



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

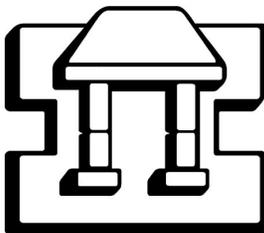
---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL TERCER GEN DE LA  
Piruvato-ferredoxín oxido reductasa (PFOR A) DE  
*Trichomonas vaginalis*”

TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
BIÓLOGA  
PRESENTA  
PATRICIA MEZA CERVANTEZ



Directora de Tesis:  
Dra. Rossana Arroyo Verástegui  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

Los Reyes Iztacala Edo. de Méx.

Febrero 2005



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el laboratorio 11, del Departamento de Patología Experimental del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN).

## AGRADECIMIENTOS

A LA DRA. ROSSANA ARROYO V:

Por la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo y por la paciencia que tuvo hacia mi. Gracias por guiar este trabajo con el que culmino una etapa muy importante en mi vida.

A LETY (Leticia Ávila González):

Por los grandes consejos y los regaños que me dieron la oportunidad de crecer como persona.

A LA DRA. ELIZBETH ÁLVAREZ:

Por su asesoría en la realización de este proyecto.

A LOS GRANDES AMIGOS Y MAESTROS:

Gracias a Verónica, Josefina, Rodolfo e Iza por que además de haber sido mis maestros se convirtieron en grandes amigos. Sin olvidar a un nuevo amigo, Gerardo.

A CLAUDIA Y EDUARDO:

Gracias a ustedes que estuvieron conmigo a lo largo de este trabajo, son de las personas que contribuyeron de manera directa en él.

Gracias por ayudarme a superar obstáculos y por celebrar conmigo los buenos momentos.

*A todas aquellas personas que colaboraron en la realización de este trabajo ya sea moral y académicamente aunque no se mencionan.*

## AGRADECIMIENTOS

### *A MIS PAPÁS*

#### *ESTELA Y CARLOS:*

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

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

#### *A GRIS, CARLOS y RICARDO:*

Gracias por apoyarme en todo momento, los quiero mucho.

### *A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS*

#### *MONSE, SANDRA, MARIANA, LOLA, DIEGO y RICARDO:*

Gracias por su amistad, por los buenos momentos y por dejarme ser parte de su vida.

#### *ANA LILIA, MARICELA y EVELYN:*

Aunque vivimos buenos momentos durante poco tiempo siempre han sido mis amigas.

## AGRADECIMIENTOS

### A MIS HERMANAS

*HILDA, RAQUEL, MARALY Y LILIANA:*

Gracias por haberme ayudado a superar algunas etapas de mi vida, por compartirme sus secretos y por su paciencia. Siempre serán mis amigas, aunque cada una ya estemos experimentando diferentes situaciones, sabemos que nos tenemos unas a las otras.

### A MIS GRANDES AMIGOS

*ERICK, ANGEL, FRANCISCO, ALEJANDRO, MARY, CESAR Y ERICK (P):*

Gracias por ser mis amigos, los que siempre he tenido cerca, los que me recuerdan que vale la pena seguir creyendo en las personas.

A las personas que estuvieron conmigo en varias etapas de mi vida, que me han visto crecer y que se han quedado o que han tomado caminos distintos al mío, por las buenas y malas experiencias.

“Esta tesis la dedico a una persona muy especial, que ya no está conmigo y que colaboró en una parte de este trabajo de manera directa, en algún momento fue un gran apoyo..... “

**¡GRACIAS A LA VIDA POR PERMITIRME LLEGAR A ESTE  
MOMENTO!**

## ABREVIATURAS

AP	Proteína adhesina
ATP	Adenosín trifosfato
CNCD	Centro Nacional de Clínicas de Displasias del Hospital General
CoA	Coenzima A
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfatos
FD	Ferredoxina
Hyd	Hidrogenasa
kDa	Kilodaltones
μg	Microgramo
min	Minutos
μl	Microlitro
ml	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PDH	Piruvato deshidrogenasa
Pfo3.4s	Gen <i>pfor a</i> (después de la metionina –antes del codón de paro)
PFOR	Piruvato ferredoxín oxidoreductasa
<i>pfor a</i>	Gen a de la piruvato ferredoxín oxidoreductasa
<i>pfor b</i>	Gen b de la piruvato ferredoxín oxidoreductasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg	segundos
TAE	Amortiguador de Tris-Acetato
TE	Amortiguador Tris-EDTA
TTP	Tiamina pirofostato
u	Unidades
UTR	Región no traducida (“Untranslated Region”)
X-Gal	5- bromo- 4-cloro-e-indol-β-D-galactopiranósido.

## ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras

Índice de Tablas

Agradecimientos

<b>1.- RESUMEN.</b>	12
<b>2.- INTRODUCCIÓN</b>	14
2.1 Epidemiología	14
2.2 Manifestaciones clínicas	16
2.3 Tratamiento	17
2.4 Características generales	17
2.4.1 Agente etiológico y Morfología	17
2.4.2 Biología de <i>T. vaginalis</i>	18
2.4.3 Ciclo de vida	20
2.4.4 Metabolismo	22
2.4.5 Mecanismo de acción del metronidazol	27
2.5 Patogénesis	29
2.5.1 Cisteín proteinasas	29
2.5.2 Evasión de la respuesta inmune	30
2.5.3 Citotoxicidad	30
2.5.4 Regulación por Hierro	31
2.5.5 Citoadherencia	32
<b>3.- JUSTIFICACIÓN</b>	36
<b>4.- HIPÓTESIS</b>	37
<b>5.- OBJETIVOS</b>	37
5.1 Objetivo general	37
5.2 Objetivos particulares	37
<b>6.- ESTRATEGIA</b>	38
6.1 Clonación del gen <i>pfor a</i>	38
6.2 Determinar el efecto del Fe <sup>2+</sup> a nivel de transcripción del gen <i>pfor a</i>	39
6.3 Análisis <i>in silico</i> del genoma de <i>T. vaginalis</i>	40

<b>7.- METODOLOGÍA</b>	41
7.1 Cultivo de <i>T. vaginalis</i>	41
7.2 Extracción de DNA genómico	41
7.3 Diseño de Iniciadores para la amplificación del gen <i>pfor a</i>	42
7.4 Amplificación de la región conservada de CPs	44
7.5 Amplificación del gen <i>pfor a</i>	44
7.6 Clonación de los productos de amplificación	46
7.7 Extracción de DNA plasmídico	47
7.8 Mapa de Restricción	48
7.9 Purificación de DNA por Gene Clean	48
7.10 Congelación de clonas candidatas	49
7.11 Secuenciación del DNA	49
7.12 Reamplificación del fragmento PFO2.9	50
7.13 Análisis del diseño de Oligonucleótidos	51
7.14 Reamplificación de un fragmento de 3.4 kb sin codón de paro	51
7.15 Selección de clonas por “PCR colony “ anidada	52
7.16 Análisis de los dominios “motifs” en el gen <i>pfor a</i>	53
7.17 Extracción de RNA total de <i>T. vaginalis</i>	54
7.18 Síntesis de cDNA de <i>T. vaginalis</i> para ensayos de RT-PCR	54
7.19 RT-PCR	55
7.20 Purificación de RNA poli A+	56
7.21 Marcaje de Sonda Radiactiva	57
7.22 Ensayo tipo Northern blot	58
7.23 Análisis <i>in silico</i> del genoma de <i>T. vaginalis</i> en busca de otros genes <i>pfor a</i>	60
<i>a</i>	
<b>8.- RESULTADOS</b>	
8.1 Amplificación de la región conservada de CPs	61
8.2 Amplificación por PCR del gen <i>pfor a</i>	61
8.3 Clonación del producto de PCR del gen <i>pfor a</i>	61
8.4 Secuenciación del gen <i>pfor a</i> del aislado 188 y su análisis comparativo con <i>pfor a</i>	66

8.5 Análisis de los dominios “motifs” del gen <i>pfor a</i>	71
8.6 Efecto del hierro en la expresión del gen <i>pfor a</i> CNCD 188	76
8.7 Secuenciación del fragmento de 1.1 kb	77
8.8 Ensayo tipo Northern blot	87
8.9 Análisis <i>in silico</i> del genoma de <i>T. vaginalis</i> en busca de otros genes <i>pfor a</i>	87
<b>9.- DISCUSIÓN</b>	<b>93</b>
<b>10.- CONCLUSIONES</b>	<b>98</b>
<b>11.- PERSPECTIVAS</b>	<b>99</b>
<b>12.- BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>100</b>
<b>13.- APÉNDICE</b>	<b>107</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Incidencia de la Trichomonosis a nivel nacional	15
<b>Figura 2</b>	Morfología de <i>Trichomonas vaginalis</i>	19
<b>Figura 3</b>	Ciclo de vida de <i>Trichomonas vaginalis</i>	21
<b>Figura 4</b>	Metabolismo energético de procariontes y eucariontes	25
<b>Figura 4a</b>	Metabolismo de <i>T. vaginalis</i>	25
<b>Figura 4b</b>	Metabolismo de carbohidratos en la mitocondria	26
<b>Figura 5</b>	Análisis de los iniciadores utilizados para amplificar <i>pfor a</i>	43
<b>Figura 6</b>	Amplificación por PCR de la región conservada para cisteína proteinasas de tipo papaína	63
<b>Figura 7</b>	Amplificación por PCR del gen <i>pfor a</i>	64
<b>Figura 8</b>	Mapa de restricción de la clona candidata	65
<b>Figura 9</b>	Secuencia en nucleótidos del gen <i>pfor a</i> (aislado CNCD 188)	68
<b>Figura 10</b>	Alineamiento múltiple en nucleótidos entre los diferentes genes <i>pfor a</i> de <i>T. vaginalis</i>	69
<b>Figura 11</b>	Alineamiento múltiple en aminoácidos entre las diferentes PFOR de <i>T. vaginalis</i>	70
<b>Figura 12</b>	Comparación de los “motifs” de las PFOR -A de <i>T. vaginalis</i>	74
<b>Figura 13</b>	Comparación de los “motifs” de las PFOR A de diversos organismos	75
<b>Figura 14</b>	Amplificación por RT-PCR del fragmento de 1.1 kb del aislado CNCD 147 de <i>T. vaginalis</i>	79
<b>Figura 15</b>	Amplificación por RT-PCR del fragmento de 1.1 kb del aislado CNCD 188 de <i>T. vaginalis</i>	80
<b>Figura 16</b>	Selección por “PCR colony” y restricción CNCD 147	81
<b>Figura 17</b>	Selección de clonas por “PCR colony” y restricción CNCD 188	82
<b>Figura 18</b>	Alineamiento entre los fragmentos 1.1 kb con las PFOR reportadas en nucleótidos de <i>T. vaginalis</i>	83
<b>Figura 19</b>	Alineamiento entre los fragmentos de 1.1 kb con las PFOR deducidas en aminoácidos de <i>T. vaginalis</i>	84

<b>Figura 20</b>	Dendrograma para 5 secuencias en nucleótidos que codifican para <i>pfor</i> de <i>T. vaginalis</i>	85
<b>Figura 21</b>	Dendrograma para 5 secuencias deducidas en aminoácidos que codifican para <i>pfor</i> de <i>T. vaginalis</i>	86
<b>Figura 22</b>	Northern blot de la PFOR A	90
<b>Figura 23</b>	Comparación de los “motifs” de nuevas secuencias que codifican para PFOR A	91
<b>Figura 24</b>	Dendrograma para las secuencias completas que codifican para <i>pfor</i> .	92

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1</b>	Oligonucleótidos específicos utilizados para amplificar diferentes fragmentos del gen <i>pfor a</i>	45
<b>TABLA 2</b>	Oligonucleótidos utilizados en la secuenciación del gen <i>pfor a</i> (aislado CNCD 188).	50
<b>TABLA 3</b>	Lista de plásmidos obtenidos mediante clonación en el vector PCR II TOPO	56
<b>TABLA 4</b>	Características de los “motifs” encontrados en las secuencias de <i>T. vaginalis</i> .	73

## 1.-RESUMEN

La Trichomonosis humana es una enfermedad de transmisión sexual causada por el protozoo flagelado *Trichomonas vaginalis*. La adhesión es el primer evento en el desarrollo de una infección. En *T. vaginalis* es un proceso multifactorial en el que participan al menos cinco adhesinas, AP120, AP65, AP51, AP33 y AP23. Estas proteínas están reguladas coordinadamente a nivel de transcripción y de traducción por concentraciones de hierro. Los genes para las adhesinas AP65, AP51, y AP33 mostraron homología significativa con enzimas metabólicas, como la enzima málica o las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la succinil CoA sintetasa. Recientemente, en el laboratorio se ha identificado y caracterizado una nueva adhesina de 120 kDa (AP120). La secuencia del extremo amino de la proteína AP120 reconocida por el anticuerpo que inhibe la adhesión muestra homología con la secuencia correspondiente al gen *pfor a* que codifica para la enzima Piruvato ferredoxín oxidoreductasa (PFOR A) de *T. vaginalis*. Por ello en este trabajo el gen *pfor a* se amplificó por PCR, se clonó en el vector PCR- II TOPO y se secuenció. La secuencia deducida de aminoácidos mostró cinco diferencias con respecto a la del gen *pfor a* reportado (Hrdý y Muller, 1995): los cambios modifican un segmento transmembranal y algunos dominios de fosforilación. El alineamiento múltiple entre las secuencias de PFOR A, B y esta nueva secuencia de PFOR mostró que otro de los 5 cambios que presenta, lo comparte con el gen *pfor b*, por lo que se piensa que tenemos un gen distinto a los ya reportados. Dado que por el análisis de doble dimensión y Western blot se detecta una proteína que sólo aparece en altas concentraciones de  $Fe^{2+}$  la cual tiene homología con PFOR-A y por inmunofluorescencia indirecta se observa un aumento en la expresión de superficie de una proteína con homología a PFOR. Por lo que en este trabajo se analizó el efecto del

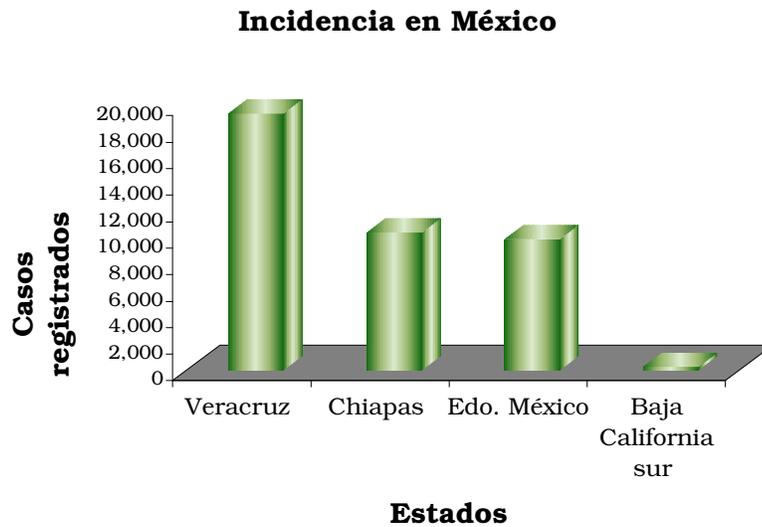
hierro en la expresión del gen *pfor a* a nivel de transcripción por RT-PCR utilizando RNAm obtenido de parásitos crecidos en diferentes concentraciones de  $Fe^{2+}$  provenientes de dos aislados diferentes (CNCD188 y CNCD 147) de *T. vaginalis*. Estos experimentos se realizaron utilizando como molde cDNA de los diferentes aislados y oligonucleótidos específicos para amplificar la región carboxilo terminal (1.1kb) de la PFOR A, ya que esta es la región reconocida por el anticuerpo anti-EhPFO, que reconoce la superficie y organelos citoplásmicos de *T. vaginalis*. Finalmente, también se realizó un ensayo tipo Northern blot para determinar el tamaño del transcrito en las tres condiciones de hierro. Al utilizar como sonda el fragmento de 1.1 kb en altas concentraciones de hierro y se obtuvo un transcrito de 4.2 kb. Con estos resultados podemos determinar que tenemos un tercer gen que codifica para PFOR A. Aunque se requieren otros análisis para determinar si la adhesina presenta solo homología con la PFOR A, de acuerdo al mapeo tróptico y espectometría de masas realizado anteriormente, o si este nuevo gen que tiene una identidad del 99% al de PFOR A se comporta como una adhesina o es bifuncional dependiendo de la localización de la proteína en el parásito.

