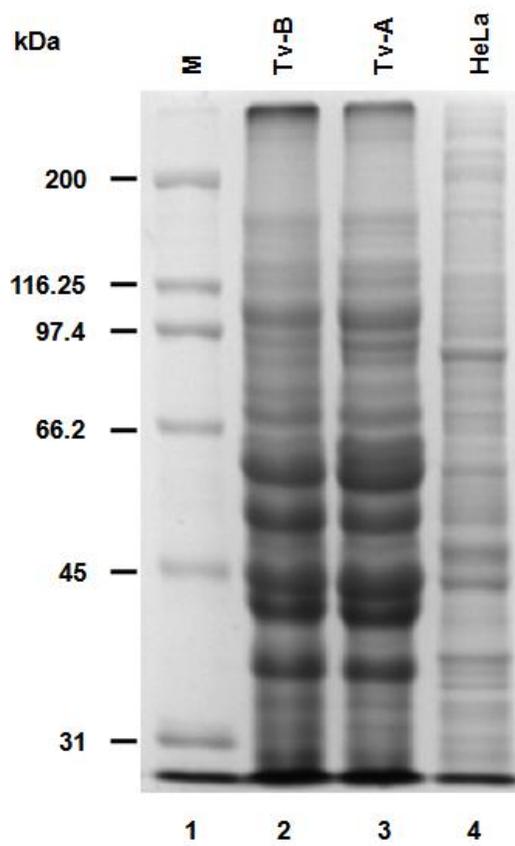
*En la Figura 8 se observó que ambas sondas (IRE-fer e IRE-tvcp4; Figura 8, carriles 1 y 6, respectivamente) interaccionaron con al menos cuatro proteínas de 135, 110, 70 y 45 kDa (Figura 8, carriles 2 y 7). La banda de 45 kDa fue más intensa en presencia de IRE-tvcp4 que en presencia de IRE-fer. La presencia de bandas reactivas requiere la ocurrencia simultánea de RNA y proteínas durante la irradiación con luz UV, ya que las bandas desaparecieron cuando la reacción de entrecruzamiento se trató con: proteínasa K (Figura 8, carriles 3 y 8) o con RNasas (Figura 8, carriles 4 y 9), o cuando se utilizaron IREs no marcados radioactivamente (Figura 8, carriles 5 y 10). Estos datos indican que las bandas radioactivas se formaron cuando las proteínas citoplásmicas de tricomonas y el RNA marcado radioactivamente estaban presentes en la reacción e interactuaron específicamente uno con el otro.*

**9.3. Proteínas  $\alpha$ -actininas de *T. vaginalis* están presentes en los complejos RNA-proteína formados entre los extractos citoplásmicos y las sondas de RNA de humanos (IRE-fer) y de tricomonas (IRE-tvcp4).**

*Para confirmar la identificación de la proteína  $\alpha$ -actinina de 135 kDa como una proteína de unión a RNA [206], primero se realizaron ensayos de WB con los anticuerpos policlonales comerciales anti- $\alpha$ -actinina y anti-IRP-1 que se utilizarán en los ensayos de super-retardo con las proteínas de extractos citoplásmicos de *T. vaginalis* crecidas en concentraciones bajas de hierro. Estos anticuerpos reconocieron bandas de proteínas de 135, 110, 65 y 40 kDa (Figura 9, carril 3) y de 135, 110, 60 y 50 kDa, respectivamente (Figura 9, carril 4). Mediante el uso de estos dos anticuerpos se observó un reconocimiento similar de las bandas de proteínas de 135 y 110 kDa de *T. vaginalis*.*

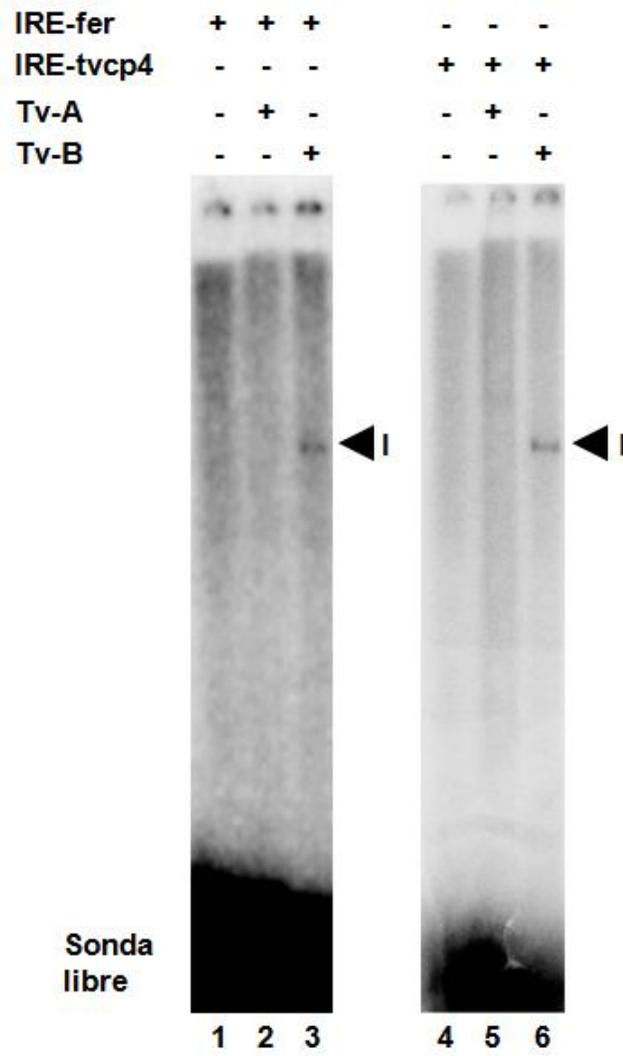
*Para corroborar la presencia de la proteína  $\alpha$ -actinina en los complejos RNP entre las proteínas citoplásmicas de tricomonas y las sondas de RNA (IRE-fer e IRE-tvcp4), se realizaron ensayos de super-retardo, mediante la adición de anticuerpos policlonales ( $\alpha$ -chACTN) y monoclonales ( $\alpha$ -bACTN) contra la  $\alpha$ -actinina en la reacción de REMSA. En la Figura 10, se muestran que ambos anticuerpos heterólogos redujeron drásticamente la formación del complejo RNP entre las proteínas de extractos citoplásmicos de *T. vaginalis* crecidas en bajas concentraciones de hierro y ambas sondas de RNA (IRE-fer e IRE-tvcp4) (Figura 10, carriles 3-6 y 9-12, respectivamente) a las dos concentraciones evaluadas. El anticuerpo no relacionado utilizado como control negativo ( $\alpha$ -TvTIM2r) no afectó la migración del complejo RNP (Figura 10, carril 13). Estos resultados confirman la presencia de proteínas  $\alpha$ -actininas en los complejos RNPs. Por lo que faltaba determinar cual de las  $\alpha$ -actininas se encontraba involucrada en estos complejos RNPs.*

**Fig. 6. Patrón de proteínas citoplásmicas de *T. vaginalis* y de células HeLa.**  
*Gel de poliacrilamida al 8% teñido con Azul Brillante de Coomassie. Carril 1. Marcadores de peso molecular de amplio rango. Patrón de proteínas de extractos citoplásmicos de *T. vaginalis* (Tv), crecidas en concentraciones bajas de hierro (50 µg) (Tv-B; carril 2) y altas de hierro (50 µg) (Tv-A; carril 3). Patrón de proteínas de extractos citoplásmicos de células HeLa (20 µg) (HeLa; carril 4).*



**Fig. 7. Presencia de proteínas de unión a RNA en *T. vaginalis* crecidas en bajas concentraciones de hierro.**

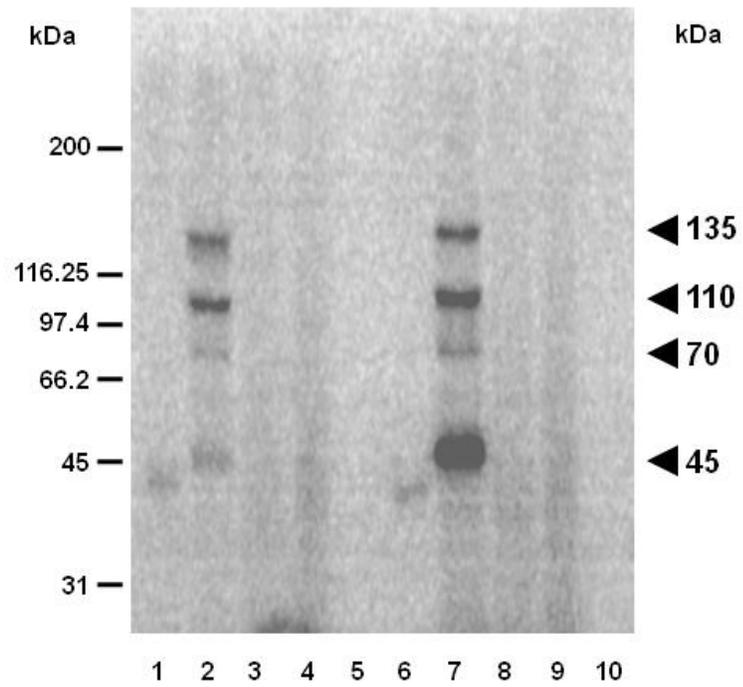
*Mediante ensayos de retardo con RNA (REMSA) se detectó la formación de complejos RNA-proteína (RNP) entre las sonda de RNA de IRE-fer (carriles 1-3) e IRE-tvcp4 (carriles 4-6) y las proteínas de extractos citoplásmicos de *T. vaginalis* crecidas en concentraciones de alto hierro (Tv-A; carriles 2 y 5) o bajo hierro (Tv-B; carriles 3 y 6). Las sondas de RNA libre se usaron como controles negativos (carriles 1 y 4).*



**Fig. 8. Detección de proteínas citoplásmicas de *T. vaginalis* que interaccionan específicamente con las sondas IRE-fer e IRE-tvcp4, de mRNA.**

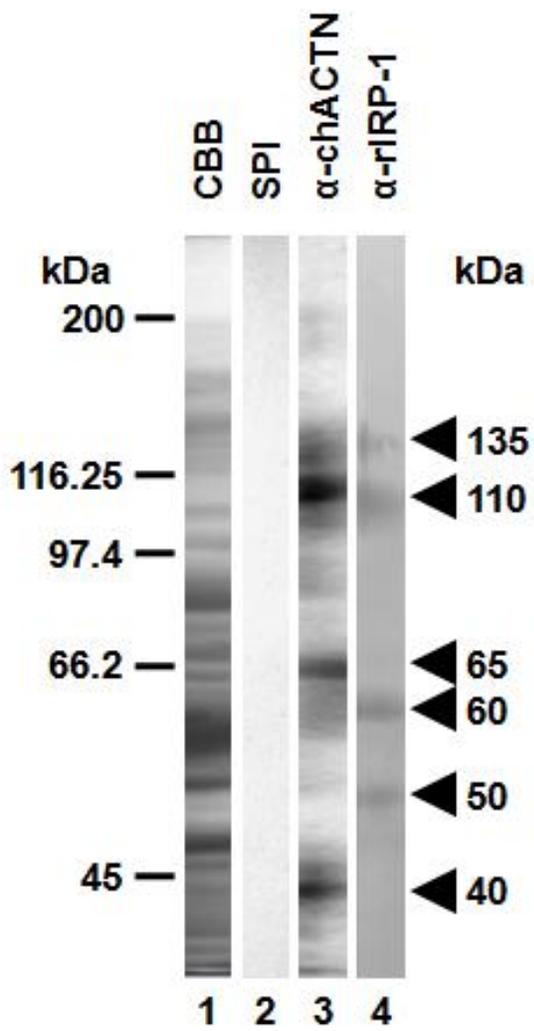
*Ensayo de entrecruzamiento con luz UV entre las proteínas de extractos citoplásmicos de *T. vaginalis* crecidas en concentraciones bajas de hierro (Tv-B) con los transcritos IRE-fer e IRE-tvcp4 marcados radioactivamente (carriles 2 y 7 respectivamente). La especificidad de la interacción se demostró por el tratamiento de la reacción de entrecruzamiento con proteinasa K (10 µg, Promega) (carriles 3 y 8), RNasas (carriles 4 y 9) y una reacción de unión completa utilizando las sondas IRE-fer e IRE-tvcp4 sin marca radioactiva (carriles 5 y 10). Los marcadores de pesos moleculares están indicados en kilodaltones (kDa). Las cabezas de flecha indican las posiciones de las bandas de los complejos RNA-proteína de 135, 110, 70 y 45 kDa. Un resultado representativo de tres experimentos independientes.*

<b>IRE-fer</b>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>IRE-tvcp4</b>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<b>Tv-B</b>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<b>Proteinasa K</b>	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
<b>RNAsas</b>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
<b>RNA no marcado</b>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+



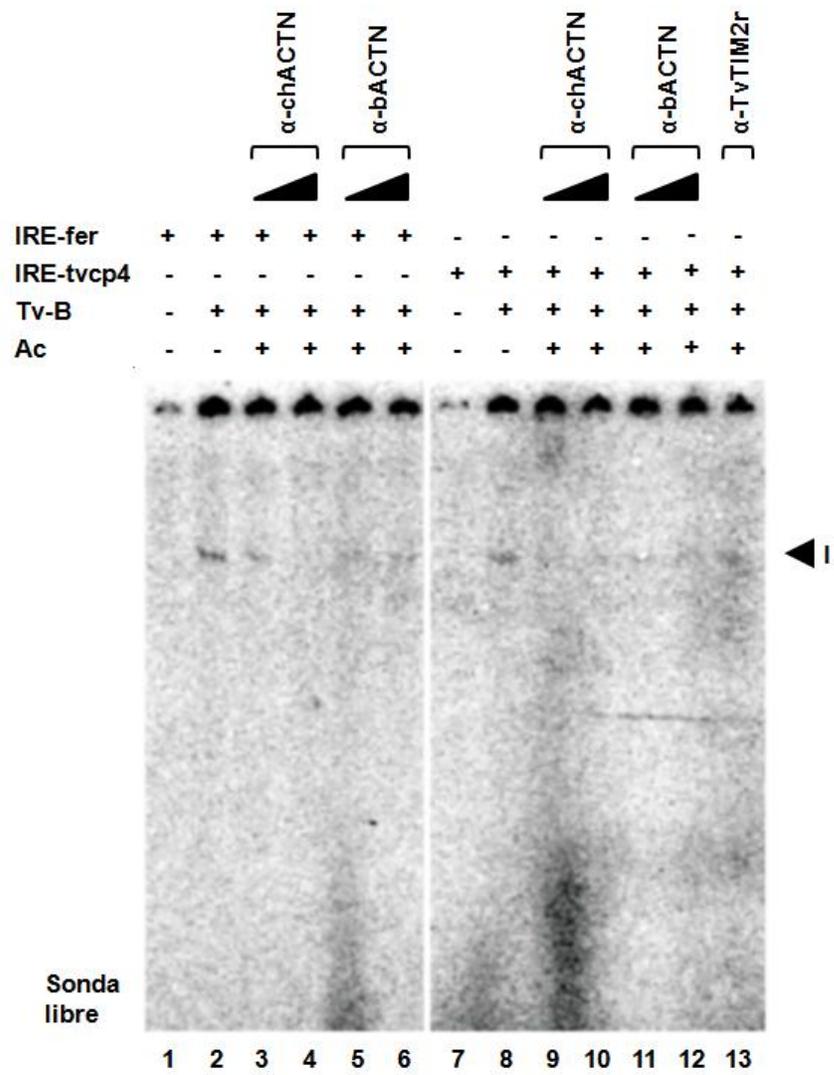
**Fig. 9. Detección de proteínas  $\alpha$ -actininas (TvACTN) mediante WB.**

*Proteínas de extractos citoplásmicos de *T. vaginalis* crecidas en concentraciones bajas de hierro (Tv-B) separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 8% teñido con Azul Brillante de Coomassie (carril 1); transferido a membranas de NC (carriles 2, 3 y 4); e incubados con: suero preinmune (SPI) (control negativo, carril 2), anticuerpos policlonales anti- $\alpha$ -actinina de pollo ( $\alpha$ -chACTN, carril 3), o anti-IRP de rata ( $\alpha$ -rIRP-1, carril 4). Los marcadores de pesos moleculares se indican en kilodaltones (kDa).*



**Fig. 10. Las proteínas  $\alpha$ -actininas de *T. vaginalis* están presentes en los complejos RNA-proteína (RNP).**

*Ensayo de super-retardo. Sondas de RNA de IRE-fer e IRE-tvcp4 marcadas radioactivamente IRE-fer e IRE-tvcp4 (carriles 1 y 7, respectivamente) se incubaron con proteínas de extractos citoplásmicos de *T. vaginalis* crecidas en concentraciones bajas de hierro sin (carriles 2 y 8), o con anticuerpos policlonales  $\alpha$ -chACTN (1  $\mu$ g) (carriles 3 y 9), (2  $\mu$ g) (carriles 4 y 10), o con anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -bACTN (1  $\mu$ g) (carriles 5 y 11), (2  $\mu$ g) (carriles 6 y 12), o con un anticuerpo no relacionado ( $\alpha$ -TvTIM2r, carril 13). La cabeza de flecha indica el complejo RNA-proteína (RNP).*



En el genoma de *T. vaginalis* (<http://trichdb.org/trichdb/>) se tienen anotados las secuencias de cinco genes que codifican a las  $\alpha$ -actininas [47], con los siguientes códigos de acceso: TVAG\_156680, TVAG\_190450, TVAG\_239310, TVAG\_247460 y TVAG\_260390, a las cuales se las designó: *tvactn1*, *tvactn2*, *tvactn3*, *tvactn4* y *tvactn5*, respectivamente.

#### **9.4. Expresión de los genes: *tvactn1*, *tvactn2*, *tvactn3*, *tvactn4* y *tvactn5* de *T. vaginalis* en diferentes concentraciones de hierro.**

Por lo que se analizó la expresión mediada por hierro de los cinco genes que codifican a las  $\alpha$ -actininas de *T. vaginalis* mediante ensayos de RT-PCR semicuantitativo y qRT-PCR. Para ello se diseñaron oligonucleótidos específicos (mediante el programa Primer Premier V 6.0) (Tabla 4) para amplificar fragmentos de cada uno de los genes *tvactn*, a partir de cDNA de parásitos crecidos en las tres condiciones de hierro como molde. La Figura 11 muestra que solo los genes *tvactn1*, *tvactn2* y *tvactn3* de *T. vaginalis* se expresaron en mayor cantidad en presencia de hierro (Figura 11, carriles 2 y 3) que en ausencia de hierro (Figura 11, carril 1); mientras que los genes *tvactn4* y *tvactn5* no se expresaron en ninguna de las concentraciones de hierro. Como se esperaba, se obtuvieron productos de amplificación de cada uno de los genes que codifican para las cinco  $\alpha$ -actininas cuando se realizó el ensayo de PCR utilizando DNA genómico como molde (Figura 11, carril 4). El nivel de expresión del transcrito del gen  $\beta$ -tubulina en las mismas muestras de RNA en cada una de las concentraciones de hierro se utilizó para normalizar las cantidades de transcrito de cada uno de los genes. Dos genes regulados diferencialmente por hierro también se usaron como controles (*tvpfo a* para la regulación positiva y *tvcp12* para la regulación negativa por hierro) y una reacción de RT-PCR sin la enzima retrotranscriptasa SuperScript II se utilizó para descartar la posible contaminación con DNA genómico. La expresión de los cinco genes que codifican a las  $\alpha$ -actininas fueron analizadas por densitometría, utilizando como control de expresión constitutiva el gen  $\beta$ -tubulina, el análisis densitométrico de los productos de amplificación

observados en la Figura 11 se realizó mediante el software del programa Quantity One (BioRad) (Figura 12).

Mediante el análisis de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) se confirmaron estos resultados y demostramos que la expresión del gen *tvactn3* es muy reducida en ausencia de hierro en comparación con la expresión de los genes *tvactn1* y *tvactn2* (Figura 13). Tampoco se observó amplificación de los genes *tvactn4* y *tvactn5* bajo las mismas condiciones experimentales (Figura 13). Las diferencias del nivel de expresión en bajo y alto hierro entre los amplicones correspondientes a los genes *tvactn1*, *tvactn2* y *tvactn3* fue estadísticamente significativa:  $p < 0.0001$  (genes *tvactn2* y *tvactn3*) y  $p < 0.005$  (gen *tvactn1*). La expresión de los genes fue dependiente de las concentraciones de hierro (Figura 13); la expresión de los genes *tvactn4* y *tvactn5* solo se observó cuando se saturó el número de ciclos para el ensayo de qRT-PCR (>40 ciclos). Estos datos muestran que solo tres de los cinco genes de  $\alpha$ -actinina se expresan bajo estas condiciones experimentales.

#### **9.5. Búsqueda y análisis de ESTs para los genes *tvactn1*, *tvactn2*, *tvactn3*, *tvactn4* y *tvactn5* de *T. vaginalis*.**

Para corroborar estos datos se buscó en la base de datos TrichDB, todos los ESTs (que proviene del acrónimo “Expressed Sequence Tags”, que representan secuencias de cDNA) para los distintos genes de  $\alpha$ -actininas a partir de RNAs expresados bajo diferentes condiciones ambientales. El número de ESTs reportados para los genes: *tvactn1*, *tvactn2*, *tvactn3*, *tvactn4* y *tvactn5* fue de: 68, 711, 342, 2 y 1, respectivamente (Tabla 5).

Estos datos muestran un comportamiento similar al observado en las diferentes concentraciones de hierro para cada gen *tvactn*.

**Tabla 4. Oligonucleótidos usados en los ensayos de PCR, RT-PCR, qRT-PCR y oligonucleótidos para obtener las secuencias IRE.**

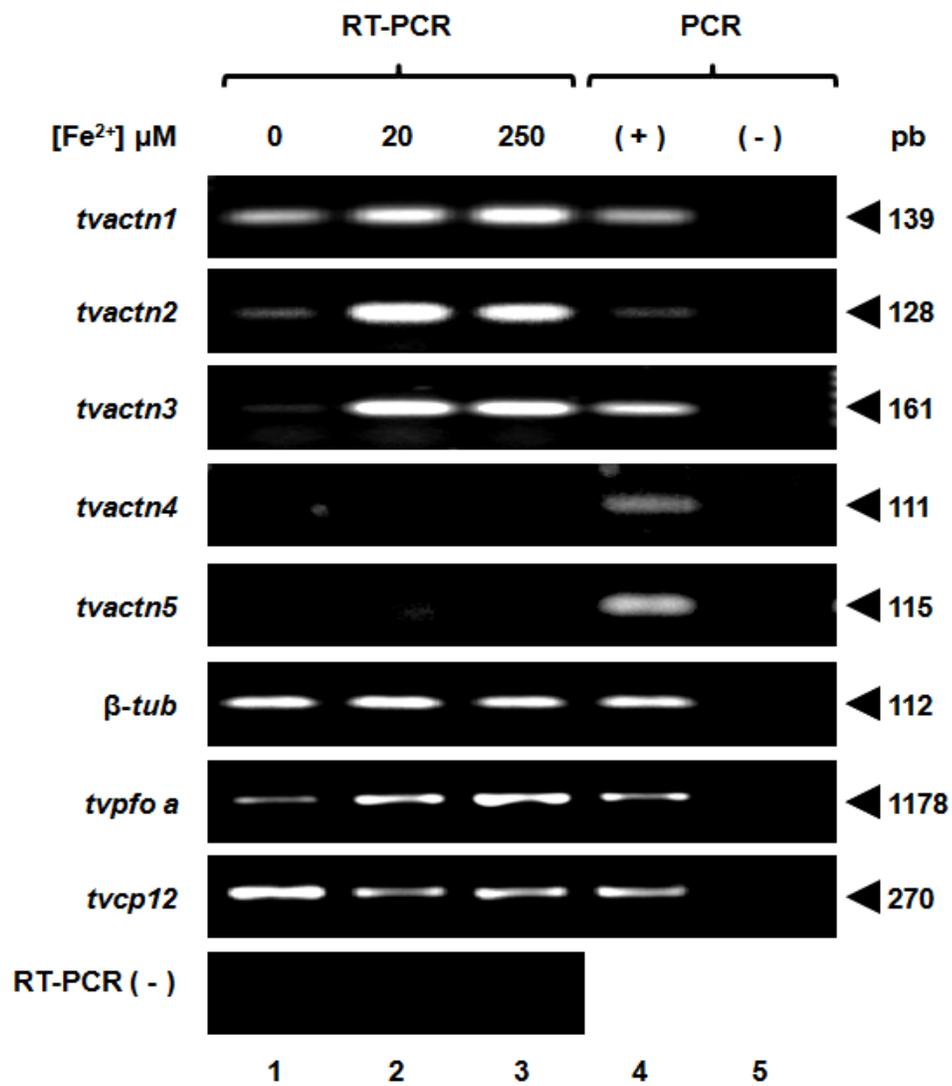
Gen	Ubicación <sup>a</sup> (pb)	Oligonucleótidos (5' - 3')	
		Sentido	Antisentido
<i>tvactn1<sup>b</sup></i>	1512–1648	CCGCTTGCCTTACAG CACTCGG	CCCTTGTTGAAGTGGT CGAGCAT
<i>tvactn2<sup>b</sup></i>	1551–1676	TACACAGTTCCTCGC CAAGCAG	CCTCTGTTGGGCTGT GGTTGACA
<i>tvactn3<sup>b</sup></i>	1540–1698	CAGCGCGCTGCCAAC GTTGAC	CCAAGGCAAGCTGTG TACATGGCTG
<i>tvactn4<sup>b</sup></i>	1561–1667	CCTTAAAGCAACAGTT AGCAGCAGC	CCTGTTGTTTGTCTCT TGCAATTAC
<i>tvactn5<sup>b</sup></i>	1561–1673	CCCCAGGCGAAGAAC CAGAAATT	CCGTTTGAGTCCATTG CGACTAACT
<i>β-tubulin<sup>b</sup></i>	611-722	CATTGATAACGAAGCT CTTTACGAT	GCATGTTGTGCCGGA CATAACCAT [205]
<i>tvactn3<sup>c</sup></i>	1-3390	<u>GGCGGGATCCATGTC</u> TAATAATCGTGGACTT CTAGAC	<u>GGCGGCGGCCGCTTA</u> GGCATAGATAGAATTG AC
<i>tvactn3 D1<sup>d</sup></i>	1-873	<u>GGCGGGATCCATGTC</u> TAATAATCGTGGACTT CTAGAC	<u>GGCGAAGCTTTCCTG</u> GAACTGTCTGGTCGT AC
<i>tvactn3 D1I<sup>e</sup></i>	688-2400	<u>GGCGGGATCCCACTT</u> CTTCGCTGGCGAGTC A	<u>GGCGGCGGCCGCGA</u> CCTTCTCGGCGATGG CAAGAACC
<i>tvactn3 D1II<sup>f</sup></i>	1984-3390	<u>GGCGGGATCCGACAT</u> CACATTCGCCTTCTTG ACAC	<u>GGCGGCGGCCGCTTA</u> GGCATAGATAGAATTG AC
<i>tvpfo a<sup>g</sup></i>	2281–3458	GAAGAGGGCAAGAAC TGGGATC	ATCTTCTTGTAGCCCT CGTAA [79]
<i>tvcp12<sup>h</sup></i>	8-276	GATTTCAAACCTTGCTT	CTTGACTGTTTGGCCC

		CCGGCATT	TTGGAAA [205]
		<u>TAATACGACTCACTAT</u>	CTTTCTGCTCATGTGC
IRE-tvcp4 <sup>i</sup>	-3-28	<u>AGGGCACATGTTTCGT</u>	CTGAACGAACATGTG
		TCAGGCACCAT	[218]
		<u>TAATACGACTCACTAT</u>	GGAGAGCCAAATGCC
disrupt IRE-tvcp4 <sup>i</sup>	12-107	<u>AGGGGGCACATGAGC</u>	AAG [218]
		AGAAAGC	

<sup>a</sup> Ubicación de la región amplificada por PCR, RT-PCR y qRT-PCR de cada gen tvactn. <sup>b</sup> Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de RT-PCR y qRT-PCR para evaluar la expresión de los genes tvactn en distintas concentraciones de hierro. <sup>c-f</sup> Oligonucleótidos utilizados para subclonar el gen completo tvactn3 y los dominios de la TvACTN3 (DI, DII y DIII) de *T. vaginalis* aislado CNCD 147 en un sistema de expresión bacteriana, todos estos oligonucleótidos tienen sitios de reconocimiento (subrayados) para enzimas de restricción <sup>g y h</sup> Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de RT-PCR para evaluar la expresión de los genes tvpfo a y tvcp12 en diferentes concentraciones de hierro, utilizados como control de expresión positiva y negativa por hierro, respectivamente. <sup>i y j</sup> Oligonucleótidos utilizados para los ensayos de PCR de la secuencia IRE-tvcp4 y la secuencia de la mutante por delección de IRE-tvcp4 (IRE-Δtvcp4).

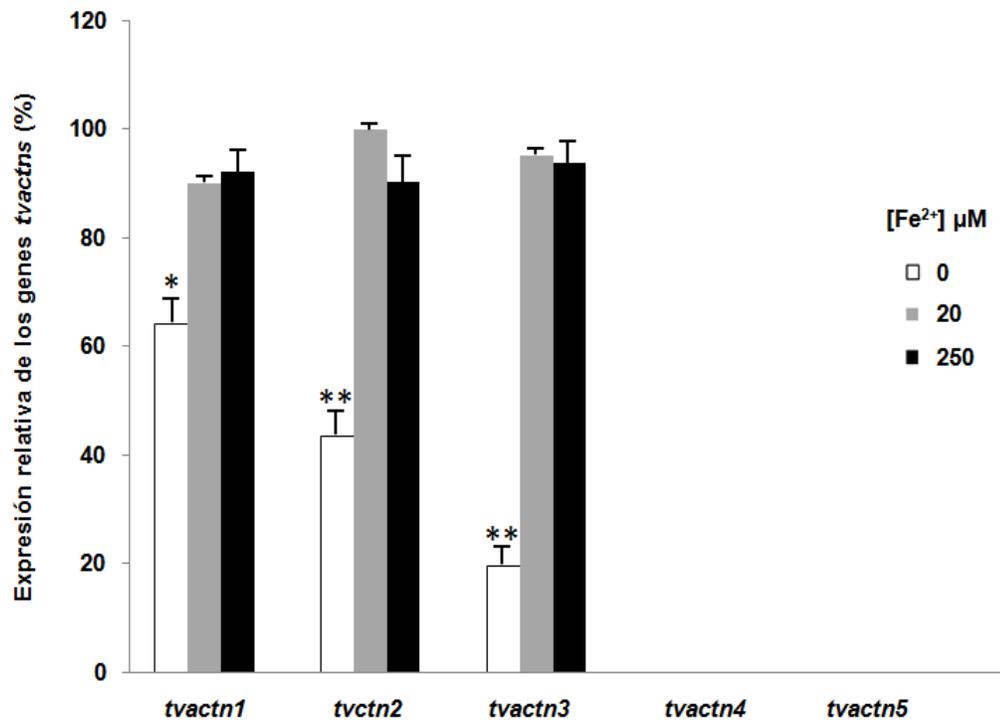
**Fig. 11. Análisis mediante RT-PCR semi-cuantitativa del efecto del hierro en la transcripción de los genes que codifican a las cinco  $\alpha$ -actininas (*tvactn*) de *T. vaginalis*.**

*RT-PCR con oligonucleótidos específicos para amplificar cada uno de los genes (Tabla 4) utilizando cDNA de T. vaginalis crecidas en condiciones de bajo (0  $\mu$ M; carril 1), normal (20  $\mu$ M; carril 2) y alto (250  $\mu$ M; carril 3) hierro. Como control interno de cantidad se amplificó un fragmento del gen  $\beta$ -tubulina. La amplificación de fragmentos correspondientes a los genes *tvpfo a* y *tvcp12* se utilizaron como genes controles que se sobreexpresan en condiciones alto y bajo hierro, respectivamente. Una reacción de RT-PCR sin la enzima retrotranscriptasa SuperScript II se utilizó para verificar la ausencia de contaminación por DNA genómico en las muestras de cDNA, (RT-PCR (-)) para cada gen. El DNA genómico se utilizó como control positivo (+) de amplificación (carril 4) en la reacción de PCR, como control negativo (-) no se agregó DNA (carril 5). Los tamaños de los amplicones están en pb.*



**Fig. 12. Análisis densitométrico del ensayo de RT-PCR semi-cuantitativa del efecto del hierro en la transcripción de los genes que codifican a las  $\alpha$ -actininas (*tvactn*) de *T. vaginalis*.**

*Para cuantificar los niveles de expresión diferencial de los mRNAs de los cinco genes tvactn de tricomonas crecidas en diferentes concentraciones de hierro se utilizó RT-PCR semi-cuantitativa. Las barras representan la desviación estándar de muestras evaluadas por triplicado. Las diferencias estadísticamente significativas se señalan con asteriscos: (\*)  $p < 0.005$  o (\*\*)  $p < 0.0001$  del nivel de expresión de los genes en condiciones de bajo, normal y alto hierro, como se describió en la Figura 11.*



**Fig. 13. Análisis mediante qRT-PCR del efecto del hierro en la transcripción de los genes que codifican a las  $\alpha$ -actininas (tvactn) de *T. vaginalis*.**

*Para cuantificar los niveles de expresión diferencial de los mRNAs de los cinco genes tvactn de tricomonas crecidas en diferentes concentraciones de hierro se utilizó RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR). Las barras representan la desviación estándar de muestras evaluadas por triplicado. Las diferencias estadísticamente significativas se señalan con asteriscos: (\*)  $p < 0.005$  o (\*\*)  $p < 0.0001$  del nivel de expresión de los genes en condiciones de bajo, normal y alto hierro, como se describió en las Figuras 11 y 12.*

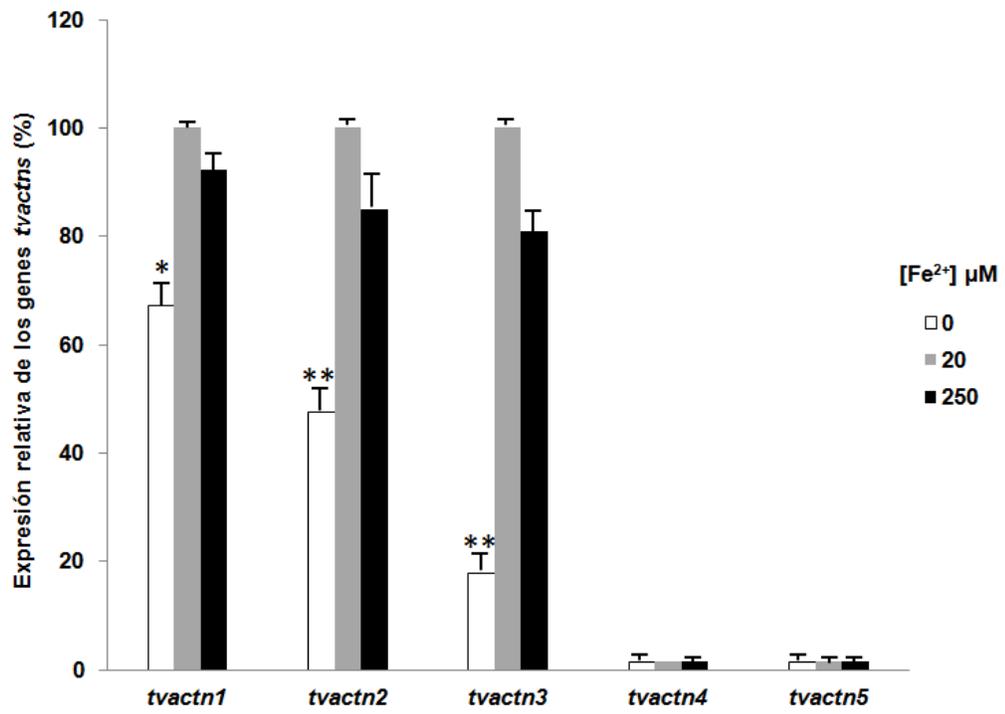


Tabla 5. Número de ESTs correspondientes a los genes *tvactn1*, *tvactn2*, *tvactn3*, *tvactn4* y *tvactn5* de *T. vaginalis*.

Genes	No de ESTs totales	Pseudoquiste	Cultivo no sincronizado	Adherencia a fibronectina	Trofozoito	Bajo hierro	Baja glucosa	Citoadherencia a células VEC
<i>tvactn1</i>	68	9	15	7	8	0	24	5
<i>tvactn2</i>	711	32	125	292	20	8	103	131
<i>tvactn3</i>	342	44	78	51	43	0	105	21
<i>tvactn4</i>	2	0	1	0	1	0	0	0
<i>tvactn5</i>	1	0	0	0	0	1	0	0

Número de ESTs expresados para los genes *tvactn* en las diferentes condiciones ambientales [47].

## **9.6. Proteínas $\alpha$ -actininas reportadas en el genoma de *T. vaginalis*.**

*Enseguida, se analizaron in silico las secuencias de las cinco  $\alpha$ -actininas de *T. vaginalis* mediante un alineamiento múltiple de las secuencias deducidas de aminoácidos para cada  $\alpha$ -actinina [47] (Figura 14). Las cinco proteínas  $\alpha$ -actininas tienen diferentes tamaños: 609, 931, 1129, 1137 y 1271 residuos de aminoácidos (aa), respectivamente. Estas proteínas tienen diferentes porcentajes de identidad en comparación con la proteína TvACTN3 (55.19, 53.25, 22.1 y 15.56% con TvACTN1, TvACTN2, TvACTN4 y TvACTN5, respectivamente).*

## **9.7. Probables Dominios funcionales presentes en las TvACTNs de *T. vaginalis*.**

*Mediante los programas SMART, MOTIF SCAN y PROSITE se analizaron los dominios putativos presentes en las proteínas TvACTNs. Todas las proteínas TvACTNs tienen dos dominios calponina (CH) en el extremo amino terminal que le confiere la habilidad para unirse a actina en  $\alpha$ -actininas de otros organismos. Enseguida, presentan repetidos de espectrina (SR) en la región central, conocido como dominio “rod”, asociado a cambio de estructura de la proteína y finalmente, dos dominios con homología a “EF-hand” en el extremo carboxilo terminal, asociados a la unión a calcio. El número de repetidos de espectrina es variable en las proteínas TvACTN1, TvACTN2 y TvACTN3. Además el dominio central de las proteínas TvACTN4 y TvACTN5 presentan diferentes motivos específicos (“coiled coil” C, “SEL1” S y C2) en comparación a las otras  $\alpha$ -actininas (Figura 15).*

*Los dominios “coiled coil” son regiones ricas en hélices alfa. Este tipo de estructuras es muy abundante en proteínas como las  $\alpha$ -actininas. Los motivos SEL1 (S) están asociados a la regulación negativa de los genes *lin-12* y *glp-1* que codifican para probables proteínas extracelulares en *Caenorhabditis elegans* [235]. Los motivos C2, están formados por secuencias de unión a calcio*

presentes en fosfolipasas, protein kinasa C, entre otros. Estos dominios están relacionados a la modulación de transporte membranar, transducción de señales y localización subcelular [236].

### **9.8. Análisis in silico del gen *tvactn3* de *T. vaginalis*.**

El análisis in silico de la secuencia del gen *tvactn3* reportada en el genoma de *T. vaginalis* corresponde a un gen con un marco de lectura de 3390 pb que codifica a la proteína TvACTN3, de 1129 residuos de aminoácidos (Figura 16), con un peso molecular teórico de 124.2 kDa y un pI de 4.9 ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)).

#### **9.8.1. Regiones regulatorias 5´.**

Un alineamiento de las secuencias correspondientes a los EST reportados para el gen *tvactn3* en la base de datos [www.trichdb.org](http://www.trichdb.org) mostró dos probables *Inr* localizados a 3 y 10 pb la región río arriba del ATG del gen. Estos posibles elementos de inicio de la transcripción presentan la secuencias **TCACT**), similar a la secuencia consenso reportada en *T. vaginalis* para el *Inr* es **TCAYT/A** [237] (Figura 16).

Además, tiene una secuencia que corresponde al motivo 4 de función desconocida que se encuentra repetidamente en las regiones río arriba de algunos genes, con la secuencia CAAAATT) a 38 pb río arriba del ATG [237] (Figura 16B). Sin embargo, no se sabe si es un elemento o una secuencia que se encuentra en varias regiones río arriba de algunos genes y tampoco se sabe si cumple alguna función como “enhancer” o represor en la transcripción de los genes. Para que un motivo sea considerado como tal, debe cumplir 3 características: 1) El motivo de DNA debe ser representativo, en comparación a ser una opción al azar en las regiones 5´-UTR de genes que codifican a proteínas; 2) Su localización debe ser fija en relación al inicio de la transcripción y

3) Las mutaciones puntuales dentro del motivo podrían afectar la actividad transcripcional [237].

### **9.8.2. Regiones regulatorias 3´.**

La región no traducida 3´-UTR está relacionada con el procesamiento y poliadenilación del mRNA. En *T. vaginalis* tres secuencias motivos en los pre-mRNA se han involucrado en la formación del extremo 3´-terminal: 1) El tetranucleótido UAAA acoplada en la mayoría de los casos al codón de término de la traducción llamada señal poliadenilación (SP), 2) El sitio de corte localizado de 10 a 30 nt río arriba del primer motivo llamado sitio de corte, con la secuencia A<sub>0-3</sub>(AAUU), 3) Un elemento rico en U o GU localizada 30 nt río abajo del sitio de corte (“Downstream element” DSE [149,238]. En el extremo 3´-UTR del gen *tvactn3* se identificaron dos probables secuencias correspondiente a la SP una de ellas acoplada al codón de término de la traducción y la otra a 11nt río abajo del codón de paro,,un sitio de corte (28-31 nt río abajo del codón de paro) y DSE (48-68 pb río abajo del codón de corte) (Figura 16C).

### **9.8.3. Dominios funcionales en TvACTN3.**

La proteína TvACTN3 contiene tres dominios: El Dominio I (DI) incluye dos dominios de unión a actina o calponinas (CH) en la región amino terminal (16-118 aa y 131-228 aa, respectivamente); el Dominio II (DII), formado por cuatro repetidos de espectrina (SR) en la región central o dominio “rod” (393-474 aa, 475-562 aa, 806-905 y 906-987 aa, respectivamente); y el Dominio III (DIII), incluye a dos “EF-hand” (E) (1002-1030 aa y 1038-1066 aa, respectivamente) y un “EF-hand” sensible a calcio (EF) (1069-1129 aa) en el extremo carboxilo terminal (Figura 15).

TvACTN3 MSNNR-GLDDAWEQTIKVF SRWTAQQLSFKGIPFDNVLEEFADGVKLIQILLEIVSKEP 59  
TvACTN2 MSVRREGLLDDAWKTIKVF SRWVQKQLLARQIQFETIETDFEDGKTLNLLLEIVGKEP 60  
TvACTN1 -----MTLTKNWEQTIKVF SRWCNKYCCQAGMKVEDCTQDFEDGVKLIITLLEIVGKEP 55  
TvACTN4 -----MTRTWEETQINTFTKWMNSYLKQRKLNINDIKTDLDCDGTILINLCEILSKKP 52  
TvACTN5 -----MPSRWEETQINTFTRWVNSYLRSRDLKVNLDLKTDLCDGRLLINLCEILTQOT 52  
: \*\*:\*:\*:\*:\* . : : : : \*\* \* : \* \* : \* : .

TvACTN3 MKGKWHKQPKMRVQRENCGMALDFISS-KNIRMVVGIGSDDIIDKNKKLTLGLIWTIINK 118  
TvACTN2 MPKWHKQPKMMVQKRENVDLALKYINEVKKIRTVGIGADDIINKNLKTLGLTWTICINK 120  
TvACTN1 MPGKWHKTPKMRIQKLENDLAIKYISEVKKVRLVIGSNNIVDHDTKLTLGLIWSVINK 115  
TvACTN4 FPSRWHKNPKQKVMLENCHMAVDYINQTLKIKLVGIGGEDVLNGTLKILGLVWSVINK 112  
TvACTN5 FPKKWHKTPKLNMQKLENCHMAVDYINQDMQIKLVGIGGDDVNAGNLKILGLIWSIINK 112  
: : \*\* \* \* : \* \* \* : \* : : \* . : : : \* \* \* : : \* \* \* \* : \* \* \*

TvACTN3 FMIEEISVEEAT-----ARDALLLWAKKNTQGYKGVNVTNFTTSWSDGLAFALINKFR 172  
TvACTN2 FMIEEISVEEAT-----ARDALLLWAKKNTQGYEHVAVNNFTTSWNTGLAFAALINKFR 174  
TvACTN1 FVIEEITVEEAT-----ARDALLLWCKKNTQGYEGVDVTNFTSSWTSGLAFALINHFR 169  
TvACTN4 FQVEAIKEDLAEGEQ-ISGRDKLLQWAKESTANHNGVNIVDEFSKSWHGGLPFCAILHHYL 171  
TvACTN5 YQVEAIQEDFPQTEKKQSGKEKLNWAKTATADHKGVNITDFSKSWRGLPLCAIFHHYL 172  
: : \* \* : . : : \* \* \* \* \* : : \* : \* : \* : \* \* \* \* : : : : :

TvACTN3 PNMLDYDSLQDTQQKENCEKFAACKELGIYVFLDPELDVGTQPDDEKSVVTVQAEFFHFF 232  
TvACTN2 PNLLDYSDLDYNDHKGACEKFAACKELGIYVFLDPELDVIDTTPDEKSVVTVQAEFFHFF 234  
TvACTN1 PELLDYNALDKANHPENCRLAFAECKQLGITVYLDVEDIADTQPDDEKSVVTVQAEFFHFF 229  
TvACTN4 PEIVDYDSITPEN---SINEAFLVMNECGINFLDQDLEVEAPDEKSVVTVQSELYHFF 228  
TvACTN5 PDCINYSIKPED---SINEAFLVMKRAVNVFIDPQDLEVAAPDEKSVVTVQSELYHFF 229  
\* : : \* : : : . \* \* : . \* : \* : \* : \* : \* \* \* \* : \* : \* \*

TvACTN3 AGESKTQAADKLRKI----GIQKAIIEEALNYEKQAQECLDVINTEREKLLAQ----- 283  
TvACTN2 ASESKIAAMADKIKRTV----AIQKQIDELKNITYIEDAKAAIEKMTVEDEKLLAD----- 285  
TvACTN1 ASDTKADQMAEKLNKTV----GIQREIKDMTEAYIQACQAAIAEMDAKSAEIAAD----- 280  
TvACTN4 KKPENIAAAAKRNADRRK----YILATIKKMVNESEGLDHLDALVVMKNIIDTLLLEDPALNF 284  
TvACTN5 KKPEKVEAIHKTLKPIPGFINCTVVNGRNLAAAMDKGGKSDPYVIVKINKNGNPHKTEI IK 289  
: . . : : .

TvACTN3 -----DYDQTVPGVKSCLFN-----CIKFGRRVVRPVIIVDKRG-----VAMKTWGQL 324  
TvACTN2 -----DYEKTIPIGIRGLAS-----VISYNRDIRPEIVDHRA-----KAMRSWAAL 326  
TvACTN1 -----SFDKDTKGIKQKLVN-----TIAYGKDGRPKIFELKA-----NAVAAYSAL 321  
TvACTN4 CPLCAEFETIEKLYALLKNPKVPADALQQIENLNKQLLEFQEKVKQLDEEKAQKEKEAE 344  
TvACTN5 ETLNPDFNQDFTIQFADQKVDSIILECYDWDHNSHDLIGTAEIQLNQYVFNRIERDIE 349  
. : : : .

TvACTN3 VTKCNSNGRPIPVQKEELLPTLNLFEEIEKTAASDRRDELTKILEELQAKLINAFDEAA 384  
TvACTN2 VTKCKSGNRPIPEIQGLEPEALTNKFNEIEQTSSTRRDELTELNDMIKKKVEDFMAKC 386  
TvACTN1 QLKCKATKRPMPPEIPPEYIEQALNQRFEQLDQQVSDRRSELGLLN----- 367  
TvACTN4 ELKQQNNAKEQELQNLKNEKEAKEKELEEKNEKAAKEQELNVKNEKTAKE-QELEN IK 403  
TvACTN5 LKKEGGHRKERGTIHFRIILLASLDNTDSEGEDNVVPEENATVPPIVNLATVIDARDLP 409  
\* : : : . : . : : . : .

TvACTN3 NAKIAVCDDINNKAINTGDLYEQRDALNNYLQQAQEAAG----- 424  
TvACTN2 MDIINKCDAIHEEVKTIETGTTAEKDKKVEQKLHEAEDLQP----- 426  
TvACTN1 -----DKVKSYSVQAKEVQG----- 382  
TvACTN4 NEKEAKEKELENVNEKAAKEQELNVKNEKAAKEQELLEN----- 443  
TvACTN5 AMDADGQADPFCILTVNGKGEQFKTRVIKNNLNPVWNHAFNIPINNQFTDTLYVNLIDFD 469  
: . :

TvACTN3 TVKELQPQFVELVELRLNNRVKRTVIAVDGEFEQLIATIKRLIEGNKAAIFE--YENKKK 482  
TvACTN2 ALAELTPLFQELVELRINTLSSQTDSDSVNRHHSQLITYIKHLEQLNGKLFEE--ETNEAR 484  
TvACTN1 ALEALD----- 388  
TvACTN4 VKNEKTAKEQELENIKNEKEAKEKELEEKNEKTSKEQELNVKNEKAAKEQLAKMTTD 503  
TvACTN5 ETNNNDLIGYNKISLRDLQIGKPEELQLPLRKLHAVRTDRGTVHMLQAYKPGEEPEIMP 529

TvACTN3 IEEYNQAAQKYVDEVAQLKQDLEAIAGELREQRAANVDKSEEIIQKRNQVSDIRPMFQEL 542  
TvACTN2 INEYNALAQPLYDEAIAFKEEVLAISGELRE----- 515  
TvACTN1 -----KELDSIEGELEQ----- 400  
TvACTN4 FEQKNNESGNLSSELEQLKQQLAAQQQNEQLNIMIKAKDNEMNAVIRANEQLQNLNQ 563  
TvACTN5 PKEEPEVKAFVDCKVISATKLVAMDSNGKSDPYVVLKYNKDGEPQKTEICKKTLNPEWN 589  
. : : : .

```

TvACTN3      EKQSLHLGIENTPDAVTAMYTAQLSQAQDKITQISKQLVDEYNEKAI A I HEKIGDVHKTA 602
TvACTN2      -----
TvACTN1      -----
TvACTN4      KDEELKKKDEIN----- 576
TvACTN5      QDFTFTVVQKKT DILYVECWDWDHNSHDLIG----- 621

TvACTN3      DSVSGTTQEKKDGALKCQSDLTEIKASIQPTLEEPYQYLSIKYSNAVKYTPNDLTRDSD 662
TvACTN2      -----
TvACTN1      -----
TvACTN4      -----
TvACTN5      -----

TvACTN3      ITFAFLTTLNQLLEEQLQSESN DARIAAYNELATKYVDIANEFHQKVSTIDGRATR RNA 722
TvACTN2      -----RRTQ 519
TvACTN1      -----
TvACTN4      -----AIKEAKNSELAQLRSENEQNLAKKDLLLQEKDQEIQKRFREIEDLNN 623
TvACTN5      ---VGEVKIEEFMYDTLVETDVELKKEGGHRKERGTVHLRIFVTRDRTGETDNEMGNTES 678

TvACTN3      YLSAQLELGNKREGLSQLKPEYEALERDTLHIRVNDSPATISKVYANALQIITDKLAEIY 782
TvACTN2      FLAKQAEAPT KREHVNEIDPIFDGLEKDSLHLRVNHSPT EIRNVYAVTLQHIITELNKIF 579
TvACTN1      -----KKEALNAKVD----- 410
TvACTN4      NKEELLKQKDQIEIQMKNLQSQEEKRREAEVSELSQQIEQLKQLQSSGAQEAQNIL IETQ 683
TvACTN5      EGEEAPSAQPAETATPIVVHCTVVD AKDLPAMDINGKADPFQCLTVNGKGQ EYKTEVVMK 738
                ::      :.

TvACTN3      NEMVADFDAQVLAIAEKVKVQN--VELTGTLEL LKDKIAQSKAQAQEILPELPTLDAPW 840
TvACTN2      EEMVANFDATAVPIIDGITALVTSSHQIPGDAAAVKAQVEENLASLDGFAEKIQALQDPY 639
TvACTN1      -----
TvACTN4      NKYSAQIAEKDKRIEEL ENAKS QLEKESEDRNEENKLLVQC SNLRDEVSSKDKALQESE 743
TvACTN5      NKNPTWNQSFNIPVEDQNKDHLVYVTLDFDKDSNDNLIGYNR IKLRDLPLNTPVEREVEL 798

TvACTN3      EDLCDFNLNRYVKQTPENLRATLEAVIAFLNHQEESNNEKLASEGRESRIFAYNQKA AVS 900
TvACTN2      NELVEFKLNKYVTYTYS DATGELDQARLDLQIILAKKTFLEEEERKARINNYTVKADEH 699
TvACTN1      -----
TvACTN4      KNLEEAKKEINVIVTKQKQSADDEAVKAAVEGYKEVIAGLKCEYGHGVTKNDTEAFKH YT 803
TvACTN5      KKKHGLRPRDGRVAHLIILTAYKPGEEPQIEATPVEEPVKSEVPKAEFLDCTVVSASNLVK 858

TvACTN3      VALA-RELEQKVSNDGTLPEKQKLFDIKQEVIDGDE-AAKELTPIFEDLEKDELHLAI 958
TvACTN2      MNEA-HALD GKINSVDGHELEPKRQKLYEVREVN AKKEKAAEELTPIYEDLEK DQLHLEI 758
TvACTN1      -----KIRSKHG-----DVEALAPIYNDIEEAEMHLEI 438
TvACTN4      VAAK-LNIAEGQFSLGRLL EQGRGNIKNERLAFQSYARAQNQNHYAAMNNMAAMLLTGRG 862
TvACTN5      MDKHGLSDPYVVLKVNKDGE PQKTEVVQNLNPEWNQEFHFTPVDKTKDVLVVECYDWD D 918
                .                : :

TvACTN3      EDTPDSIAAFFANILSHIDGLVREIDTAIAAEKGLQISEEQLTFR----- 1004
TvACTN2      TSTPASINIFFENLIAHIDTLVKEIDAAIAAAKGLEISEEELNEFK----- 804
TvACTN1      DETPSFIESIYNATIAHATTLIREIEAAIAAAKGLEISEEQ LASFH----- 484
TvACTN4      VDKDEKLAAQKFKVAADNGNVA AQCNYGILLDKGTGVEKNEIDAVRYFR LANAGHPRAI 922
TvACTN5      HNSHDLIGNAILELAQYAYDIP I EADVELKKEGGHRKDRGTVHLRFTIRK----- 968
                .. :                : : : * .. :

TvACTN3      -----ETFNHFDKDHTNFLQYFELRACL T----- 1028
TvACTN2      -----DTFKYFDKDKSNSLEYFELKACL T----- 828
TvACTN1      -----ETFNHFDKDHSKSLQYFELRACL T----- 508
TvACTN4      NNLAYKLENGSGIDKDHAEATKMFHQAA SQGSVAKFNVSLY-----ESDQEKV 971
TvACTN5      -----DKTGEFDDEHTTSEEENKAVAKADPIVLHCTVVDGVELPAMDITGFSDFVVR 1021
                :. *.: : : . ..

TvACTN3      -----ALGDDISD-----DQAKEVCKKYSATGE-EKLNFD EYVKF 1062
TvACTN2      -----ALGEDITD-----DQAKEYCKKYSKGE GTALEFDDYVRF 863
TvACTN1      -----ALGEDFTD-----DQAKETCKKYSASGE-EKLNFD EYVKF 542
TvACTN4      LNEWKLAASQNVPAAKNNIGV TMSDGI L LPKNEE GAELVKTA AEGGS--TAAIFNYSIM 1029
TvACTN5      LTVNGQKPYTTGIVMRELNPIWNQEFNIPIDNQN KDKLYITCYDWD EDSANDLIGYRL 1081
                :. :. : : : . .. : * :

```

```

TvACTN3      MLDHFSKAENADTTAKAFKAIANNNPILTDALDQYFKGEEAEYLR--KVLKQVDGGYEF 1120
TvACTN2      MLDHFSKAETTETTMEAFKAIAQNQPVLTDAQLDQYFFSAEDAAYLR--SQLKQGENGYEF 921
TvACTN1      MLDHFNKAETNETTMEAFKTIAGNPVLNDAQLDRYFSAEDAAFLR--QELPQVEGGYDF 600
TvACTN4      LMNAKGVENKKGAARLLKISSDKGYAKAMNNLGVMFIKGEVVKLAPLEGVKMVRKAADE 1089
TvACTN5      PLDDIKVGEPVERECILKKKHALRANRGKIHLKICAFKPGEEPQVSKVPGAHPIKNIKPK 1141
      ::      *      .      *      :      *      :      :

TvACTN3      AEWVNSIYA----- 1129
TvACTN2      ADWVNSLYNQ----- 931
TvACTN1      QSWVNKIYA----- 609
TvACTN4      LNDPDALFNMGLIFLKGLGVTADPAFAQNYFQKAAKNGNKTAELYLQQ----- 1137
TvACTN5      ETLLDATVVNARDLVPMDKNGKSDPYVILKLNRGIPQQTTVVKASLNPDINENFDFTLI 1201
      :

TvACTN3      -----
TvACTN2      -----
TvACTN1      -----
TvACTN4      -----
TvACTN5      DPKTDVLLVYCYDWDDHNNHDLIGVGEIPLEGIALDVPVEKQVELKKEGGHRKERGKVNL 1261

TvACTN3      -----
TvACTN2      -----
TvACTN1      -----
TvACTN4      -----
TvACTN5      KLRLHNSRDG 1271

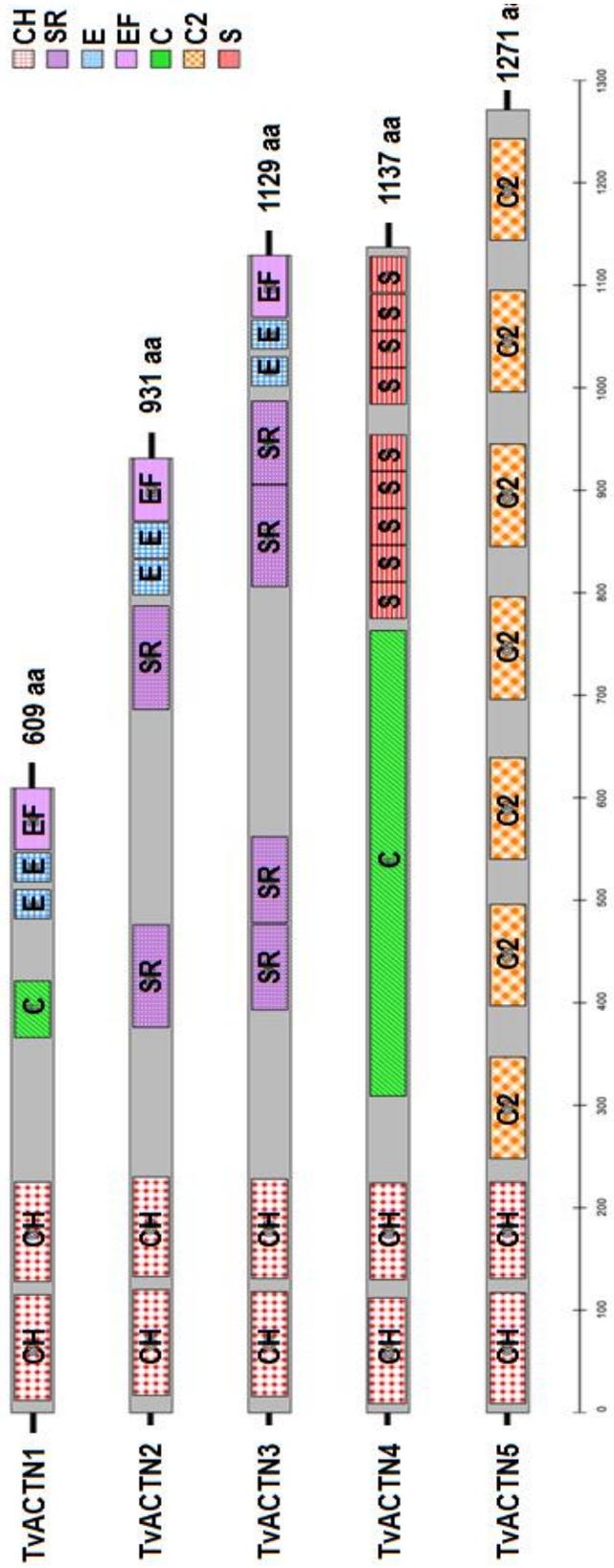
```

**Fig. 14. Alineamiento múltiple entre las secuencias deducidas de aminoácidos de las cinco  $\alpha$ -actininas reportadas en el genoma del aislado G3 ([www.trichdb.org](http://www.trichdb.org)) y la secuencia de TvACTN3 del aislado CNCD 147 de *T. vaginalis*.**

*Las secuencias deducidas de aminoácidos de las cinco  $\alpha$ -actininas de *T. vaginalis* se alinearon mediante el programa ClustalW. Los aminoácidos idénticos en todas las secuencias se señalan en color gris con la finalidad de mostrar los aminoácidos idénticos (\*). Los aminoácidos diferentes pero muy conservados o similares (:). Los aminoácidos diferentes poco conservados (.). Los aminoácidos diferentes o espaciamentos entre las secuencias (---). Las  $\alpha$ -actininas de *T. vaginalis* son: TvACTN1: TVAG\_156680, TvACTN2: TVAG\_190450, TvACTN3: TVAG\_239310, TvACTN4: TVAG\_247460, TvACTN5: 260390.*

**Fig. 15. Probables dominios funcionales presentes en las  $\alpha$ -actininas de *T. vaginalis*.**

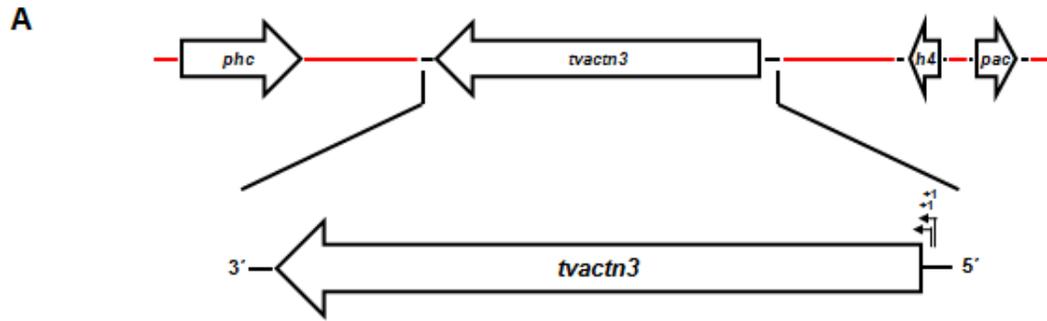
*Principales motivos hallados a partir de las secuencias deducidas de aminoácidos de los cinco genes reportados en el genoma de *T. vaginalis* [47]. Los dominios funcionales putativos de las cinco proteínas: TvACTN1 (609 aa), TvACTN2 (931 aa), TvACTN3 (1129 aa), TvACTN4 (1137 aa) y TvACTN5 (1271 aa), se analizaron mediante los programas: SMART, MOTIF SCAN y PROSITE. Se hallaron las secuencias principales de motivos conservados presentes en las cinco proteínas TvACTNs, dos dominios de calponina (CH) en el extremo amino terminal, seguido por repeticiones variables de espectrina (SR) en el dominio central “rod” y dos regiones con homología a los “brazos EF” (EF-hand): Un brazo EF (E) y un segundo brazo EF insensible a calcio (EF) en el extremo carboxilo terminal. TvACTN4 y TvACTN5 presentan una región central y un extremo carboxilo terminal más divergente. La proteína TvACTN4 presenta un dominio “coiled coil” (C) y nueve dominios SEL1 (S). Y la proteína TvACTN5 presenta siete dominios C2 (C2).*



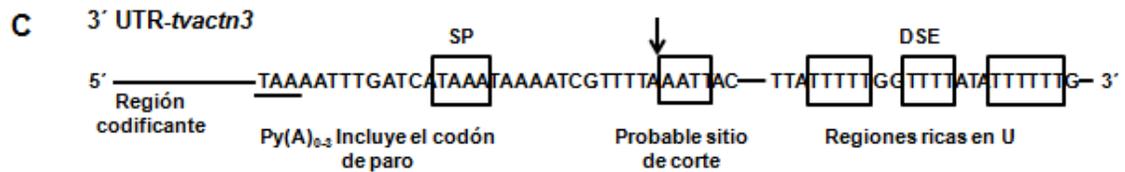
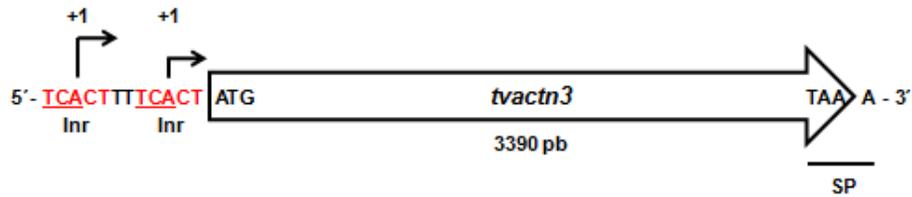
**Fig. 16. Mapa genómico del gen *tvactn3* y secuencias regulatorias.**

**A.** *Análisis in silico del gen tvactn3 de T. vaginalis.* **B.** *Regiones regulatorias 5'.* **C.** *Regiones regulatorias 3'*

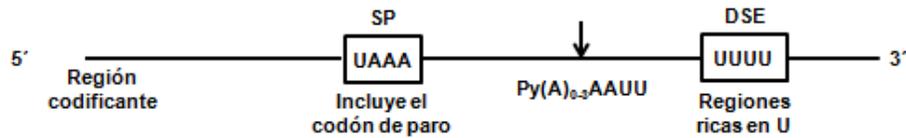
*Genes correspondientes a: phc: proteína hipotética conservada, tvactn3:  $\alpha$ -actinina 3, h4: histona 4, pac: proteína A del centrómero. SP: Señal de poliadenilación, DSE: Elementos río abajo y la flecha vertical ( $\downarrow$ ) indica el sitio de corte.*