## 2.- INTRODUCCIÓN

### 2.1.-Epidemiología

Las enfermedades de transmisión sexual (ETS) representan uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, a pesar de los avances médicos logrados en las últimas décadas. Actualmente, se reconocen más de 30 enfermedades bacterianas, virales y parasitarias que pueden transmitirse por vía sexual (www.saludpublica.com. 2000). Una de las ETS que se presenta con mayor frecuencia principalmente en las mujeres, es la trichomonosis causada por *Trichomonas vaginalis*, ya que existen alrededor de 180 millones de mujeres en el mundo afectadas por este padecimiento cada año (OMS, 2000). La prevalencia varía entre las poblaciones estudiadas en un rango de 5-74% en mujeres y 5-29% en hombres (Anorlu y col., 2001).

En México esta enfermedad se encuentra distribuida principalmente en la zona centro y sur del país; el número de casos de trichomonosis registrados hasta Octubre del 2004 es de 131,051. En la zona sur (Veracruz y Chiapas) se registra el mayor número de casos con un porcentaje del 14.7% y 7.8%, respectivamente y en la zona centro (Edo. de México) con un 7.7%, a diferencia de la zona norte, como en Baja California que presenta solo un 0.2% (Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica, SSA, 2004) (**Fig. 1**). Esta enfermedad prevalece en regiones de clima cálido, en mujeres de edad fértil, de vida sexual activa con múltiples compañeros sexuales e higiene personal pobre (Arroyo, 2000).



**Figura 1. Incidencia de casos registrados de pacientes con Trichomonosis en México hasta Noviembre del 2004.** Comparación de los casos registrados entre algunos estados de la Republica Mexicana.

## **2.2.- Manifestaciones clínicas**

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

En el hombre, el cual es considerado un reservorio del parásito, este organismo la mayoría de las veces se aloja en la uretra, aunque en ocasiones se localiza también en la próstata y vesículas seminales (Honigberg, 1990). Cuando se presentan síntomas se puede observar una trichomonosis aguda caracterizada por una uretritis purulenta; o como una enfermedad asintomática, la cual es clínicamente indistinguible de la uretritis no gonocócica (Krieger, 1995).

### **2.3.- Tratamiento**

Cada vez es más frecuente encontrar aislados de *T. vaginalis* resistentes a la familia de los 5- nitroimidazoles, entre los que se encuentra el tinidazol y metronidazol. Estos son antimicrobianos de amplio espectro que son los medicamentos comúnmente utilizados para el tratamiento de algunas parasitosis como amibiasis, giardiasis y trichomonosis. El metronidazol fue originalmente sintetizado y aprobado para ser utilizado contra la trichomonosis en 1959 (Durel y col., 1967).

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

### **2.4.- Características generales**

#### **2.4.1.-Agente etiológico y morfología**

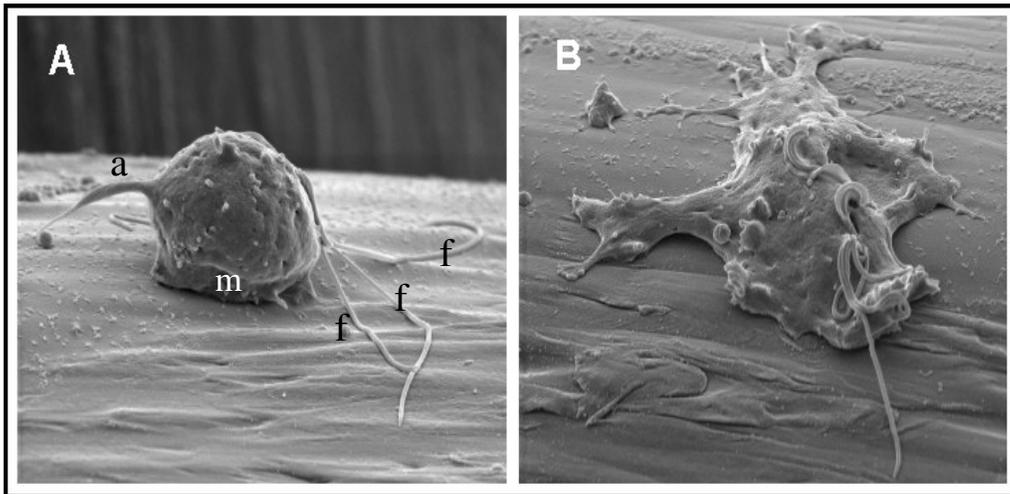
*Trichomonas vaginalis* es un protozoo flagelado que mide 10-20  $\mu$ m de largo, aun cuando puede llegar a medir hasta 30  $\mu$ m y 7  $\mu$ m de diámetro. El organismo presenta cuatro flagelos anteriores libres y uno recurrente a lo largo de la membrana ondulante, el cual carece del extremo posterior libre.

La membrana ondulante ocupa aproximadamente el tercio anterior del cuerpo. El núcleo es excéntrico con la cromatina distribuida uniformemente. Además, en la región de la costa y del axostilo existen gran cantidad de gránulos siderófilos, entre los que se encuentran los hidrogenosomas. El citostoma de esta especie es pequeño y poco aparente (Tay, 1995) (**Fig. 2**).

#### **2.4.2.-Biología de *Trichomonas vaginalis***

##### CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

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



Ovoide

Ameboide

González Robles A.

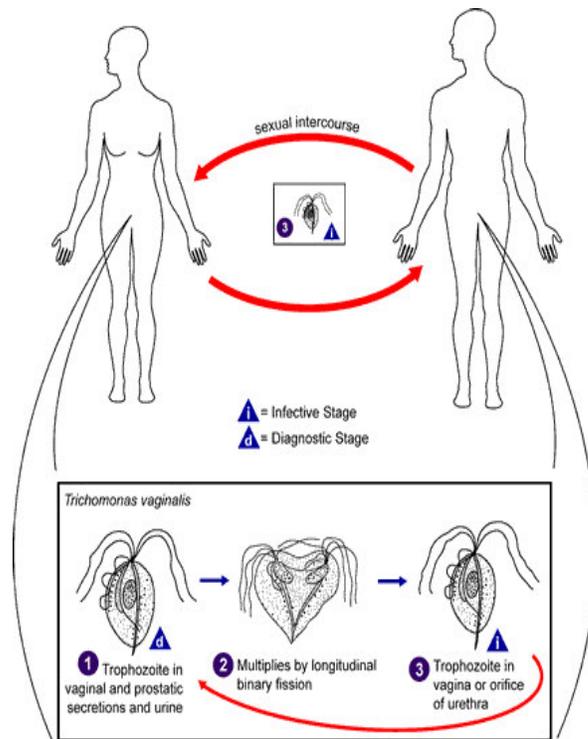
**Figura 2. Morfología de *Trichomonas vaginalis*.** Forma en la que se puede presentar el parásito. **A.** Ovoide: a) axostilo f) flagelo, m) membrana ondulante. **B** forma de costra

### 2.4.3.- Ciclo de vida

El ciclo biológico de *T. vaginalis*, es directo, ya que el parásito se transmite de persona a persona por contacto sexual, en forma de trofozoíto uninucleado y se establece en la mucosa vaginal, uretra y próstata (**Fig. 3**). Este protozoario se reproduce por fisión binaria que empieza con la división nuclear, después la del blefaroplasto y resto de los organelos. Finalmente, se originan dos células hijas en las que el citoplasma se separa en dos porciones (Gómez-Conde, Tesis de doctorado 2000; Gómez-Conde y col., 2000). No se conoce un estado de quiste. Aunque la formación de un pseudoquiste ha sido descrita en células que han experimentado estrés ambiental (Ribeiro y col., 2002).

La caracterización de la mitosis en *T. vaginalis* ha demostrado la presencia de las 5 fases: profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis (Gómez-Conde y col., 2000). La cromatina de *T. vaginalis* experimenta diferentes grados de condensación de los cromosomas en metafase para condensar la cromatina en anafase (Brugerolle, 1975; Petrin y col., 1998; Gómez-Conde, Tesis de Doctorado 2000).

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



**Figura 3. Ciclo de Vida de *Trichomonas vaginalis*.** i: estado infectivo. d: estado de diagnóstico. 1: trofozoitos en secreciones prostáticas 2: fisión binaria. 3: trofozoito en vagina o en uretra. (Tomado de la base de datos: Introduction “The *Trichomonas vaginalis* Genome Database”, [www.tigr .or/tdb/e2k1/tvg/intro.shtml](http://www.tigr.or/tdb/e2k1/tvg/intro.shtml).)

*T. vaginalis* se alimenta de componentes solubles, células del huésped, bacterias y eritrocitos (Honigberg, 1990). Son altamente sensibles a los cambios del microambiente, como temperatura, pH, osmolaridad y potencial redox, por lo que difícilmente sobreviven en el exterior de cuerpo humano y la infección por medio de toallas contaminadas, en albercas o retretes contaminados es casi imposible (Honigberg, 1990).

#### **2.4.4.- Metabolismo**

*Trichomonas vaginalis* es un organismo protista eucariótico primitivo. Aunque es muy similar en muchos aspectos a otros eucariontes, es disímil en el metabolismo ya que se parece más a bacterias anaeróbicas primitivas, que carece de mitocondrias y peroxisomas. Este protista aerotolerante anaeróbico contiene un organelo especializado llamado hidrogenosoma (Johnson y col., 1993). Este organelo es análogo a la mitocondria de eucariontes superiores pero menos eficiente en la producción de energía (Arroyo, 2000).

Aunque hay marcadas diferencias entre la mitocondria y el hidrogenosoma, los organelos son funcionalmente similares. Ambos organelos contienen rutas metabólicas implicadas en el proceso metabólico y la producción de ATP (**Fig. 4a**). (Cavalier-Smith, 1987).

Este organelo tiene un diámetro de 0.5 a 1.0  $\mu\text{m}$ , se encuentra rodeado por 2 membranas y no contiene material genético (Muller, 1988). Se ha planteado varias

teorías acerca del origen de éste. Estudios bioquímicos del hidrogenosoma han revelado similitudes y diferencias en cuanto a algunas de las funciones entre este organelo y la mitocondria. En cuanto al origen se considera que los hidrogenosomas son modificaciones u organelos degenerados de las mitocondrias. Otra teoría sugiere que los hidrogenosomas y las mitocondrias surgen de un ancestro común (Johnson y col., 1993).

Una tercera hipótesis sugiere que los hidrogenosomas se originaron a través de una endosimbiosis de una bacteria anaeróbica con una célula eucariótica primitiva, dándole la habilidad al hidrogenosoma para metabolizar en ausencia de oxígeno. Esta última teoría es una de las más aceptadas ya que de acuerdo a los análisis de 2 proteínas hidrogenosomales (ferredoxina y  $\alpha$ -succinil Co A sintetasa) se observan que hay similitudes importantes entre la mitocondria y el hidrogenosoma sugiriendo que se originaron de manera independiente (Johnson y col, 1993).

La fuente primordial de energía de *T. vaginalis* son los carbohidratos y el metabolismo de éstos ocurre tanto en el citoplasma como en los hidrogenosomas. En el citoplasma la glucosa es convertida a fosfoenolpiruvato y subsecuentemente a piruvato por la vía Embden-Meyerhoff-Parnas. El piruvato se metaboliza en el hidrogenosoma y con ayuda de la enzima Piruvato-ferredoxín oxidoreductasa (PFOR) es descarboxilado para formar Acetil Co A. El acetato es producido como producto final en la vía de transferencia de Co A a succinato.