Secuencia consenso del elemento promotor Inr de *T. vaginalis*: **TCAYT/A**



Secuencia consenso 3'-UTR de *T. vaginalis*



### 9.9. Clonación del gen completo de la TvACTN3.

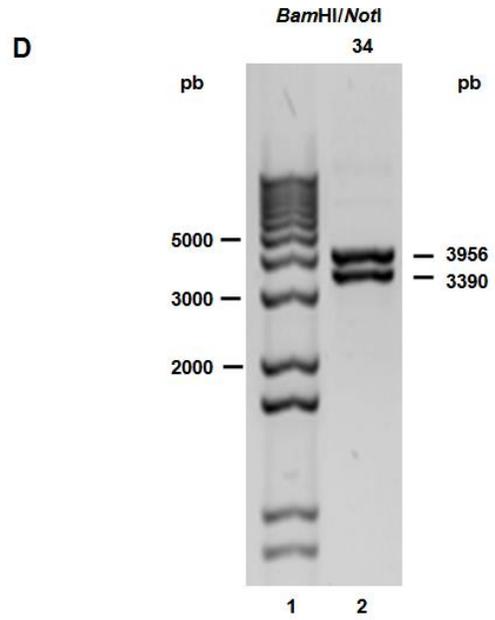
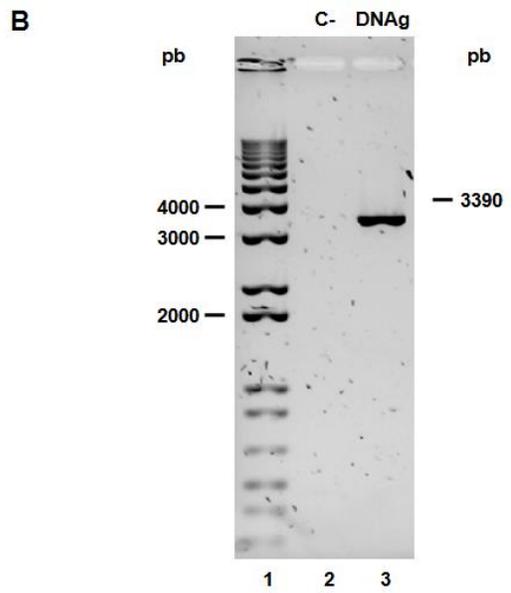
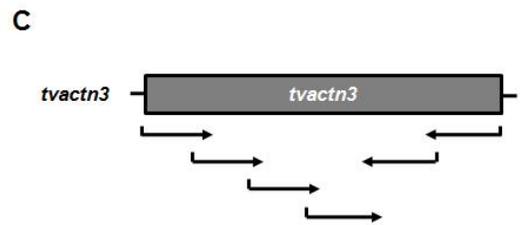
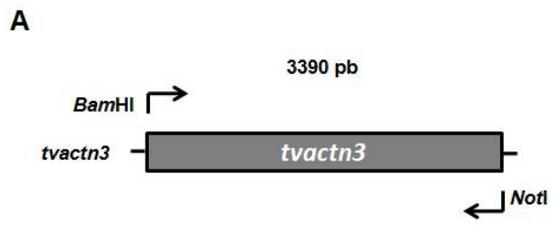
*Para poder caracterizar funcionalmente a la  $\alpha$ -actinina 3 (TvACTN3) se necesitaba a la proteína recombinante por lo que primero se clonó el gen, se secuenció y se subclonó en un vector de expresión en bacterias.*

*Para clonar el gen *tvactn3* por PCR se amplificó con una enzima de alta fidelidad el fragmento (3390 pb) que codifica a la  $\alpha$ -actinina de 135 kDa (TvACTN3), a partir de DNA genómico de *T. vaginalis* del aislado CNCD 147 y los oligonucleótidos sentido y anti-sentido (Tabla 4). En la Figura 17B se muestra el amplicón de 3390 pb, el cual se purificó y se clonó en el vector de transición (pCR®4-TOPO®) y se secuenció el inserto utilizando 6 oligonucleótidos diferentes (Figura 17C). El DNA plasmídico conteniendo el inserto del gen *tvactn3* completo en el vector pCR®4-TOPO®, se digirió con: BamHI y NotI y se observó la liberación de un fragmento de 3390 pb (correspondiente al gen *tvactn3*) (Figura 17D), el cual se subclonó en el vector de expresión pProEX-HTb. Las clonas candidato se caracterizaron mediante PCR en colonia y doble restricción enzimática.*

*Mediante el alineamiento múltiple de la secuencia del gen *tvactn3* del aislado G3 reportado en el genoma de *tricomonas* [47] con la secuencia del gen *tvactn3* del aislado CNCD 147 de *T. vaginalis*, se identificaron 13 cambios en la secuencia de nucleótidos (Figura 18 y Tabla 6), que generaron 4 cambios en la secuencia deducida de aminoácidos (Figura 19 y Tabla 6). Estos cambios se encuentran en la región central correspondientes a los repetidos espectrina. Esta región es también la más divergente entre las cinco TvACTNs. Los cambios en la secuencia de aa al parecer no causan cambios en la estructura de la proteína (Geno 3D y Pymol), los cambios pertenecen a aminoácidos del mismo grupo o carga. Sin embargo, no sabemos si pueden causar cambios en la función de la proteína TvACTN3.*

**Fig. 17. Amplificación, clonación y secuenciación del gen *tvactn3*.**

*A. Representación esquemática del gen completo *tvactn3* con los sitios de unión de los oligonucleótidos. B. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 0.5x, teñido con bromuro de etidio al 1%. Carril 1. Marcadores de tamaño molecular de 1 Kb; carril 2, control negativo; carril 3, amplicón del gen completo *tvactn3* de 3390 pb. Gel de agarosa al 1% en TBE 1x. C. Representación del vector de clonación pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>. D. Representación esquemática de los seis diferentes oligonucleótidos utilizados para la secuenciación del gen *tvactn3* (3390 pb).*



**Fig. 18. Secuencia de nucleótidos del gen *tvactn3*.**

*La secuencia completa del gen tvactn3 del aislado CNCD147 de T. vaginalis, obtenida por el método de secuenciación de Sanger, se depositó en la base datos del “GenBank” con el siguiente número de acceso: KF280188. Los nucleótidos subrayados corresponden a los nucleótidos cambiados en comparación a la secuencia de nucleótidos del gen tvactn3 del aislado G3 de T. vaginalis, reportado en la base de datos del genoma [47].*

1 ATGTCTAATA ATCGTGGACT TCTAGACGAT GCATGGGAAC AGACTCAGAT CAAAGTTTTTC  
61 TCAAGATGGA CAGCTAAACA GCTTTCCTTC AAGGGAATTC CATTTGACAA CGTTTTAGAG  
121 GAATTTGCAG ATGGCGTTAA ACTCATTCAG CTCCTTGAGA TCGTTTCTAA GGAACCAATG  
181 AAGGGCAAAT GGCACAAGCA GCCAAAGATG CGCGTTCAA TCGTGAAAA CTGTGGTATG  
241 GCCTTAGACT TCATCTCATC AAAGAATATC CGTATGGTTG GTATCGGATC TGATGATATC  
301 ATCGACAAGA ACAAGAAGCT CACACTCGGT CTTATCTGGA CAATCATCAA CAAGTTCATG  
361 ATTGAAGAAA TTTCTGTCGA AGAAGCCACA GCTCGTGACG CTCTTCTTCT TTGGGCTAAG  
421 AAGAACACAC AAGGATACAA GGGTGTCAAT GTTACAAACT TCACAACATC CTGGTCCGAC  
481 GGTCTTGCCT TTTGCGCCTT AATCAACAAG TTCCGTCCAA ACATGCTCGA CTACGATTCA  
541 CTTGATCAGA CACAGCAGAA GGAGAACTGT GAGAAGGCCT TCGCTGCATG CAAGGAACTC  
601 GGCATCTACG TCTTCCTTGA TCCAGAAGAT CTTGTGCGAA CACAGCCAGA TGAGAAATCC  
661 GTCGTTACAC AGGTTGCCGA ATTCTTCCAC TTCTTCGCTG GCGAGTCAA GACACAGGCC  
721 GCCGCTGACA AGCTCAAGCG CACAATCGGC ATTCAGAAGG CCATCGAAGA AGAAGCCCTC  
781 AACTACGAGA AGCAAGCTCA GGAGTGCCTC GACGTTATCA ACACAGAACG CGAGAAGCTC  
841 CTTGCTCAAG ACTACGACCA GACAGTTCCA GGAGTTAAGT CCAAACCTCTT CAACTGCATC  
901 AAGTTCGGAC GTGTTGTTTCG TCCAGTCATC GTCGACAAGC GTGGTGTTCG TATGAAGACA  
961 TGGGGTCAGC TTGTTACAAA GTGCAACTCC AATGGCCGTC CAATTCCACA GGTCAAGGAA  
1021 GAGTTGTTAC CACCAACCCT CAACCTCAAG TTCGAAGAGA TCGAAAAGAC AGCATCAGAC  
1081 CGCCGCGACG AACTCACAAA GATTCTCGAG GAACTCCAGG CCAAGTTAAT CAATGCCCTC  
1141 GACGGAAGCTG CCAACGCTAA GATTGCTGTC TGCGACGACA TCAACAACAA GGCTATCAAC  
1201 CTTACAGGAG ATCTCTACGA ACAGCGCGAT GCCCTTAACA ACTACCTCCA GCAGGCCAG  
1261 GAAGCTGCTG GCACAGTCAA GGAATTACAG CCACAGTTCG TTGAACTTGT CGAATTAAGA  
1321 CTCAACAACA GAGTTAAGCG CACAGTCATC GCTGTTGATG GCGAATTCGA ACAACTCATC  
1381 GCTACAATCA AGCGTCTTAT CGAAGGCAAC AAGGCTGCTA TCTTCGAATA CGAGAACAAG  
1441 AAGAAGATCG AAGAGTACAA CCAGGCTGCT CAGAAGTACG TCGACGAAGT TGCTCAGCTC  
1501 AAGCAAGACC TTGAAGCAAT CGCTGGCGAA CTCCGCGAAC AGCGCGCTGC CAACGTTGAC  
1561 AAGTCAGAAG AAATCATCCA GAAGAGAAAT GGCGTTTCTG ACATCAGACC AATGTTCCAG  
1621 GAACTCGAAA AGCAGTCCCT CCACCTCGGT ATCGAGAACA CTCCAGATGC CGTCACAGCC  
1681 ATGTACACAG CTTGCCTTTC TCAAGCTCAG GACAAGATCA CACAGATCTC AAAGCAGCTC  
1741 GTTGACGAGT ACAACGAGAA GGCCATCGCT ATCCACGAGA AGATCGGCGA TGTCACAAG  
1801 ACAGCTGACA GCGTTTCAGG CACAACACAG GAGAAGAAGG ATGGTGCCCT CAAGTGCCAG  
1861 TCTGATCTCA CAGAGATCAA GGCTTCAATC CAGCCAACAC TTGAAGAACC ATACCAGTAC  
1921 TTACAGTCCA TCAAGTACTC CAACGCTGTC AAGTACACAC CAAACGACTT AACACGTGAC  
1981 TCCGACATCA CATTGCTTCT CTTGACAACA CTCCTCAACC AGCTCGAAGA GCAGTTGCAG  
2041 TCAGAATCCA ACGATGCTCG CATCGCTGCA TACAACGAGT TGGCCACGAA GTACGTGCAG

2101 ATCGCTAACG AATTCCACCA GAAGGTCAGC ACAATCGATG GCGATCGCGC CACACGCCGC  
2161 AATGCTTACC TCTCTGCTCA GCTCGAGTTA GGAAACAAGC GTGAAGGATT GTCCCAGCTC  
2221 AAGCCAGAGT ACGAAGCACT CGAACGTGAT ACATTACACA TCCGTGTCAA TGATTACCA  
2281 GCTACAATCT CAAAGGTTTA CGCCAACGCT CTTCAGATCA TCACAGACAA GTTGGCTGAA  
2341 ATCTACAACG AGATGGTTGC TGATTTTCGAT GCCCAGGTTT TGGCCATCGC CGAGAAGGTC  
2401 AAGGTTGTAC AGAACGTCGA ATTAACAGGC ACACTCCTTG AGTTGAAGGA TAAGATCGCT  
2461 CAGTCAAAGG CTCAAGCTCA GGAAATCCTT CCAGAGTTAC CAACACTCGA TGCTCCATGG  
2521 GAAGATCTCT GCGACTTCAA CCTCAACTAC CGTGTCAAGC AGACACCAGA AACTTGAGA  
2581 GCAACACTCG AAGCTGTCAT CGCATTCCTC AACCACCAGG AGGAATCCAA CAACGAAAAG  
2641 CTTGCTTCCG AAGGCCGTGA ATCCCGTATC TTCGCTTACA ACCAAAAGGC AGCAGTTTCC  
2701 GTTGCTTTGG CTCGCGAGTT GGAGCAGAAA GTTTCCAATG TCGACGGCAC TCTTCCTGAG  
2761 AAGCAGCAGA AGTTGTTCGA CATCAAGCAG GAAGTCATCG ATGGCGATGA GGCTGCTAAG  
2821 GAGTTGACAC CAATCTTCGA AGACCTCGAA AAGGACGAAC TCCACCTTGC TATCGAAGAC  
2881 ACACCAGATT CAATCGCTGC ATTCTTCGCA AACATCTTAT CACACATCGA CGGCCTTGTT  
2941 CGCGAAATCG ATACAGCCAT CGCTGCTGAG AAGGGTCTCC AGATCTCAGA AGAGCAGCTC  
3001 ACAGAGTTCA GAGAAACATT CAACCACTTC GATAAGGACC ACACAAACTT CTTACAGTAC  
3061 TTCGAACTCC GCGCTTGCCT TACAGCTCTT GGCGATGATA TCTCCGATGA TCAGGCCAAG  
3121 GAAGTCTGCA AGAAGTACTC TGCAACAGGC GAAGAGAAGC TTAACTTCGA TGAGTATGTT  
3181 AAATTCATGC TTGACCACTT CTCCAAGGCT GAAAACGCAG ATACAACAGC AAAAGCATTC  
3241 AAGGCTATCG CAAACAACAA CCCAATCCTT ACAGACGCAC AGCTCGACCA GTACTTCAAG  
3301 GGTGAAGAGG CAGAGTACCT TAGAAAGGTC CTAAAGCAAG TCGACGGCGG ATACGAATTC  
3361 GCCGAGTGGG TCAATTCTAT CTATGCCTAA

**Tabla 6. Cambios en la secuencia de nucleótidos del gen *tvactn3* entre el aislado G3 y el aislado CNCD147 de *T. vaginalis* y su efecto en la secuencia de aminoácidos de TvACTN3.**

<b>Nucleótido (Posición)</b>	<b><i>T. vaginalis</i> aislados: G3 → CNCD147</b>	<b>Efecto en aa</b>
42	A→G	---
93	A→G	---
363	C→T	---
726	T→C	---
1037	C→A	T→N
1104	C→T	---
1134	G→T	N→K
1143	T→C	---
1847	T→C	A→V
2087	A→C	T→K
2451	C→T	---
2781	T→C	---
3333	C→A	---

**Fig. 19. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína TvACTN3.**

*La secuencia deducida de aminoácidos de la proteína TvACTN3 del aislado CNCD147 de T. vaginalis. Los aminoácidos resaltados y subrayados corresponden a los aminoácidos que cambiaron en comparación a la secuencia de aminoácidos de la proteína TvACTN3 del aislado G3 de T. vaginalis.*

1 MSNNRGLLDD AWEQTQIKVF SRWTAKQLSF KGIPFDNVLE EFADGVKLIQ  
51 LLEIVSKEPM KGKWHKQPKM RVQMRENCGM ALDFISSKNI RMVGIGSDDI  
101 IDKNKKLTLG LIWTIINKFM IEEISVEEAT ARDALLLWAK KNTQGYKGVN  
151 VTNFTTSWSD GLAFCALINK FRPNMLDYDS LDQTQQKENC EKAFACKEL  
201 GIYVFLDPED LVGTQPDEKS VVTQVAEFFH FFAGESKTQA AADKLRKTIG  
251 IQKAIEEEAL NYEKQAQECL DVINTEREKL LAQDYDQTVP GVSKLFCNCI  
301 KFGRVVRPVI VDKRGVAMKT WGQLVTKCNS NGRPIPVQKE ELLPPNLNLK  
351 FEEIEKTASD RRDELTKILE ELQAKLIKAF DEAAAKIAV CDDINNKAIN  
401 LTGDLYEQRD ALNNYLQQAQ EAAGTVKELQ PQFVELVELR LNNRVKRTVI  
451 AVDGEFEQLI ATIKRLIEGN KAAIFEYENK KKIEEYNQAA QKYVDEVAQL  
501 KQDLEAIAIGE LREQRAANVD KSEEI IQKRN GVSDIRPMFQ ELEKQSLHLG  
551 IENTPDAVTA MYTACLSQAQ DKITQISKQL VDEYNEKAIA IHEKIGDVHK  
601 TADSVSGTTQ EKKDGVLLKQC SDLTEIKASI QPTLEEPYQY LQSIKYSNAV  
651 KYTPNDLTRD SDITFAFLTT LLNQLEEQLQ SESNDARIAA YNELAKKYVD  
701 IANEFHQKVS TIDGDRATRR NAYLSAQLEL GNKREGLSQL KPEYEALERD  
751 TLHIRVNDSP ATISKVYANA LQIITDKLAE IYNEMVADFD AQVLAIAEKV  
801 KVVQNVELTG TLELKDZIA QSKAQAEIL PELPTLDAPW EDLCDFNLNY  
851 RVKQTPENLR ATLEAVIAFL NHQEESNNEK LASEGRESRI FAYNQKAASV  
901 VALARELEQK VSNVDGTLPE KQKLFDIKQ EVIDGDEAAK ELTPIFEDLE  
951 KDELHLAIED TPDSIAAFFA NILSHIDGLV REIDTAIAAE KGLQISEEQL  
1001 TEFRETFNHF DKDHTNFLQY FELRACTAL GDDISDDQAK EVCKKYSATG  
1051 EEKLNFDYV KFMLDHFASKA ENADTTAKAF KAIANNNPIL TDAQLDQYFK  
1101 GEEAEYLRKV LKQVDGGYEF AEWVNSIYA

### **9.10. Subclonación, expresión y purificación de la proteína recombinante TvACTN3r.**

*Una vez confirmada la clonación del gen tvactn3 en el vector de expresión, se transformaron células competentes E. coli Rosetta-gami™ con la construcción pProEX-HTb-tvactn3. Se realizó la inducción y expresión de la proteína recombinante TvACTN3r de 135 kDa (Figura 20A, carril 3)*

*La purificación de la TvACTN3r se realizó por cromatografía de afinidad a Níquel, a partir de la fracción soluble (tal como se describe en Materiales y Métodos). Las diferentes fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE al 8% (Figura 20A), como se esperaba, se observa poca o nula proteína recombinante TvACTN3r en la fracción de proteínas no unidas (PNU) (Figura 20A, carril 4). La TvACTN3r se eluyó entre las fracciones E1-E5 (Figura 20A, carriles 5 al 9), que se confirmó mediante el ensayo de WB (con el anticuerpo anti-histidinas), que muestra el reconocimiento de una proteína de 135 kDa de la TvACTN3r (Figura 20B). De esta manera se obtuvo la expresión de la proteína  $\alpha$ -actinina de 135 kDa (TvACTN3r).*

### **9.11. Inducción, expresión y purificación de la hIRP-1r recombinante.**

*También se purificó a la proteína hIRP-1 recombinante (donado generosamente por el Dr. Lukas Khün), la cual se encuentra clonada en el vector pGEX-2T. Para ello se realizó la inducción y expresión de la hIRP-1r con 1 mM de IPTG (Figura 21A, Carril 3) y se purificó por cromatografía de afinidad a GST (columna empacada con Glutation-sefarosa 4B) (Figura 21A, Carriles 4-10). La proteína hIRP-1r eluida se muestra en la Figura 21A, Carriles 7 al 10.*

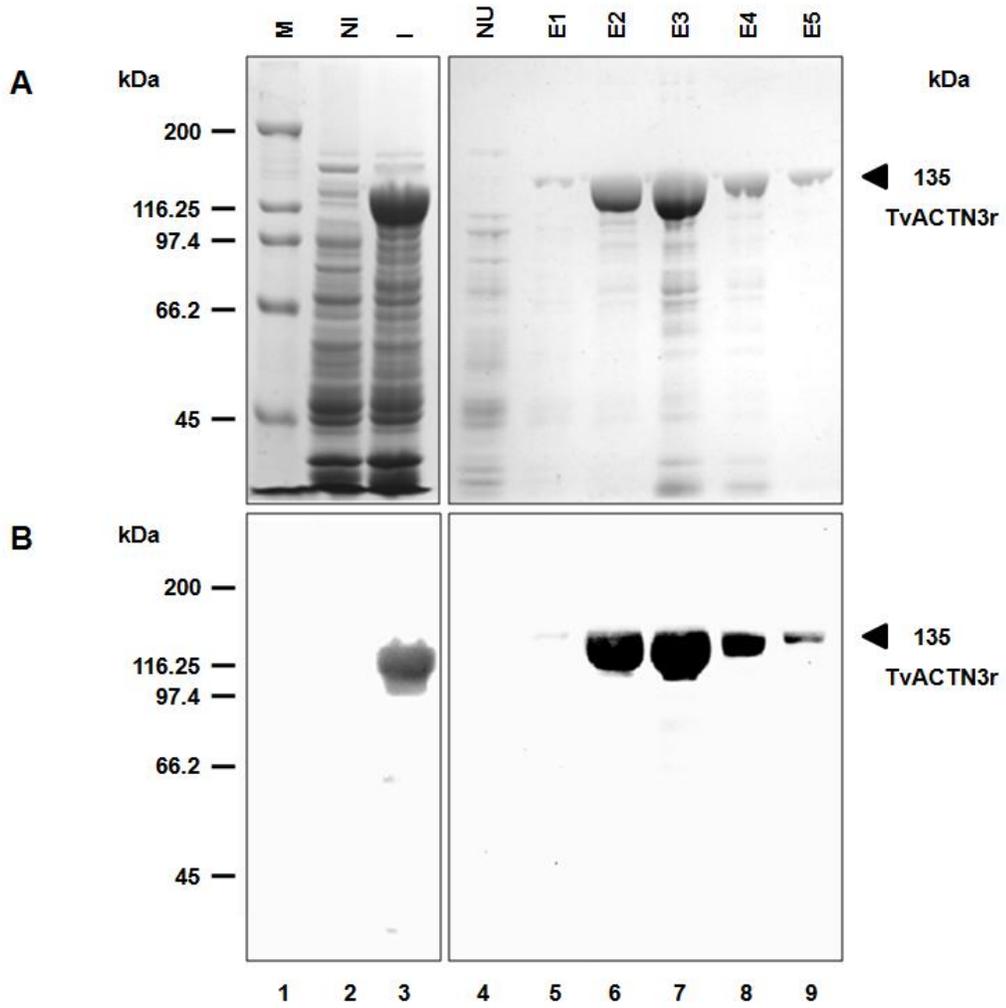
*La proteína hIRP-1r de la fracción de elución (E4; Figura 21 A, Carril 10 y Figura 21 B, Carril 2), se desaló por cromatografía de exclusión a través de una columna de PD-10 (Figura 21 B), se cuantificó y se almacenó a 4 °C, hasta su uso, para la*

*generación de anticuerpos anti-hIRP-1r y para los ensayos funcionales REMSA utilizada como control positivo.*

**Fig. 20. Expresión y purificación de la proteína recombinante TvACTN3r por cromatografía de afinidad a níquel.**

**A. Inducción y expresión de la proteína recombinante TvACTN3r a 16 °C por 16 h. Carril 1.** *Marcador de peso molecular de amplio rango; carril 2. Extracto de bacterias sin inducir (NI); carril 3. Extracto de bacterias inducidas (I); carril 4. Proteína no unida (NU); carriles 5-9. Proteína TvACTN3r purificada por cromatografía de afinidad a níquel (Eluciones 1 al 5, respectivamente).*

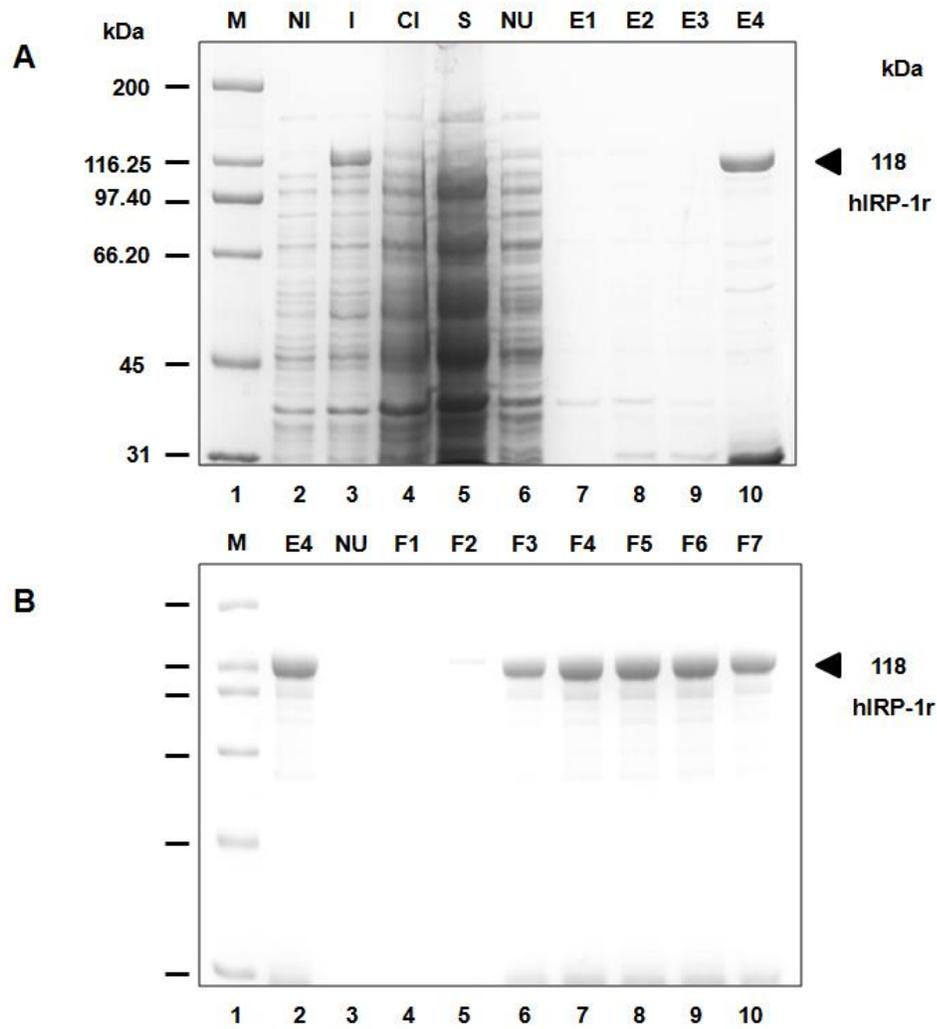
**B. Ensayo de WB con el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -histidinas.** *Un gel duplicado de la sección A se transfirió a una membrana de NC y se realizó el ensayo de WB con el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -histidinas (1:1,000). El revelado se realizó por quimioluminiscencia (Super Signal West Pico Kit - Pierce).*



**Fig. 21. Expresión y purificación de la proteína recombinante hIRP-1r.**

**A. Purificación de la proteína recombinante hIRP-1r por cromatografía de afinidad a glutatión-sefarosa (GST).** Carril 1. Marcadores de tamaño molecular de amplio rango; carril 2. Proteína no inducida (NI), carril 3. Proteína inducida (I); carril 4. Proteína inducida en cuerpos de inclusión (CI); carril 5. Proteína inducida soluble (S); carril 6. Proteína no unida (NU); carriles 7-10. Proteína hIRP-1r purificada por cromatografía de afinidad a GST (Eluciones 1 al 4, respectivamente).

**B. Cromatografía de exclusión (columnas de PD10) de la proteína recombinante hIRP-1r.** Carril 1. Marcador de tamaño molecular de amplio rango; carril 2. Proteína purificada por cromatografía de afinidad a GST (Elución 4; Figura 21A, carril 10); carril 3. Proteína no unida (NU); carriles 4-10. Proteína hIRP-1r purificada por cromatografía de exclusión (columna PD-10).



### **9.12. Obtención de anticuerpos policlonales en contra de las proteínas recombinantes TvACTN3r y h-IRP-1r.**

*Las proteínas recombinantes TvACTN3r obtenida en las eluciones E4 y E5 (Figura 20A) y hIRP-1r obtenida en la elución 3 y 4 (Figura 21B) se dializaron, se cuantificaron y 300 µg de las proteínas recombinantes TvACTN3r y hIRP-1r se utilizaron como antígenos para la producción de anticuerpos policlonales en contra de las proteínas TvACTN3r ( $\alpha$ -TvACTN3r) y hIRP-1r ( $\alpha$ -hIRP-1r).*

### **9.13. Reconocimiento cruzado de las proteínas recombinantes TvACTN3r y hIRP-1r.**

*Debido a que observamos un reconocimiento de proteínas con pesos moleculares similares (135 kDa; Figura 9, carriles 3 y 4), se evaluó si los anticuerpos policlonales generados en este trabajo ( $\alpha$ -TvACTN3r y  $\alpha$ -hIRP-1r) reconocen a las proteínas recombinantes TvACTN3r y hIRP-1r de forma cruzada.*

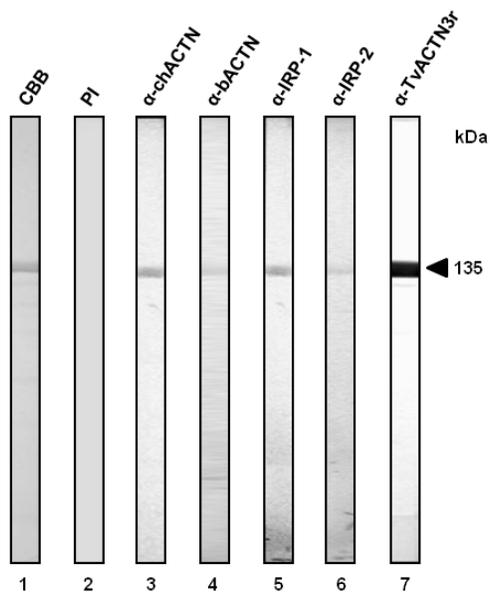
*Para ello las proteínas recombinantes TvACTN3r y hIRP-1r se utilizaron como antígenos en los ensayos de WB. La Figura 22 muestra que los anticuerpos comerciales ( $\alpha$ -IRP-1 y  $\alpha$ -IRP-2), así como el anticuerpo policlonal  $\alpha$ -hIRP-1r reconocieron de forma cruzada a la proteína recombinante TvACTN3r (Figura 22A). Los anticuerpos comerciales  $\alpha$ -ACTN y los anticuerpos  $\alpha$ -TvACTN3r reconocieron de forma cruzada a la proteína recombinante hIRP-1r (Figura 22B). Enseguida, se realizó el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas hIRP-1 y TvACTN3 donde se observó que tienen una similitud y una identidad del 14.33% (Figura 23). Estos resultados sugieren la presencia de epítopes antigénicos compartidos entre ambas proteínas (TvACTN3r y hIRP-1r).*

**Fig. 22. Reactividad cruzada entre los anticuerpos:  $\alpha$ -TvACTN y  $\alpha$ -hIRP-1.**

**A. Carril 1**, Proteína recombinante TvACTN3r teñida con Azul Brillante de Coomassie (CBB). Ensayo de WB de la proteína TvACTN3r incubada con diferentes anticuerpos: **Carril 2**, Suero preinmune (SPI); **carril 3**,  $\alpha$ -chACTN; **carril 4**,  $\alpha$ -bACTN; **carril 5**,  $\alpha$ -IRP-1; **carril 6**,  $\alpha$ -IRP-2; **carril 7**,  $\alpha$ -TvACTN3r. **B. Carril 1**, Proteína recombinante hIRP-1r teñida con Azul Brillante de Coomassie (CBB); Ensayo de WB de la proteína hIRP-1r incubada con diferentes anticuerpos: **Carril 2**, Suero preinmune (SPI); **carril 3**,  $\alpha$ -chACTN; **carril 4**,  $\alpha$ -bACTN; **carril 5**,  $\alpha$ -IRP-1; **carril 6**,  $\alpha$ -IRP-2; **carril 7**,  $\alpha$ -TvACTN3r.

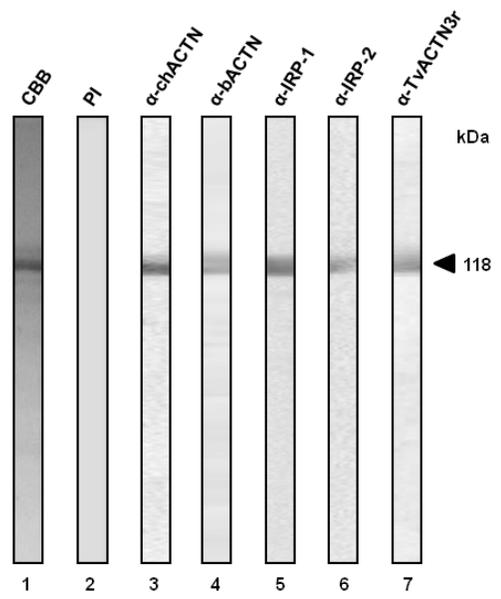
A

TvACTN3r



B

hIRP-1r



**Fig. 23. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína h-IRP-1 de humanos y la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína TvACTN3.**

*En este alineamiento se observa la identidad entre ambas secuencias (\*). Las líneas continuas indican las regiones que probablemente representan epítopes compartidos entre ambas secuencias.*



#### **9.14. Clonación de los fragmentos correspondientes a los Dominios: I, II y III de la TvACTN3.**

*Con la finalidad de determinar que dominio de la proteína  $\alpha$ -actinina de 135 kDa (TvACTN3r) que interacciona con el RNA (IREs), se clonaron y expresaron los dominios: amino (DIr), central (DIIr) y carboxilo (DIIIr) de la proteína TvACTN3 de 135 kDa.*

*Primero, se amplificaron por PCR los fragmentos que codifican los dominios amino (DI) 1-873 (873 pb), central (DII) 688-2400 (1713 pb) y carboxilo (DIII) 1984-3390 (1407 pb) de tvactn3 utilizando como molde el DNA plasmídico de la clona 34 con la construcción pCR®4-TOPO®-tvactn3 y oligonucleótidos sentido y anti-sentido específicos (Figura 24 y Tabla 4).*

#### **9.15. Caracterización de clonas candidato (DI, DII y DIII).**

*Los amplicones purificados se clonaron en el vector de transición (pCR®4-TOPO®) y las clonas candidato para cada fragmento, se seleccionaron mediante PCR en colonia y doble restricción enzimática.*

*La PCR en colonia se realizó utilizando como molde a las clonas: 6 (DI), 2 (DII) y 16 (DIII) y oligonucleótidos específicos para amplificar cada uno de los fragmentos de interés, se observó la amplificación específica de cada uno de los fragmentos, Dominio I (Figura 25A), Dominio II (Figura 25C) y Dominio III (Figura 25E) de la TvACTN3. Enseguida, se extrajo DNA plasmídico (DNAp) de la clonas (mediante lisis alcalina, miniprep) y se realizó la doble restricción, observándose la liberación de los fragmentos correspondientes al Dominio I (Figura 25B), Dominio II (Figura 25D) y Dominio III (Figura 25F). La clonación de los fragmentos del gen tvactn3 correspondientes a cada uno de los dominios fue confirmada por secuenciación por el método de Sanger.*

### **9.16. Subclonación y expresión de las proteínas recombinantes correspondientes a los Dominios: I, II y III de la TvACTN3.**

*Los fragmentos liberados por doble restricción enzimática correspondientes a cada uno de los Dominios y el vector de expresión pProEX-HTb digerido por doble restricción enzimática, se purificaron, se ligaron y se transformaron en células competentes DH5 $\alpha$ . Las clonas candidato se seleccionaron mediante PCR en colonia y doble restricción enzimática. Una vez confirmada la clonación de cada uno de los fragmentos del gen tvactn3 (correspondientes a los Dominios: DI, DII y DIII) en el vector de expresión, se transformaron células competentes E. coli BL-21 (DE3) con cada uno de los DNA plasmídicos, se realizó la inducción y expresión de las proteínas recombinantes: D1r, D11r y D111r con pesos molecular de: 35, 64 y 53 kDa, respectivamente. La purificación de las proteínas recombinantes se realizó por cromatografía de afinidad a Níquel y se confirmó mediante WB con los anticuerpos:  $\alpha$ -histidinas y  $\alpha$ -TvACTN3r (Figura 26).*

### **9.17. Producción de anticuerpos policlonales y reconocimiento específico de los dominios (D1r, D11r y D111r) de la proteína TvACTN3r y proteínas citoplásmicas de T. vaginalis por anticuerpos específicos.**

*Las proteínas recombinantes purificadas: D1r, D11r y D111r se utilizaron como antígenos para la obtención de anticuerpos policlonales en contra de cada una de las proteínas recombinantes: D1r ( $\alpha$ -D1r), D11r ( $\alpha$ -D1r) y D111r ( $\alpha$ -D1r).*

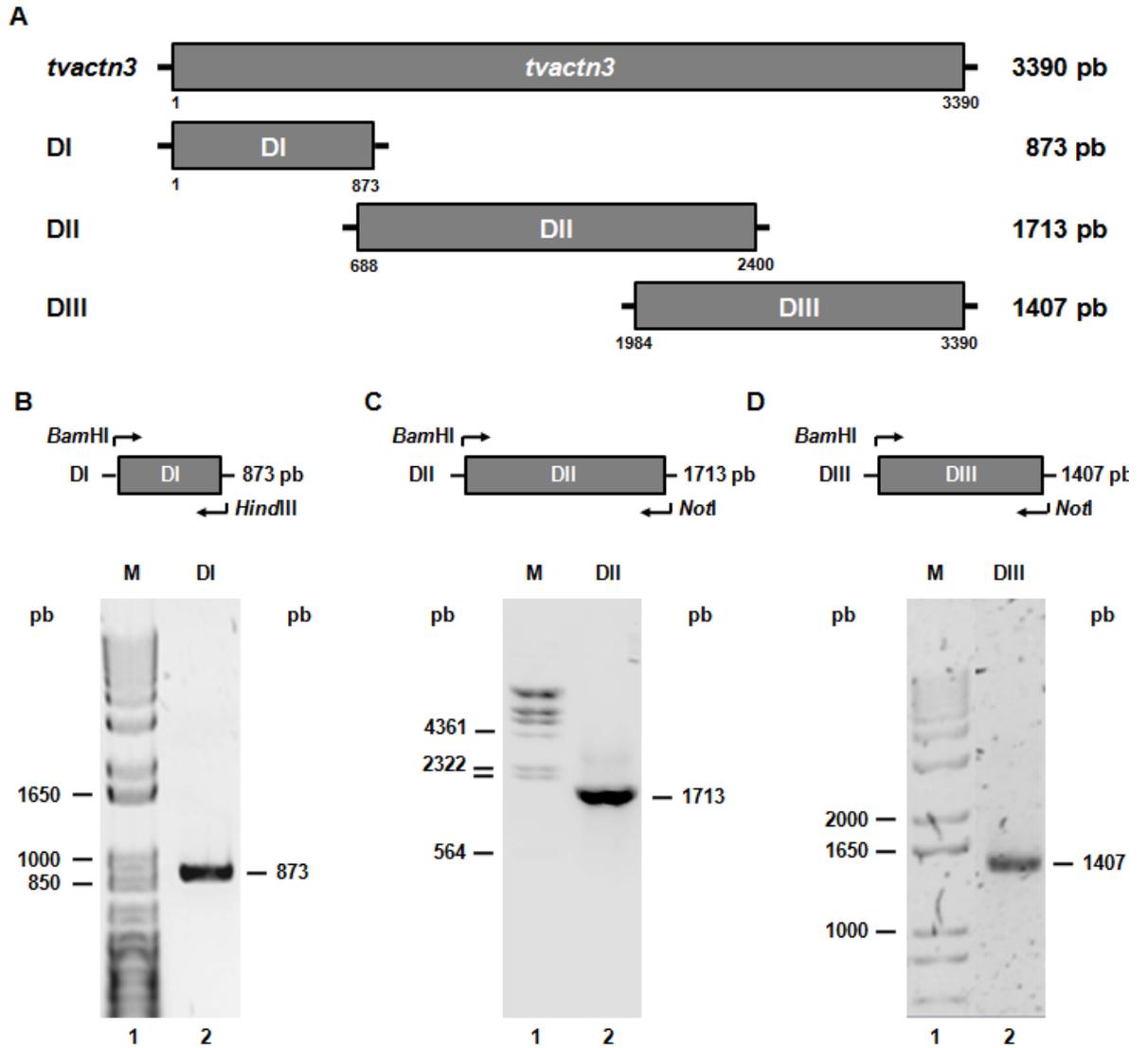
*Tanto las proteínas recombinantes como los anticuerpos generados se utilizaron en los ensayos funcionales: REMSA, NWB, entrecruzamiento por luz UV y super-retardo.*

*El reconocimiento específico de cada uno de los anticuerpos generados se evaluó mediante ensayos de WB, utilizando como antígenos a cada de las proteínas recombinantes y proteínas de extractos citoplásmicos de T. vaginalis crecidas en concentraciones normales de hierro (Tv-N) (20  $\mu$ M  $Fe^{2+}$ ). Como se esperaba, cada uno de los anticuerpo reconoció a la proteína TvACTN3r completa así como a la proteína nativa de 135 kDa presente en los extractos citoplásmicos de T. vaginalis. Además, los anticuerpos generados en contra de cada uno de los dominios solo reconocen a las proteínas recombinantes correspondientes, mientras que el anticuerpo  $\alpha$ -TvACTN3r, reconoce a todos los dominios recombinantes de la proteína TvACTN3 tal y como se esperaba (Figura 27).*

**Fig. 24. Amplificación por PCR de los fragmentos de DNA que codifican a los dominios: DI (873 pb), DII (1713 pb) y DIII (1407 pb) de TvACTN3.**

**A.** *Representación esquemática del gen completo tvactn3 y los fragmentos correspondientes a los Dominios I, II y III de la TvACTN3.*

**B, C y D.** *Electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 0.5x, teñido con bromuro de etidio al 1%. B; carril 1. Marcadores de tamaño molecular de 1 Kb; carril 2, amplicón del fragmento de 873 pb para el Dominio I. C; carril 1. Marcadores de tamaño molecular lambda DNA/HindIII; carril 2, amplicón del fragmento de 1713 pb para el Dominio II. D; carril 1. Marcadores de tamaño molecular de 1 Kb; carril 2, amplicón del fragmento de 1407 pb para el Dominio III. Gel de agarosa al 1 % en TBE 1x.*



**Fig. 25. Caracterización de la clona 6 (DI), clona 2 (DII) y clona 16 (DIII) mediante PCR en colonia y doble restricción enzimática.**

**A, C y E. PCR en colonia.** *Electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 0.5x, teñido con bromuro de etidio al 1%.*

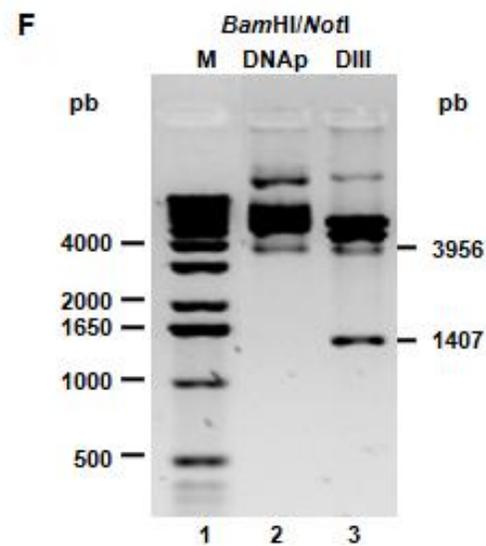
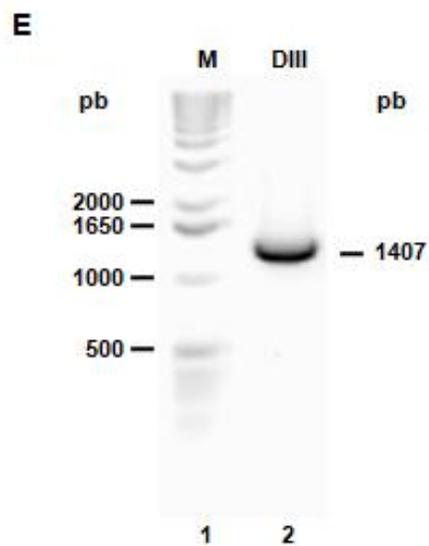
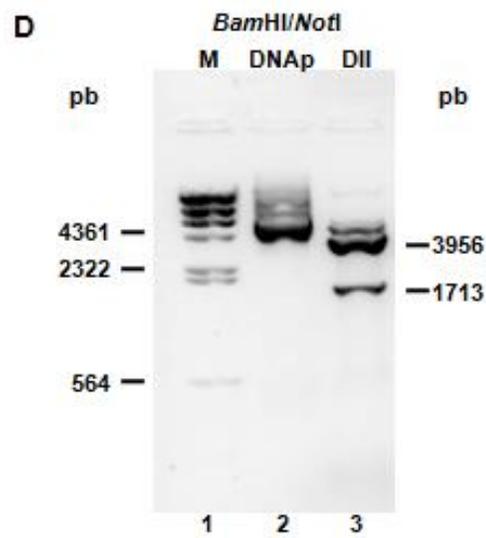
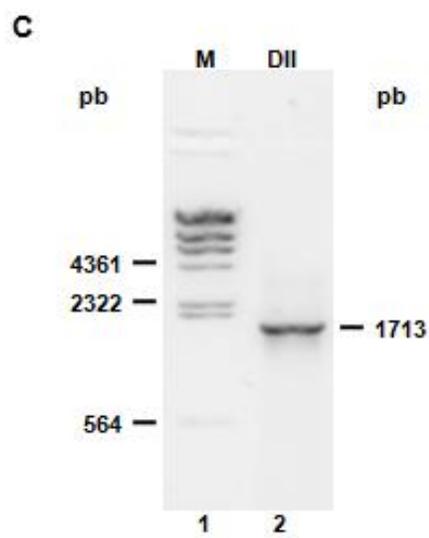
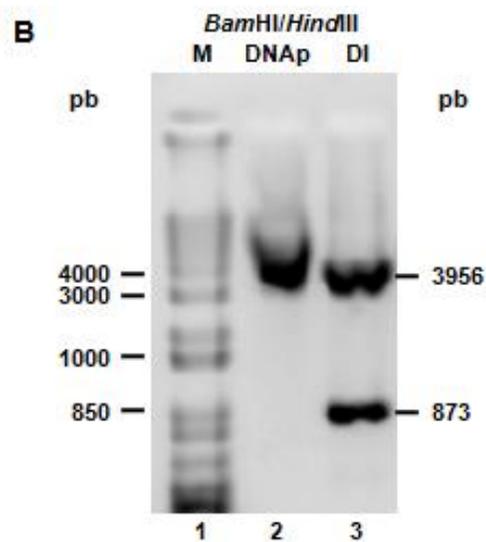
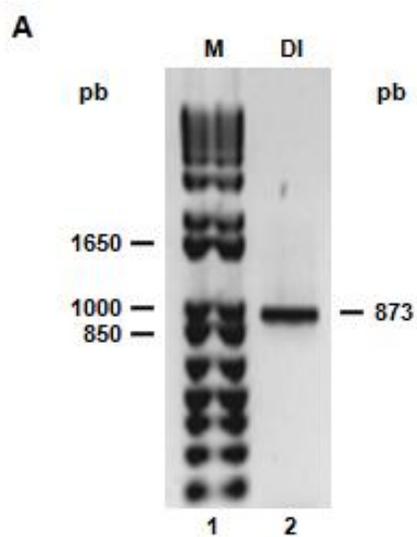
**Carriles 1.** *Marcadores de tamaño molecular de 1 Kb o lambda DNA/HindIII.*

**Carriles 2.** *Amplicones de fragmentos de: 873, 1713 y 1407 pb, correspondiente a los Dominios: I (DI, Panel A), II (DII, Panel B) y III (DIII, Panel C), respectivamente de la TvACTN3. Gel de agarosa al 1% en TBE 1x.*

**B, D y F. Doble restricción Enzimática.** *Electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 0.5x, teñido con bromuro de etidio al 1%.*

**Carriles 1.** *Marcadores de tamaño molecular de 1 Kb o lambda DNA/HindIII.*

**Carriles 2,** *DNAp de la: clona 6 (DI, Panel B), clona 2 (DII, Panel D) y clona 16 (DIII, Panel F). Carriles 3.* *Doble restricción del DNAp de las clonas 6, 2 y 16, liberación de los fragmentos de: 3956 pb correspondiente al vector linearizado (pCR®4-TOPO®; Invitrogen) y 873, 1713 y 1407 pb correspondiente a los dominios: DI, DII y DIII, respectivamente de la TvACTN3. El DNAp de cada clona se digirió con las enzimas de restricción respectivas a 37 °C por 5 h. Geles de agarosa al 1% en TBE 1x.*

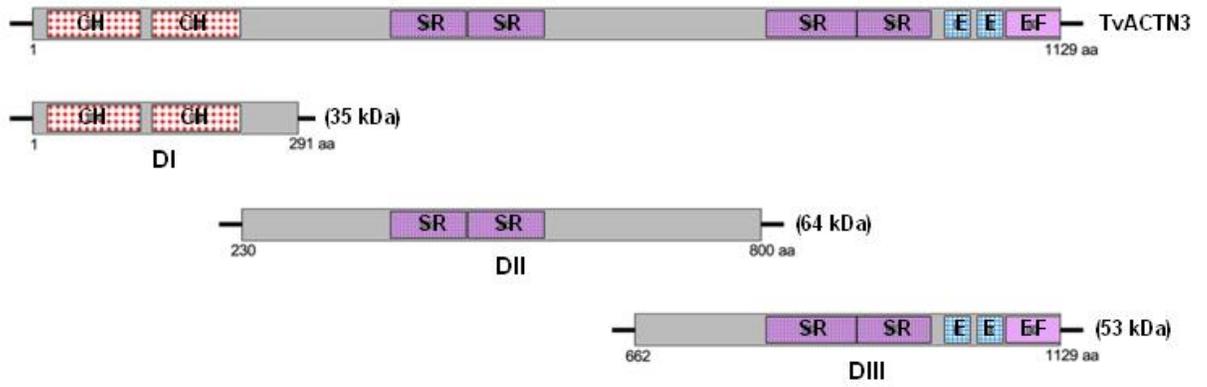


**Fig. 26. Expresión de las proteínas recombinantes del Dominio I (35 kDa), Dominio II (64 kDa) y Dominio III (53 kDa) de TvACTN3. Ensayos de WB con los anticuerpos  $\alpha$ -histidinas y  $\alpha$ -TvACTN3r.**

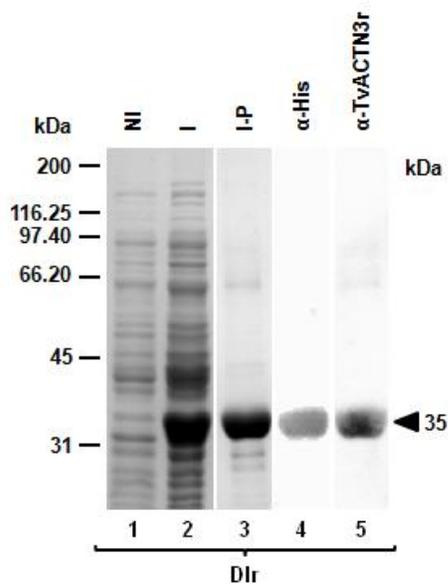
*A. Representación esquemática de la proteína completa TvACTN3 y sus dominios.*

**B, C y D. Inducción, expresión y purificación de las proteínas recombinantes correspondientes a los Dominios de la TvACTN3r.** *La inducción se realizó a 16 °C por 16 h. kDa. Marcadores de peso molecular de amplio rango; carril 1. Extracto correspondiente a las proteínas no inducidas (NI); carril 2. Extracto de las proteínas inducidas (I); carril 3. Proteína recombinante purificada por cromatografía de afinidad (I-P); carril 4. Ensayo de WB con el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -histidinas; carril 5. Ensayo de WB con el anticuerpo policlonal  $\alpha$ -TvACTN3r. Para los ensayos de WB, un gel duplicado del carril 3 (de los paneles B, C y D) se transfirió a una membrana de NC y se incubaron con los anticuerpos respectivos, se observó el reconocimiento específico de las proteínas recombinantes: DIr, DIIr y DIIIr con pesos moleculares de 35, 64 y 53 kDa respectivamente.*

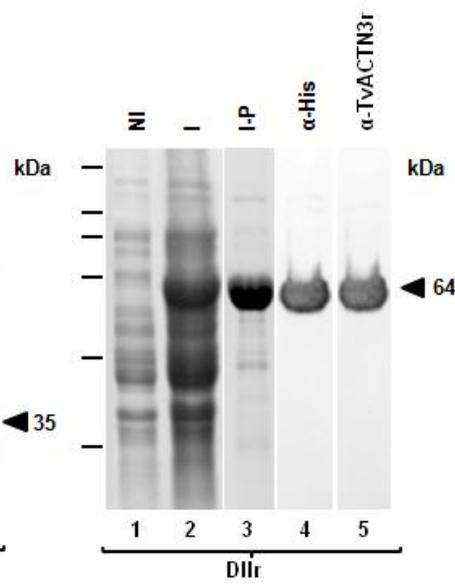
A



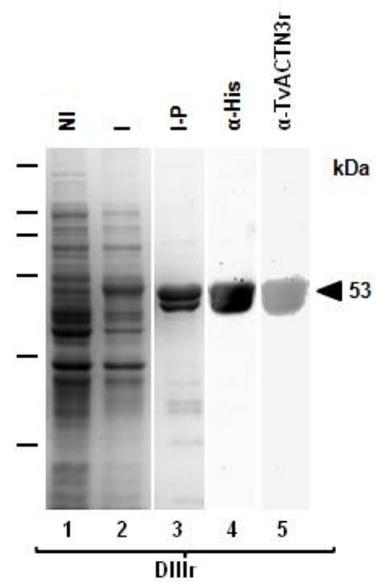
B



C

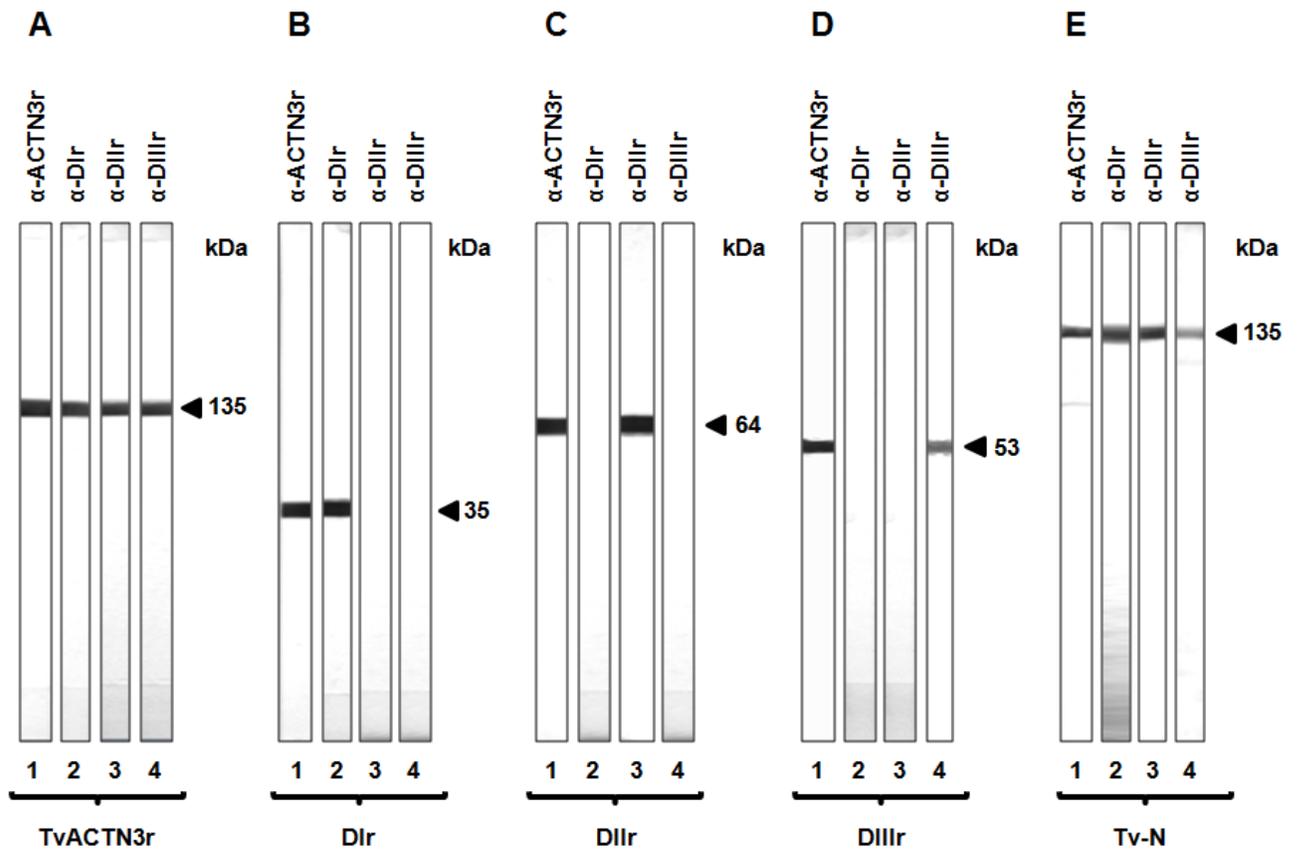


D



**Fig. 27. Producción de anticuerpos policlonales y reconocimiento de los dominios (Dlr, Dllr, Dlllr) de TvACTN3r y proteínas citoplásmicas de *T. vaginalis* por anticuerpos específicos.**

*Ensayo de WB utilizando como antígenos a las proteínas recombinantes purificadas por cromatografía de afinidad a níquel: TvACTN3r (Panel A), Dlr (Panel B), Dllr (Panel C), Dlllr (Panel D) y proteínas de extractos citoplásmicos de *T. vaginalis* crecidas en concentraciones normales de hierro. Estas proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con los anticuerpos policlonales:  $\alpha$ -TvACTN3r,  $\alpha$ -Dlr,  $\alpha$ -Dllr y  $\alpha$ -Dlllr (carriles 1-4). Revelado por color (HRP). Peso molecular en kilodaltones (kDa).*



### **9.18. Los anticuerpos policlonales $\alpha$ -TvACTN3r, $\alpha$ -Dlr, $\alpha$ -DIIr y $\alpha$ -DIIIr super-retardan el complejo I ribonucleoproteico.**

*Para demostrar que la proteína TvACTN3 se comporta como proteína de unión a RNAm e identificar el o los dominios involucrados en tal interacción, se realizaron ensayos funcionales utilizando tanto las proteínas recombinantes obtenidas como los anticuerpos generados.*

*El ensayo de super-retardo se realizó utilizando los anticuerpos  $\alpha$ -TvACTN3r,  $\alpha$ -Dlr,  $\alpha$ -DIIr y  $\alpha$ -DIIIr en una reacción de retardo (REMSA) entre las proteínas de extractos citoplásmicos de *T. vaginalis* crecidas en concentraciones bajas de hierro y las sondas de RNA (IRE-fer de humanos e IRE-tvcp4 de tricomonas).*

*En las Figuras 28 y 29 se observa que el complejo ribonucleoproteico I RNP-I (Figuras 28 y 29; carriles 2) se super-retardó por los anticuerpos:  $\alpha$ -TvACTN3r,  $\alpha$ -Dlr,  $\alpha$ -DIIr y  $\alpha$ -DIIIr; en una manera dependiente de la concentración. Por lo que se observó un complejo adicional RNP-II en los carriles: 3-5; 6-8; 9-11 y 12-14, respectivamente. Todos los anticuerpos generados en contra de la proteína completa TvACTN3r y sus dominios muestran efectos similares, mientras que con los dos anticuerpos no relacionados ( $\alpha$ -IgG y  $\alpha$ -TvTIM2r) a altas concentraciones y utilizados como controles negativos, no se observó ningún efecto en la formación del complejo RNP-I, tal como se esperaba (Figuras 28 y 29; carriles 15-17).*

*Estos resultados nos sugieren la participación de la TvACTN3 en la formación de complejos ribonucleoprotéicos (RNP) que unen a los dos IREs.*

### **9.19. Identificación del posible Dominio de unión a RNA de la TvACTN3r.**

*Con la finalidad de identificar el o los dominios de unión a RNA en la TvACTN3, se realizaron dos ensayos funcionales, Northwestern blot y entrecruzamiento con luz ultravioleta. Para estos ensayos utilizamos a las proteínas recombinantes purificadas (TvACTN3r, D1r, D11r y D111r) y las sondas de RNA marcadas radioactivamente (IRE-fer e IRE-tvc4).*

*La Figura 30, muestra que las sondas de RNA marcadas radioactivamente IRE-tvc4 y IRE-fer interaccionan en ensayos de Northwestern blot, con la proteína recombinante completa (TvACTN3r) así como a sus dominios D1r y D11r, al igual que la proteína recombinante hIRP-1r, utilizada como control positivo. La sonda de RNA no se une a la proteína BSA utilizada como control negativo (Figura 30; Panel II, carril 6 y Panel III, carril 6). No se observó ninguna interacción RNA-proteína cuando se utilizaron las sondas marcadas radioactivamente No relacionadas (NR; Panel VI) y la mutante por delección de la estructura IRE-tvc4 [218] (IRE- $\Delta$ tvc4; Panel V). Ambas sondas se utilizaron como controles negativos (Panel IV y V, respectivamente).*

*Con la finalidad de confirmar estos resultados, se realizaron ensayos de entrecruzamiento por luz UV para analizar las interacciones RNA-proteína utilizando las mismas proteínas recombinantes y las sondas de RNA marcadas radioactivamente descritas en la Figura 31. La Figura 31 muestra una interacción específica entre las sondas de RNA IRE-tvc4 e IRE-fer con la proteína TvACTN3r (Figura 31; Panel II, carril 1 y Panel III, carril 1, respectivamente) y el dominio D11r de la TvACTN3r (Figura 31; Panel II, carril 3 y Panel III, carril 3, respectivamente) y la hIRP-1r (Figura 31; Panel II, carril 5 y Panel III, carril 5, respectivamente), en comparación con los controles negativos (Figura 31; Paneles IV y V).*

*En conjunto estos resultados sugieren que en tricomonas crecidas en bajas concentraciones de hierro, la proteína TvACTN3r tiene la función de proteína unión a RNA, utilizando el dominio central (DIIr) para la interacción con las estructura IRE-tvcp4 de tricomonas.*

#### **9.20. El Dominio II de la TvACTN3r presenta posibles dominios de unión a RNA que podrían ser utilizados para la interacción con el RNA (IRE).**

*Mediante un análisis in silico de las secuencia deducida de aminoácidos de la proteína completa TvACTN3, así como sus dominios (DI, DII y DIII) a través de los programas SMART, Motif Scan y PROSITE se identificaron posibles motivos de unión a RNA presentes en la región del DII de la TvACTN3.*

*Los posibles motivos de unión a RNA identificados se han reportado previamente como motivos involucrados en las interacciones RNA-proteína, tales como: BRIGHT/ARID (B/A; 292-386) [239], B5 (344-401 aa) [240], LA (392-448 aa) [241], Pumilio-binding (428-464 aa) [242-244], and KH (433-502 aa) [243-245]. Estos dominios están representados en la Figura 33A y la tabla 8, la cual apoya que sea el dominio II de TvACTN3 el que confiera la capacidad de unión a RNA*

*Debido a que la proteína de 110 kDa identificada como TvACTN2 es una posible proteína de unión a RNA (Figura 8) [206], también se analizó la secuencia de aminoácidos con los mismo programas. Sin embargo, no se identificaron posibles dominios de unión a RNA como en TvACTN3. Mediante el alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de TvACTN2 y TvACTN3 se observó un 54% de identidad en sus secuencias completas (Figura 32) y un 53.25% de identidad en las regiones del dominio II donde se identificaron los probables motivos de unión a RNA (Figura 33B). Esta alta identidad en las regiones correspondientes a las proteínas TvACTN2 y TvACTN3 sugiere que la TvACTN2 podría ser una de las*

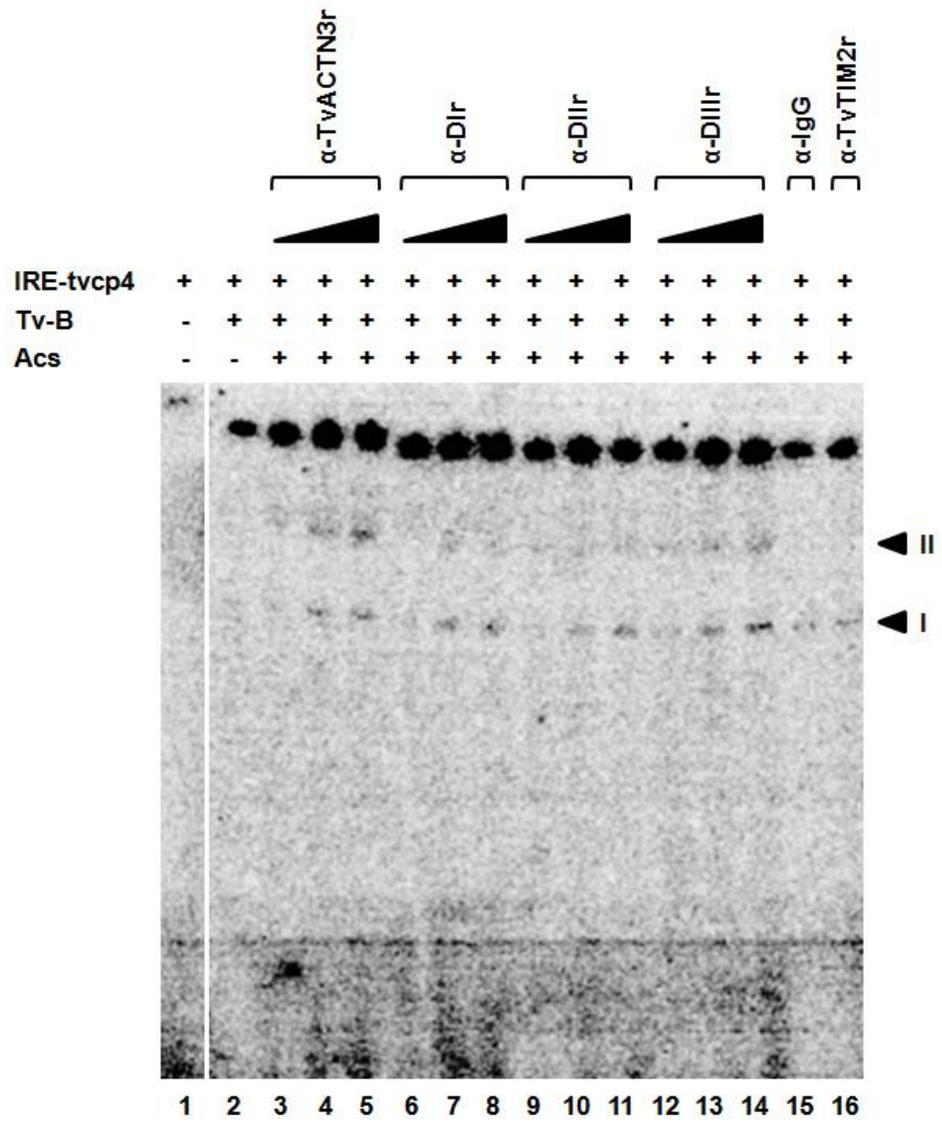
*proteínas de unión a RNA, donde el dominio II podría ser el responsable de tal interacción.*