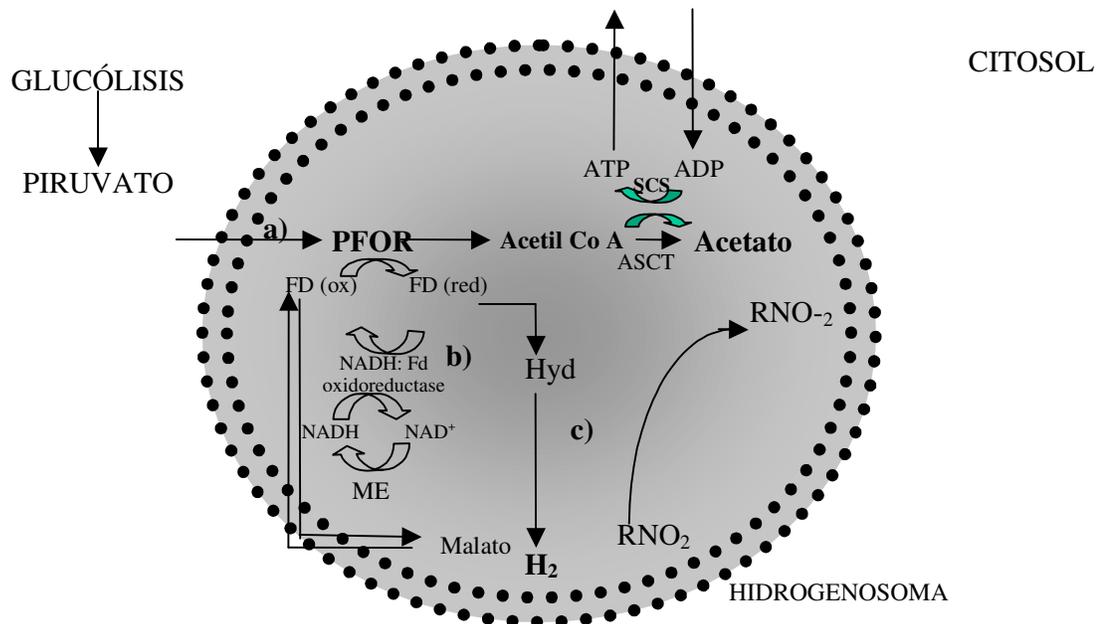
Subsecuentemente, la ferredoxina (Fd) acepta los electrones generados por la PFOR. La ferredoxina es reoxidada por la hidrogenasa (HYD) produciendo hidrógeno

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

En organismos aeróbicos, la misma reacción es catalizada por el complejo multienzimático de aproximadamente  $10^3$  kDa de la piruvato deshidrogenasa (PDH) (Weiland, 1983). Los mecanismos catalíticos de PFOR y la PDH son diferentes (**Fig. 4b**). La única propiedad que tienen en común ambas es la presencia de tiamina pirofosfato (TTP) (Kerscher y Oesterhelt, 1982). Este grupo prostético de 200 – 300 kDa, es usado como un cofactor por los “cluster” Fe-S y está implicado en la ruptura de los enlaces carbono-carbono (Schonheit y Schafer, 1995).

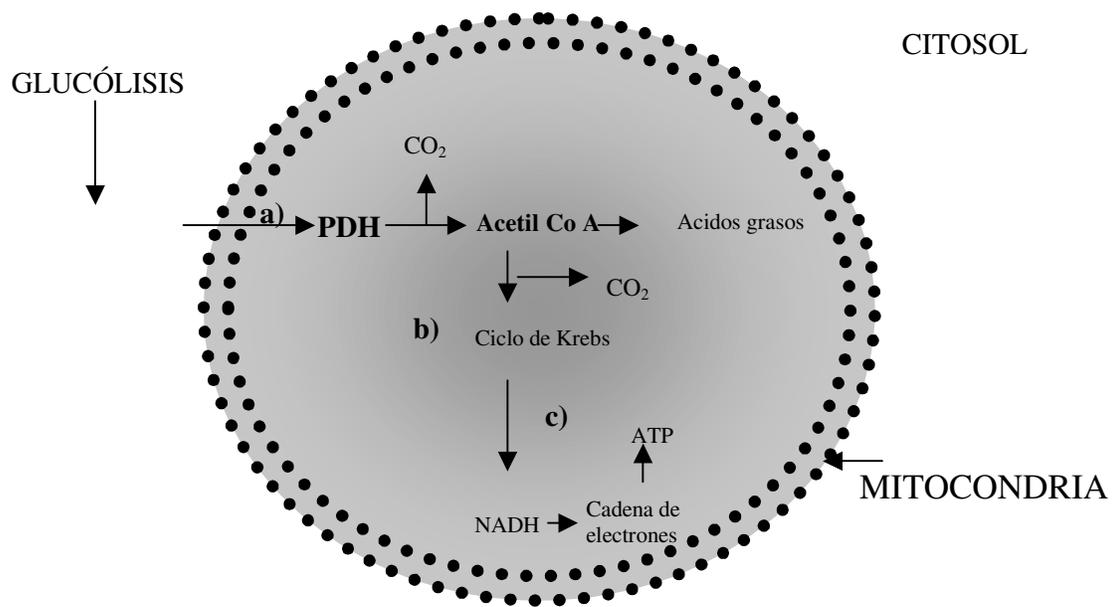
Existen 3 tipos de PFOR, la PFOR en algunos organismos como en algunos protozoarios y bacterias es un dímero o proteína tetramérica de aproximadamente 240 kDa. En otros organismos como *Halobacterium halobium*, la PFOR que tiene 2 subunidades, de 86 y 42 kDa, mientras que en *Pirococcus furiosus*, *Thermotoga maritima* y *Archaeoglobus fulgidus* la PFOR se compone de 4 subunidades: 47, 32, 25 y 13 kDa (Kunow y col., 1995).

# Metabolismo de Carbohidratos en el hidrogenosoma



**Figura 4a** Metabolismo de *Trichomonas vaginalis*. Representación de la estructura del hidrogenosoma en *T. vaginalis* y los mecanismos que utilizan diferentes moléculas en el metabolismo. a) Descarboxilación del piruvato por la PFOR (Piruvato ferredoxina oxidoreductasa). b) Reoxidación de la ferredoxina. c) hidrógeno molecular, producto final de la cadena transportadora de electrones. SCS: succinil Co A sintetasa, ME: enzima mállica, ASCT: acetato succinato Co A transferasa, RNO<sub>2</sub>: metronidazol (Tomado de Land col., 2004).

# Metabolismo de Carbohidratos en la mitocondria



**Figura 4b Metabolismo de eucariontes superiores.** Representación de la estructura de la mitocondria y representación de los mecanismos que utilizan diferentes moléculas en el metabolismo. a) Descarboxilación del piruvato por la PDH (piruvato deshidrogenasa). b) Descarboxilación del piruvato. Ciclo de Krebs c) ATP, producto final de la cadena transportadora de electrones.

La PFOR se encuentra en pocos grupos protistas amitocondriados, como *Giardia lamblia* (Ellis y col., 1993), *Entamoeba histolytica* (Rodríguez y col., 1996) y en *T. vaginalis*. En estos protistas se encuentran formadas por dos subunidades homólogas de aproximadamente 120 kDa cada una (Hrdy y Muller, 1995).

La PFOR de *T. vaginalis* está localizada en el hidrogenosoma, un organelo limitado por una doble membrana (Muller, 1993); es el primer miembro de un sistema de transferencia de electrones que tiene una corta cadena y usa protones como aceptor de electrones. Esta enzima reduce un “cluster” [2Fe-2S] de la ferredoxina, el cual es subsecuentemente reoxidado por una hidrogenasa (ferredoxin: H<sub>2</sub> oxidoreductase) (Hrdy y Muller, 1995). La ferredoxina de *T. vaginalis* es una proteína hidrogenosomal de 12 kDa, que participa en la activación del metronidazol en un compuesto tóxico y es el aceptor natural de electrones para la PFOR. Está codificada por un gen único sin intrones y en los aislados de *T. vaginalis* que presentan resistencia al metronidazol, su expresión se encuentra reducida hasta en un 50%, tanto a nivel de traducción como de transcripción, disminuyendo la capacidad de la célula para activar al metronidazol (Quon y col., 1994).

#### **2.4.5.- Mecanismos de acción del metronidazol**

Como se sabe, en las rutas metabólicas que se realizan en la célula, el hidrogenosoma juega un papel importante en la activación del metronidazol. Esta droga entra por difusión pasiva tanto a la célula como también a este organelo como una prodroga y compete con una enzima terminal llamada hidrogenasa como un aceptor de electrones donados por la ferredoxina. La activación de la droga ocurre cuando un

electrón es transferido a un grupo nitro formando un nitro-radical tóxico (Upcroft y Upcroft 2001; Kulda, 1999). En ausencia de la droga, los protones normalmente deben ser reducidos a hidrógeno molecular por acción de la hidrogenasa (**Fig 4a**).

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

El número de aislados de *T. vaginalis* clínicamente resistentes han aumentado (Sobel y col., 1999) y poco se conoce acerca de las bases moleculares de la resistencia al metronidazol. En estos organismos se ha observado una relación directa entre la expresión del gen de la ferredoxina y la resistencia a la droga. Aunque por análisis moleculares como el reemplazamiento del gen de la ferredoxina, midiendo la concentración mínima letal del metronidazol confirma que esta molécula no es la responsable de la resistencia de los diferentes aislados a este fármaco. Esto quiere decir que hay mecanismos aún desconocidos para explicar la resistencia de los aislados de *T. vaginalis* (Kirkwood y col., 2004).

A la fecha, se han clonado dos genes para la PFOR de *T. vaginalis* (*pfor-a* y *pfor-b*) con un tamaño de 3,665 pb con un marco de lectura abierto de 3,473 pb para ambos, que codifican para 1157 aa y una proteína de aproximadamente 120 kDa. Al comparar la secuencia deducida de aminoácidos presentaron 95% de identidad (Hrdý y Muller, 1995). Estos genes difieren en 211 nucleótidos resultando 5.5% divergentes.

Ambos genes son ricos en A+T tanto en las regiones codificantes como en las no codificantes.

## **2.5.-Patogénesis**

### **2.5.1-Cisteín proteinasas**

Este parásito tiene proteasas de tipo cisteín y metaloproteasas, la mayoría de las cuales son cisteín proteinasas (CPs). Algunas de las CPs participan en la virulencia de *T. vaginalis* y son consideradas como factores líticos en la hemólisis de eritrocitos, en la adherencia y en la citotoxicidad de *T. vaginalis* a células epiteliales (Arroyo y Alderete, 1989), en la degradación de inmunoglobulinas A y G (IgA e IgG) y en la resistencia al complemento (Provenzano y Alderete, 1995).

Se han identificado aproximadamente 23 CPs por electroforesis de sustrato en geles de dos dimensiones. Algunas CPs ya se han identificado y caracterizado. Una de ellas es la CP de 30 kDa (CP30), la cual participa en la adhesión además de degradar sustratos como fibronectina y colágena IV a pH ácidos, de manera que puede degradar proteínas de matriz extracelular (Arroyo y Alderete, 1989; Arroyo, 1995; Mendoza-López y col., 2000). Otra CP que se ha demostrado que participa en citoadherencia es la de 62 kDa mediante el uso de anticuerpos monoclonales en contra de esta proteína. Además confiere protección a los ratones inmunizados con este antígeno (Hernández y col., 2004).

### **2.5.2.-Evasión de la respuesta inmune**

A la fecha se ha mostrado una relación muy compleja huésped-parásito en la trichomonosis, lo cual se evidencia por los mecanismos que *T. vaginalis* utiliza para sobreponerse a las barreras naturales de defensa del huésped. La respuesta inmune del huésped es neutralizada por numerosas enzimas proteolíticas y por la variación fenotípica que poseen las trichomonas infectadas por el virus de RNA de doble cadena (dsRNA) (TVV) (Alderete y col., 1986, Khoshnan y Alderete, 1994; Provenzano y Alderete, 1995). Este virus regula la expresión de la proteína de superficie de 270 kDa (p270) que le confiere variación fenotípica. Otro evento para evadir la respuesta inmune del huésped es la degradación de anticuerpos en secreciones de pacientes con trichomonosis observándose CPs y anticuepos en contra de éstas (Alderete y col., 1991; Bozner y col., 1992). Estas CPs son capaces de degradar los anticuerpos generados por el huésped y evitar la protección a la infección (Provenzano y Alderete, 1995). El mimetismo molecular es otra manera de evadir la respuesta inmune utilizando la homología que existe entre las adhesinas y enzimas metabólicas.

### **2.5.3.-Citotoxicidad**

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

En este proceso participa una proteinasa de 65 kDa, que presenta afinidad a la superficie de las células HeLa y se encuentra ausente en los aislados de *T. vaginalis* no citotóxicos. La actividad de la CP65 es modulada negativamente por concentraciones de zinc similares a las encontradas en las secreciones prostáticas (•1.6 mM) de pacientes masculinos con prostatitis crónica (Álvarez-Sánchez, Tesis de doctorado 2001).

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

#### **2.5.4.-Regulación por Hierro**

En el huésped, el hierro está unido a moléculas específicas como transferrina y lactoferrina, las cuales son glicoproteínas con una afinidad muy elevada por este ión y están presentes en el suero y en la mucosa vaginal, respectivamente.

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

implicado en la regulación de una serie de mecanismos que le permite al parásito subsistir en el huésped gracias a la inducción de la síntesis de diferentes proteínas dependiendo de la concentración de este ión en el medio.

De manera específica, en altas concentraciones de hierro se induce la expresión de la ferredoxina, de la succinil CoA sintetasa, de la PFOR y las adhesinas AP65, AP51, AP33, AP23, AP120 (Arroyo y col., 1992; Lehker y col., 1991; Yáñez- Gómez, 1999 Tesis de maestría; Moreno-Brito y col., 2005). La regulación de algunas de estas proteínas se lleva a cabo a nivel transcripcional y traduccional; tal es el caso de las adhesinas cuya expresión es inhibida utilizando actinomicina D o cicloheximida en el medio suplementado con hierro (Lehker y col., 1991).

La disponibilidad del hierro es necesaria para procesos metabólicos y el crecimiento de este parásito. Además en la citoadherencia de este organismo a la célula huésped, el hierro regula la expresión de genes que codifican para las adhesinas y la cisteín proteinasa CP30; por lo que se ha postulado que este ión es esencial para la sobrevivencia de este protozooario.

#### **2.5.5.-Citoadherencia**

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

El mecanismo de citoadherencia de *T. vaginalis* es complejo, dependiente de pH y temperatura (Alderete y Garza, 1985) e involucra una serie de eventos entre los que se incluyen transducción de señales transmembranales (Arroyo y col., 1993), además de la participación de moléculas como adhesinas (Arroyo y col., 1992), una cisteín proteínasa de 30 kDa, CP30 (Arroyo y Alderete, 1989; 1995, Mendoza-López y col., 2000) y glicoconjugados de superficie con actividad receptora para proteínas de matriz extracelular como laminina (Silva Filho y col., 1988).

Este parásito presenta un sofisticado sistema de transducción de señales con el cual controla la expresión de genes de virulencia como los que codifican para las adhesinas (Arroyo y col., 1993). A la fecha, se han identificado y caracterizado cinco proteínas de superficie, como adhesinas AP65, AP51, AP33, AP23 y AP120, involucradas en la adhesión de *T. vaginalis* a las células epiteliales (Alderete y Garza, 1985; 1988, Arroyo y col., 1992; Yáñez-Gómez, Tesis de Maestría 1999; Moreno Brito y col., 2005). La expresión de los genes de las adhesinas se encuentra regulada a nivel de transcripción y en forma coordinada, por condiciones ambientales, tales como la concentración de  $Fe^{2+}$  en el microambiente de la vagina (Lehker y col., 1991) y por contacto con las células del epitelio vaginal (Arroyo y col., 1993; García y col., 2003).