*La búsqueda de posibles dominios de unión a RNA también se realizó para las secuencias de aminoácidos de las proteínas TvACTN1, TvACTN4 y TvACTN5, donde en ninguno de ellos se hallaron los dominios presentes en la secuencia de aminoácidos de la proteína TvACTN3. Estos resultados sugieren que estas proteínas podrían cumplir la función típica de las proteínas  $\alpha$ -actininas o que podrían desempeñar una nueva función no descrita.*

*Basándonos en las secuencias halladas en la base de datos del genoma de *T. vaginalis* y la base de datos del NCBI, ninguno de estos posibles motivos de unión a RNA se identificaron en las otras proteínas TvACTN (Figuras 14 y 15). Tampoco hallamos estos dominios de unión a RNA en las ACTN de otros organismos, tales como: *Aedes aegypti* (gi|157115648|), *Gallus gallus* (gi|211083|), *Homo sapiens* (gi|178058|), *Drosophila melanogaster* (gi|22831541|), *Naegleria gruberi* (gi|284087152|), *Paracoccidioides braziliensis* (gi|226286950|), *Wuchereria bancrofti* (gi|402588131|) y *Entamoeba dispar* (gi|167384828|).*

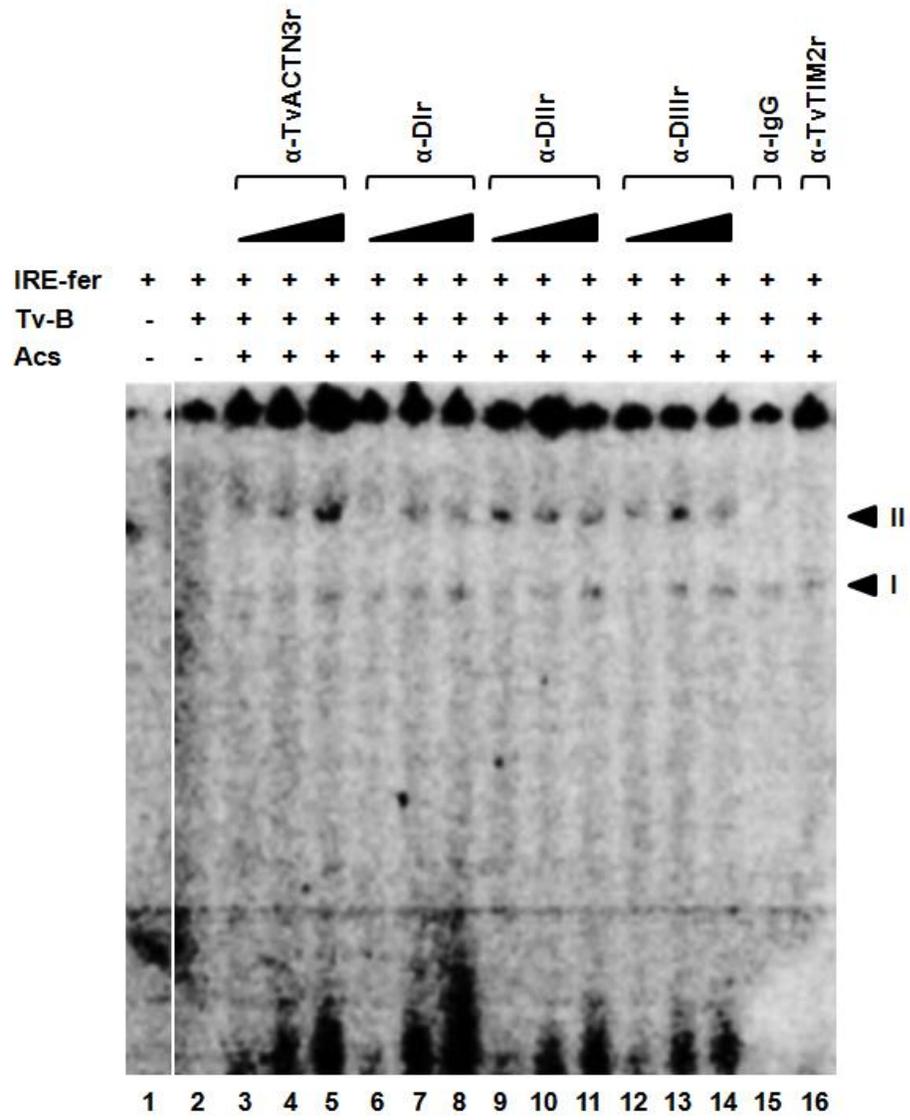
**Fig. 28. Interacción entre TvACTN3r y la estructura IRE-tvcp4 mediante REMSA.**

*Ensayo de super-retardo con los anticuerpos:  $\alpha$ -TvACTN3r,  $\alpha$ -Dlr,  $\alpha$ -DIIr y  $\alpha$ -DIIIr. La sonda de RNA marcada radioactivamente IRE-tvcp4 (de tricomonas) (carril 1) se incubó con proteínas de extractos citoplásmicos de *T. vaginalis* crecidas en bajas concentraciones de hierro (Tv-B) sin (carril 2); o con diferentes cantidades de los anticuerpos policlonales:  $\alpha$ -TvACTN3r (carriles 3-5);  $\alpha$ -Dlr (carriles 6-8);  $\alpha$ -DIIr (carriles 9-11);  $\alpha$ -DIIIr (carriles 12-14); o con los anticuerpos no relacionados;  $\alpha$ -IgG; (carril 15); o  $\alpha$ -TvTIM2r (carril 16). Las cabezas de flecha indican los complejos RNA-proteína formados. (Complejo RNA-Proteína: I; Complejo RNA-proteína-anticuerpo: II). Gel de poliacrilamida en condiciones nativas al 6%. Las bandas radioactivas se visualizaron por autoradiografía en el Phosphoimager Fla 5000 (Fujifilm) con el software MultiGauge V 3.0.*



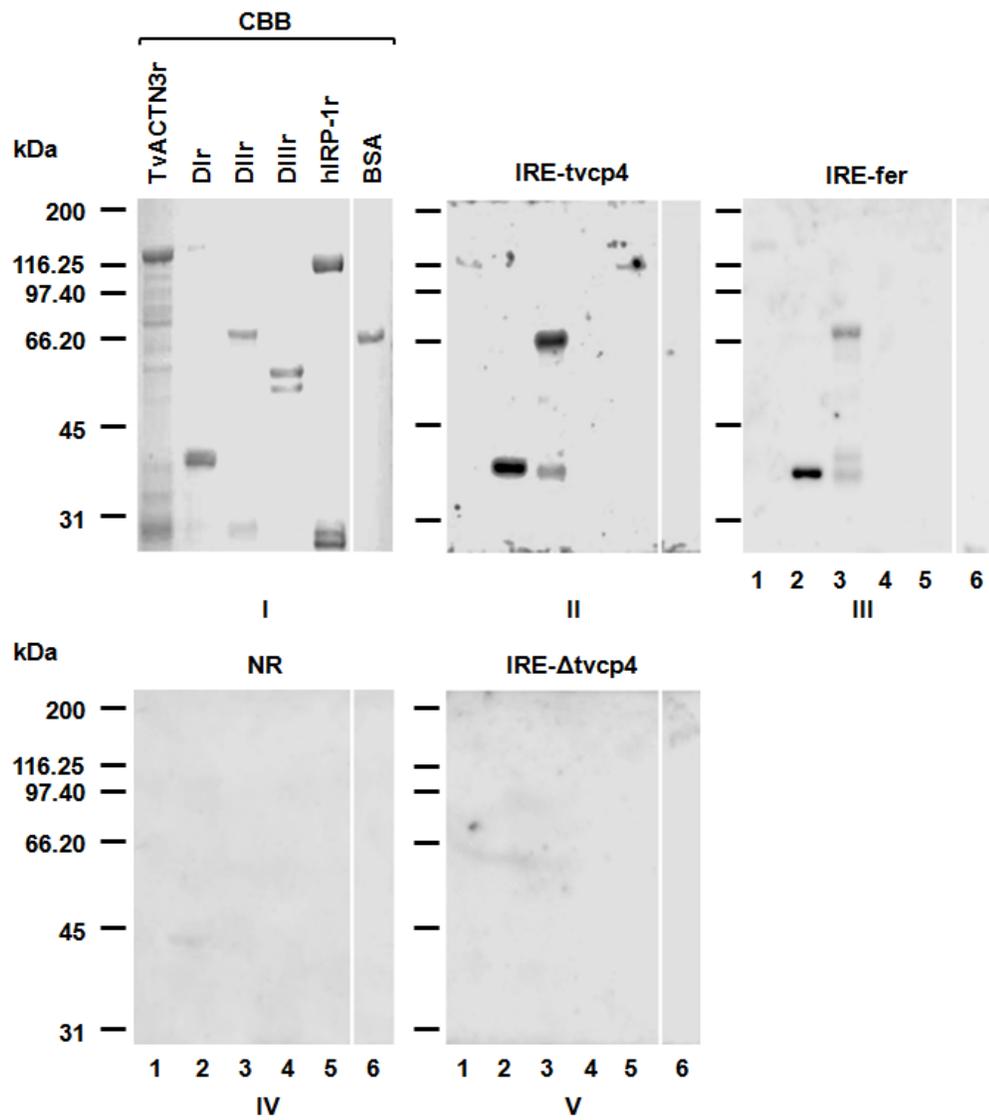
**Fig. 29. Interacción entre TvACTN3r y la estructura IRE-fer de humano mediante REMSA.**

*Ensayo de super-retardo con los anticuerpos:  $\alpha$ -TvACTN3r,  $\alpha$ -Dlr,  $\alpha$ -DIIr y  $\alpha$ -DIIIr. La sonda de RNA marcada radioactivamente IRE-fer (de humanos) (**carril 1**) fue incubada con proteínas de extractos citoplásmicos de *T. vaginalis* crecidas en bajas concentraciones de hierro (Tv-B) sin (**carril 2**); o con diferentes cantidades de los anticuerpos policlonales:  $\alpha$ -TvACTN3r (**carriles 3-5**);  $\alpha$ -Dlr (**carriles 6-8**);  $\alpha$ -DIIr (**carriles 9-11**);  $\alpha$ -DIIIr (**carriles 12-14**); o con los anticuerpos no relacionados;  $\alpha$ -IgG; (**carril 15**); o  $\alpha$ -TvTIM2r (**carril 16**). Las cabezas de flecha indican los complejos RNA-proteína formados. (Complejo RNA-Proteína: I; Complejo RNA-proteína-anticuerpo: II). Gel de poliacrilamida en condiciones nativas al 6%. Las bandas radioactivas se visualizaron por autoradiografía en el Phosphoimager Fla 5000 (Fujifilm) con el software MultiGauge V 3.0.*



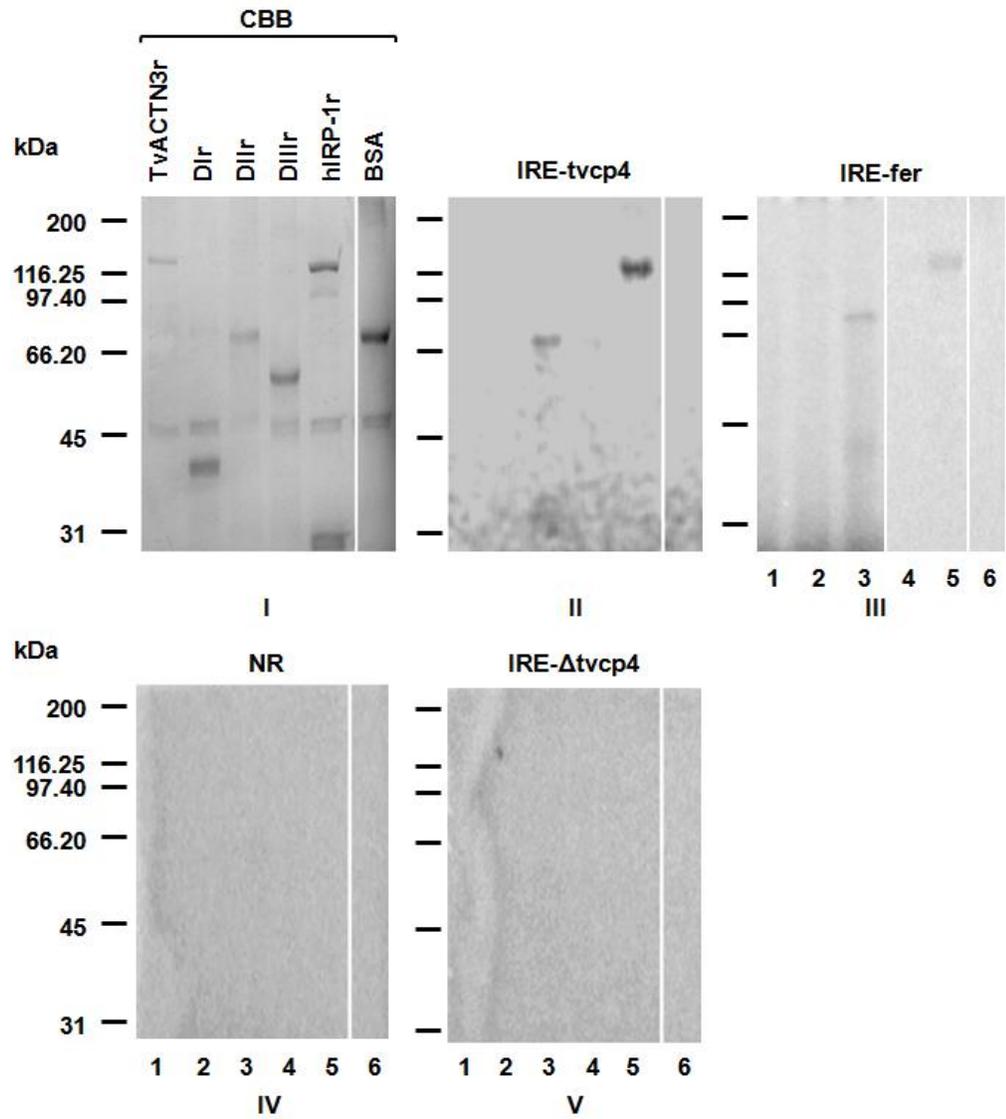
**Fig. 30. Interacción entre TvACTN3r y las estructuras IRE-tvcp4 e IRE-fer por ensayos de Northwestern blot.**

*Ensayo de Northwestern blot. Las proteínas recombinantes TvACTN3, D1r, D11r, D111r y los controles hIRP-1r y BSA se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes (Panel I) y transferidos a membranas de NC, las cuales se incubaron con las sondas de RNA marcadas radioactivamente: IRE-tvcp4 (Panel II) y IRE-fer (Panel III). Los controles incluidos fueron la sonda de RNA no-relacionada (NR; Panel IV) y una sonda de RNA correspondiente a la mutante por delección de la estructura IRE-tvcp4 (IRE- $\Delta$ tvcp4; Panel V). kDa. Pesos moleculares estándar en kilodaltones. Resultado representativo de tres experimentos independientes.*



**Fig. 31. Interacción entre TvACTN3r y las estructuras IRE-tvcp4 e IRE-fer por ensayos de entrecruzamiento por luz UV.**

*Ensayo de entrecruzamiento de las proteínas recombinantes TvACTN3, Dlr, Dllr, Dlllr, hIRP-1r y BSA (como control negativo) y las sondas de RNA marcada radioactivamente, IRE-tvcp4 y IRE-fer, se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (Panel II y Panel III, respectivamente). Como controles, las proteínas recombinantes TvACTN3r y sus dominios se incubaron con la sonda de RNA no relacionada (NR) marcada radioactivamente (Panel IV) y sonda de RNA marcada radioactivamente correspondiente a la mutante por delección de la estructura IRE-tvcp4 (IRE- $\Delta$ tvcp4; Panel V). Además, como control un gel representativo de las diferentes proteínas recombinantes en una mezcla de entrecruzamiento fue teñida con Azul Brillante de Coomassie (CBB; Panel I). kDa. Pesos moleculares estándar en kilodaltones. Resultado representativo de tres experimentos independientes.*



**Fig. 32. Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de las proteínas TvACTN3 y TvACTN2 de *T. vaginalis*.**

*En este alineamiento se observa la identidad entre ambas secuencias (\*).*

*Las secuencias deducidas de aminoácidos de las TvACTN3 y TvACTN2 de *T. vaginalis* se alinearon mediante el programa ClustalW. Los aminoácidos idénticos en todas las secuencias se señalan en color gris con la finalidad de mostrar los aminoácidos idénticos (\*). Los aminoácidos diferentes pero muy conservados o similares (:). Los aminoácidos diferentes poco conservados (.). Los aminoácidos diferentes o espaciamentos entre las secuencias (---).*



TvACTN3  
TvACTN2

TTAKAFKAIANNPIILTDALDQYFKGEAEYLRKVLKQVDGGYEFAEWVNSIYA- 1129  
TMEAFKAIQNQVLTDAQLDQYFSAEDAAVLRSQLKQGENGYEFADWVNSLYNQ 931  
\*\* :\*\*\*\*\*:\*.:.\*\*\*\*\*.....\*:\* \*\* . \*\* :.\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*

**Fig. 33. Identificación de los posibles motivos de interacción RNA-proteína en las proteínas TvACTN2 y TvACTN3 mediante análisis in silico.**

**A.** La proteína completa y los diferentes dominios de la TvACTN3 se ilustraron en “brackets”, los posibles motivos de interacción RNA-proteína están representados con cajas de colores. **B.** Alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos correspondiente al Dominio II de las proteínas TvACTN2 y TvACTN3, en las cajas de colores se señala la homología de los posibles motivos de interacción RNA-proteína presentes en TvACTN2 y TvACTN3. Cada caja de color muestra la localización del motivo en los dominios. Los motivos de unión identificados fueron: BRIGHT/ARID (B/A; en color mostaza), B5 (B5; en color azul), LA (LA; en color verde), Dominio de unión-Pumilio (P; en color rojo) y KH (KH; en color naranja). La secuencia de los motivos de unión a RNA está descrita en la Tabla 7.



**Tabla 7. Identificación de posibles motivos de interacción RNA-proteína en la proteína TvACTN3.**

<b>Dominio</b>	<b>Localización (aa)*</b>	<b>Función GO</b>	<b>Ref.</b>
<i>BRIGHT/ ARID</i>	292-386	<i>Unión a DNA.</i>	[239]
<i>B5</i>	344-401	<i>Unión a RNA. Unión a magnesio y unión a ATP.</i>	[240]
<i>LA</i>	392-448	<i>Unión a RNA</i>	[241]
<i>Dominio de unión- Pumilio</i>	428-464	<i>Unión a RNA</i>	[242-244]
<i>KH</i>	433-502	<i>Unión a RNA</i>	[243-245]

*La secuencia de aminoácidos de la proteína TvACTN3 se analizó mediante el programa SMART para identificar la presencia de posibles motivos de unión a DNA-RNA. Una búsqueda PSI-BLAST utilizando la secuencia de aminoácidos completa de la proteína TvACTN3 (residuos 1–1129) de T. vaginalis y un E < 0.01 nos permitió identificar cada una de las secuencias correspondientes a los dominios de unión a DNA o RNA presentes en el DII de la proteína TvACTN3 mostrados en la Figura 33. Estas secuencias de aa muestran un 60% de similitud con las secuencias consenso de estos motivos por alineamiento múltiple. \* Localización de los posibles motivos de interacción RNA-proteína.*

### **9.21. Localización de la proteína nativa TvACTN3 en *T. vaginalis*.**

*Una de las características de las proteínas reguladoras del hierro (IRPs) es la localización citoplásmica en las células (fracción donde se presenta la regulación post-transcripcional de genes), por tal motivo se analizó la localización de la proteína TvACTN3 en el parásito.*

*Para determinar la localización de la proteína nativa TvACTN3 en *T. vaginalis*, se realizó un fraccionamiento celular de parásitos crecidos en las tres condiciones de hierro (0, 20 y 250  $\mu\text{M}$ ) y ensayos de WB utilizando el anticuerpo anti-TvACTN3r.*

*Para ello, primero se obtuvieron proteínas totales de *T. vaginalis* crecidas en concentraciones normales de hierro (20  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$ ) y se evaluó el reconocimiento de la proteína nativa TvACTN3 mediante ensayos de WB utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -TvACTN3r y suero preinmune (como control negativo), se observó el reconocimiento específico de una banda de 135 kDa, correspondiente a la proteína TvACTN3 (Figura 34A). Enseguida, se realizó el fraccionamiento celular de *T. vaginalis* crecidas en diferentes concentraciones de hierro. La proteína nativa TvACTN3 se detectó en las fracciones totales (T) y citoplásmica (C), tal como se esperaba. La Figura 34B muestra que la cantidad de la proteína nativa TvACTN3 no se afectó por las concentraciones de hierro en comparación con la expresión de las proteínas utilizadas como controles: TvPFO A para la fracción membranal (proteína regulada positivamente por hierro) [79] y TvHSP70 para la fracción citoplásmica (proteína regulada negativamente por hierro).*

### **9.22. El hierro afecta la redistribución de TvACTN3 en el parásito.**

*Para confirmar la localización citoplásmica de la proteína nativa TvACTN3 en *T. vaginalis*, realizamos ensayos de inmunofluorescencia indirecta y microscopia confocal con el anticuerpo  $\alpha$ -TvACTN3r y Faloidina rodaminada con la finalidad*

*de detectar la actina filamentosa o polimerizada (F-actina), para lo cual utilizamos parásitos crecidos en diferentes concentraciones de hierro.*

*La Figura 35 muestra a la TvACTN3 y a la actina localizadas en el citoplasma, pero con una diferente distribución en los parásitos crecidos en diferentes concentraciones de hierro (Figura 35, Paneles c, g y k). Un patrón diferente en la distribución de la TvACTN3 y una asociación con la actina se observó en cada concentración de hierro. En parásitos crecidos en concentraciones bajas y normales de hierro (0 y 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ , respectivamente), las marcas de TvACTN3 y actina se encuentran dispersas en el citoplasma (Figura 35, Paneles a-h). En concentraciones normales de hierro se observó una colocalización parcial de la TvACTN3 con la actina (Figura 35, Paneles e-h). En contraste, en parásitos crecidos en altas concentraciones de hierro las marcas correspondientes a la TvACTN3 y la actina colocalizan en el citoplasma pero en forma de agregados o cúmulos (Figura 35, Paneles i-l). Ninguna señal de la TvACTN3 se detectó en los núcleos (Figura 35, Paneles d, h y l) teñidos con DAPI (en azul) (Figura 35, Paneles a, e, i y m). El suero preinmune (SPI) utilizado como control negativo no mostró ninguna señal para la TvACTN3 (Figura 35, Panel o), como se esperaba.*

*Además, se observó una localización perinuclear de la proteína nativa TvACTN3, solo en parásitos crecidos en bajas concentraciones de hierro, tal como se observa en la Figura 36, Paneles c y g; donde también se observó una colocalización parcial con actina (Figura 36, Paneles d y h).*

*Estos resultados nos permiten concluir que la proteína nativa TvACTN3 se encuentra localizada en el citoplasma, dispersa o asociada a actina en cúmulos dependiendo de las diferentes concentraciones de hierro, pero también puede hallarse en la región perinuclear, solo en parásitos crecidos en bajas concentraciones de hierro. Estos datos sugieren que el hierro modula la asociación de la  $\alpha$ -actinina 3 (TvACTN3) con la actina, la cual es su función típica,*

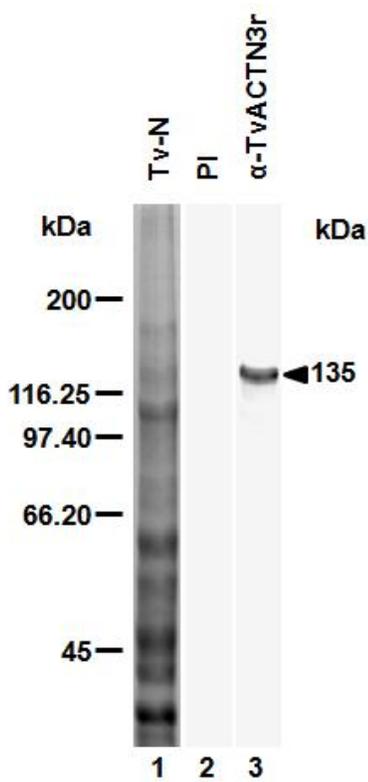
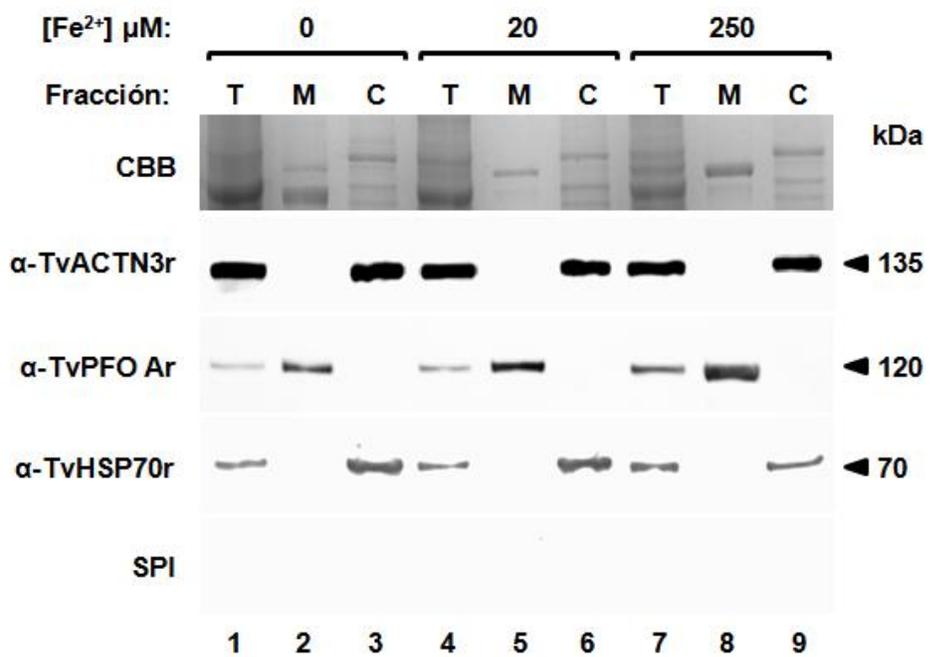
o con estructuras tallo-burbuja de RNA (IRE), la cual podría ser una nueva función.

También evaluamos el comportamiento típico de la proteína TvACTN3, considerando que la TvACTN2 ( $\alpha$ -actinina de 110 kDa) [62] es sobre-expresada cuando el parásito cambia de forma ovoide a ameboide. Mediante microscopía confocal, en la Figura 37, observamos a las proteínas nativas TvACTN3 y actina localizados en el citoplasma de *T. vaginalis* crecidas en concentraciones normales de hierro (Figura 37, Paneles a-o). Observamos que la proteína TvACTN3 se relocaliza a los pseudópodos en parásitos ameboides (Figura 37, Panel i) en comparación a parásitos ovoides (Figura 37, Panel d). Además observamos una colocalización entre la TvACTN3 y la actina en el citoplasma (Figura 37, Paneles e y j). Ninguna señal de la TvACTN3 se detectó en los núcleos (Figura 37, Paneles e y j) teñidos con DAPI (en azul) (Figura 37, Paneles b, g y i). El suero preinmune (SPI) utilizado como control negativo no exhibió ninguna señal de la TvACTN3 (Figura 37, Panel n), como se esperaba. Estos datos sugieren que el cambio estructural del parásito está asociado a una re-localización de la proteína TvACTN3 en el parásito. Por lo que es necesario analizar si existe sobre-expresión de la TvACTN3 bajo estas condiciones experimentales.

**Fig. 34. Detección de TvACTN3 por fraccionamiento de *T. vaginalis* crecidas en diferentes concentraciones de hierro (0, 20 y 250  $\mu$ M).**

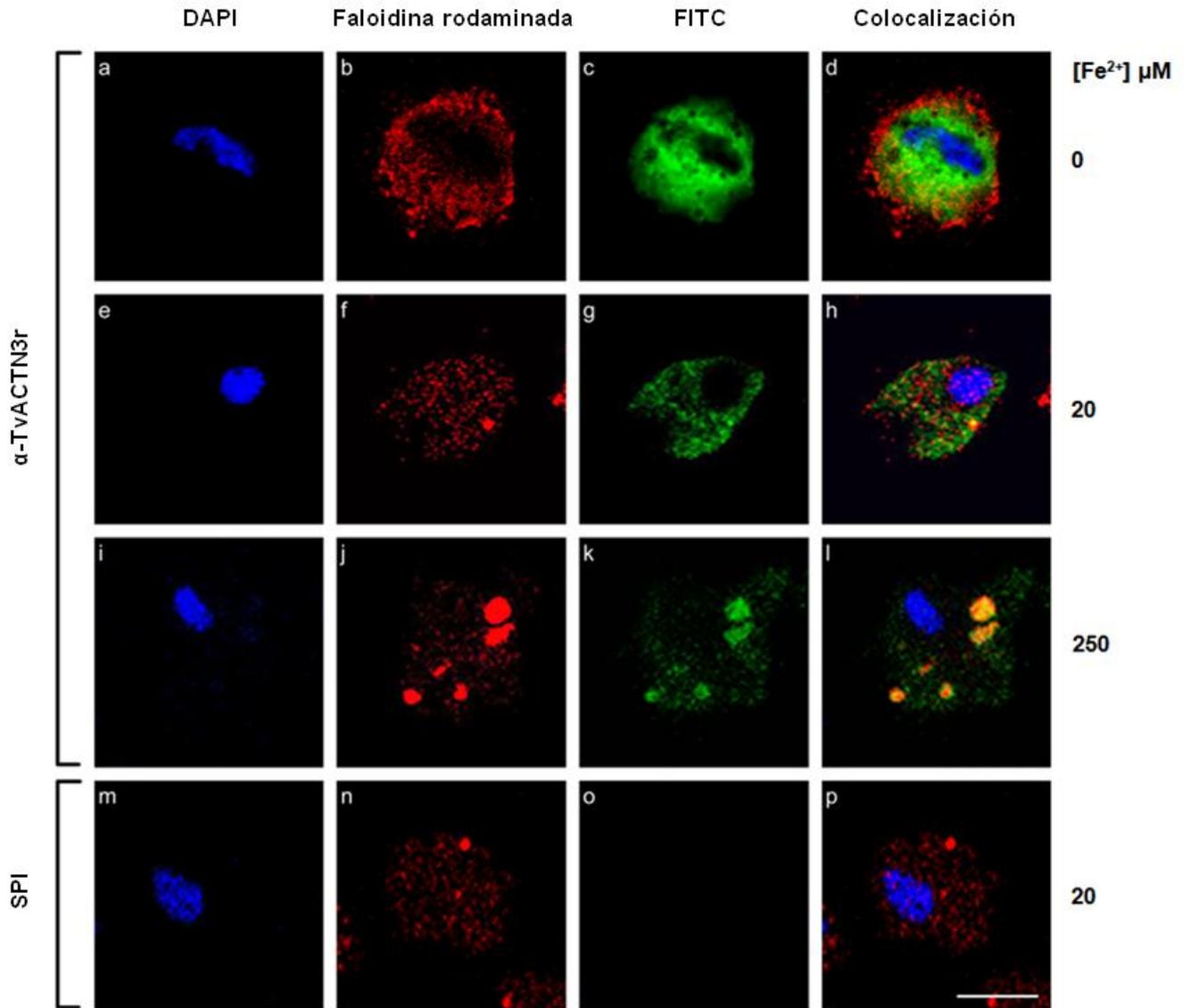
**A. Detección de la expresión de la proteína nativa TvACTN3 mediante WB con el anticuerpo  $\alpha$ -TvACTN3r. Carril 1.** *Patrón de proteínas totales de *T. vaginalis* crecidas en concentraciones normales de hierro (Tv-N), teñidas con Azul Brillante de Coomassie (CBB). Proteínas totales de *T. vaginalis* transferidas a membrana de NC e incubadas con: el suero preinmune (SPI) (carril 2), o el anticuerpo policlonal  $\alpha$ -TvACTN3r (carril 3).*

**B. Fraccionamiento celular de *T. vaginalis* crecidas en diferentes concentraciones de hierro:** *bajo hierro (0  $\mu$ M; carriles 1-3), normal hierro (20  $\mu$ M; carriles 4-6) y alto hierro (250  $\mu$ M; carriles 7-9). Las fracciones: Total (T), membranal (M) y citoplásmica (C), se analizaron mediante ensayos de WB con los anticuerpos policlonales  $\alpha$ -TvACTN3r,  $\alpha$ -TvPFO Ar y  $\alpha$ -TvHSP70r. Los anticuerpos  $\alpha$ -TvPFO Ar y  $\alpha$ -TvHSP70r se utilizaron como controles. Las cabezas de flecha indican el tamaño y posición de las bandas de proteínas detectadas por los anticuerpos. kDa. Pesos moleculares estándar en kilodaltones. Resultado representativo de tres experimentos independientes.*

**A****B**

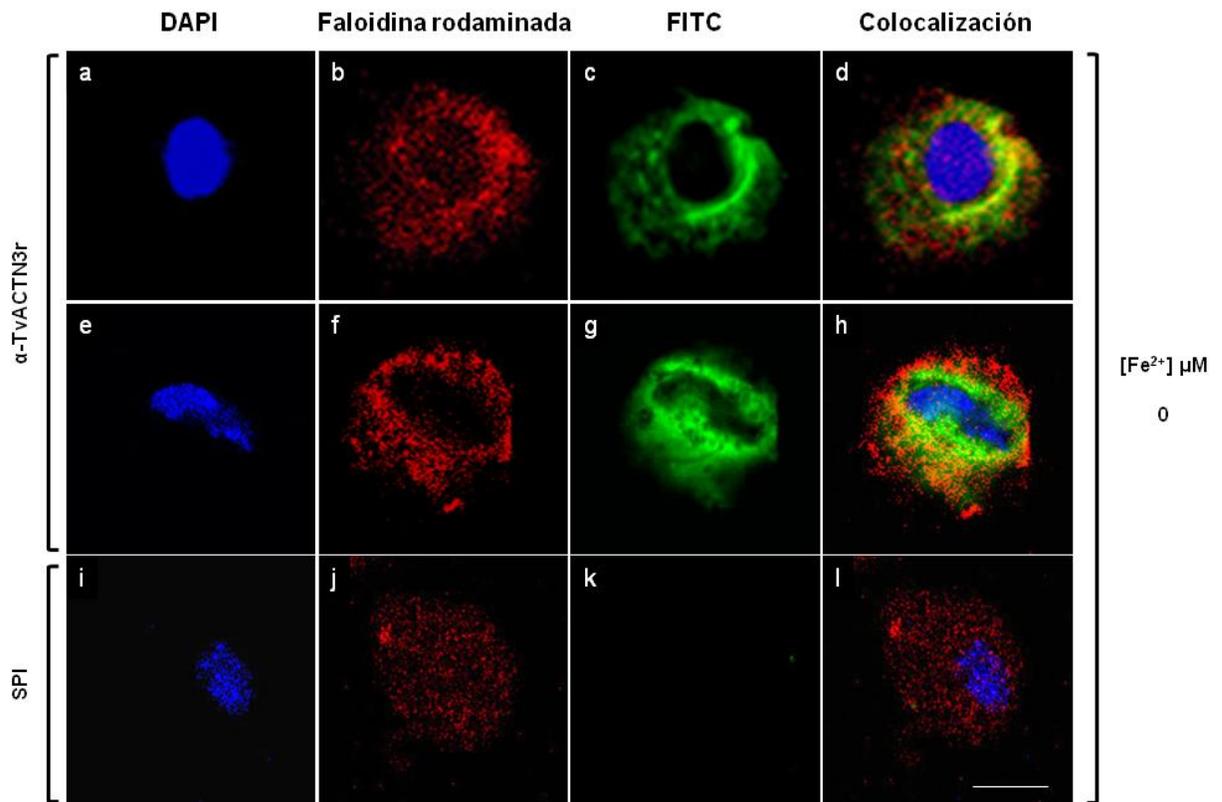
**Fig. 35. Localización citoplásmica de la TvACTN3 por inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal.**

*Parásitos crecidos en concentraciones de: bajo hierro (Paneles a-d), normal hierro (Paneles e-h) o alto hierro (Paneles i-l) se fijaron, se bloquearon y se incubaron con el anticuerpo policlonal primario  $\alpha$ -TvACTN3r (Paneles c, g y k) y enseguida se incubaron con el anticuerpo secundario (cabra anti-conejo-FITC). Como control negativo, los parásitos se incubaron con el suero preinmune (SPI) (Paneles m-p). Las muestras se analizaron por microscopía confocal. DAPI (en azul), Faolidina rodaminada (en rojo), fluorescencia FITC (en verde); y la Colocalización de las fluorescencias. Barra de 5  $\mu$ m (Panel p). Resultado representativo de tres experimentos independientes.*



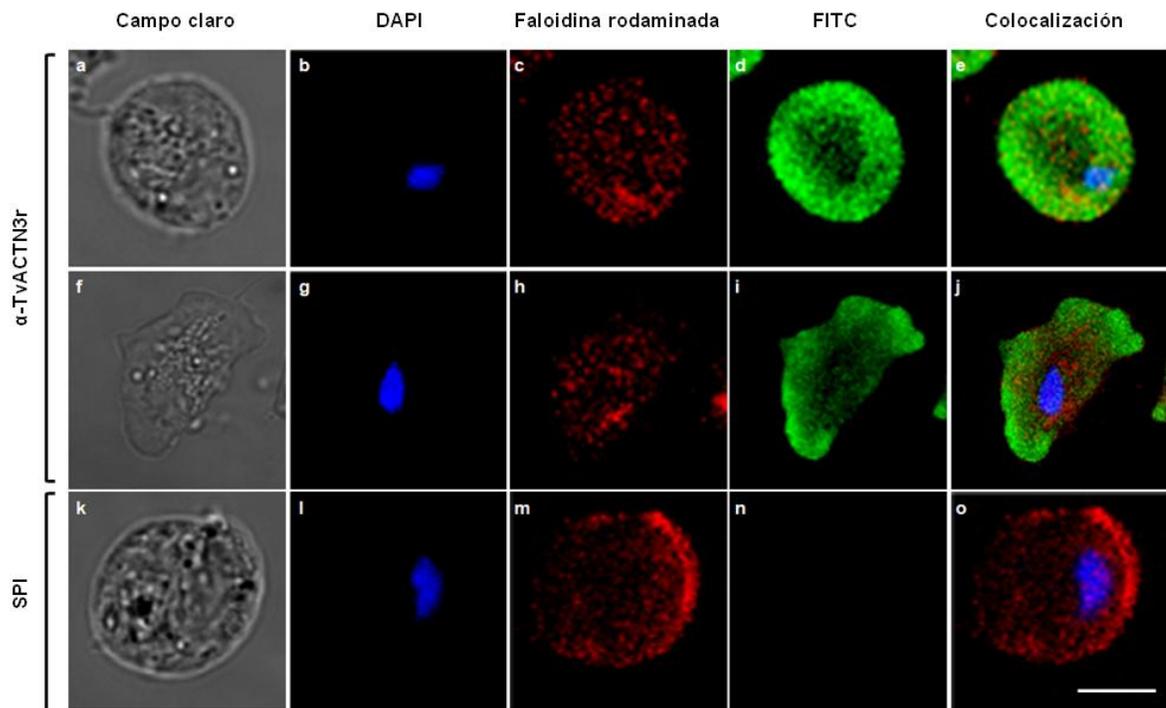
**Fig. 36. Localización perinuclear de TvACTN3 por inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal.**

*Parásitos crecidos en concentraciones de: bajo hierro (Paneles a-l) se fijaron, se bloquearon y se incubaron con el anticuerpo policlonal primario  $\alpha$ -TvACTN3r (Paneles c y g) y enseguida incubados con el anticuerpo secundario (cabra anti-conejo-FITC). Como control negativo, los parásitos se incubaron con el suero preinmune (SPI) (Paneles i-l). Las muestras se analizaron por microscopía confocal. DAPI (en azul), Faolidina rodaminada (en rojo), fluorescencia FITC (en verde); y la colocación de las fluorescencias. Barra de 5  $\mu$ m (Panel l). Resultado representativo de tres experimentos independientes.*



**Fig. 37. Localización citoplásmica y re-localización a los pseudópodos de TvACTN3 por inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal.**

*Parásitos crecidos en concentraciones normales de hierro (Paneles a-o) se fijaron, se permeabilizaron, se bloquearon y se incubaron con el anticuerpo policlonal primario  $\alpha$ -TvACTN3r (Paneles d y i), enseguida, se incubaron con el anticuerpo secundario (cabra anti-conejo-FITC). Como control negativo, los parásitos se incubaron con el suero preinmune (SPI) (Paneles k-o). Parásitos ovoides (Paneles a-e) o (Paneles k-o). Parásitos ameboides (Paneles f-j). Las muestras se analizaron por microscopía confocal. DAPI (en azul), Faolidina rodaminada (en rojo), fluorescencia FITC (en verde); y la Colocalización de las fluorescencias. La barra de escala presenta 5  $\mu$ m.*



## 10. DISCUSIÓN.

*El hierro es un nutriente esencial para procesos metabólicos fundamentales en las células y es un modulador para el crecimiento y virulencia en organismos patógenos. T. vaginalis coloniza el tracto genitourinario y debe adaptarse a los cambios cíclicos en las concentraciones de hierro durante el ciclo menstrual en mujeres infectadas. El hierro juega un rol importante en las interacciones hospedero-parásito mediante la estimulación de la citoadherencia, resistencia al complemento, reducción de la citotoxicidad e inducción de la apoptosis en células del hospedero [88].*

*Los mecanismos por los cuales el hierro modula la expresión de genes asociada a la virulencia en T. vaginalis son pobremente entendidos. Sin embargo, se sabe que a nivel transcripcional, la expresión de genes es mediada por un promotor de respuesta al hierro [213] y la interacción coordinada con por lo menos tres proteínas Myb [215-217]. Hasta la fecha este tipo de regulación se ha descrito solo para el gen ap65-1, regulado positivamente por hierro [213]. Recientemente, la expresión positiva de la proteína TvCP4 por hierro se describió a nivel de proteína. Además, se identificó y caracterizó una estructura de tallo-burbuja atípica similar a un IRE localizada en la región 5' del mRNA tvcp4, sugiriendo que una forma ancestral de estructuras tallo-burbuja está involucrado en un mecanismo de regulación a nivel post-transcripcional mediado por la interacción RNA-proteína, paralelo al sistema IRE/IRP [218,246].*

*En este trabajo, caracterizamos a la proteína citoplasmática de 135 kDa correspondiente a una de las cinco  $\alpha$ -actininas de T. vaginalis, a la cual denominamos TvACTN3, como una de las proteínas involucradas en las interacciones RNA-proteína que podría participar en la regulación post-transcripcional por hierro en T. vaginalis. Nuestros resultados sugieren que esta proteína es parte del complejo ribonucleoproteico capaz de interactuar con las estructuras tallo-burbuja: IRE-fer e IRE-tvcp4 (Figuras: 8, 10, 26 y 29-32).*

*Demostramos una interacción específica entre las proteínas citoplásmicas de T. vaginalis* crecidas en concentraciones bajas de hierro y las estructuras IRE presentes en RNAm de este parásito así como en el RNAm de la ferritina de humano mediante ensayos de retardo (REMSA) (Figura 7). Estos datos respaldan nuestros resultados previos, sugiriendo la presencia de un sistema de regulación post-transcripcional por hierro en *T. vaginalis* que se ha conservado durante la evolución [218,246]. Sin embargo, este mecanismo paralelo en *T. vaginalis* utiliza una estructura de RNA tallo-burbuja atípica y diferentes proteínas de unión a RNA (RBPs) (Figuras 8). Este hallazgo no es sorprendente debido a que el parásito *T. vaginalis* ha perdido la actividad de la aconitasa y no tiene genes que codifiquen a proteínas tipo IRP [47]. En este trabajo mostramos la presencia de cuatro proteínas citoplásmicas (RBPs) que específicamente se unen a las estructuras tallo-burbuja: IRE-fer e IRE-tvcp4 con pesos moleculares de 135, 110, 70 y 45 kDa (identificadas mediante espectrometría de masas como TvACTN3, TvACTN2, TvHSP70 y actina, respectivamente) en proteínas de extractos citoplásmicos de *T. vaginalis* crecidas en bajas concentraciones de hierro (Figuras 10, carriles 2 y 7). Esta interacción específica sugiere que estas proteínas podrían cumplir el rol de RBPs en *T. vaginalis*. Sin embargo, la diferencia en los pesos moleculares con las proteínas típicas IRP-1 o IRP-2, así como el efecto negativo del agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol en la formación de los complejos RNA-proteína, sugiere la presencia de RBPs atípicos en este mecanismo particular. Resultados similares se han reportado en otros parásitos protistas [173,174,180,182,200].

### **¿Por qué la TvACTN3 es una de las proteínas de unión a RNA en este parásito?**

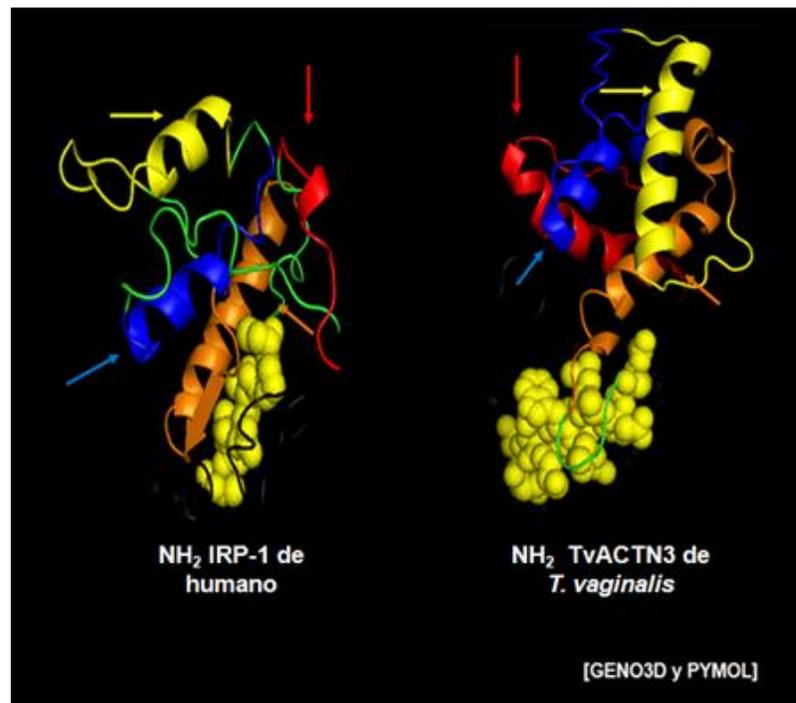
*De acuerdo a la secuenciación del genoma de T. vaginalis, este parásito tiene cinco genes que codifican a diferentes  $\alpha$ -actininas (tvactn) [47]. Mediante el alineamiento múltiple de la secuencia a nivel de nucleótidos y aminoácidos*

observamos que los dominios amino y carboxilo terminal (Dominios I y III) son conservados entre las cinco  $\alpha$ -actininas de *T. vaginalis*. Observamos que solo la región central (Dominio II) es la más divergente debido a la presencia en el número de repetidos de espectrina en cada isoforma (Figuras 14 y 15). Sin embargo, solo una  $\alpha$ -actinina se ha estudiado previamente. La  $\alpha$ -actinina de 110 kDa (denominada TvACTN2 en el presente trabajo) fue hallada en el citoplasma de *T. vaginalis* ovoides. En las formas ameboides, altas concentraciones de la  $\alpha$ -actinina se hallaron en la periferia de estas células, principalmente en los pseudópodos y en las placas de adhesión que colocalizan con la proteína actina [62]. Además, la sobre-expresión del gen *tvactn2* se reportó en parásitos adheridos a células del epitelio vaginal y en parásitos cultivados en bajas concentraciones de hierro [247], . Además, en la base de datos de tricomonas TrichDB, el gen *tvactn2* presenta un gran número de ESTs (711), en parásitos crecidos en diferentes condiciones ambientales comparados con los otros cuatro genes *tvactn* (Tabla 5). En nuestros ensayos experimentales de RT-PCR y qRT-PCR observamos menor expresión del gen *tvactn2* en parásitos crecidos en bajas concentraciones de hierro. Nuestros resultados de expresión del gen *tvactn2* son respaldados por el trabajo de Horváthová y col, 2012 [248] , quienes no observan sobre expresión del gen *tvactn2* en parásitos crecidos en bajo hierro mediante análisis de ESTs y Microarreglos. Una posible explicación al resultado de Kucknoor y col, 2005 [249], es que en ese año no estaba publicado el genoma de *T. vaginalis* y se hubieran diseñado oligonucleótidos “degenerados” que permitan la amplificación inespecífica de otros fragmentos de DNA.

Además, nuestros resultados son consistentes con el número de ESTs reportados en la base de datos TrichDB (Figuras 11-13). Observamos menor expresión de los genes *tvactn1*, *tvactn2* y *tvactn3* en parásitos crecidos en concentraciones bajas de hierro en comparación a parásitos crecidos en concentraciones normales y altas de hierro. También observamos una ausencia en la expresión de los genes *tvactn4* y *tvactn5* en las diferentes concentraciones de hierro que evaluamos. La expresión de los genes *tvactn4* y *tvactn5* se observó

en los ensayos de RT-PCR y qRT-PCR, en parásitos crecidos en las diferentes concentraciones de hierro (0, 20 y 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ ), solo cuando se satura el sistema, es decir se aumenta el número de ciclos de amplificación (40 ciclos), lo cual coincide con el número de ESTs reportados para estos dos genes (Tabla 5), casi nulo.

Con la finalidad de explicar el reconocimiento cruzado de los anticuerpos  $\alpha$ -IRP-1,  $\alpha$ -IRP-2,  $\alpha$ -ACTN y  $\alpha$ -TvACTN3 con las proteínas *h*-IRP1r y TvACTN3r (Figura 22) se realizó un análisis *in silico* de plegamiento de la región amino terminal (primeros 200 aa) de las proteínas *h*IRP-1 de humano y TvACTN3 de *T. vaginalis* y se observó un plegamiento similar en cuanto a estructuras de hélices-alfa, este resultados podría explicar el reconocimiento de cruzado de los anticuerpos evaluados (Figura 38).



**Fig. 38.** Plegamiento de la región amino de las proteínas IRP-1 de humano y TvACTN3 de *T. vaginalis*.

En la Figura 27, se observó un reconocimiento específico de los anticuerpos generados en contra de cada uno los dominios de la proteína TvACTN3, a pesar de que existe regiones compartidas entre los dominios, mediante un análisis in silico con el programa SMART se identificó un motivo denominado THY (timosina), el cual esta presente en el dominio II de la TvACTN3. Este motivo es considerado un “modificador de la respuesta biológica” al ser altamente inmunogénico. La presencia de este motivo inmunogénico en el dominio II de la proteína TvACTN3 podría enmascarar la reacción inmunológica en el conejo inmunizado y por lo tanto los anticuerpos obtenidos reconocen solo a este dominio.

La participación de la proteína TvACTN3 en la formación de complejos RNA-proteína fue evaluada mediante diferentes ensayos funcionales, utilizando las herramientas que generamos: principalmente, las proteínas recombinantes (TvACTN3r y sus tres dominios, así como la hIRP-1r) y los anticuerpos específicos para cada una de las proteínas recombinantes (Figuras 22, 30 y 31). Mediante los ensayos de super-retardo (REMSA), NWB y entrecruzamiento observamos que la proteína recombinante TvACTN3r se une a las estructuras de RNA tallo-burbuja posiblemente a través del Dominio II (DIIr) (Figuras 32 y 33). Estos resultados sugieren un nuevo rol de la TvACTN3r como una proteína de unión a RNA. Además, mediante un análisis in silico del dominio DII de la TvACTN2 y la TvACTN3 observamos que ambas secuencias comparten un 54% de identidad (Figuras 32 y 33), lo cual sugiere que podría ser la segunda proteína de unión a RNA de 110 kDa presente en tricomonas.

En los ensayos de super-retardo (REMSA), observamos la formación de un segundo complejo ribonucleoproteico (II) que nos indica la participación de la proteína TvACTN3 en la unión a RNA (IRE-tvcp4 e IRE-fer) (Figuras 28 y 29). Donde también observamos que a medida que incrementamos la concentración de los anticuerpos anti- $\alpha$ -actinina ( $\alpha$ -TvACTN3,  $\alpha$ -DIr,  $\alpha$ -DIIr y  $\alpha$ -DIIIr) se incrementa la concentración de no solo el complejo II, si no también el complejo I (el cual se espera debería disminuir). Una explicación a este hallazgo es que

reactivos como BSA (presente en el suero) cumplen la función de “aditivo” en ensayos de interacción RNA-proteína [250].

El rol típico de la  $\alpha$ -actinina es servir como una proteína del citoesqueleto ubicua y conservada en las células eucariotes, donde entrecruza filamentos de actina y juega un rol importante en el movimiento y en los cambios morfológicos [251]. La  $\alpha$ -actinina pertenece a la super-familia de las espectrinas, las cuales se caracterizan por tener la habilidad de unirse a actina y por tener varios repetidos de espectrina (estructuras hélices alfa repetidas en la región central de la proteína) [252]. Sus otras funciones importantes en la célula están relacionadas a la asociación del citoesqueleto a diferentes proteínas transmembrana, regulación de la actividad de varios receptores y sirven como un andamiaje para conectar diversas vías de señalización con el citoesqueleto. Durante el curso de la evolución, se han asociado a: corte y empalme alternativo, duplicación de genes que han dado lugar a una variedad funcional sustancial dentro de la familia de la proteína  $\alpha$ -actinina. Esta diversidad es más marcada en las células de mamíferos, en la cual cuatro genes que codifican  $\alpha$ -actininas producen al menos seis diferentes productos o isoformas. Cada isoforma tiene diferente localización subcelular y tisular, así como diferentes perfiles de expresión y características bioquímicas [253]. Por lo tanto se puede esperar que las diferentes  $\alpha$ -actininas de *T. vaginalis* presenten un comportamiento similar ya que tienen niveles de expresión específicos bajo diferentes concentraciones de hierro (Figuras 11-13). Estos resultados son consistentes con los recientes reportes de RT-PCR, microarreglos y datos de ESTs ([www.trichdb.org](http://www.trichdb.org)) [247,248].

Por otra parte, en el genoma de *T. vaginalis* se ha reportado múltiples eventos de duplicación de genes, por lo que la presencia de cinco genes que codifican a  $\alpha$ -actininas, probablemente representan un proceso de neofuncionalización. Aunque la función primaria de la  $\alpha$ -actinina como una proteína de unión a actina, la duplicación de genes durante la evolución podría conducir a la adquisición de nuevas funciones dentro de la célula, incluyendo la unión al RNA, dependiendo

de las condiciones microambientales. Esto no es sorprendente porque las proteínas del citoesqueleto están también involucradas en asociaciones RNA-citoesqueleto, localización y re-localización del mRNA en la mayoría de los tipos de células. La asociación de RNAs con proteínas del citoesqueleto es requerida en diferentes procesos celulares tales como el transporte de mRNA y la síntesis de proteínas [254]. Proteínas del citoesqueleto tales como la  $\beta$ -actina y anexina A2 contribuyen a la regulación post-transcripcional de la expresión de genes específicos a través de interacciones entre estas proteínas y elementos en cis (región río arriba), generando una estructura de orden superior y regulan la localización y traducción de transcritos específicos [255-257].

Debido a que las interacciones RNA-proteína se identificaron solo en concentraciones bajas de hierro, analizamos la expresión del gen *tvactn3*. Observamos que este gen es regulado positivamente por hierro a nivel de mRNA (Figuras 11-13). Sin embargo, la expresión a nivel de proteínas parece ser constitutiva (Figura 34). La interacción de la  $\alpha$ -actinina TvACTN3 con el RNA podría ocurrir en ausencia de hierro a través de algún motivo de unión a RNA que se encuentran en el dominio central (DII), particularmente en la región entre los residuos de aminoácidos 230 al 662, de acuerdo a nuestros análisis *in silico* (Figura 33 y Tabla 7). Estos datos sugieren que el hierro podría controlar la interacción de la proteína TvACTN3 con la actina o RNA posiblemente a través de cambios conformacionales que permiten el cambio de funciones dependiente de las concentraciones de hierro, pero sin la modificación de la cantidad de proteína.

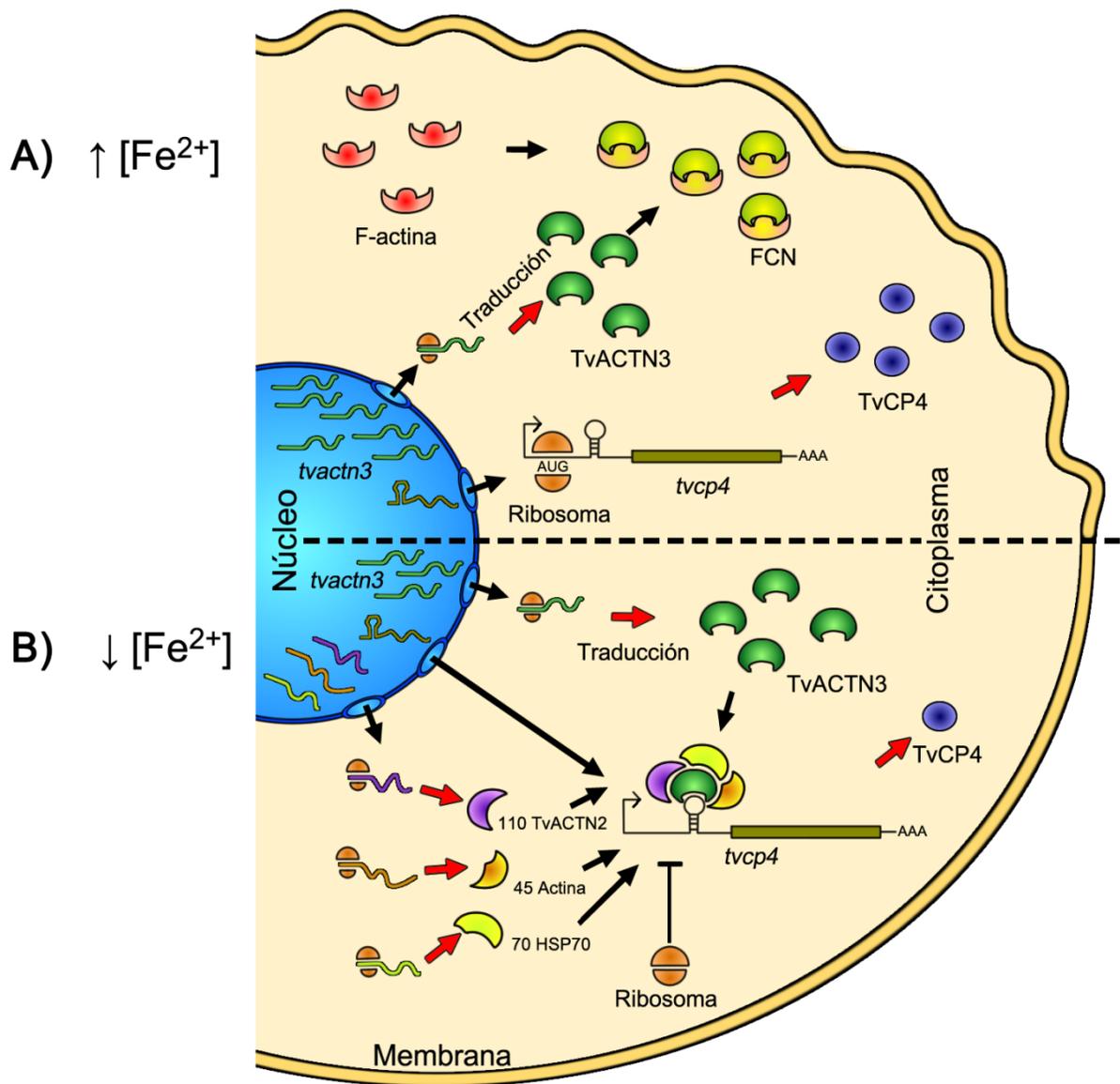
De acuerdo a estos resultados, se propone el siguiente modelo hipotético: a) en altas concentraciones de hierro, la proteína TvACTN3 es una proteína de unión a actina que promueve la polimerización y estabilización de los filamentos de actina; y b) En bajas concentraciones de hierro, la proteína TvACTN3 es una proteína de unión a RNA que interacciona con las estructuras tallo-burbuja del RNA, la cual podría estar involucrada en un mecanismo paralelo de regulación

*post-transcripcional por hierro (Figura 39), Esta unión a RNA podría ser dependiente de un complejo ribonucleomultiproteico, donde estén involucradas las proteínas TvACTN3, TvACTN2, TvHSP70 (caracterizada por Torres-Romero, 2010) y actina. (Figura 39).*

**Fig. 39. Modelo hipotético de la regulación post-transcripcional por hierro por un sistema paralelo tipo IRE/IRP en *T. vaginalis*, utilizando el gen *tvcp4* como modelo.**

*A. En altas concentraciones de hierro, la proteína TvACTN3 cumple la función de unión a actina, donde promueve la polimerización y estabiliza los filamentos de actina y procede la traducción del mRNA tvcp4.*

*B. En bajas concentraciones de hierro, la proteína TvACTN3 cumple la función de una proteína de unión a RNA, al interaccionar con las estructuras tallo-burbuja de RNA como una parte de un complejo ribonucleoproteico que podría estar involucrado en un mecanismo paralelo de regulación post-transcripcional por hierro. En este caso la traducción del mRNA tvcp4 es bloqueada por la unión del complejo multiproteico conteniendo a la proteína TvACTN3 y probablemente a la proteína TvACTN2, para el IRE ubicados en la región 5'UTR de este mRNA.*



*La interacción TvACTN3-RNA parece estar ausente en las otras  $\alpha$ -actininas de T. vaginalis (a excepción de la TvACTN2, Figuras 8 y 33) e incluso en las  $\alpha$ -actininas de otras especies cuando se analizan por diferentes programas computacionales. Por lo tanto, para identificar posibles dominios de unión a RNA en el dominio central (DII) de la TvACTN3, se necesitan estudios adicionales para definir la región o regiones particulares del DII responsables de la interacción RNA-proteína, que podría incluir los posibles motivos previamente identificados (Figura 33 y Tabla 7) o un nuevo motivo no caracterizado que podría ser el responsable del nuevo rol de unión al RNA identificado en la proteína TvACTN3 de este parásito protista de evolución temprana. También será necesario determinar si la TvACTN3 puede interaccionar con otras estructuras tipo IRE presente en múltiples genes regulados por hierro, tal como recientemente se han descrito [247,251]. Además de la estructura identificada en la región 3'UTR del gen tvcp12 que se regula negativamente por hierro, la cual codifica otra cistein proteinasa (CP) de T. vaginalis y participa en la citotoxicidad [207,246,258]. Por lo tanto, este hallazgo podría representar un nuevo mecanismo de regulación post-transcripcional mediado por hierro común a los genes regulados diferencialmente por hierro en T. vaginalis.*

*Este mecanismo alternativo descrito en T. vaginalis podría ser el responsable de la regulación post-transcripcional por hierro de otros genes que codifica para factores de virulencia como adhesinas, CPs y otros aún no identificados que participan en la virulencia de un protozoo tan primitivo como T. vaginalis. La relevancia de este hallazgo radica en que ayudará a entender mejor el efecto que tienen los cambios ocasionados durante el ciclo menstrual sobre la regulación de la virulencia de T. vaginalis y su posible aplicación para mejorar el diagnóstico y el tratamiento de la tricomonosis humana, una de las infecciones de transmisión sexual no viral más común en el mundo [205,218,259].*

*Mediante la caracterización de la proteína TvACTN3 se han identificado varias características, que también están presentes en las proteínas IRP de humanos*

(principales reguladores de la homeostasis por hierro eucariotes) y proteínas de unión a RNA de parásitos como *P. falciparum* y *L. tarentolae*, las mismas que se describen en la Tabla 8.