Los genes para tres de las cinco adhesinas se clonaron con lo que se confirmó la regulación de la transcripción de los genes de las adhesinas por hierro (Arroyo y col., 1995). De manera inesperada, se encontró que las tres adhesinas presentan homología significativa con enzimas metabólicas hidrogenosomales, pero ubicadas en la superficie del parásito (Arroyo, 2000; García y col., 2003).

Al comparar los genes de estas adhesinas AP65, AP51 y AP33, mostraron homología significativa con enzimas metabólicas como la málica, una enzima localizada en los hidrogenosomas que participa en la producción de ATP, presentando una identidad del 78%, con la AP65. Lo mismo ocurre con las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la succinil-Co A sintetasa con la AP33 y la AP51, respectivamente, mostrando una identidad la AP51 del 44.2% con la subunidad  $\beta$ , mientras que los tres genes de la AP33 tienen una identidad de 53.8%, 54.5% y 54.9% con la subunidad  $\alpha$  de la succinil – CoA sintetasa (Engbring y col., 1996).

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

La AP120 se caracterizó determinando el número de manchas que forman a la proteína de 120 kDa en extractos de proteínas totales de *T. vaginalis* crecidas en diferentes concentraciones de hierro, 20 y 250  $\mu$ M, comparadas en electroforesis de

2-D. Por ensayos de “Western blot” con el anticuerpo anti-TvAP120, que inhibió la adhesión de *T. vaginalis* a monocapas de células HeLa (Yáñez-Gómez, Tesis de Maestría, 1999), se observó un patrón diferencial entre las proteínas de parásitos crecidos en diferentes condiciones de cultivo. En parásitos crecidos en 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  se observaron 2 manchas en la región de 120 kDa y en parásitos crecidos en 250  $\mu\text{M}$  de hierro se observaron 3 manchas. El anticuerpo anti-TvAP120, reconoció a la mancha numero 1 que solo se encontró en parásitos crecidos en alto hierro. Esta mancha podría corresponder a la AP120. (Moreno-Brito y col., 2005). De esta mancha se realizó el mapeo tríptico (MALDI-TOF MS-“peptide mass mapping”) y los espectrogramas muestran las masas de 59 péptidos. Las masas de 22 de 59 péptidos coincidieron con las masas de los péptidos generados teóricamente de la piruvato flavodoxin deshidrogenasa de *T. vaginalis*, conocida como Piruvato ferredoxin oxidoreductasa (PFOR, mostrando que la adhesina de superficie AP120 presenta homología con la PFOR hidrogenosomal del parásito (Moreno-Brito, Tesis de Doctorado, 2004; Moreno-Brito y col., 2005).

Debido a éllo se realizaron ensayos de “Western blot” e inmunolocalización con un anticuerpo anti- EhPFO preparado contra un fragmento recombinante de 648 aa de la parte carboxilo- terminal de la PFOR de *E. histolytica* (del nucleótido 1,260 a 3,408 del gen *pfor*). Las PFOR de estos dos parásitos presentaron una identidad del 45% (Rodríguez y col., 1998). Además, en este fragmento se encontraron 11 de los 22 péptidos identificados de la mancha no. 1 correspondiente a la AP120 (Moreno-Brito y col., 2005).

### **3.-JUSTIFICACIÓN**

La identificación y caracterización de una nueva adhesina de 120 kDa (AP120), mostró que hay otra proteína de *T. vaginalis* que sólo se induce en altas concentraciones de hierro que el parásito utiliza para adherirse al epitelio vaginal y que tiene homología con la PFOR una enzima hidrogenosomal que participa en el metabolismo de este organismo, repitiendo el patrón de las otras adhesinas ya antes reportadas. Por ello, es de interés amplificar, clonar y expresar a la PFOR A para su posterior localización y determinación de su función para confirmar si hay un gen que tenga dos funciones (adhesina y enzima metabólica) o si están codificadas por dos genes distintos que comparten cierta homología.

#### **4.-HIPÓTESIS**

Dado que la AP120 comparte péptidos de masas iguales con la secuencia deducida del gen *pfor a*, se sugiere que la AP120 presenta homología a la PFOR A de *Trichomonas vaginalis*, o que se trate de un homólogo del gen *pfor a* con algunas modificaciones que le permitan realizar una función diferente y localizarse en la membrana plasmática del parásito.

#### **5.-OBJETIVOS**

##### **5.1.-OBJETIVO GENERAL**

Clonar y expresar el gen de la PFOR A de *Trichomonas vaginalis*

##### **5.2.-OBJETIVOS PARTICULARES**

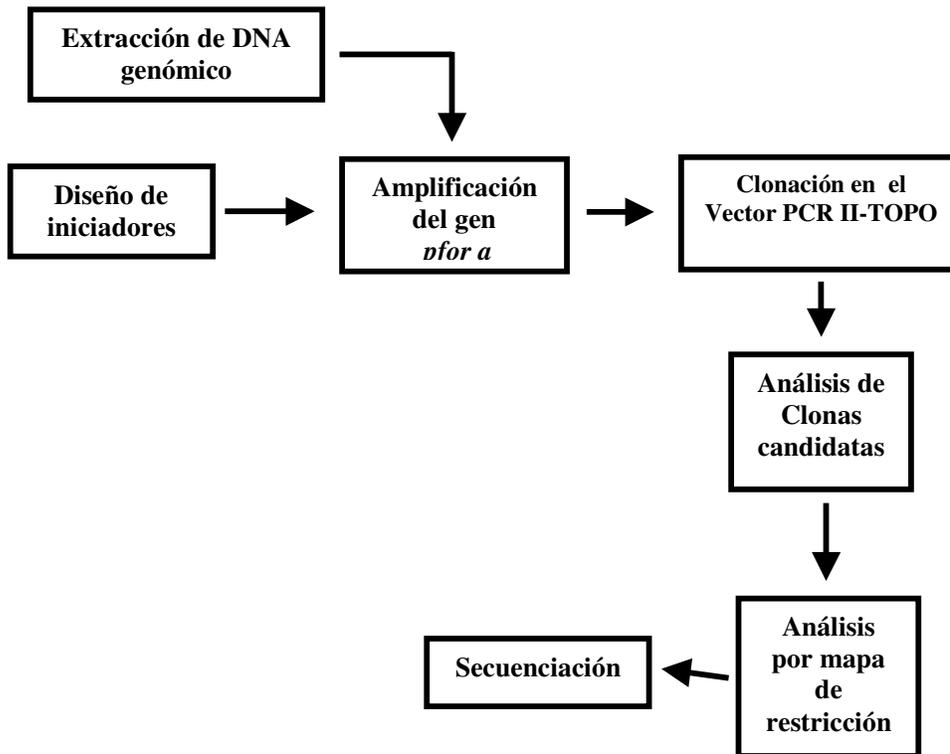
Clonar el gen *pfor a* de *T. vaginalis*

Determinar el efecto del Fe<sup>2+</sup> a nivel de transcripción del gen *pfor a*.

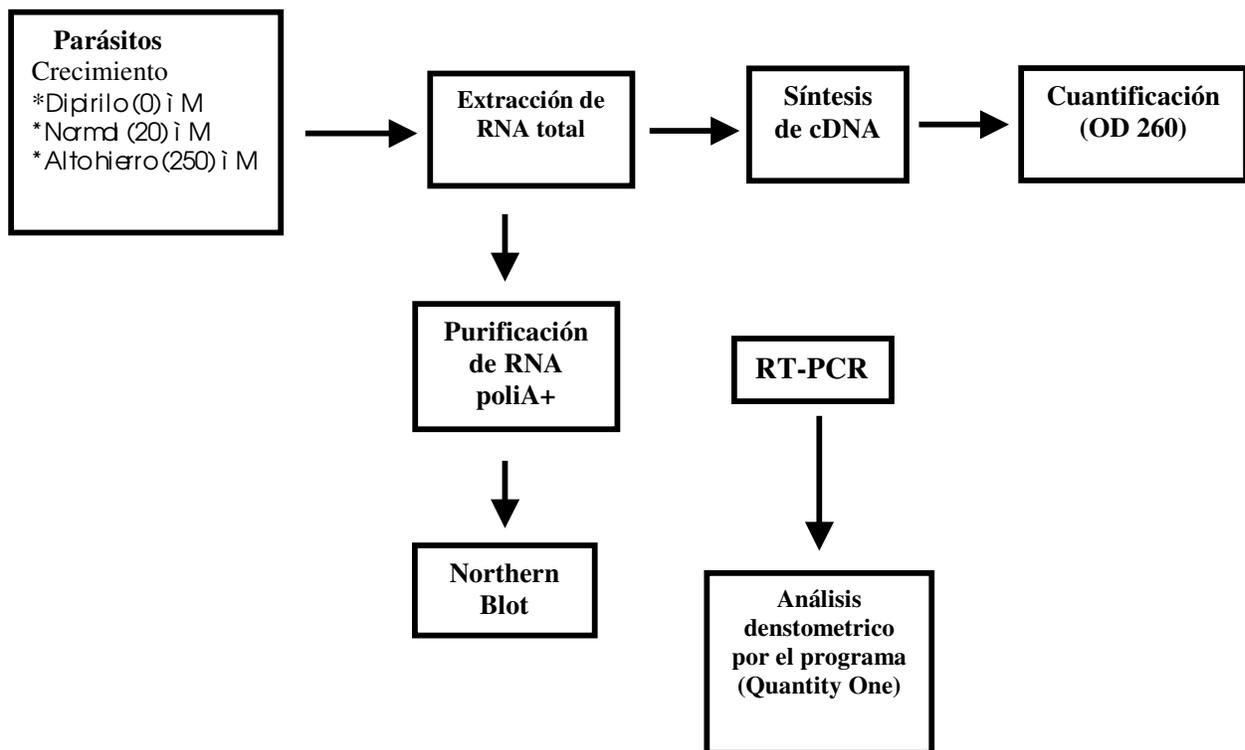
Buscar genes tipo *pfor* en el genoma de *T. vaginalis*.

## Estrategia

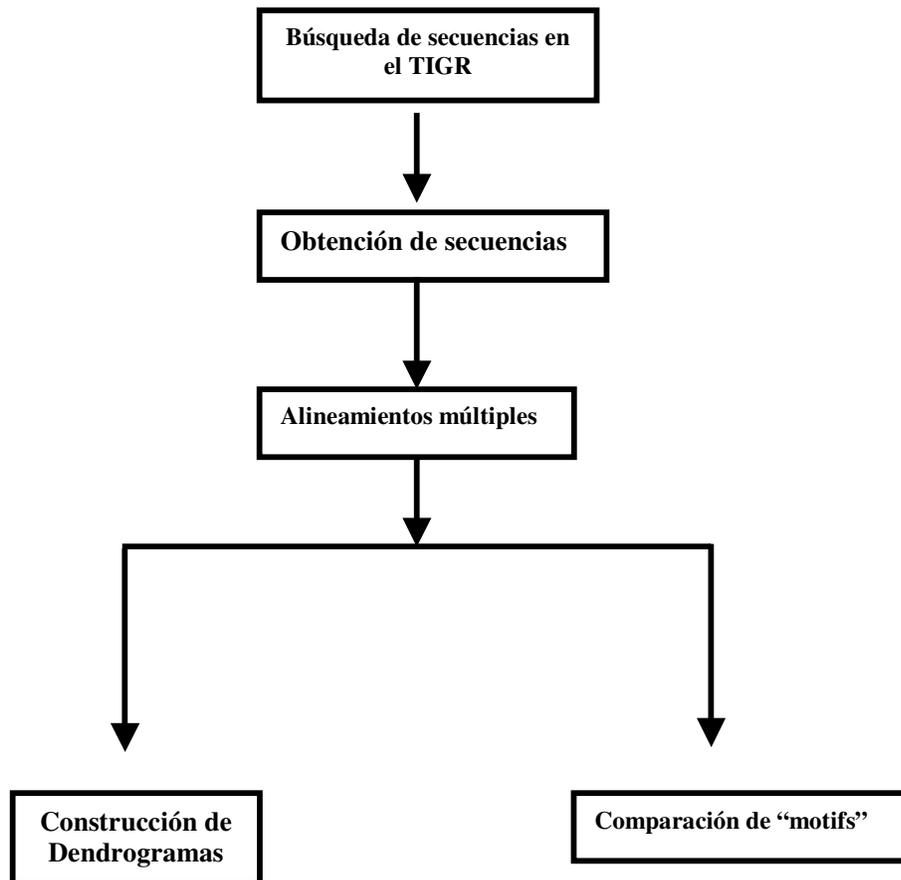
### 6.1.-Clonación del gen *pfor a*



**6.2.- Determinar el efecto del Fe<sup>2+</sup> a nivel de transcripción del gen *pfor a*.**



### 6.3.-Análisis *in silico* del genoma de *T. vaginalis*



## **7.-METODOLOGÍA**

### **7.1.-CULTIVO DE *Trichomonas vaginalis***

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

Antes de la extracción de RNA total, los cultivos de parásitos se suplementaron con altas concentraciones de hierro, al agregar sulfato ferroso amoniacal (250 µM final) al medio TYM. Para concentraciones bajas de hierro al medio se agregó 2-2 dipirilo (150 µM final), el cual es un agente quelante de hierro. Estos compuestos se agregaron 24 h antes de hacer la resiembra de parásitos.

### **7.2.-EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO**

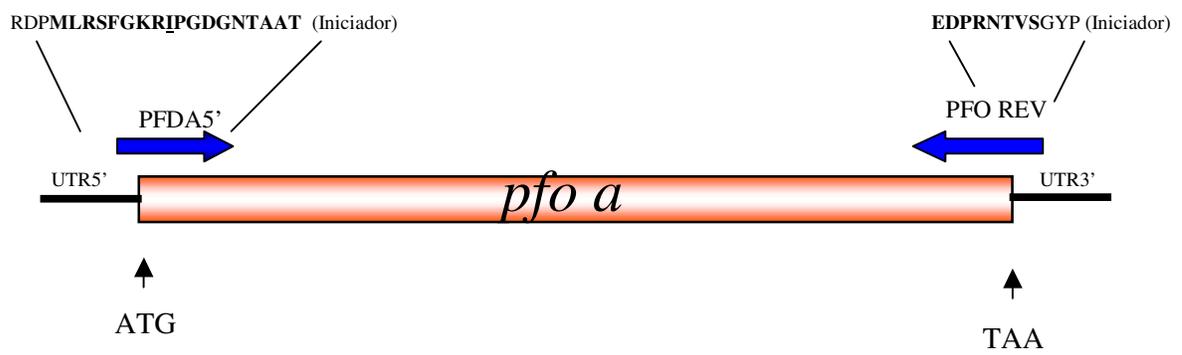
La extracción de DNA genómico del parásito, se realizó por medio de la técnica de fenol-cloroformo (Chou y Tai, 1996) modificada (Espinosa y col., 2001) a partir de  $1.5 \times 10^8$  parásitos.