**Tabla 8. Características funcionales de las proteínas TvACTN3 de tricomonas y IRP de humanos.**

<b>Características</b>	<b>IRP-1</b>	<b>IRP-2</b>	<b>Proteína tipo IRP de <i>P. falciparum</i></b>	<b>Proteína tipo IRP de <i>L. tarentolae</i></b>	<b>TvACTN3 de <i>T. vaginalis</i></b>
<b>Unión a RNA en bajas concentraciones de hierro</b>	<i>Si</i>	<i>Si</i>	<i>Si</i>	<i>Si</i>	<i>Si</i>
<b>Localización citoplásmica</b>	<i>Si</i>	<i>Si</i>	<i>Si</i>	<i>Si</i>	<i>Si</i>
<b>Función típica</b>	<i>Aconitasa</i>	<i>Proteína de unión a RNA</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>Proteína de unión a actina</i>
<b>Otras funciones</b>	<i>Proteína de unión a RNA</i>	<i>ND</i>	<i>Proteína de unión a RNA</i>	<i>Proteína de unión a RNA</i>	<i>Proteína de unión a RNA</i>
<b>Unión a RNA dependiente de agentes reductores (<math>\beta</math>-ME).</b>	<i>Si</i>	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>No</i>

## **11. CONCLUSIONES.**

- 1. La TvACTN3 es una proteína citoplásmica multifuncional, que cumple una función típica como una proteína de unión a actina y además es una proteína de unión a RNA de acuerdo a las concentraciones de hierro.*
- 2. La proteína TvACTN3 interacciona con el IRE-tvcp4 y además interacciona con una estructura tallo burbuja consenso típica como el IRE-fer de ferritina humano.*

*Estos datos apoyan la participación de la TvACTN3 en la regulación por hierro a nivel post-transcripcional por un mecanismo mediado por las interacción de proteína-RNA paralelo al sistema IRE/IRP.*

## **12. PERSPECTIVAS.**

- 1. Estudiar o determinar la funcionalidad del motivo 4 y los posibles Inr en diferentes condiciones de cultivo, para analizar si existen sitios de inicio de la transcripción alternativos en el gen tvactn3 de T. vaginalis.*
- 2. Evaluar la re-distribución de la proteína TvACTN3 en el T. vaginalis mediante microscopía confocal, a diferentes tiempos y en diferentes concentraciones de hierro y su asociación con actina y RNA.*
- 3. Realizar ensayos de colocalización entre TvACTN3 y RNA de doble cadena.*
- 4. Evaluar el correcto plegamiento de la proteína TvACTN3 mediante dicroísmo circular y realizar ensayos funcionales de unión a las estructuras IRE.*
- 5. Identificar los aminoácidos responsables de la interacción de la proteína TvACTN3 con las estructuras IRE-fer e IRE-tvcp4.*
- 6. Caracterizar a las proteínas de unión a RNA con pesos moleculares de 110 y 45 kDa.*

7. *Reconstituir in vitro el sistema de regulación post-transcripcional por hierro.*
8. *Identificar el o los RNAs blanco de la TvACTN3 como proteína reguladora.*
9. *Determinar si la TvACTN3 interacciona con las proteínas de unión a RNA para formar el complejo ribonucleoprotéico.*

### 13. BIBLIOGRAFÍA.

1. Alderete JF, Garza GE (1985) Specific nature of *Trichomonas vaginalis* parasitism of host cell surfaces. *Infect Immun* 50: 701-708.
2. Schwebke J, and Burgess, D. (2004) Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Reviews* 17: 794-803.
3. Schwebke J (2002) Update of trichomoniasis. *Sex Transm Infect* 78: 378-379.
4. Swygard H, Seña, AC., Hobbs, MM., and Cohen, MS. (2004) Trichomoniasis: clinical manifestations, diagnosis and management. *Sex Transm Infect* 80: 91-95.
5. Petrin D, Delgaty, K., Bhatt, R., and Garber, G. (1998) Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microb Reviews* 11: 300-317.
6. Wang J (2000) Trichomoniasis. *Prim Care Update Ob/Gyns* 7: 148-153.
7. Uneke C, Alo, MN., Ogbu, O., and Ugwuoru (2007) *Trichomonas vaginalis* infection in human immunodeficiency virus/seropositive Nigerian women: The public health significance. *Journal of Health and Allied Sciences* 6: 1-7.
8. Van Der Pol B, Kwok, C., Pierre-Louis, B., Rinaldi, A., Salata, RA., Chen, PL., van de Wijgert, J., Mmiro, F., Mugerwa, R., Chipato, T., and Morrison, CS. (2008) *Trichomonas vaginalis* Infection and Human Immunodeficiency Virus Acquisition in African Women. *The Journal of Infectious Diseases* 197: 548-554.
9. Lehker M, and Alderete, JF. (2000) Biology of trichomonosis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 13: 37-45.
10. Gram I, Macaluso, M., Churchill, J. and Stalsberg, H. (1992) *Trichomonas vaginalis* (TV) and human papillomavirus (HPV) infection and the incidence of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade III. *Cancer Causes Control* 3: 231-236.
11. Kharsany A, Hoosen, AA., Moodley, J., Bagaratee, J., and Gouws, E. (1993) The association between sexually transmitted pathogens and cervical intra-epithelial neoplasia in a developing community. *Genitourin Med* 69: 357-360.
12. Sutcliffe S, Alderete JF, Till C, Goodman PJ, Hsing AW, et al. (2008) Trichomonosis and subsequent risk of prostate cancer in the Prostate Cancer Prevention Trial. *Int J Cancer*.
13. Stark JR, Judson G, Alderete JF, Mundodi V, Kucknoor AS, et al. (2009) Prospective study of *Trichomonas vaginalis* infection and prostate cancer incidence and mortality: Physicians' Health Study. *J Natl Cancer Inst* 101: 1406-1411.
14. Heine P, and McGregor, JA. (1993) *Trichomonas vaginalis*: a reemerging pathogen. *Clin Obstet Gynecol* 36: 137-144.
15. Zhang Z, and Begg, CB. (1994) Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies. *Int J Epidemiol* 23: 682-690.
16. Moodley P, Wilkinson, D., Connolly, C., Moodley, J., and Sturm, W. (2002) *Trichomonas vaginalis* Is Associated with Pelvic Inflammatory Disease in

- Women Infected with Human Immunodeficiency Virus. *Clin Infect Dis* 34: 519-522.
17. Grodstein F, Goldman, MB., and Cramer, DW. (1993) Relation of tubal infertility to history of sexually transmitted diseases. *Am J Epidemiol* 137: 577-584.
  18. Spence D, and Melville, C. (2007) Vaginal discharge. *BMJ* 335: 1147-1151.
  19. Krieger J (2000) Trichomoniasis in Men: Old Issues and New Data. *Sexually Transmitted Diseases* 22: 83-96.
  20. Jarecki-Black JC, Lushbaugh WB, Golosov L, Glassman AB (1988) *Trichomonas vaginalis*: preliminary characterization of a sperm motility inhibiting factor. *Ann Clin Lab Sci* 18: 484-489.
  21. Ozdemir E, Kelestemur N, Kaplan M (2011) *Trichomonas vaginalis* as a rare cause of male factor infertility at a hospital in East Anatolia. *Andrologia* 43: 283-285.
  22. Han Q, Liu J, Wang T, Xiao H, Fang Z (2004) [Influence of the metabolite produced by *Trichomonas vaginalis* on human sperm motility in vitro]. *Zhonghua Nan Ke Xue* 10: 272-274.
  23. Hoffman DJ, Brown GD, Wirth FH, Gebert BS, Bailey CL, et al. (2003) Urinary tract infection with *Trichomonas vaginalis* in a premature newborn infant and the development of chronic lung disease. *J Perinatol* 23: 59-61.
  24. Wang JJ, Yeung LK, Sun LC, Sy LB, Leu FJ (2005) Premature with trichomoniasis: report of one case. *Acta Paediatr Taiwan* 46: 219-221.
  25. Carter JE, Whithaus KC (2008) Neonatal respiratory tract involvement by *Trichomonas vaginalis*: a case report and review of the literature. *Am J Trop Med Hyg* 78: 17-19.
  26. Trintis J, Epie N, Boss R, Riedel S (2010) Neonatal *Trichomonas vaginalis* infection: a case report and review of literature. *Int J STD AIDS* 21: 606-607.
  27. Szarka K, Temesvari P, Kerekes A, Tege A, Repkeny A (2002) Neonatal pneumonia caused by *Trichomonas vaginalis*. *Acta Microbiol Immunol Hung* 49: 15-19.
  28. Temesvari P, Kerekes A, Tege A, Szarka K (2002) Demonstration of *Trichomonas vaginalis* in tracheal aspirates in infants with early respiratory failure. *J Matern Fetal Neonatal Med* 11: 347-349.
  29. Duboucher C, Noel C, Durand-Joly I, Gerbod D, Delgado-Viscogliosi P, et al. (2003) Pulmonary coinfection by *Trichomonas vaginalis* and *Pneumocystis* sp. as a novel manifestation of AIDS. *Hum Pathol* 34: 508-511.
  30. Meites E, Llata E, Braxton J, Schwebke JR, Bernstein KT, et al. (2013) *Trichomonas vaginalis* in Selected US Sexually Transmitted Disease Clinics: Testing, Screening, and Prevalence. *Sex Transm Dis* 40: 865-869.
  31. Kirkcaldy RD, Augostini P, Asbel LE, Bernstein KT, Kerani RP, et al. (2012) *Trichomonas vaginalis* antimicrobial drug resistance in 6 US cities, STD Surveillance Network, 2009-2010. *Emerg Infect Dis* 18: 939-943.
  32. Johnson PJ (1993) Metronidazole and drug resistance. *Parasitol Today* 9: 183-186.
  33. Sobel JD, Nagappan V, Nyirjesy P (1999) Metronidazole-resistant vaginal trichomoniasis--an emerging problem. *N Engl J Med* 341: 292-293.

34. Lomax NJ, Estcourt C, Mirakian R (2004) Symptomatic trichomoniasis, metronidazole allergic and pregnant--a management dilemma. *Int J STD AIDS* 15: 275-276.
35. Schmid G, Narcisi E, Mosure D, Secor WE, Higgins J, et al. (2001) Prevalence of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* in a gynecology clinic. *J Reprod Med* 46: 545-549.
36. Dunne RL, Dunn LA, Upcroft P, O'Donoghue PJ, Upcroft JA (2003) Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Research* 13: 239-249.
37. Brumbarova T, and Bauer, P. (2005) Iron-Mediated Control of the Basic Helix-Loop-Helix Protein FER, a Regulator of Iron Uptake in Tomato. *Plant Physiology* 137: 1018-1026.
38. WHO (2001) *Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections. Overview and Estimates.* World Health Organization, Geneva. 1-42.
39. Schmid G (2003) *Trichomoniasis treatment in women: RHL commentary.* The WHO Reproductive Health Library.
40. Van Der Pol B (2007) *Trichomonas vaginalis Infection: The Most Prevalent Nonviral Sexually Transmitted Infection Receives the Least Public Health Attention.* *Clinical Infectious Diseases* 44: 23-25.
41. Salud SNdVEdISd (2013) *Vigilancia Epidemiológica. Información preliminar.*
42. Honigberg BM (1990) *Trichomonads parasitic in humans.* New York: Springer-Verlag. x, 424 p. p.
43. Leherker M, and Sweeney, D. (1999) *Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility.* *Sexually Transmitted Infections* 75: 231-238.
44. Honigberg B (1990) *Host cell-trichomonad interactions and virulence assays using in vitro systems.* En: *Trichomonads parasitic in humans.* Springer-Verlag: 5-35.
45. Arroyo R, González-Robles, A., Martínez-Palomo, A., and Alderete, JF. (1993) *Signalling of Trichomonas vaginalis for amoeboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence.* *Molecular Microbiology* 7: 299-309.
46. Pereira-Neves A, Consort-Ribeiro, K, and Benchimol, M. (2003) *Pseudocysts in Trichomonads - New Insights.* *Protist* 154: 313-329.
47. 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.; Perteza, 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* 315: 207-212.
48. Hirt RP, Noel CJ, Sicheritz-Ponten T, Tachezy J, Fiori PL (2007) *Trichomonas vaginalis* surface proteins: a view from the genome. *Trends Parasitol* 23: 540-547.
  49. Honigberg B, and Brugerolle, G. (1990) Structure. En: *Trichomonads parasitic in humans* (Honigberg, B.M., editor). Springer-Verlag, New York, NY: 5-35.
  50. Bastida-Corcuera F, Okumura, Ch., Colocoussi, A., and Johnson, P. (2005) *Trichomonas vaginalis* Lipophosphoglycan Mutants Have Reduced Adherence and Cytotoxicity to Human Ectocervical Cells. *Eukaryotic Cell* 4: 1951-1958.
  51. Kneipp L, Andrade, AF., de Souza, W., Angluster, J., Alviano, CS. and Travassos, LR. (1999) *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*: expression of chitin at the cell surface. *Exp Parasitol* 89: 195-204.
  52. Yuh Y, Liu, JY., and Shaio, MF. (1997) Chromosome number of *Trichomonas vaginalis*. *J Parasitol* 83: 551-553.
  53. Gomez-Conde E, Mena-Lopez R, Hernandez-Jauregui P, Gonzalez-Camacho M, Arroyo R (2000) *Trichomonas vaginalis*: chromatin and mitotic spindle during mitosis. *Exp Parasitol* 96: 130-138.
  54. Malik SB, Pightling AW, Stefaniak LM, Schurko AM, Logsdon JM, Jr. (2008) An expanded inventory of conserved meiotic genes provides evidence for sex in *Trichomonas vaginalis*. *PLoS One* 3: e2879.
  55. Alderete J, Benchimol, M., Lehker, MW. y Crouch, ML. (2002) Mini review: The complex fibronectin *Trichomonas vaginalis* interactions and Trichomonosis. *Parasitol Int* 51: 285-292.
  56. Brugerolle G, Bricheux, G., and Coffe, G. (2000) Immunolocalization of two hydrogenosomal enzymes of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol Res* 86: 30-35.
  57. Müller M (1993) The hydrogenosome. *J Gen Microbiol* 139: 2879-2889.
  58. Bricheux G, Coffe, G., Bayle, D., and Brugerolle, G. (2000) Characterization, cloning and immunolocalization of a coronin homologue in *Trichomonas vaginalis*. *European Journal of Cell Biology* 79: 413-422.
  59. ExPASy Compute pI/Mw- Compute the theoretical isoelectric point (pI) and molecular weight (Mw) from a UniProt Knowledgebase entry or for a user sequence. .
  60. Virel A, and Backman, L. (2007) A Comparative and Phylogenetic Analysis of the  $\alpha$ -Actinin Rod Domain. *Mol Biol Evol* 24: 2254-2265.
  61. Bricheux G, Coffe, G., Pradel, N., and Brugerolle, G. (1998) Evidence for an uncommon  $\alpha$ -actinin protein in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 95: 241-249.
  62. Addis M, Rappelli, P., Delogu, G., Carta, F., Cappuccinelli, P., and Fiori PL. (1998) Cloning and Molecular Characterization of a cDNA Clone Coding for *Trichomonas vaginalis* alpha-actinin and intracellular localization of the protein. *Infect Immun* 66: 4924-4931.

63. Mirhaghani A, and Warton, A. (1998) Involvement of *Trichomonas vaginalis* surface associated glycoconjugates in the parasite/target cell interaction. A quantitative electron microscopy study. *Parasitol Res* 84: 374-381.
64. Arroyo R, Engring, J., and Alderete, JF. (1992) Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Molec Microb* 6: 853-862.
65. Lehker M, Arroyo, R., and Alderete, JF. (1991) The Regulation by Iron of the Synthesis of Adhesins and Cytoadherence Levels in the Protozoan *Trichomonas vaginalis*. *J Exp Med* 174: 311-318.
66. Heath J (1981) Behaviour and pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* in epithelial cell cultures. A study by light and scanning electron microscopy. *Br J Vener Dis* 57: 106-117.
67. Lehker M, Chang, TH., Dailey, DC., and Alderete, JF. (1990) Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for *Trichomonas vaginalis*. *J Exp Med* 171: 2165-2170.
68. Fiori P, Rappelli, P., Addis, MF., Mannu, F., and Cappuccinelli, P. (1997) Contact-Dependent Disruption of the Host Cell Membrane Skeleton Induced by *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity* 65: 5142-5148.
69. Alderete J, and Pearlman, E. (1984) Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers. *Br J Vener Dis* 60: 99-105.
70. Krieger J, Radvin, JL., and Rein, MF. (1985) Contact-dependent cytopathogenic mechanisms of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 50: 778-786.
71. Rendón-Maldonado J, Espinosa-Cantellano, M., González-Robles, A., and Martínez-Palomo, A. (1998) *Trichomonas vaginalis*: in vitro phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes, and erythrocytes. *Exp Parasitol* 89: 241-258.
72. Rosset I, Tasca, T., Tessele, PM., and De Carli, GA. (2002) Scanning electron microscopy in the investigation of the in vitro hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol Res* 88: 356-359.
73. Fiori P, Rapelli, P., Rocchigiani, AM., and Capuccinelli, P. (1993) *Trichomonas vaginalis* haemolysis: evidence of functional pores formation on red cell membranes. *FEMS Microbiol Lett* 109: 13-18.
74. Neale K, and Alderete, J. (1990) Analysis of the Proteinases of Representative *Trichomonas vaginalis* Isolates. *Infect Immun* 58: 157-162.
75. Alderete J, Provenzano, D., and Lehker, MW. (1995) Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. *Microb Pathogen* 19: 93-103.
76. Sommer U, Costello, CE., Hayes, GR., Beach, DH., Gilbert, RO., Lucas, JJ., and Singh, BN. (2005) Identification of *Trichomonas vaginalis* Cysteine Proteases That Induce Apoptosis in Human Vaginal Epithelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 23853-23860.
77. Kummer S, Hayes, GR., Gilbert, RO., Beach, DH., Lucas, JJ., and Singh, BN. (2008) Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron. *Microbial Pathogenesis* 44: 197-203.

78. Alderete J, and Garza, GE. (1988) Identification and Properties of *Trichomonas vaginalis* Proteins Involved in Cytoadherence. *Infect Immun* 56: 28-33.
79. Meza-Cervantez P, Gonzalez-Robles A, Cardenas-Guerra RE, Ortega-Lopez J, Saavedra E, et al. (2011) Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO) is a surface-associated cell-binding protein in *Trichomonas vaginalis* and is involved in trichomonal adherence to host cells. *Microbiology* 157: 3469-3482.
80. 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 hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. *Cellular Microbiology* 7: 245-258.
81. Garcia AC, TH.; Benchimol, M.; Klumpp, DJJ.; Lehker, MW., and Alderete, JF. (2003) Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol* 47: 1207-1224.
82. Alderete JF (1999) Iron modulates phenotypic variation and phosphorylation of P270 in double-stranded RNA virus-infected *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 67: 4298-4302.
83. Alderete J, O'Brien, JL., Arroyo, R., Engbring, JA., Musatovova, O., López, O., Lauriano, C., and Nguyen, J. (1995) Cloning and molecular characterization of two genes encoding adhesion proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Mol Microbiol* 17: 69-83.
84. O'Brien JL, CM., and Alderete, JF. (1996) Molecular characterization of a third malic enzyme-like AP65 adhesin gene of *Trichomonas vaginalis*. *Microbial Pathogenesis* 20: 335-349.
85. Alderete J, Engbring, J., Lauriano, CM., and O'Brien, JL. (1998) Only two of the *Trichomonas vaginalis* triplet AP51 adhesins are regulated by iron. *Microbial Pathogenesis* 24: 1-16.
86. Engbring J, and Alderete, JF. (1998) Three genes encode distinct AP33 proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Molec Microb* 28: 305-313.
87. Kulda J (1999) *Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance*. *Int J Parasitol* 29: 199-212.
88. Figueroa-Angulo EE, Estrella-Hernandez P, Salgado-Lugo H, Ochoa-Leyva A, Gomez Puyou A, et al. (2012) Cellular and biochemical characterization of two closely related triosephosphate isomerases from *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology* 139: 1729-1738.
89. Alderete J, Millsap, KW., Lehker, MW., and Benchimol, M. (2001) Enzymes on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry and functional diversity. *Cel Microbiol* 3: 359-370.
90. Ardalan S, Lee, BC., and Garber, GE. (2009) *Trichomonas vaginalis*: The adhesins AP51 and AP65 bind heme and hemoglobin. *Experimental Parasitology* 121: 300-306.
91. Jeffery CJ (2009) Moonlighting proteins--an update. *Mol Biosyst* 5: 345-350.
92. Rodriguez-Trelles F, Tarrío R, Ayala FJ (2003) Convergent neofunctionalization by positive Darwinian selection after ancient recurrent

- duplications of the xanthine dehydrogenase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13413-13417.
93. Arroyo R, and Alderete, J. (1989) *Trichomonas vaginalis* Surface Proteinase Activity Is Necessary for Parasite Adherence to Epithelial Cells. *Infect Immun* 57: 2991-2997.
  94. Arroyo R, and Alderete, JF. (1995) Two *Trichomonas vaginalis* surface proteinases bind to host epithelial cells and are related to levels of cytoadherence and cytotoxicity. *Arch Med Res* 26: 279-285.
  95. Mendoza-López R, Becerril-García, C., Fattel-Facenda, L., Avila-Gonzalez, L., Ruíz-Tachiquín, M., Ortega-Lopez, J., and Arroyo, R. (2000) CP30, a Cysteine Proteinase Involved in *Trichomonas vaginalis* Cytoadherence. *Infect Immun* 68: 4907-4912.
  96. Hernandez H, Sariego I, Garber G, Delgado R, Lopez O, et al. (2004) Monoclonal antibodies against a 62 kDa proteinase of *Trichomonas vaginalis* decrease parasite cytoadherence to epithelial cells and confer protection in mice. *Parasite Immunol* 26: 119-125.
  97. Rendon-Gandarilla FJ, Ramon-Luing Lde L, Ortega-Lopez J, Rosa de Andrade I, Benchimol M, et al. (2013) The TvLEGU-1, a legumain-like cysteine proteinase, plays a key role in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Biomed Res Int* 2013: 561979.
  98. Lama A, Kucknoor A, Mundodi V, Alderete JF (2009) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 77: 2703-2711.
  99. Mundodi V, Kucknoor AS, Alderete JF (2008) Immunogenic and plasminogen-binding surface-associated alpha-enolase of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 76: 523-531.
  100. Hirt RP, de Miguel N, Nakjang S, Dessi D, Liu YC, et al. (2011) *Trichomonas vaginalis* pathobiology new insights from the genome sequence. *Adv Parasitol* 77: 87-140.
  101. Noel CJ, Diaz N, Sicheritz-Ponten T, Safarikova L, Tachezy J, et al. (2010) *Trichomonas vaginalis* vast BspA-like gene family: evidence for functional diversity from structural organisation and transcriptomics. *BMC Genomics* 11: 99.
  102. Singh BN, Hayes GR, Lucas JJ, Sommer U, Viseux N, et al. (2009) Structural details and composition of *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan in relevance to the epithelial immune function. *Glycoconj J* 26: 3-17.
  103. Ryan CM, Mehlert A, Richardson JM, Ferguson MA, Johnson PJ (2011) Chemical structure of *Trichomonas vaginalis* surface lipoglycan: a role for short galactose (beta1-4/3) N-acetylglucosamine repeats in host cell interaction. *J Biol Chem* 286: 40494-40508.
  104. Ma L, Meng Q, Cheng W, Sung Y, Tang P, et al. (2011) Involvement of the GP63 protease in infection of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol Res* 109: 71-79.
  105. Lushbaugh W, Turner, AC., Gentry, GA., and Klykken, PC. (1989) Characterization of a secreted cytoactive factor from *Trichomonas vaginalis*. *Am J Trop Med Hyg* 41: 18-28.

106. Pindak F, Mora de Pindak, M., and Gardner, WA. Jr. (1993) Contact-independent cytotoxicity of *Trichomonas vaginalis*. *Genitourin Med* 69: 35-40.
107. Garber G, and Lemchuk-Favel, LT. (1990) Association of production of cell-detaching factor with the clinical presentation of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 28: 2415-2417.
108. Vargas-Villarreal J, Mata-Cárdenas, BD., Palacios-Corona, R., González-Salazar, F., Cortes-Gutierrez, El., Martínez-Rodríguez, HG., Said-Fernández, S. (2005) *Trichomonas vaginalis*: identification of soluble and membrane-associated phospholipase A1 and A2 activities with direct and indirect hemolytic effects. *J Parasitol* 91: 5-11.
109. Solano-González E, Álvarez-Sánchez, M., Ávila-González, L., Rodríguez-Vargas, V., Arroyo, R., and Ortega-López, J. (2006) Location of the cell-binding domain of CP65, a 65 kDa cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 38: 2114-2127.
110. Hernández-Gutiérrez R, Ávila-González, L., Ortega-López, J., Cruz-Talonia, F., Gómez-Gutiérrez, G., and Arroyo, R. (2004) *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Experimental Parasitology* 107: 125-135.
111. 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* 28: 193-202.
112. 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* 50: 696-698.
113. Álvarez-Sánchez M, Solano-González, E., Yañez-Gómez, C., and Arroyo, R. (2007) Negative iron regulation of the CP65 cysteine proteinase cytotoxicity in *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and Infection* 9: 1597-1605.
114. Min D, Hyun, KH., Ryu, JS., Ahn, MH., and Cho, MH. (1998) Degradation of human immunoglobulins and hemoglobin by a 60 kDa cystein proteinase of *Trichomonas vaginalis*. *The Korean Journal of Parasitology* 36: 261-268.
115. Vazquez-Carrillo LI, Quintas-Granados LI, Arroyo R, Mendoza-Hernández G, González-Robles A, et al. (2011) The effect of Zn<sup>2+</sup> on prostatic cell cytotoxicity caused by *Trichomonas vaginalis*. *JIOMICs* 1: 198-210.
116. Midlej V, Benchimol M (2010) *Trichomonas vaginalis* kills and eats--evidence for phagocytic activity as a cytopathic effect. *Parasitology* 137: 65-76.
117. Benchimol M, de Andrade Rosa I, da Silva Fontes R, Burla Dias AJ (2008) *Trichomonas* adhere and phagocytose sperm cells: adhesion seems to be a prominent stage during interaction. *Parasitol Res* 102: 597-604.
118. Pereira-Neves A, and Benchimol, M. (2007) Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biol Cell Research* article: 87-101.
119. Carlton JM, Malik SB, Sullivan SA, Sicheritz-Ponten T, Tang P, et al. (2010) The Genome of *Trichomonas vaginalis*. In: Clark CG, Johnson PJ, Adam RD, editors. *Anaerobic Parasitic Protozoa: Genomics and Molecular*

- Biology*. March 2010 ed. Los Angeles, USA: Caister Academic Press. pp. 45-80.
120. Lecker MW, Chang TH, Dailey DC, Alderete JF (1990) Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for *Trichomonas vaginalis*. *J Exp Med* 171: 2165-2170.
  121. Dailey DC, Chang TH, Alderete JF (1990) Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Parasitology* 101 Pt 2: 171-175.
  122. Krieger JN, Poisson MA, Rein MF (1983) Beta-hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* correlates with virulence. *Infect Immun* 41: 1291-1295.
  123. Fiori PL, Rappelli P, Addis MF (1999) The flagellated parasite *Trichomonas vaginalis*: new insights into cytopathogenicity mechanisms. *Microbes Infect* 1: 149-156.
  124. Arroyo R, Alderete JF (1989) *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infect Immun* 57: 2991-2997.
  125. Lubick KJ, Burgess DE (2004) Purification and analysis of a phospholipase A2-like lytic factor of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 72: 1284-1290.
  126. Alvarez-Sanchez ME, Avila-Gonzalez L, Becerril-Garcia C, Fattel-Facenda LV, Ortega-Lopez J, et al. (2000) A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microb Pathog* 28: 193-202.
  127. Carvalho SE, Freitas D, Murad AM, Franco OL, Simoes-Barbosa A (2005) *Trichomonas vaginalis*: identification of a triacylglycerol acylhydrolase. *Exp Parasitol* 111: 260-263.
  128. Arroyo R, Alderete JF (1995) Two *Trichomonas vaginalis* surface proteinases bind to host epithelial cells and are related to levels of cytoadherence and cytotoxicity. *Arch Med Res* 26: 279-285.
  129. Cardenas-Guerra RE, Arroyo R, Rosa de Andrade I, Benchimol M, Ortega-Lopez J (2013) The iron-induced cysteine proteinase TvCP4 plays a key role in *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Microbes Infect*.
  130. Hirt RP, de Miguel N, Nakjang S, Dessi D, Liu YC, et al. (2011) *Trichomonas vaginalis* pathobiology new insights from the genome sequence. *Adv Parasitol* 77: 87-140.
  131. Provenzano D, and Alderete, JF. (1995) Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 63: 3388-3395.
  132. de Miguel N, Lustig G, Twu O, Chattopadhyay A, Wohlschlegel JA, et al. (2010) Proteome analysis of the surface of *Trichomonas vaginalis* reveals novel proteins and strain-dependent differential expression. *Mol Cell Proteomics* 9: 1554-1566.
  133. Ryu J, Choi, H., Min, DY., Ha, S., and Ahn, M. (2001) Effect of Iron on the Virulence of *Trichomonas vaginalis*. *J Parasitol* 87: 457-460.
  134. Song HO, Shin MH, Ahn MH, Min DY, Kim YS, et al. (2008) *Trichomonas vaginalis*: reactive oxygen species mediates caspase-3 dependent apoptosis of human neutrophils. *Exp Parasitol* 118: 59-65.
  135. Chang JH, Kim SK, Choi IH, Lee SK, Morio T, et al. (2006) Apoptosis of macrophages induced by *Trichomonas vaginalis* through the

- phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase that locates at downstream of mitochondria-dependent caspase activation. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 638-647.
136. Arroyo R (2000) *Biología molecular de la trichomonosis. Genética y Biomedicina Molecular Edit Limusa, Noriega: 287-304.*
  137. Gonzalez-Lazaro M, Gonzalez-Robles A, Hernandez-Gutierrez R, Arroyo R (2005) HeLa cell nucleus, a source of thymidine for *Trichomonas vaginalis* growing in vitro. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 166-176.
  138. Gorrell T (1985) Effect of Culture Medium Iron Content on the Biochemical Composition and Metabolism of *Trichomonas vaginalis*. *J Bacteriol* 161: 1228-1230.
  139. Espinosa N, Hernandez R, Lopez-Griego L, Arroyo R, Lopez-Villasenor I (2001) Differences between coding and non-coding regions in the *Trichomonas vaginalis* genome: an actin gene as a locus model(1). *Acta Trop* 78: 147-154.
  140. Liston D, and Johnson, PJ. (1999) Analysis of a Ubiquitous Promoter Element in a Primitive Eukaryote: Early Evolution of the Initiator Element. *Molecular and Cellular Biology* 19: 2380-2388.
  141. Liston D, and Johnson, PJ. (1998) Gene Transcription in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Today* 14: 261-265.
  142. Liston D, Lau, AO., Ortiz, D., Smale, ST., and Johnson, PJ. (2001) Initiator Recognition in a Primitive Eukaryote: IBP39, an Initiator-Binding Protein from *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and cellular Biology* 21: 7872-7882.
  143. Lau AO, Smith AJ, Brown MT, Johnson PJ (2006) *Trichomonas vaginalis* initiator binding protein (IBP39) and RNA polymerase II large subunit carboxy terminal domain interaction. *Mol Biochem Parasitol* 150: 56-62.
  144. Torres-Machorro AL, Hernandez R, Alderete JF, Lopez-Villasenor I (2009) Comparative analyses among the *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas tenax*, and *Tritrichomonas foetus* 5S ribosomal RNA genes. *Curr Genet* 55: 199-210.
  145. Vanacova S, Yan W, Carlton JM, Johnson PJ (2005) Spliceosomal introns in the deep-branching eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4430-4435.
  146. Simoes-Barbosa A, Meloni D, Wohlschlegel JA, Konarska MM, Johnson PJ (2008) Spliceosomal snRNAs in the unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis* are structurally conserved but lack a 5'-cap structure. *RNA* 14: 1617-1631.
  147. Vanacova S, Liston DR, Tachezy J, Johnson PJ (2003) Molecular biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Int J Parasitol* 33: 235-255.
  148. Simoes-Barbosa A, Louly C, Franco OL, Rubio MA, Alfonzo JD, et al. (2008) The divergent eukaryote *Trichomonas vaginalis* has an m7G cap methyltransferase capable of a single N2 methylation. *Nucleic Acids Res* 36: 6848-6858.
  149. Espinosa N, Hernandez R, Lopez-Griego L, Lopez-Villasenor I (2002) Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in *Trichomonas vaginalis* mRNAs. *Gene* 289: 81-86.

150. Rouault T, and Klausner, R. (1997) Regulation of Iron Metabolism in Eukariotes. *Current Topics in Cellular Regulation* 35: 1-19.
151. Sanchez M, Galy, B., Dandekar, T., Bengert, P., Vainshtein, Y., Stolte, J., Muckenthaler, MU., and Hentze, MW. (2006) Iron Regulation and the Cell Cycle. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 22865-22874.
152. Pantopoulos K (2004) Iron Metabolism and the IRE/IRP Regulatory System. An Update. *Ann N Y Acad Sci* 1012: 1-13.
153. Hentze M, and Kuhn, LC. (1996) Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Acad Sci Proc Natl USA* 93: 8175-8182.
154. Hantke K (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4: 172-177.
155. Lee JW, Helmann JD (2007) Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals* 20: 485-499.
156. Hantke K (2002) Members of the Fur protein family regulate iron and zinc transport in *E. coli* and characteristics of the Fur-regulated *fhuF* protein. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4: 217-222.
157. Troxell B, Hassan HM (2013) Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* 3: 59.
158. Pantopoulos K, Gray, NK., and Hentze, W. (1995) Differential regulation of two related RNA-binding proteins, iron regulatory protein (IRP) and IRPB. *RNA* 1: 155-163.
159. Yu Y, Radskyp, E., and Leibold, EA. (1992) The Iron-responsive Element Binding Protein. Purification, Cloning, and Regulation in Rat Liver. *The Journal of Biological Biochemistry* 267: 19005-19010.
160. Volz K (2008) The functional duality of iron regulatory protein 1. *Current Opinion in Structural Biology* 18: 106-111.
161. Henderson BR, Seiser C, Kuhn LC (1993) Characterization of a second RNA-binding protein in rodents with specificity for iron-responsive elements. *J Biol Chem* 268: 27327-27334.
162. Schalinske KL, Blemings KP, Steffen DW, Chen OS, Eisenstein RS (1997) Iron regulatory protein 1 is not required for the modulation of ferritin and transferrin receptor expression by iron in a murine pro-B lymphocyte cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10681-10686.
163. Guo B, Brown FM, Phillips JD, Yu Y, Leibold EA (1995) Characterization and expression of iron regulatory protein 2 (IRP2). Presence of multiple IRP2 transcripts regulated by intracellular iron levels. *J Biol Chem* 270: 16529-16535.
164. Rouault TA, Tang, CK., Kaptain, S., Burgess, WH., Haile, DJ., Samaniego, F., McBride, OW., Harford, JB., and Klausner, RD. (1990) Cloning of the cDNA encoding an RNA regulatory protein-the human iron-responsive element-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7958-7962.
165. Samaniego F, Chin, J., Iwai, K., Rouault, TA., and Klausner, RD. (1994) Molecular characterization of a second iron-responsive element binding protein, iron-regulatory protein 2. Structure, function, and post-translational regulation. *J Biol Chem* Vol. 269: 30904-30910.