Cultivos de *T. vaginalis* en cajas de 75 cm<sup>2</sup>, en 100 ml de medio se cosecharon en fase logarítmica de crecimiento, por medio de centrifugación a 1,800 rpm por 5 min a 4°C y se lavaron 3 veces con 20 ml de PBS, pH 7.4. El botón celular se resuspendió en 2 ml de PBS y se transfirieron a 2 tubos Eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente, a cada

tubo se agregaron 300  $\mu$ l de amortiguador de lisis (Apéndice) y 300  $\mu$ l de Fend (equilibrado con Tris-HCl, pH 8.0), se agitó suavemente por 30 seg y se centrifugó a 13,000 rpm por 3 min a 4°C en microcentrifuga. La fase superior se tomó cuidadosamente, sin tocar la interfase, se colocó en un tubo Eppendorf nuevo con 300  $\mu$ l de Fend y 300  $\mu$ l de cloroformo al 100%, se agitó y se centrifugó de la misma forma que en el paso anterior. La fase superior se colocó en un tubo Eppendorf nuevo con 500  $\mu$ l de cloroformo al 100%, se agitó y se centrifugó. Posteriormente, la fase superior se colocó en otro tubo Eppendorf nuevo y el DNA se precipitó con 1 ml de Etanol al 100% y 40  $\mu$ l de acetato de sodio 3M (2.5 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M), a -20°C durante 2 h y se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min para obtener los ácidos nucleicos. Se retiró el sobrenadante y el botón de ácidos nucleicos se lavó con 1 ml de etanol al 70%, se retiró el etanol y la pastilla se secó y se resuspendió en 50  $\mu$ l de amortiguador TE (Apéndice). Finalmente, se agregó 0.5  $\mu$ l de ribonucleasa A (2 mg/ml) y se incubó durante 30 min a 37°C. El DNA se analizó en geles de agarosa al 1% en TAE 1 $\times$  y se almacenó a 4°C.

### **7.3.-DISEÑO DE INICIADORES PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN *pfor a*.**

A partir de la secuencia de DNA reportada del gen de la *pfor a* de *T. vaginalis* del aislado ATCC 30001 (no. de acceso U16822) se diseñaron oligonucleótidos en sentido (PFDA5') y en antisentido (PFO A REVERSE). Incluyendo el codón de inicio y el codón de paro, respectivamente (**Fig. 5; Tabla 1**).



**Figura. 5** Esquema del gen *pfor a* del aislado ATCC30001. Ubicación de los iniciadores utilizados para amplificar el gen *pfor a* de *Trichomonas vaginalis* del aislado CNCD 188.

#### 7.4.-AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN CONSERVADA DE CPs

Al comprobar que los iniciadores están ubicados de manera que pueden amplificar. Una forma de probar que todos los reactivos están trabajando eficazmente en la reacción de PCR, como control se utilizó una amplificación de la región conservada de CPs de *T. vaginalis*. Los iniciadores utilizados son específicos para CPs de tipo papaina de *T. vaginalis*. Como molde se utilizó el DNA genómico de *T. vaginalis*, [4.3 µl] de los iniciadores CP5': 5'-CCG AAT TCC ARG GIC ART GYG GIW SIT GYT GG-3' y CP3':5' -CCC TCG AGC CAI SWR TTY TTI ACD ATC CARTA-3' (10 pmol/l) se añadieron 3 µl de Taq polimerasa (Perkin Elmer), 1 µl de DNA genómico, 1 µl 0.6 µl dNTP's 10 mM, 2.7 µl MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 3 µl de amortiguador de PCR 10x, 12.2 µl H<sub>2</sub>O, dando como resultado una reacción de 30 µl a los que se les agregó la misma cantidad de aceite de silicona. Las condiciones para amplificar fueron: la desnaturalización, 94°C 2 min, para alinear 44°C 30 seg y extensión 61°C 45 seg 35 ciclos; y las condiciones de extensión final: 61° C 7 min, 1 ciclo. Para visualizar los resultados, se corrió un gel de agarosa al 1%, utilizando un amortiguador TAE 1x (**Fig. 6**).

#### 7.5.-AMPLIFICACIÓN DEL GEN *pfor a*.

Para amplificar el gen de *pfor a*, se consideró el tamaño del gen y las temperaturas de fusión de los iniciadores diseñados para la desnaturalización, extensión e hibridación; así como también el número de ciclos suficientes para amplificar este gen de aproximadamente 3.4 kb, para establecer condiciones reproducibles. En un tubo

Eppendorf estéril 500  $\mu$ l, con paredes delgadas, se colocó 1  $\mu$ l del iniciador PFDA5' : 5'-CGG GAT CCC ATG CTC CGC AGC TTC GGC AAG-3' (1 $\mu$ g/ $\mu$ l) y 1  $\mu$ l del iniciador PFO Reverse: 5'-GGG GTA CCC ACT TAC TGT GTT TCG TGG ATC TTC-3' (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) (**Tabla 1**). Estos iniciadores permiten amplificar el gen *pfor a* completo. Como control negativo se preparó una reacción de 50  $\mu$ l sin DNA genómico, se puso una segunda reacción con el mismo volumen que la anterior a la cual se le agregó 1  $\mu$ l de DNA genómico y una tercera que a la cual se le adicionó 0.5  $\mu$ l de DNA genómico (4.3  $\mu$ g/ $\mu$ l). La mezcla de PCR contiene 1 $\mu$ l de Taq Polimerasa (Perkin Elmer) 7.5  $\mu$ g/ $\mu$ l, 9  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 5  $\mu$ l de amortiguador para PCR (1x) y 1 $\mu$ l de deoxirribonucleótidos trifosfatados 0.2 mM (dATP, dTTP, dGTP y dCTP). Las condiciones de PCR fueron: para desnaturalizar: 94°C por 2 min, 1 ciclo, 35 ciclos de 94 °C 1 min, 56 °C 35 seg, 72°C 4 min y las condiciones de extensión final 72 °C 7 min 1 ciclo. Para visualizar los productos, se corrió un gel de agarosa al 1%, utilizando un amortiguador TAE 1 $\times$  (**Fig. 7**).

**Tabla 1.** Secuencia y ubicación de los oligonucleótidos para amplificar fragmentos del gen que codifica para la *pfor a*.

Nombre	Secuencia (5'► 3')	Long.( nt)	Posición (aa)
PFDA5'	5' <u>CGG GAT CCC</u> ATG CTC CGC AGC TTC GGC AAG 3' BamHI	(30)	1-7
PFOREV	5'GGG GTA CCC ACT TAC TGT GTT TCG TGG ATC TTC 3'	(33)	1150-1157
PFOA5'	5' <u>GGA TCC</u> CGG CAA GAG AAT TCC AGG AGA 3' BamHI	(27)	5-12
PFOA3'	5' <u>GCG GCC GCA</u> TCT TCT TGT AGC CCT CGT AA 3' Not I	(29)	1145-1153
PFOR5'	5'GAA GAG GGC AAG AAC TGG GA 3'	(20)	759-767
PFOR3'	5'CCC AAC CAT CAC CAC CGA CG 3'	(20)	949-956

## 7.6.-CLONACIÓN DE PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN EN EL VECTOR

### pCRII-TOPO (Invitrogen) DEL GEN *pfor a*

Para clonar el producto de PCR del gen *pfor a* se tomaron 6 µl de la reacción de amplificación y se agregó 1 µl de Taq polimerasa (Perkin Elmer) y se dejó a 50 °C por 5 min, esto fue para recuperar las adeninas perdidas por el tiempo que transcurrió después de la amplificación, esto fue después de 2 días, ya que la técnica para clonar en el vector PCR II TOPO (Invitrogen) requiere la muestra fresca. Posteriormente, para la ligación del producto de PCR en el vector, se mezcló 0.5 µl del vector PCR II -TOPO (Invitrogen), se agregó 0.5 µl de H<sub>2</sub>O, 1 µl de los contenidos en el Kit del vector así como también 4 µl de la reacción de PCR, por 5 min a temperatura ambiente.

Posteriormente, se transformaron bacterias químicamente competentes (*E coli* TOP 10), adicionando 4 µl de la mezcla de ligación, se incubó por 30 min en hielo, posteriormente se dio un choque térmico (42°C por 30 seg), e inmediatamente se pasó a hielo. Después se agregaron 250 µl de medio SOC (Apéndice), se agitó a 200 rpm a 37°C por 1 h. Enseguida se plaquaron 2 cajas con medio LB + ampicilina (100 mg/ml) y 40 µl de X-Gal (40 mg/ml), se agregó 75 ó 100 µl del cultivo a cada caja y se incubaron a 37°C por 18 h. Finalmente, se contaron las colonias blancas y azules y las colonias blancas se sembraron en una caja “master” donde cada una de las clonas se enumeró para su posterior análisis por restricción, previa extracción del DNA plasmídico por “Miniprep”.

## 7.7.-EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

Una colonia de bacterias se colocó en un tubo de vidrio estéril de 20 ml con tapa, que contenía 5 ml de medio LB con 5 µl de Ampicilina (100 mg/ml) y se incubó a 37°C durante 16-18 h en agitación a 200 rpm. Las bacterias se empastillaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, por centrifugación a 13,000 rpm por 2 min, se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 µl de la solución I (Apéndice) fría, se agitó hasta resuspender la pastilla. Enseguida, se agregaron 200 µl de la solución II recién preparada (Apéndice), se mezcló suavemente por inversión, después se agregaron 150 µl de Solución III fría (Apéndice), se mezcló suavemente por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. Posteriormente, se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 min a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se agregó un volumen igual de la mezcla de fenol-cloroformo 1:1, se agitó y se centrifugó de la misma manera que en el paso anterior. La fase superior se transfirió (sin tomar la interfase) a un tubo limpio, se agregaron 2 volúmenes de etanol al 100% frío y se dejó precipitar por 2 h a - 20 °C. Luego se centrifugó a 13 000 rpm durante 20 min a 4°C, la pastilla obtenida se lavó 3 veces con etanol al 70% frío y luego se secó a temperatura ambiente. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 50 µl de agua estéril bidestilada, después se agregó Ribonucleasa A (10 mg/ml) y se incubó por 1h. El DNA plasmídico obtenido se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1%, para determinar la calidad del DNA. La extracción de DNA plasmídico a gran escala (maxiprep) se hace 10 veces más.

## 7.8.-MAPA DE RESTRICCIÓN

El DNA plasmídico de cada una de las colonias candidatas se analizó por restricción con *Kpn I*, para linearizar y se incubó por 1 h a 37 °C . La enzima *Bstx I* se utilizó para liberar el inserto y la digestión se realizó a 55 °C por 1h. La enzima *BamHI*, se utilizó para conocer el sentido en el que se clonó el inserto y el DNA plasmídico se dejó digiriendo por 1h a 37 °C. Para confirmar que se trataba del gen *pfor a* se utilizó la enzima *Xho I*, ya que sólo cortará al gen *pfor a*, el cual contiene un sitio de corte en la secuencia de este gen y *pfor b* no tiene este sitio (**Fig. 8**).

## 7.9.-PURIFICACIÓN DE DNA POR GENE CLEAN (Q.BIOgene)

Para purificar DNA plasmídico de la clona que contiene el fragmento de 3,400 pb que codifica para la PFO A, obtenido del maxiprep, se partió de 100 µl de DNA plásmidico. Posteriormente, se agregó 3 volúmenes de NaI y se dejó a 50°C por 5 min, se agregaron 5 µl de “Glassmilk”, se agitó por 30 min, a temperatura ambiente. Se centrifugó a 13,000 rpm por 2 min, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla 3 veces con 500 µl de “New Wash”, por centrifugación a 13,000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. La pastilla se secó, se resuspendió en 100 µl de H<sub>2</sub>O estéril bidestilada, se incubó a 55°C por 10 min, se centrifugó a 13,000 rpm por 2 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendof t nuevo y se determinó la concentración de DNA en el espectrofotómetro.

### **7.10.-CONGELACIÓN DE CLONAS DE *E. coli* RECOMBINANTE**

La clona candidata se inoculó en 5 ml de medio LB con 5 µl de ampicilina (100 mg/ml) y se incubó en agitación (200 rpm) a 37° C por 18 h. Después, se agregó 4.5 ml de glicerol - LB (1:1) estériles, al tubo de cultivo de bacterias, se mezcló y se alicuotaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml estériles, en presencia de mechero. Posteriormente estos tubos se almacenaron a -70° C. Se guardaron cinco alicuotas con el nombre **PFOR7 (Tabla 3)**.

### **7.11.-SECUENCIACIÓN DE DNA**

Para confirmar que el producto de PCR clonado corresponde a la secuencia del gen *pfor a*, reportada por Hrdy y col., 1995 se realizó la secuenciación del DNA plasmídico de la clonas seleccionadas por el Método de Sanger (Sanger y col., 1977) con iniciadores universales (T7 promotor y M13 reverse) específicos para el vector PCR II-TOPO. La secuenciación se realizó con el secuenciador automático del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Posteriormente, se diseñaron oligonucleótidos específicos en ambos sentidos (**Tabla 2**), mediante el programa OLIGO 4 (MAC). La traducción teórica de la secuencia se realizó con el programa Translate tool (<http://us.expasy.org/>) (**Fig. 9**).