166. Frishman D, and Hentze, W. (1996) Conservation of aconitase residues revealed by multiple sequence analysis. Implications for structure/function relationships. *Eur J Biochem* 239: 197-200.
167. Wallander M, Leibold, EA., and Eisenstein, RS. (2006) Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763: 668-689.
168. Klausner R, and Rouault, TA. (1993) A double life: cytosolic aconitase as a regulatory RNA binding protein. *Mol Biol Cell* 4: 1-5.
169. Wang J, Fillebeen, C., Chen, G., Biederbick, A., Lill, R., and Pantopoulos, K. (2007) Iron-Dependent Degradation of Apo-IRP1 by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Molecular and Cellular Biology* 27: 2423-2430.
170. Rouault T (2006) The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nature Chemical Biology* 2: 406-414.
171. Iwai K, Klausner, D., and Rouault, TA. (1995) Requirements for iron-regulated degradation of the RNA binding protein, iron regulatory protein 2. *The EMBO Journal* 14: 5350-5357.
172. Andersen O, Pantopoulos, K., Kao, H-T., Muckenthaler, M., Youson, JH., and Pieribone, V. (1998) Regulation of iron metabolism in the sanguivore lamprey *Lampetra fluviatilis* Molecular cloning of two ferritin subunits and two iron-regulatory proteins (IRP) reveals evolutionary conservation of the iron-regulatory element (IRE)/IRP regulatory system. *Eur J Biochem* 254: 223-229.
173. Muckenthaler M, Gunkel, N., Frishman, D., Cyrkjaff, A., Tomancak, P., and Hentze, MW. (1998) Iron-regulatory protein-1 (IRP-1) is highly conserved in two invertebrate species Characterization of IRP-1 homologues in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Eur J Biochem* 254: 230-237.
174. Tang Y, and Guest, JR. (1999) Direct evidence for mRNA binding and post-transcriptional regulation by *Escherichia coli* aconitases. *Microbiology* 145: 3069-3079.
175. Rothenberger S, Müllner, EW., and Kühn, LC. (1990) The mRNA binding protein which controls ferritin and transferrin receptor expression is conserved during evolution. *Nucl Acids Res* 18: 1175-1179.
176. Loyevsky M, LaVaute, T., Allerson, ChR., Stearman, R., Kassim, OO., Cooperman, S., Gordeuk, VR., and Rouault, TA. (2001) An IRP-like protein from *Plasmodium falciparum* binds to a mammalian iron-responsive element. *Blood* 98: 2555-2562.
177. Loyevsky M, Mompoin, F., Yikilmaz, E., Altschul, SF., Madden, T., Wootton, JC., Kurantsin-Mills, J., Kassim, OO., Gordeuk, VR., and Rouault, TA. (2003) Expression of a recombinant IRP-like *Plasmodium falciparum* protein that specifically binds putative plasmodial IREs. *Molecular & Biochemical Parasitology* 126: 231-238.
178. Saas J, Ziegelbauer, K., von-Haeseler, A., Fast, B., and Boshart, M. (2000) A Developmentally Regulated Aconitase Related to Iron-regulatory Protein-1 Is Localized in the Cytoplasm and in the Mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 275: 2745-2755.

179. Meehan H, Lundberg, RA., and Conell, GJ. (2000) A trypanosomatid protein specifically interacts with mammalian iron-responsive element. *Parasitol Res* 86: 109-114.
180. Zhang D, Dimopoulos, G., Wolf, A., Miñana, B., Kafatos, FC., and Winzerling, JJ. (2002) Cloning and molecular characterization of two mosquito iron regulatory proteins. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 579-589.
181. Gail M, Gross, U., and Bohne, W. (2004) Transferrin receptor induction in *Toxoplasma gondii*-infected HFF is associated with increased iron-responsive protein 1 activity and is mediated by secreted factors. *Parasitol Res* 94: 233-239.
182. Alén C, and Sonenshein, AL. (1999) *Bacillus subtilis* aconitase is an RNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10412-10417.
183. Dingman D, and Sonenshein, AL. (1987) Purification of Aconitase from *Bacillus subtilis* and Correlation of Its N-Terminal Amino Acid Sequence with the Sequence of the *citB* Gene. *Journal of Bacteriology* 169: 3062-3067.
184. Henderson B, Menotti, E., Bonnard, C., and Kuhn, LC. (1994) Optimal Sequence and Structure of Iron-responsive Elements. Selection of RNA Stem-Loops with High Affinity for Iron Regulatory Factor. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 17481-17489.
185. Address KJ, Basilion JP, Klausner RD, Rouault TA, Pardi A (1997) Structure and dynamics of the iron responsive element RNA: implications for binding of the RNA by iron regulatory binding proteins. *J Mol Biol* 274: 72-83.
186. Kohler S, Henderson, BR., and Kühn, LC. (1995) Succinate Dehydrogenase *b* mRNA of *Drosophila melanogaster* Has a Functional Iron-responsive Element in Its 5'-Untranslated Region. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 30781-30786.
187. Piccinelli P, and Samuelsson, T. (2007) Evolution of the iron-responsive element. *RNA Bioinformatics* 13: 952-966.
188. Gray N, Pantopoulos, K., Dandekar, T., Ackrell, BA., and Hentze, MW. (1996) Translational regulation of mammalian and *Drosophila* citric acid cycle enzymes via iron-responsive elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4925-4930.
189. Aisen P, Enns, C., and Wessling-Resnick, M. (2001) Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 33: 940-959.
190. Leipuviene R, Theil EC (2007) The family of iron responsive RNA structures regulated by changes in cellular iron and oxygen. *Cell Mol Life Sci* 64: 2945-2955.
191. Erlitzki R, Long JC, Theil EC (2002) Multiple, conserved iron-responsive elements in the 3'-untranslated region of transferrin receptor mRNA enhance binding of iron regulatory protein 2. *J Biol Chem* 277: 42579-42587.
192. Sierzputowska-Gracz H, Theil EC (1995) <sup>15</sup>N NMR and CD studies of the IRE (iron regulatory element in ferritin mRNA with single base substitution in the hairpin loop. *Nucleic Acids Symp Ser*: 203-206.

193. Butt J, Kim HY, Basilion JP, Cohen S, Iwai K, et al. (1996) Differences in the RNA binding sites of iron regulatory proteins and potential target diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 4345-4349.
194. Lin E, Graziano JH, Freyer GA (2001) Regulation of the 75-kDa subunit of mitochondrial complex I by iron. *J Biol Chem* 276: 27685-27692.
195. Kohler SA, Menotti E, Kuhn LC (1999) Molecular cloning of mouse glycolate oxidase. High evolutionary conservation and presence of an iron-responsive element-like sequence in the mRNA. *J Biol Chem* 274: 2401-2407.
196. Huang TS, Melefors O, Lind MI, Soderhall K (1999) An atypical iron-responsive element (IRE) within crayfish ferritin mRNA and an iron regulatory protein 1 (IRP1)-like protein from crayfish hepatopancreas. *Insect Biochem Mol Biol* 29: 1-9.
197. Rogers JT, Randall JD, Cahill CM, Eder PS, Huang X, et al. (2002) An iron-responsive element type II in the 5'-untranslated region of the Alzheimer's amyloid precursor protein transcript. *J Biol Chem* 277: 45518-45528.
198. dos Santos CO, Dore LC, Valentine E, Shelat SG, Hardison RC, et al. (2008) An iron responsive element-like stem-loop regulates alpha-hemoglobin-stabilizing protein mRNA. *J Biol Chem* 283: 26956-26964.
199. Dandekar T, Beyer K, Bork P, Kenealy MR, Pantopoulos K, et al. (1998) Systematic genomic screening and analysis of mRNA in untranslated regions and mRNA precursors: combining experimental and computational approaches. *Bioinformatics* 14: 271-278.
200. Banerjee S, Nandyala AK, Raviprasad P, Ahmed N, Hasnain SE (2007) Iron-dependent RNA-binding activity of *Mycobacterium tuberculosis* aconitase. *J Bacteriol* 189: 4046-4052.
201. Carvalho SE, Freitas D, Murad AM, Franco OL, Simoes-Barbosa A (2005) *Trichomonas vaginalis*: identification of a triacylglycerol acylhydrolase. *Exp Parasitol* 111: 260-263.
202. De Jesus J, Ferreira, MA., Cuervo, P., Britto, C., Costa e Silva-Filho, F., Meyer-Fernandes, JR. (2006) Iron modulates ecto-phosphohydrolase activities in pathogenic trichomonads. *Parasitol Int* 55: 285-290.
203. Mundodi VK, AS.; Chang, TH., and Alderete, JF. (2006) A novel surface protein of *Trichomonas vaginalis* is regulated independently by low iron and contact with vaginal epithelial cells. *BMC Microbiology* 6: 1-12.
204. Crouch M-L, and Alderete, JF. (2001) *Trichomonas vaginalis* Has Two Fibronectin-Like Iron-Regulated Genes. *Archives of Medical Research* 32: 102-107.
205. León-Sicairos C, León-Félix, J., and Arroyo, R. (2004) tvcp12: a novel *Trichomonas vaginalis* cathepsin L-like cysteine proteinase-encoding gene. *Microbiology* 150: 1131-1138.
206. Torres-Romero J-C (2007) Identificación de proteínas tipo IRP de *Trichomonas vaginalis*. Tesis de Maestría Patología Experimental CINVESTAV-IPN: 1-91.
207. Ramon-Luing LA, Rendon-Gandarilla FJ, Cardenas-Guerra RE, Rodriguez-Cabrera NA, Ortega-Lopez J, et al. (2010) Immunoproteomics of the active

- degradome to identify biomarkers for *Trichomonas vaginalis*. *Proteomics* 10: 435-444.
208. Álvarez-Sánchez M, Carvajal-Gamez, Bl., Solano-Gonzalez, E., Martinez-Benitez, M., Garcia, 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. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 2442-2451.
  209. Alderete J (1999) The *Trichomonas vaginalis* phenotypically varying P270 immunogen is highly conserved except for numbers of repeated elements. *Microbial Pathogenesis* 27: 93-104.
  210. Peterson K, and Alderete, JF. (1984) Iron uptake and increased intracellular enzyme activity follow host lactoferrin binding by *Trichomonas vaginalis* receptors. *J Exp Med* 160: 398-410.
  211. Lehker M, and Alderete, JF. (1992) Iron regulates growth of *Trichomonas vaginalis* and the expression of immunogenic trichomonad proteins. *Mol Microbiol* 6: 123-132.
  212. Alderete J, Nguyen, J., Mundodi, V., and Lehker, MW. (2004) Heme-iron increases levels of AP65-mediated adherence by *Trichomonas vaginalis*. *Microbial Pathogenesis* 36: 263-271.
  213. Tsai C, Liu, HW., and Tai, JH. (2002) Characterization of an Iron-responsive Promoter in the Protozoan Pathogen *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 5153-5162.
  214. Ong SJ, Huang SC, Liu HW, Tai JH (2004) Involvement of multiple DNA elements in iron-inducible transcription of the ap65-1 gene in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol* 52: 1721-1730.
  215. Ong SJ, Hsu HM, Liu HW, Chu CH, Tai JH (2006) Multifarious transcriptional regulation of adhesion protein gene ap65-1 by a novel Myb1 protein in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell* 5: 391-399.
  216. Ong SJ, Hsu HM, Liu HW, Chu CH, Tai JH (2007) Activation of multifarious transcription of an adhesion protein ap65-1 gene by a novel Myb2 protein in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *J Biol Chem* 282: 6716-6725.
  217. Hsu HM, Ong SJ, Lee MC, Tai JH (2009) Transcriptional regulation of an iron-inducible gene by differential and alternate promoter entries of multiple Myb proteins in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell* 8: 362-372.
  218. Solano-González E, Burrola-Barraza, E., León-Sicairos, C., Avila-González, L., Gutiérrez-Escolano, L., Ortega-López, J., and Arroyo, R. (2007) The trichomonad cysteine proteinase TVCP4 transcript contains an iron-responsive element. *FEBS Letters* 581: 2919-2928.
  219. León-Sicairos C (2007) Caracterización de la cisteín proteinasa TVCP12 de *Trichomonas vaginalis*. Tesis de Doctorado - Patología Experimental CINVESTAV-IPN.
  220. Burrola-Barraza M (2001) ¿Existen proteínas tipo IRPs en *Trichomonas vaginalis*? Tesis de Maestría - Patología Experimental CINVESTAV-IPN.

221. Kim YS, Song HO, Choi IH, Park SJ, Ryu JS (2006) Hydrogenosomal activity of *Trichomonas vaginalis* cultivated under different iron conditions. *Korean J Parasitol* 44: 373-378.
222. Muller M (1992) Energy metabolism of ancestral eukaryotes: a hypothesis based on the biochemistry of amitochondriate parasitic protists. *Biosystems* 28: 33-40.
223. Torres-Romero JC (2010) Análisis de estructuras IRE y caracterización de una de las proteínas tipo IRP de *Trichomonas vaginalis*. Tesis de Doctorado Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular CINVESTAV-IPN: 1-151.
224. Diamond L (1957) The Establishment of Various *Trichomonads* of Animals and Man in Axenic Cultures *The Journal of Parasitology* 3: 488-490.
225. Popovic Z, and Templeton, DM. (2005) A Northwestern blotting approach for studying iron regulatory element-binding proteins. *Molecular and Cellular Biochemistry* 268: 67-74.
226. Letunic I, Doerks T, Bork P (2011) SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.*
227. Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5857-5864.
228. Sigrist CJA, Cerutti L, de Castro E, Langendijk-Genevaux PS, Bulliard V, et al. (2010) PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Res* 38: D161-D166.
229. Sigrist CJ, de Castro E, Cerutti L, Cucho BA, Hulo N, et al. (2013) New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res* 41: D344-347.
230. Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523.
231. Salinovich O, Montelaro RC (1986) Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 156: 341-347.
232. Gutierrez-Escolano AL, Vazquez-Ochoa M, Escobar-Herrera J, Hernandez-Acosta J (2003) La, PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 311: 759-766.
233. Leibold EA, Munro HN (1988) Cytoplasmic protein binds in vitro to a highly conserved sequence in the 5' untranslated region of ferritin heavy- and light-subunit mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 2171-2175.
234. Zhao SL, Liang CY, Zhang WJ, Tang XC, Peng HY (2006) Mapping the RNA-binding domain on the DpCPV VP4. *Arch Virol* 151: 273-283.
235. Grant B, Greenwald I (1996) The *Caenorhabditis elegans* sel-1 gene, a negative regulator of lin-12 and glp-1, encodes a predicted extracellular protein. *Genetics* 143: 237-247.
236. Davletov BA, Sudhof TC (1993) A single C2 domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity Ca<sup>2+</sup>/phospholipid binding. *J Biol Chem* 268: 26386-26390.

237. Smith AJ, Chudnovsky L, Simoes-Barbosa A, Delgadillo-Correa MG, Jonsson ZO, et al. (2011) Novel core promoter elements and a cognate transcription factor in the divergent unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Mol Cell Biol* 31: 1444-1458.
238. Liston DR, Johnson PJ (1999) Analysis of a ubiquitous promoter element in a primitive eukaryote: early evolution of the initiator element. *Mol Cell Biol* 19: 2380-2388.
239. Dallas PB, Pacchione S, Wilsker D, Bowrin V, Kobayashi R, et al. (2000) The human SWI-SNF complex protein p270 is an ARID family member with non-sequence-specific DNA binding activity. *Mol Cell Biol* 20: 3137-3146.
240. Dou X, Limmer S, Kreutzer R (2001) DNA-binding of phenylalanyl-tRNA synthetase is accompanied by loop formation of the double-stranded DNA. *J Mol Biol* 305: 451-458.
241. Kenan DJ, Keene JD (2004) La gets its wings. *Nat Struct Mol Biol* 11: 303-305.
242. Edwards TA, Pyle SE, Wharton RP, Aggarwal AK (2001) Structure of Pumilio reveals similarity between RNA and peptide binding motifs. *Cell* 105: 281-289.
243. Glisovic T, Bachorik JL, Yong J, Dreyfuss G (2008) RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett* 582: 1977-1986.
244. Lunde BM, Moore C, Varani G (2007) RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 479-490.
245. Garcia-Mayoral MF, Hollingworth D, Masino L, Diaz-Moreno I, Kelly G, et al. (2007) The structure of the C-terminal KH domains of KSRP reveals a noncanonical motif important for mRNA degradation. *Structure* 15: 485-498.
246. Torres-Romero JC, Arroyo R (2009) Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE/IRP-like system. *Infect Genet Evol* 9: 1065-1074.
247. Kucknoor A, Mundodi V, and Alderete, JF. (2005) Adherence to Human Vaginal Epithelial Cells Signals for Increased Expression of *Trichomonas vaginalis* Genes. *Infect Immun* 73: 6472-6478.
248. Horvathova L, Safarikova L, Basler M, Hrdy I, Campo NB, et al. (2012) Transcriptomic identification of iron-regulated and iron-independent gene copies within the heavily duplicated *Trichomonas vaginalis* genome. *Genome Biol Evol* 4: 1017-1029.
249. Kucknoor AS, Mundodi V, Alderete JF (2005) Adherence to human vaginal epithelial cells signals for increased expression of *Trichomonas vaginalis* genes. *Infect Immun* 73: 6472-6478.
250. Hellman LM, Fried MG (2007) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc* 2: 1849-1861.
251. Meyer RK, Aebi U (1990) Bundling of actin filaments by alpha-actinin depends on its molecular length. *J Cell Biol* 110: 2013-2024.
252. Dixson JD, Forstner MJ, Garcia DM (2003) The alpha-actinin gene family: a revised classification. *J Mol Evol* 56: 1-10.
253. Sjoblom B, Salmazo A, Djinovic-Carugo K (2008) Alpha-actinin structure and regulation. *Cell Mol Life Sci* 65: 2688-2701.

254. Jansen RP (1999) RNA-cytoskeletal associations. *FASEB J* 13: 455-466.
255. Vedeler A, Hollas H, Grindheim AK, Raddum AM (2012) Multiple roles of annexin A2 in post-transcriptional regulation of gene expression. *Curr Protein Pept Sci* 13: 401-412.
256. MacDonald PM (1990) bicoid mRNA localization signal: phylogenetic conservation of function and RNA secondary structure. *Development* 110: 161-171.
257. Ross AF, Oleynikov Y, Kislauskis EH, Taneja KL, Singer RH (1997) Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol Cell Biol* 17: 2158-2165.
258. Cuellar-Silva P-A (2011) Participación de la cisteína proteinasa TvCP12 en la virulencia de *Trichomonas vaginalis*. Tesis de Maestría Infectómica y Patogénesis Molecular CINVESTAV-IPN: 1-114.
259. Figueroa-Angulo EE, Rendon-Gandarilla FJ, Puente-Rivera J, Calla-Choque JS, Cardenas-Guerra RE, et al. (2012) The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect* 14: 1411-1427.

## 14. APÉNDICE.

### **MEDIO TYM PARA CULTIVO DE *T. vaginalis*.**

<i>Triptona</i>	10 g
<i>Extracto de levadura</i>	5 g
<i>Maltosa</i>	2.5 g
<i>Cisteína</i>	0.5 g
<i>Ácido ascórbico</i>	0.1 g
$K_2HPO_4$	0.4 g
$KH_2PO_4$	0.4 g
$H_2O$ bidestilada	500 ml

#### *Preparación:*

1. *Disolver todos los ingredientes en 400 ml de agua bidestilada y ajustar el pH a 6.2, con NaOH 1 N ó HCl 1 N.*
2. *Llevar a un volumen final de 500 ml.*
3. *Filtrar a través de papel Whatman no. 1.*
4. *Esterilizar por autoclave a 120 libras de presión durante 15 min.*
5. *Someter a prueba de esterilidad, 2 días a 37 °C.*
6. *Guardar a -20 °C hasta su uso.*

### **SOLUCIÓN STOCK DE SULFATO FERROSO AMONIACAL 25 mM.**

*Pesar 0.098 g de sulfato ferroso. Disolver en 10 ml de ácido sulfosalicílico 50 mM (0.127 gr de ácido sulfosalicílico en 10 ml de agua destilada). Esterilizar por autoclave (120 libras de presión/20 min) y almacenar a 4 °C, protegido de la luz.*

*Nota: No utilizar después de 1 semana de su preparación.*

## **SOLUCIÓN 2, 2 DIPIRILLO 15 mM.**

*Pesar 0.02343 g de 2,2 dipirilo. Disolver en 10 ml de agua destilada, esterilizar por filtración en membrana de 0.22  $\mu$ m y almacenar a 4 °C, protegido de la luz.*

*Nota: No utilizar después de 1 semana de su preparación.*

## **SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATO SALINO (PBS) pH 7.0**

	<b>1x</b>	<b>5x</b>	<b>10x</b>	<b>[1x]</b>
	<i>g</i>	<i>g</i>	<i>g</i>	
<i>NaCl (Merck)</i>	<i>8</i>	<i>40</i>	<i>80</i>	<i>137 mM</i>
<i>KCl</i>	<i>0.2</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>2.7 mM</i>
<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)</i>	<i>1.419</i>	<i>7.09</i>	<i>14.19</i>	<i>10 mM</i>
<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)</i>	<i>0.27</i>	<i>1.35</i>	<i>2.7</i>	<i>2 mM</i>

*Mezclar todos los ingredientes en 800 ml de agua destilada. Una vez disuelto, ajustar el pH a 7.0 y aforar a un litro. Esterilizar por autoclave y almacenar a temperatura ambiente o a 4 °C (frío).*

## **SOLUCIONES PARA PROTEÍNAS:**

### **ACRILAMIDA AL 30% /BISACRILAMIDA AL 0.8%:**

<i>Acilamida</i>	<i>29.2 g</i>
<i>Bisacrilamida</i>	<i>0.8 g</i>

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

*Filtrar a través de papel filtro "Whatman" no. 1.*

*Almacenar a 4 °C hasta 1 mes, previamente protegido de la luz.*

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

Trizma-base	9.08 g
SDS	0.2 g

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

*Aforar a un volumen final de 50 ml con agua destilada.*

*Filtrar la solución a través de un filtro de 0.45 µm.*

*Almacenar a 4 °C.*

**Tris-Cl/SDS 4x, pH 6.8 (0.5 M Tris-Cl, 0.4% SDS):**

Trizma-base	3.025 g
SDS	0.2 g

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

*Aforar a un volumen final de 50 ml con agua destilada.*

*Filtrar la solución a través de un filtro de 0.45 µm.*

*Almacenar a 4 °C.*

**PERSULFATO DE AMONIO AL 10%:**

*Disolver 10 mg (0.01 gr) de Persulfato de amonio en 1 ml de agua destilada.*

*Nota: Almacenar en alícuotas hasta 2 semanas a -20 °C*

**SDS-amortiguador 2x:**

Trizma-base (125 mM)	1.52 g
SDS (2%)	2 g

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

Glicerol (20%)	20 ml
Agua destilada (aforar a 100 ml)	

**AMORTIGUADOR DE MUESTRA 1x (AM 1x):**

<i>SDS-amortiguador 2x</i>	<i>500 µl</i>
<i>β-mercaptoetanol (5%)</i>	<i>50 µl</i>
<i>Azul de bromofenol (stock 10 mg/ml)</i>	<i>50 µl</i>
<i>Agua desionizada</i>	<i>400 µl</i>

**AMORTIGUADOR DE MUESTRA 2x (AM 2x):**

<i>SDS-amortiguador 2x</i>	<i>900 µl</i>
<i>β-mercaptoetanol (5%)</i>	<i>50 µl</i>
<i>Azul de bromofenol (stock 10 mg/ml)</i>	<i>50 µl</i>

**SOLUCIÓN COLORANTE DE PROTEÍNAS (AZUL BRILLANTE DE COOMASSIE R-250):**

	<i>0.05%</i>	<i>0.2%</i>
	<i>(Normal)</i>	<i>(Fuerte)</i>
<i>Metanol</i>		
<i>Ácido Acético glacial</i>	<i>500 ml</i>	<i>500 ml</i>
<i>Agua destilada</i>	<i>100 ml</i>	<i>100 ml</i>
<i>Azul Brillante de</i>	<i>400 ml</i>	<i>400 ml</i>
<i>Coomassie</i>	<i>0.5 g</i>	<i>2 g</i>

*Tapar perfectamente el matraz y disolver toda la noche. Filtrar con papel "Whatman" No. 1 y proteger de la luz.*

## SOLUCIÓN DECOLORANTE DE GELES DE POLIACRILAMIDA:

	Normal	Fuerte
<i>Metanol</i>	<i>165 ml</i>	<i>500 ml</i>
<i>Ácido acético glacial</i>	<i>50 ml</i>	<i>125 ml</i>
<i>Agua destilada</i>	<i>785 ml</i>	<i>625 ml</i>

*Tapar perfectamente el matraz y disolver.*

*Nota: Almacenar a temperatura ambiente.*

## AMORTIGUADOR DE CORRIDA 10X

*Trizma-base 25 mM*      *302 g*

*Glicina 192 mM*      *144.1 g*

*SDS 0.1%*      *100 g*

*Aforar a 1000 ml con agua bidestilada.*

## AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA:

*Trizma-base 25 mM*      *3.028 g*

*Glicina 192 mM*      *14.41 g*

*Metanol 20%*      *200 ml*

*Disolver primeramente el trizma y la glicina. Una vez disuelto agregar el metanol y finalmente, aforar a 1 l con agua destilada. Enfriar a 4 °C, hasta su uso.*

*Nota: No es necesario ajustar el pH.*

### **GEL DESNATURALIZANTE PARA RNA:**

<i>MOPS 10x</i>	<i>3 ml</i>
<i>Agua-DEPC</i>	<i>22.35 ml</i>
<i>Agarosa</i>	<i>0.3 g</i>

*Fundir y dejar enfriar un poco. Añadir 4.6 5ml de formaldehido al 37%.*

*Nota: Se usa MOPS 1x como amortiguador de corrida.*

### **MOPS 10x:**

*Para preparar 800 ml de agua-DEPC agregar:*

*41.8 g de MOPS, ajustar pH a 7.0*

*16.6 ml de acetato de sodio 3M, pH 7.2.*

*20 ml de EDTA 0.5 M, pH 8.0*

*Esterilizar por filtro de 0.22  $\mu$ m.*

### **AMORTIGUADOR TRIS-SALINO (TBS 1x, pH 7.5):**

*Tris 20 mM*                      *2.42 g*

*NaCl 150 mM*                    *29.22 g*

*Disolver en 800 ml de agua bidestilada, ajustar el pH a 7.5 y aforar a 1000 ml.*

*Almacenar a temperatura ambiente.*

## REVELADO POR COLOR (HRP)

Solución A		Solución B	
<b>HRP</b>	<b>Metanol</b>	<b>TBS</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>
<b>60 mg</b>	<i>20 ml</i>	<i>100 ml</i>	<i>60 µl</i>
<b>30 mg</b>	<i>10 ml</i>	<i>50 ml</i>	<i>30 µl</i>
<b>15 mg</b>	<i>5 ml</i>	<i>25 ml</i>	<i>15 µl</i>
<b>7.5 mg</b>	<i>2.5 ml</i>	<i>12.5 ml</i>	<i>7.5 µl</i>

*Mezclar la solución A y B por separado y finalmente ambas soluciones por agitación suave.*

*Nota, la mezcla se prepara en el momento de revelado. La reacción se detiene con lavados de agua bidestilada.*

## MEDIOS CULTIVOS PARA BACTERIAS

### MEDIO LURIA BERTANI (LB):

*Cloruro de sodio (1%)                      10 g*

*Triptona (1%)                                10 g*

*Extracto de levadura (0.5%)            5 g*

*Ajustar el pH a 7.0 (con NaOH) y aforar a 1 l con agua bidestilada. Esterilizar en autoclave y agregar ampicilina esterilizada por filtración a una concentración de 100 mg/ml.*

### LB/AGAR:

*Agregar 1.5 g de agar por cada 100 ml de medio LB*

### MEDIO "TERRIFIC BROTH" (TB):

*Bactotriptona (1.2%)                      12 g*

<i>Extracto de levadura (1.2%)</i>	<i>24 g</i>
<i>Glicerol (0.4%)</i>	<i>4 ml</i>
<i>Aforar a 900 ml con agua bidestilada</i>	
<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (17 mM)</i>	<i>2.314 g</i>
<i>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O (72 mM)</i>	<i>16.43 g</i>

*Aforar a 100 ml con agua bidestilada.*

*Esterilizar por separado en autoclave y hacer la mezcla en un matraz estéril antes de su uso.*

## **PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO**

### **SOLUCIÓN I:**

*Glucosa 50 mM*  
*Tris-Cl 25 mM, pH 8.0*  
*EDTA 10 mM, pH 8.0*  
*Esterilizar en autoclave*

### **SOLUCIÓN II:**

*NaOH 0.2 N*  
*SDS 1%*  
*Usar recién preparada y sin esterilizar.*

### **SOLUCIÓN III:**

<i>Acetato de sodio 5M</i>	<i>60 ml</i>
<i>Ácido acético glacial</i>	<i>11.5 ml para ajustar pH a 5.2</i>
<i>Agua bidestilada</i>	<i>28.5 ml</i>
<i>Volumen total</i>	<i>100 ml</i>

*Esterilizar en autoclave.*

### **TBE 10 x (Amortiguador de electroforesis):**

*Trizma base* 108 g

*Acido bórico* 55 g

*EDTA (0.5 M, pH 8.0)* 40 ml

*Aforar a 1000 ml con agua bidestilada y se esteriliza.*

*Nota: Aforar a 1000 ml con agua-DEPC y se esteriliza (para trabajar con RNA).*

### **Agua-DEPC al 0.1%:**

*Adicionar 1 ml de dietil pirocarbonato (Sigma) por cada 1000 ml de agua bidestilada, dejar en agitación durante toda la noche. Esterilizar por autoclave y almacenar a temperatura ambiente o 4 °C.*

### **AMORTIGUADOR DE LISIS A**

*Hepes 10 mM pH 7.5*

*MgCl<sub>2</sub> 3 mM*

*KCl 40 mM*

*Preparar con agua-DEPC y almacenar a 4 °C.*

### **AMORTIGUADOR AE**

*Hepes 10 mM pH 7.5* 1.191 g

*MgCl<sub>2</sub> 3 mM* 0.304 g

*KCl 40 mM* 1.491 g

*DTT 0.5 mM* 0.0771 g

*NP-40 0.5%*

*Glicerol 5%*

*Preparar con agua-DEPC y almacenar a 4 °C. NOTA: es preferente disolver los inhibidores de proteasas (TLCK y Leupeptin) directamente en el amortiguador.*

### **AMORTIGUADOR E**

*Tris-HCl 10 mM pH 7.5*                      0.121 g

*NaCl 50 mM*                                      0.29 g

*Aforar a 100 ml con agua-DEPC y almacenar a 4 °C.*

*Nota: Amortiguador utilizado en los ensayos de NWB.*

### **AMORTIGUADOR STMT**

*Tris-HCl 10 mM pH 7.5*                      1.211 g

*NaCl 1 M*                                         5.8 g

*MgCl<sub>2</sub> 2 mM*                                    0.040 g

*Tritón X-100 0.05%*                         50 µl

*Preparar con agua-DEPC y almacenar a 4 °C.*

### **AMORTIGUADOR TBE 10X**

*Trizma base*                                    108 g

*Acido bórico*                                 55 g

*EDTA (0.5 M, pH 8.0)*                      40 ml

*Aforar a 1000 ml con agua bidestilada y se esteriliza.*

## SOLUCIONES PARA ENSAYOS DE RETARDO Y ENTRECruzAMIENTO.

### GEL DE RETARDO:

*En un matraz estéril se añaden:*

<i>Acrilamida-bisacrilamida 80:1</i>	<i>22.5 ml</i>
<i>TBE 5x</i>	<i>6 ml</i>
<i>Agua bidestilada estéril</i>	<i>31.25 ml</i>

*Mezclar y añadir 300 µl de persulfato de amonio al 10% y 90 µl de TEMED.*

*Realizar la electroforesis en amortiguador TBE 0.5x a 20 mA*

*Nota: 20 mA por cada gel.*

### ACRILAMIDA 80:1

<i>Acrilamida</i>	<i>16 g</i>
<i>Bisacrilamida</i>	<i>0.2 g</i>

*Aforar a 100 ml con agua-DEPC.*

### AMORTIGUADOR DE ENTRECruzAMIENTO 5X (BB5XC)

		<i>[CF]</i>
<i>Hepes, pH 7.5, 1 M</i>	<i>25 µl</i>	<i>50 mM</i>
<i>MgCl<sub>2</sub> 1M</i>	<i>40 µl</i>	<i>80 mM</i>
<i>DTT 0.1 M</i>	<i>5 µl</i>	<i>100 µM</i>
<i>KCl 3M</i>	<i>11.7 µl</i>	<i>70.2 µM</i>
<i>Glicerol</i>	<i>100 µl</i>	
<i>Agua-DEPC (c.b.p.).</i>	<i>500 µl</i>	

*Nota: Amortiguador utilizado en los ensayos de entrecruzamiento con luz UV.*

## **15. ANEXOS.**

### **15.1. Artículos.**