**Tabla 2.** Secuencia y ubicación de los oligonucleótidos diseñados para secuenciar la clona que contiene el gen *pfor a*

Nombre	Secuencia (5'-3')	Longitud. (nt)	Posición (aa)
PFOR25'	5' CAC CTC ACA ACT ATC CAC 3'	(18)	159-165
PFOR35'	5' GTT GCT GCT GCT CTC ATT GG 3'	(20)	344-351
PFOR33'	5'ATA GCT GTT TCA CCG CAT CC 3'	(20)	801-808
PFOR23'	5' TCC TTC TTA GCC TTT GTG 3'	(18)	1009-1015

## 7.12.-REAMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO PFO 2.9

Para reamplificar un fragmento de 2,900 pb, del gen *pfor a*. Se preparó una mezcla en un tubo Eppendorf de 0.5 ml con paredes delgadas. Esta mezcla contiene 1µl de Taq polimerasa (Perkin Elmer) 7.5 ùl, 9 ùl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 5 ùl de amortiguador de PCR (10x) y 1 ùl de deoxirribonucleótidos trifosfatados 10 mM (dATP, dTTP, dGTP y dCTP). A esta mezcla se le agregó 1.5 ùl del iniciador en sentido PFOA5' : 5'-GGA TCC CGG CAA GAG AAT TCC AGG AGA-3' que las primeras 9 bases son parte del sitio de corte para *BamHI* localizado entre los nucleótidos 15-36 y del iniciador antisentido PFOR3': 5' -CCC AAC CAT CAC CAC CGA CG-3' (1 ùl) (**Tabla 1**), localizado entre los nucleótidos 2849-2869. Como molde se utilizó 1 ùl de DNA plasmídico de la clona CNCD 188 PFOR A (0.7 ùl). Además, se agregó H<sub>2</sub>O estéril bidestilada para un volumen total de 50 ùl y 50 ùl de aceite de silicona. El control negativo que se preparó fue la misma reacción; pero sin DNA plasmídico. Las condiciones de PCR utilizadas fueron: Para desnaturalizar: 94°C por 2 min 1 ciclo, 35 ciclos de 94 °C 1 min, 53°C 35 seg, 72°C 4 min y las condiciones de extensión final a 72 °C 7 min 1 ciclo. Para visualizar los resultados, se corrió un gel

de agarosa al 1%, utilizando un amortiguador TAE 1× teñido con Bromuro de etidio al 0.5 mg/ml. Posteriormente se realizó un mapa de restricción en el que solo se utilizaron las enzimas *KpnI*, *BstxI* y *BamHI* siguiendo el protocolo anterior. Después se clono en el vector PCR II-TOPO. Se almacenaron a -70°C, con el nombre **PFO2.9 (Tabla 3)**.

### **7.13.-ANÁLISIS DEL DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS**

Para amplificar un fragmento de 3,400 pb sin el codón de inicio (ATG) y sin el codón de paro (TAA) del gen *pfor a*, se diseñaron otros oligonucleótidos, para subclonar el gen en el vector pET38b(+) de expresión ya que tiene la bandera para su purificación en el lado carboxilo.

### **7.14.-REAMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DE 3.4 kb SIN CODÓN DE PARO**

Para amplificar el gen de *pfor a*, se consideró el tamaño del gen y las temperaturas de fusión de los iniciadores diseñados para la desnaturalización, extensión e hibridación; así como también el número de ciclos suficientes para amplificar este gen de aproximadamente 3.4 kb, para establecer condiciones reproducibles. En un tubo Eppendorf estéril, con paredes delgadas, se colocó 1 µl de iniciador PFOA5': 5'-GGA TCC CGG CAA GAG AAT TCC AGG AGA-3' (1 µg/µg) (**Tabla 1**) y 1 µl de iniciador PFOA3': 5'-GCG GCC GCA TCT TCT TGT AGC CCT CGT AA-3' (1 µg/µl). Estos iniciadores ayudarán a amplificar el gen *pfor a* completo sin el codón de paro. Como control negativo se preparó una reacción de 50 µl sin DNA genómico, se puso una segunda reacción con el mismo volumen que la anterior a la cual se le agregó

1 µl de DNA genómico y una tercera a la cual se le adicionó 0.5 µl de DNA genómico (2.5 µg/µl). La mezcla de PCR contiene 1 µl de Taq Polimerasa (Perkin Elmer) 7.5 µg/µl, 9 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 5 µl de amortiguador para PCR (1x) y deoxirribonucleótidos trifosfatados 10 mM (dATP, dTTP, dGTP y dCTP) 1 µl. Las condiciones de PCR fueron: 94°C por 2 min, 1 ciclo, 35 ciclos de 94 °C 1 min, 65 °C 35 seg, 72°C 4 min y las condiciones de extensión final 72 °C 7 min 1 ciclo. Para visualizar los resultados, se corrió un gel de agarosa al 1%, utilizando el amortiguador TAE 1x. Después se clonó en el vector PCR II TOPO y la transformación se realizó en bacterias competentes (*E. coli* TOP 10). Posteriormente, se alicuotaron y se guardaron a -70°C y se rotularon con el nombre de **PFOs-TOPO (Tabla 3)**.

### **7.15.-SELECCIÓN DE CLONAS POR “PCR COLONY” ANIDADA**

Para seleccionar las clonas candidatas que contengan el fragmento de DNA de interés, se realizó una ‘PCR colony’ anidada, con un oligonucleótido PFOR3’ que se encuentra diseñado en la parte interna de la secuencia y el iniciador PFOA5’ (**Tabla 1**) con el objeto de reamplificar un fragmento de 2,900 pb. Se preparó una mezcla de reacción de PCR para 50 µl volumen final. Esta mezcla se le agregó 1.5 µl de cada uno de los iniciadores Taq polimerasa (Perkin Elmer) 7.5 µg/µl, 9 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 5 µl de amortiguador de PCR (10x) y 1 µl de deoxirribonucleótidos trifosfatados 10 mM (dATP, dTTP, dGTP y dCTP), además se agregó H<sub>2</sub>O para un volumen total de 50 µl, y también se agregó 50 µl de aceite de silicona en un tubo Eppendorf de 0.5 ml con paredes delgadas. Como control positivo se utilizó una porción de una colonia de bacterias que contiene el fragmento de 3.4 kb con codones de inicio y de paro que

codifica para el gen *pfor a*. El control negativo se preparó de la misma manera, pero sin templado. Se prepararon reacciones iguales que las anteriores excepto por que el templado utilizado fue una porción de cada una de las clonas. Las condiciones de PCR utilizadas fueron: 94°C por 2 min, 1 ciclo, después 35 ciclos de 94 °C 1 min, 53°C 35 seg, 72°C 4 min 35 ciclos y las condiciones de extensión final 72 °C 7 min 1 ciclo. Para visualizar los resultados, se corrió un gel de agarosa al 1%, utilizando un amortiguador TAE 1×. Para confirmar que la clona positiva por ‘PCR colony’ contiene el fragmento de interés, se realizó una extracción de DNA plasmídico (Miniprep) y posteriormente se realizaron digestiones con enzimas *KpnI*, *BamHI* y *BstxI*.

#### **7.16.-ANÁLISIS DE LOS DOMINIOS (motifs) EN EL GEN *pfor a***

Para determinar la presencia de dominios típicos de PFOR se realizó un alineamiento múltiple de la secuencia deducida en aminoácidos entre la nueva secuencia obtenida del aislado CNCD 188 de *T. vaginalis*, y con los genes ya reportados de *T. vaginalis* (**Fig.10**), así como con PFORs de bacterias y otros protozoarios (**Fig. 13**), para confirmar si los cambios encontrados afectan los dominios que caracterizan a la *pfor a*. Esta búsqueda se realizó por medio del programa Prosite (<http://us.expasy.org/>) en el cual se analizan cada una de las secuencias para saber el tipo y la posición de cada uno de los ‘motifs’. También se realizó un alineamiento entre las mismas secuencias pero en nucleótidos. Estas secuencias reflejarán mayores diferencias que desaparecen aunque en la traducción de los codones, ya que varios codifican para un mismo aminoácido. Por lo que existirían en menos cambios entre la PFOR a nivel de aminoácidos comparado con la secuencia en nucleótidos

### **7.17.-EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE *Trichomonas vaginalis***

La extracción de RNA total se realizó a partir del aislado CNCD 188. Los parásitos se crecieron en tres diferentes condiciones: normal, dipirilo y alto hierro. Para cada condición se cosecharon  $1.4 \times 10^8$  parásitos, se lavaron 2 veces con PBS pH 7.0, se centrifugaron a 1,800 rpm por 5 min a 4 °C y se lisaron por inversión con 7 ml de TRIzol (GIBCO BRL). Las muestras se dejaron incubando por 5 min a temperatura ambiente para permitir una disociación completa de complejos nucleoprotéicos. Enseguida, se agregó 0.2 ml de cloroformo y se mezcló por inversión durante 15 seg, se incubó a temperatura ambiente por 3 min y las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, se precipitó con 0.5 ml de alcohol isopropílico, se incubó a temperatura ambiente por 20 min, se centrifugó a 13,000 rpm durante 20 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Las pastillas de RNA se lavaron con 1 ml de etanol al 70%, se dejaron secando a temperatura ambiente y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O DEPC y se almacenaron a – 70°C. Finalmente se cuantificó por medio del espectrofotómetro.

### **7.18.-SÍNTESIS DE cDNA *T. vaginalis* (First- Strand cDNA Synthesis) PARA ENSAYOS DE RT-PCR.**

A partir de RNA total de parásitos crecidos en bajas, normales y altas concentraciones de hierro, se sintetizó el cDNA con el kit “SuperSript II RNasa H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase” (Stratagene). En un tubo Eppendorf de 1.5 ml se agregaron 5  $\mu$ g de RNA total, a cada tubo se le agregó 1  $\mu$ l de Oligo dT y H<sub>2</sub>O DEPC hasta completar 12  $\mu$ l de reacción, se desnaturalizó durante 10 min a 70°C y se enfrió rápidamente sobre hielo por 5 min. Durante los 5 min en hielo se agregaron 5  $\mu$ l de amortiguador 5 $\times$  “first

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

### 7.19.-RT-PCR

Para amplificar un fragmento de 1.1 kb del extremo carboxilo de la PFOR A se utilizó como templado 1 µl (1 µg) de cDNA de los aislados CNCD 188 y CNCD 147 de *T. vaginalis*, en diferentes condiciones de hierro: normal, dipirilo y alto hierro. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos PFOR5’ 5’ -GAA GAG GGC AAG AAC TGG GA-3’ ubicados en el sitio 2,277 al 2,299 y PFOA3’ 5’ -GCG GCC GCA TCT TCT TGT AGC CCT CGT AA-3’ (**Tabla 1**) diseñado del sitio 3,436 a 3,457, a una concentración de 10 pmol/l para amplificar un fragmento de aproximadamente 1.1 kb. Para cada condición se preparó una mezcla con 1.5 µl de los oligonucleótidos, 1 µl de Taq polimerasa (Invitrogen), 3 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 5 µl de amortiguador de PCR (10x), 1 µl de deoxirribonucleótidos trifosfatados 10 mM (dATP, dTTP, dGTP y dCTP), se agregó H<sub>2</sub>O para un volumen total de 50 µl y también se agregó 50 µl de aceite de silicona. El control negativo que contenía todos los componentes de la reacción, pero sin cDNA.

Como control de cantidad se amplificó un fragmento de 112 pb del gen para  $\beta$ -tubulina de *T. vaginalis* (Madico y col., 1998) con el iniciador en sentido BTUB9 (5'-CAT TGA TAA CGA AGC TCT TTA CGA T-3') diseñado de las bases 850 a 874 y en antisentido BTUB2 (5'-GCA TGT TGT GCC GGA CAT AAC CAT-3') diseñado de las bases 961 a 938. Las condiciones de PCR para *pfor a* fueron: 94°C por 2 min, 1 ciclo, 35 y 30 ciclos de 94 °C 1 min, 62°C 35 seg, 72°C 2 min y la extensión final a 72 °C 7 min 1 ciclo. Las condiciones de PCR para  $\beta$ tubulina fueron 94°C por 2 min, 1 ciclo, 25 ciclos de 94 °C 1 min, 48°C 1 min, 72°C 30 seg y la condición de extensión final a 72 °C 7 min 1 ciclo. Para visualizar los resultados, se corrió un gel de agarosa al 1%, en amortiguador TAE 1x. En la temperatura de alineamiento, se utilizaron diferentes números de ciclos debido a la gran diferencia obtenida en la primera RT-PCR realizada con 30 ciclos para el gen *pfor a*. Las amplificaciones de 1.1 kb de ambos aislados se clonaron en el vector PCRII-TOPO y se secuenciaron. Además de la selección por "PCR colony" se realizó un mapa de restricción solo para la clona no. 2 cortando con las enzimas *BamHI* y *Not I*, para linearizar y para liberar inserto respectivamente. Después el fragmento amplificado de los aislados CNCD 188 y CNCD 147 se clonaron en el vector PCR II TOPO, se encuentran almacenados a -70°C con el nombre de **PFO1.1 (Tabla 3)**.

**Tabla 3** . Lista de plásmidos obtenidos mediante clonación en el vector PCR II TOPO.

Nombre de la clona	# de alícuotas	Tamaño (kb)	Región de PFOR (nt)	Origen	Condición de crecimiento de <i>T. vaginalis</i>
PFOR /	5	3.4	Gen completo 1-3471	DNA genómico	Condiciones normales
PFO3.4s	10	3.4	Sin codón de inicio y de paro 15-3457	DNA plasmídico	-----
PFO1.1188	10	1.1	2277-3457	cDNA	Alto Fe <sup>2+</sup>
PFO1.1 147	10	1.1	2277-3457	cDNA	Alto Fe <sup>2+</sup>
PFO2.9	10	2.9	96-2964	DNA plasmídico	-----

## 7.20.-PURIFICACIÓN DE RNA poli A+

A partir de RNA de parásitos crecidos en diferentes concentraciones de hierro se obtuvo RNA poli A+ para ensayos tipo Northern. A una serie de tubos Eppendorf nuevos y estériles, se les agregó 70  $\mu$ g de RNA total a un volumen final de 600  $\mu$ l con TES (Tris-HCl 10 mM, pH 7.6; EDTA 1 mM, pH 7.5; SDS 0.1%). Los tubos se calentaron a 65°C por 10 min y después se enfriaron rápidamente hasta 0 °C en hielo, se agregaron 75  $\mu$ l de NaCl 5 M a cada muestra y 50 mg de "Oligo dT Celulose" (Invitrogen, capacidad de unión: > 60.0 OD unidades/g) equilibrado con el amortiguador de lavado de absorción (TES con NaCl 0.5 M ) y los tubos se incubaron en agitación suave a temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente, se centrifugaron a 2500 rpm por 2 min en una microcentrífuga a temperatura ambiente, el sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y se incubaron en hielo. A las pastillas de oligo dT remanentes se les agregó 1 ml de amortiguador de lavado de absorción, se mezcló por inversión, los tubos se incubaron por 2 min en agitación a temperatura ambiente, se desecharon los sobrenadantes y las pastillas de Oligo dT remanentes se les dio el mismo tratamiento dos veces. Las pastillas de Oligo dT se resuspendieron en 0.4 ml de agua DEPC y los tubos se centrifugaron por 2 min a 4°C. El sobrenadante se removió y el RNA poli A+ se recuperó resuspendiendo las pastillas de Oligo dT en 0.4 ml de agua DEPC e incubando por 5 min a 55°C y después centrifugando los tubos por 2 min a 4°C. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos y el tratamiento para recuperar el RNA poli A+ se repitió 2 veces. Para precipitar el RNA poliA(+) de los sobrenadantes, se agregaron 0.2 volúmenes de acetato de amonio (10 M) y 2.5 volúmenes de etanol y se incubó a -20°C por 1h. El RNA poliA+ se recuperó por centrifugación a máxima

velocidad por 15 min en una microcentrífuga a 4°C, las pastillas se lavaron con etanol al 70%, se secaron al aire y se resuspendieron en 10 ìl de agua DEPC.

### **7.21.-MARCAJE RADIOACTIVO DE SONDAS DE DNA**

El fragmento de DNA purificado (200 ng) de DNA se desnaturalizaron a 100°C por 5 min e inmediatamente se transfirieron a hielo. Mientras tanto, se preparó 1 ìl de dCTP 500 ìM, 1 ìl de dGTP 500 ìM, 1 ìl de dTTP 500 ìM, 20 ìl de la solución "Random primer" (Gibco) 2.5 ×, 5 ìl de  $\alpha$ -P<sup>32</sup> dATP (3000 Ci/mmol Amersham) y agua destilada para completar un volumen de 49 ìl. A esta mezcla se le agregó el DNA desnaturalizado, se adicionó 1 ìl de la enzima Klenow (40 U/ìl), se mezcló suavemente, se centrifugó 30 seg y se incubó 1 h a 37 °C. A continuación, se adicionaron 5 ìl de la solución de paro (Gibco-BRL), se agregaron 145 ìl de amortiguador TE pH 8.0 y se mezcló suavemente. Enseguida, se tomó 1 ìl de la mezcla anterior el cual se colocó en líquido de centelleo (como control inicial) para cuantificar la cantidad de radiactividad total en un contador de centelleo (canal P<sup>32</sup>). Para eliminar la marca libre, 199 ìl de la reacción se pasaron por una columna de Sephadex G-50 de 1 ml, se tomó nuevamente 1 ìl de esta solución y se colocó en 3 ml de líquido de centelleo (control final) y se cuantificó la cantidad de radiactividad incorporada y no incorporada en un contador de centelleo (canal P<sup>32</sup>).

### **7.22.-ENSAYO TIPO NORTHERN BLOT**

El RNA poliA(+) del aislado CNCD 188 en 3 condiciones de hierro purificado se separó por tamaño molecular en un gel de agarosa-formaldehído al 1.0%. Las muestras de 3.5 ìg de RNA poli A(+), se prepararon con tres volúmenes de

amortiguador de muestra 6× (Apéndice) y 1 ì l de bromuro de etidio ( 0.5 mg/ml), se mezclaron bien y se incubaron a 65 °C por 15 min. Inmediatamente después, los tubos se colocaron sobre hielo y se cargaron en el gel de agarosa-formadeldhído al 1% , el cual se corrió a 40 V por 3 h. Se tomó la foto del gel en el transiluminador y con una regla para luz UV (con los ceros a la altura de los pozos).

La transferencia del RNA a membranas de nylon se realizó por capilaridad. Para ello, el gel se colocó en agua tratada con DEPC, después en SSC 20× y se dejó en agitación muy lenta por 40 min. El papel filtro (24 x 11 cm) se humedeció en SSC 20×, se colocó en la cámara de transferencia (previamente desinfectada con benzal 1:1, toda la noche), se colocó el SSC 20× en la parte inferior de la cámara; se colocó otro pedazo del papel filtro (del tamaño del gel) previamente humedecido, se retiraron las burbujas utilizando un tubo cónico estéril nuevo (deslizándolo sobre el papel) y se colocó el gel con los pozos hacia abajo (se le corta la esquina izquierda antes del pozo). Enseguida, se colocó la membrana de nylon (Zeta-Probe, Bio-Rad) del tamaño del gel (previamente humedecida en SSC 20×), se colocó otro trozo de papel filtro del tamaño del gel (previamente humedecido en SSC 20×) y se colocaron cuatro pedazos de “parafilm” para que las sanitas no absorbieran el material de la membrana. Finalmente, la pila de sanitas se colocó encima del gel, se puso 1.5 kg toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se retiraron las sanitas, los filtros en la membrana de nylon, se marcaron los pozos del gel con una pluma, se identificó la parte marcada de la izquierda, la membrana se lavó con SSC 2×, se dejó secar por 1 h a temperatura ambiente sobre papel filtro seco y se fijó por 30 seg con luz UV (12,000 Joules) en el entrecruzador de UV (UVP).

Enseguida, la membrana de prehibridó durante 2 h a 42 °C con 10 ml de solución de prehibridación (Apéndice). Después, la membrana se hibridó con 2 sondas marcadas radiactivamente una del fragmento 1.1 kb del gen *pfor a* amplificado de cDNA del aislado 188 en altas concentraciones de  $Fe^{2+}$  y un fragmento de *̂tubulina* (112 pb) como control de cantidad (previamente marcadas con  $\alpha P^{32}$ -ATP) por 18 h a 42 °C. A continuación, la membrana se lavó dos veces con SSC 2 $\times$ , 0.5% de SDS durante 30 min a 42 °C y la autoradiografía se realizó por exposición de la membrana de nylon sobre película X- Omat KXX-1 de Kodak por 48 h a -70 °C (**Fig. 22**).

### **7.23.-ANÁLISIS *IN SÍLICO* DEL GENOMA DE *T. vaginalis* EN BUSCA DE OTROS GENES *pfor***

Estos análisis se realizaron por medio de la herramienta CLUSTAL W (<http://workbench.sdsc.edu/>) para realizar los alineamientos, comparar secuencias y construir dendrogramas. La secuencia de 1.1 kb del aislado 188 obtenida de manera experimental se utilizó como sonda para la búsqueda de otras secuencias que codifiquen para genes PFOR en la secuencia del genoma TIGR de *T. vaginalis* (The *Trichomonas vaginalis* Genome Sequencing Project) (**Fig. 23**).

## **8.-RESULTADOS**

### **8.1.-AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN CONSERVADA**

El DNA genómico utilizado como templado para la amplificación del gen *pfor a*, primeramente se probó en la amplificación de un fragmento de la región conservada de CPs de *T. vaginalis*. En la **Figura 6** se observó que el DNA genómico de *T. vaginalis* amplificó el fragmento de 570 pb (**línea 3**), correspondiente al tamaño esperado con las condiciones de PCR preestablecidas para CPs de tipo papaína. En el control de reacción, sin molde no se observó amplificación (**línea 2**).

### **8.2.-AMPLIFICACIÓN POR PCR PARA EL GEN *pfor a***

Para la amplificación del gen *pfor a* por PCR se utilizaron dos concentraciones de DNA genómico, con los iniciadores PFDA5' y PFOA REV. Cuando se utilizó la menor concentración de DNA (2.1µg/µl) se obtuvieron 2 productos uno de 3,400 pb y otro de 600 pb (Fig.7, línea 4), de este último se desconoce su relación con *pfor a*. Con el doble de concentración de DNA (4.3 µg/µl) se produjo un barrido (**Fig. 7, línea 3**). En el control sin DNA no se obtuvo amplificado alguno (**Fig.7 línea 2**).

### **8.3.-CLONACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR DEL GEN *pfor a***

La amplicón de 3.4 kb se clonó en el vector PCRII-TOPO se obtuvieron 42 colonias blancas y 4 azules las cuales se analizaron por restricción del DNA plasmídico en geles de agarosa al 1% en TAE 1× (datos no mostrados). Solo el DNA plasmídico

linearizado de la clona no. 7 mostró un fragmento de mayor tamaño 7,355 pb (**Fig. 8, línea 3**) respecto al plásmido control (3,900) (**Fig. 8, línea 2**).

Para comprobar que la clona no. 7 contiene el fragmento de DNA clonado correspondiente al gen *pfor a*, se realizaron digestiones con diferentes enzimas de restricción para obtener un mapa y compararlo con el mapa teórico de la secuencia del gen reportado (Hrdý y Muller, 1995). Con la enzima *BstxI* se obtuvieron 3 fragmentos de 3,907, 2,588 y 910 pb (**Fig. 8, línea 5**). Con la enzima *BamHI* para confirmar el sentido en que el fragmento de DNA se clonó, ya que tanto el vector como el iniciador (PFDA5') contiene un sitio de restricción para esta enzima (**línea 4**).

Para confirmar que se trataba del gen *pfor a* se utilizó la enzima *Xho I*, la cual generó fragmentos de 4,610 y 2,795 pb (**línea 6**). Esta enzima en particular sirve para diferenciar entre el gen *pfor a* y *pfor b*, que aunque las secuencias de estos 2 genes conservan identidad del 95%, el gen *pfor b* no tiene sitio de corte para esta enzima. Este mapa de restricción nos permitió corroborar que el fragmento clonado en este vector corresponde al gen *pfor a* y que no está direccionado en el vector PCR II-TOPO.

**Figura 6. Amplificación por PCR de un fragmento de DNA de la región conservada de cisteín proteinasas de *T. vaginalis*.** Amplificación de un fragmento de 570 pb a partir de DNA genómico obtenido del aislado CNCD 188 de *T. vaginalis*, con iniciadores para la región conservada de las CPs. Carril 1: Marcadores de 100 pb. Carril 2: Control de reacción sin DNA genómico. Carril 3: Reacción con DNA genómico.

**Figura 7. Amplificación del gen *pfor a* por PCR.** La reacción de PCR se realizó con diferentes concentraciones de DNA del aislado CNCD 188 de *T. vaginalis*. Carril 1: Marcadores  $\phi$ -Hind III. Carril 2: Control de reacción sin DNA genómico. Carril 3: reacción de PCR con 4.3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de DNA genómico. Carril 4: Reacción de PCR con 2.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de DNA genómico. Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa al 1% en TAE 1 $\times$ , obteniéndose fragmentos de 3471 y 600 pb.

**Figura 8. Mapa de restricción de la clona candidata.** Digestión de DNA plasmídico de la clona que contiene el inserto de 3.4 kb. A) Los productos se separaron en un gel de agarosa al 1% en TAE 1×. Carril 1: Marcadores  $\lambda$  *Hind III*. Carril 2: DNA plasmídico del vector PCRII-TOPO utilizado como control, linearizado con *KpnI* Clona azul utilizada como Control, que da un fragmento del tamaño del vector 3,900 pb. Carril 3: Digestión con *Kpn I* de la clona candidata. Carril 4: Digestión con la enzima *BamHI*. Carril 5: Digestión con la enzima *BstxI*. Carril 6: Digestión con *Xho I*. Carril 7: Marcadores de 100 pb. B) Esquema representando el mapa de restricción del gen *pfor a*, donde se muestran la posición de las enzimas utilizadas a escala.

#### **8.4.-SECUENCIACIÓN DEL GEN *pfor a* DEL AISLADO CNCD 188 Y SU ANÁLISIS COMPARATIVO CON *pfor a*.**

El fragmento de DNA de 3,471 pb, amplificado a partir del DNA del aislado CNCD 188 de *T. vaginalis* correspondiente al gen *pfor a* se secuenció por el método de Sanger (Sanger, 1977). La secuencia de DNA de 3,471 nucleótidos se analizó en el BLAST, en el cual la nueva secuencia codifica para 1157 aminoácidos (**Fig. 9**) del mismo tamaño que el gen *pfor a* ya reportado.

Enseguida, se realizó un alineamiento múltiple en aminoácidos y en nucleótidos con ayuda del programa CLUSTAL W (<http://workbench.sdsc.edu/>). Este alineamiento se hizo entre los genes *pfor a* y *pfor b* ya reportados y la nueva secuencia *pfor a* del aislado CNCD 188 a nivel de DNA y proteína (**Fig. 10 y 11**). Los datos obtenidos confirman que las secuencias tienen una homología del 99% y un identidad del 98% con PFOR A de *Trichomonas vaginalis* ya reportada. A nivel de DNA se observaron más diferencias como lo son en los sitios 336, 1389, 3072, 3462 y 3465 en nucleótidos presentando una homología del 98% y un identidad del 97% del gen *pfor a* CNCD 188 amplificado con respecto al gen *pfor a* reportado (**Fig. 10**). A nivel de proteína, solo se observaron 5 cambios entre la PFO A y PFOR A CNCD 188 las posiciones 112, 463, 1024, 1154 y 1155 (**Fig. 11**).

Al observar el alineamiento múltiple el cambio que confirma diferencias reales entre la nueva secuencia y los genes ya reportados se encuentra en la posición 1024, R por K debido a que este cambio coincide con la K del gen *pfor b*, confirmando así que este cambio es parte de la nueva secuencia. Sin embargo cuatro de los cambios

presentados aún no se confirman, ya que no se ha encontrado una secuencia idéntica en el genoma de *T. vaginalis* (**Fig 11**).

**Figura 9. Secuencia en nucleótidos y aminoácidos del gen *pfora* del aislado CNCD**

**188.** Secuencia del gen completo obtenida a partir de DNA genómico. En color se muestra los oligonucleótidos utilizados para amplificar y secuenciar este gen. ↑

PFDA5' y PFOA REV ↑ PFOA5' y PFOA3' ↑ PFOR25' y PFOR23' ↑ PFOR35' y PFOR33' ↑ PFOR5' y PFOR3'.

**Figura 10. Alineamiento múltiple en nucleótidos de las diferentes secuencias de los genes *pfor* de *T. vaginalis*.** Alineamiento entre las diferentes secuencias de los genes *pfor* por medio del programa CLUSTAL W (<http://workbench.sdsc.edu/>).

Cambios en la secuencia del gen *pfor a* del aislado CNCD 188 con respecto a los genes reportados. Cambios en la secuencia del gen *pfor a* del aislado 188 que comparte con *pfor b*.

**Figura 11. Alineamiento múltiple en aminoácidos de las diferentes PFOR de *T. vaginalis*.** Alineamiento entre las diferentes secuencias de PFOR por medio del programa CLUSTAL W (<http://workbench.sdsc.edu/>). Cambios en la secuencia de PFOR A del aislado CNCD 188 con respecto a los genes reportados. Cambios en la secuencia de PFOR A del aislado 188 que comparte con PFOR B.

## 8.5.-ANÁLISIS DE LOS DOMINIOS (motifs)

Enseguida, se realizó un análisis por alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de PFOR de *T. vaginalis*, ya reportadas con la nueva secuencia obtenida del aislado CNCD 188. Los productos de los genes *pfor a* y *pfor b* de *T. vaginalis* y la secuencia del gen *pfor a* CNCD 188 muestran un tamaño de 1157 aa (**Fig. 12**). Los dominios típicos que identifican una PFOR son dos ‘Cluster Fe-S’, localizados en los sitios 695 al 707 y 752 al 763 en las PFOR reportadas y el sitio de unión a Tiamina Pirofosfato localizado entre los residuos 976 al 979. Además, se ha demostrado que es una proteína glicosilada y que puede presentar sitios de fosforilación, la estructura de los dominios se muestra en la **Tabla 4**.

En cuanto a los segmentos transmembranales hay grandes diferencias. En especial que en el caso de las secuencias de los genes de PFOR encontrados en este trabajo para *T. vaginalis* con respecto a la nueva secuencia en esta desaparece un segmento transmembranal en el sitio 110 y 127 aa (**Fig. 12**).

Se comparó la PFOR-A CNCD 188 con PFOR de bacterias anaerobias (*Clostridium pasterianum*, *Termotoga tengconge* y *Desulfovibrio africanus*) y protozoarios amitocondriados como *E. histolytica* (**Fig. 13**). Cada uno de los dominios y sitios de posibles modificaciones post-traduccionales (**Tabla. 4**) se ubicaron en las secuencias de acuerdo a la posición en la que se encuentran.

Después se identificaron las diferencias entre las PFORs, como: el tamaño de las secuencias deducidas de aminoácidos, en bacterias como *D. africanus* tiene un tamaño de 1232 aa, *C. pasterianum*, y *T. tengconge* presentan un tamaño muy similar de 1175 y 1173 aa respectivamente (**Fig. 13**). En el protozooario amitocondriado *E. histolytica*, tiene un tamaño de 1165 aa. Por lo que las PFOR de otros organismos son mas grandes con respecto a la PFOR A de *T. vaginalis*, tomando como ejemplo el nuevo gen descrito en este trabajo.

Al realizar esta comparación nos pudimos dar cuenta que los 2 “Cluster Fe-S” en todos los organismos incluyendo bacterias, se encuentran en la misma posición al igual que el sitio de unión a Tiamina pirofosfato (**Fig. 13**). Hay diferencias en cuanto al número de sitios de glicosilación, segmentos transmembranales y fosforilación. Por ejemplo *C. pasterianum* presenta 7 sitios de glicosilación, *T. tengconge* y *D. africanus* solo tienen 4, *E. histolytica* solo tiene 3. Las PFORs de *T. vaginalis* tienen 5 sitios de glicosilación incluyendo la secuencia obtenida del aislado CNCD 188 en la cual los cambios con respecto a los genes reportados no influyen (**Fig. 13**). Esto sucede con los segmentos transmembranales ya que *T. tengconge*, *C. Pasteurianum* solo tienen 1, *D. africanus* tiene 4, *E. histolytica* solo tiene 3 y la PFOR A CNCD 188 de *T. vaginalis* solo tiene 2. Cabe aclarar que 3 de los diferentes organismos (*E. histolytica*, *D. Africanus* y *T. vaginalis*) que 1 segmento transmembranal se presenta en la misma posición.

En cuanto a los sitios de fosforilación, el número y la posición es muy diversa entre bacterias y protozoarios; pero en cuanto a la comparación entre los genes de *T. vaginalis* ya reportados y la nueva secuencia no hay diferencias, los cambios ya antes

señalados no modifican estos dominios. Aunque uno de ellos de ve modificado en un aminoácido, el cual no altera el dominio de fosforilación que se encuentra en el sitio 112 **(Fig. 13)**.

**Tabla 4.** Características de los “motifs” encontrados en las secuencias de *T. vaginalis*

Nombre	“Motif”	Tamaño (aa)	Función
N- glicosilación	N-{P}-[ST]-{P}	4	Sitio de unión de un azúcar en el nitrógeno amida de residuos Asn
Proteína cinasa C	[ST]-x-[RK]	3	Sitios de unión para proteínas de señal intracelular, forman parte del receptor (PKC). Fosforilan en serina o treonina.
Caseína cinasa II	[ST]-x (2) –[DE]	4	Sitios de unión para proteínas de señal intracelular, fosforilan en serina o treonina
Tirosina cinasa	[RK] - x (2,3) – [DE] –x (2,3) -Y	8-9	Sitios de unión a proteínas de señal intracelular, que se fosforilan en una tirosina (forman parte del receptor RTK).
Tiamina pirofosfato	GDG	3	Grupo prostético sitio de unión a cluster Fe-S (cofactor)
Sitio de unión citocromo c	C - {CPWHF} - {CPWR} – C - H - {CFYW}	6	Sitio de unión para el complejo de transporte de electrones
Segmentos transmembranales	Aminoácidos hidrofóbicos	Variable	Sitios de unión a membrana. Para proteínas integrales o de superficie.
Cluster 4Fe- 4S	C - x (2) - C - x (2) - C – x – (3) - C - [PEG]	12	Sitios iniciadores de la cadena transportadora de electrones

**Figura 12. Comparación de los motifs de las PFOR-A de *T. vaginalis*.** Las secuencias de aminoácidos de las diferentes PFOR reportadas y la obtenida en este trabajo se sometieron a un análisis por medio del programa Prosite (<http://us.expasy.org/>). Además se presenta el tamaño de cada una de las PFOR y la simbología utilizada para ubicar cada uno de los “motifs”.

**Figura 13. Comparación de los “motifs” de PFOR de diversos organismos.** Las secuencias de aminoácidos de diversos organismos *Clostridium pasteurianum*, *Termotoga tengconge*, *Desulfovibrio africanus*, *Entamoeba. histolytica* y *Trichomonas vaginalis* se sometieron a un análisis por medio del programa Prosite (<http://us.expasy.org/>). Además se presenta el tamaño de cada una de las PFOR y la simbología utilizada para ubicar cada uno de los “motifs”.

## 8.6.-EXPRESIÓN DEL GEN *pfor a* (CNCD 188) EN DIFERENTES CONDICIONES DE HIERRO

Dado que la PFOR de *T. vaginalis* se regula positivamente por hierro a nivel de proteínas se procedió a analizar la expresión del gen *pfor a* CNCD 188 al nivel de transcripción por RT-PCR. Para ello se utilizó RNA total de los aislados CNCD 188 y CNCD 147 crecidos en bajo, normal y alto hierro; se obtuvieron los siguientes concentraciones  $D = 4.7 \times 10^{-1}$  |  $N = 2.937 \times 10^{-1}$  |  $Fe = 3.047 \times 10^{-1}$ .

Solo en altas concentraciones hierro se obtuvo un fragmento de 1.1 kb del gen *pfor a* de los aislados CNCD 147 y CNCD 188 cuando se utilizaron 30 ciclos de amplificación (Figs. 14Aa y 15Aa). Al aumentar a 35 ciclos de amplificación se observó el fragmento de 1.1 kb aunque muy débil en bajo hierro. Estas diferencias se confirmaron por densitometría, fue más intenso en normal y la cantidad se duplicó en alto  $Fe^{2+}$  (Figs. 14Ab y 15Ab). Este comportamiento fue similar en ambos aislados (Figs. 14B y 15B). Estos resultados muestran que hay un gen tipo *pfor a* que se transcribe mejor en parásitos crecidos en alto hierro. Como control de cantidad se utilizó el amplificado del gen de  $\alpha$ -tubulina (FigAc y 16 Ac).

Se clonaron los fragmentos de 1.1kb de ambos aislados de *T. vaginalis* en el vector PCRII-TOPO, la manera en que se seleccionaron las clonas, fue por ‘PCR colony’ y posteriormente el DNA plasmídico se corto con BamHI para linearizar y con la enzima *Not I*, tanto para el aislado CNCD 147 y CNCD 188 se observa un amplificado de 1.1 kb en las clonas 1-4 y no en la 5, en la cual nos dice que no hay inserto (Figs. 16A y 17A).

De las clonas que se analizaron y resultaron positivas se escogió la no. 2, de la cual se cortó el DNA plasmídico con *Bam*HI se observa una banda de 5, 100 pb, para linearizar y para liberar inserto con *Not*I observándose la banda correspondiente al vector 3,900 y la banda de 1,100 pb del fragmento amplificado por RT-PCR (**Figs. 16B y 17B**).

### **8.7.-SECUENCIACIÓN DEL FRAGMENTO 1.1 kb**

Los fragmentos de 1.1 kb de *pfor* amplificados por RT-PCR a partir del RNA obtenido de los aislados CNCD 188 y CNCD 147 de *T. vaginalis* crecidos en altas concentraciones de hierro, se clonaron en el vector PCR II TOPO (**Figs. 16 y 17**). Se secuenciaron por el método de Sanger utilizando los oligonucleótidos universales M13 y T7. La secuencia de DNA de los fragmentos de 1.1 kb de *pfor* de ambos aislados corresponde al gen de la PFOR A y solo presentaron 6 cambios (**Figs. 18 y 19**). De estos 6 cambios 3 corresponden a los ya reportados en el gen *pfor* a de CNCD 188; dos solo se observaron en el fragmento de 1.1 kb del aislado 147 y uno es exclusivo del fragmento de 1.1 kb del aislado CNCD 188. Las secuencias deducidas de aminoácidos mostraron 2 cambios del aislado CNCD 147 en las posiciones 1014 y 1027 de K por E y I por T en la secuencia deducida de aminoácidos y 2 cambios del aislado CNCD 188 en las posiciones 1104 y 1024 de R por K y T por I con respecto a la PFOR A reportada. Esto podría deberse a la variabilidad de aislado aunque todavía no se conoce la secuencia de este gen hacia el extremo amino (**Fig. 19**).

A partir del alineamiento múltiple tanto en nucleótidos como en secuencia deducida en aminoácidos entre las PFORs reportadas y las obtenidas experimentalmente se construyó un dendrograma para cada alineamiento (**Figs. 20 y 21**) y se observó que

los genes de *pfor* de *T. vaginalis* se separan en 3 grupos distintos: el primer grupo lo constituye la secuencia obtenida a partir de DNA genómico del aislado CNCD 188 que es comparado con un subgrupo constituido por el gen *pfor a* reportado y por el fragmento del aislado CNCD 188 obtenido de cDNA en altas concentraciones de hierro. El segundo grupo, aunque con una mayor distancia entre los grupos, está formado por la secuencia que codifica para el gen *pfor b* reportado. El tercer grupo está compuesto por la secuencia del fragmento del aislado CNCD 147 obtenido a partir de cDNA en altas concentraciones de hierro (**Fig. 20**).

Sin embargo, cuando este mismo alineamiento se realiza con la secuencia deducida de aminoácidos de las diferentes PFORs de *T. vaginalis*, la estructura del dendrograma es distinta ya que como se mencionó anteriormente existen menos diferencias (**Fig. 21**). Se siguen estructurando 3 grupos en los que la secuencia obtenida de DNA genómico del aislado CNCD 188 tiene similitud con la secuencia del fragmento de 1.1 kb obtenido de cDNA del aislado CNCD 147. Un segundo grupo lo integra los genes ya reportados *pfor a* y *pfor b* aunque entre ellos se marca una gran diferencia. El tercer grupo lo integra la secuencia del fragmento 1.1 kb obtenido de cDNA del aislado CNCD 188 (**Fig. 21**).

**Figura 14. Amplificación por RT-PCR del fragmento de 1.1 kb del aislado CNCD 147 de *T. vaginalis*.** Como molde se utilizó cDNA sintetizado a partir de RNA total de parásitos crecidos en diferentes concentraciones de hierro. Como control de cantidad se utilizó el gen de *β tubulina* para obtener un fragmento de 112 pb. Los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 1% en TAE 1×. Panel A: Amplificación en las 3 condiciones de hierro del aislado CNCD147, a) Amplificación del fragmento de 1.1 kb de *pfor a*, con 30 ciclos. b) Amplificación del fragmento de 1.1 kb de *pfor a*, con 35 ciclos. c) control de cantidad, (*β tubulina*). B) Representación gráfica de la cuantificación de la intensidad de las bandas de los fragmentos amplificados, en las 3 condiciones de hierro comparados con el control de cantidad con el programa Quantity One.

**Figura 15. Amplificación por RT-PCR del fragmento de 1.1 kb del aislado CNCD 188 de *T. vaginalis*.** Como molde, se utilizó cDNA sintetizado a partir de RNA total de parásitos crecidos en diferentes concentraciones de hierro (0, 20 y 250  $\mu$ M) el cual se utilizó como molde para la PCR. Como control de cantidad se utilizó el gen de  *$\alpha$  tubulina* para obtener un fragmento de 112 pb. Los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 1% en TAE 1 $\times$ . Panel A: Amplificación en las 3 condiciones de hierro del aislado CNCD 188, a) Amplificación del fragmento de 1.1kb de *pfor a*, con 30 ciclos. b) Amplificación del fragmento de 1.1 kb de *pfor a*, con 35 ciclos. c) control de cantidad, ( *$\alpha$  tubulina*). B) Representación gráfica de la cuantificación de la intensidad de los fragmentos amplificados, en las 3 condiciones de hierro comparados con el control de cantidad, por medio del programa Quantity One.

**Figura 16. Selección por “PCR colony”.** Las clonas analizadas que contienen el fragmento 1.1 del aislado 147 que se expresa en altas concentraciones (0, 20, 250  $\mu$ M) de hierro. **A)** gel de agarosa al 1% en TAE IX. M: Marcadores  $\Phi$ -Hind III. Carril (-): Control de reacción sin templado. Carril (+): Amplificación del control positivo utilizando DNA plasmidico del gen *pfor a*, utilizandose los oligonucleóidos PFOR5' y PFOA3'. Carril 1-4: Amplificación de un fragmento de 1.1 kb utilizando una porcion de la clona correspondiente. Carril 5: colonia que no amplificó por PCR. **B)** Restricción de la clona 2 que se reamplifico por “PCR Colony”. Carril 1: Marcadores  $\Phi$ -Hind III. Carril 1: Restricción de la clona Azul con *BamHI*. Carril 2: Restricción de la clona 2 con *BamHI*, para linearizar. Carril 3: Restricción de la clona 2 para liberar inserto con *Not I*.

**Figura 17. Selección por “PCR colony”.** Las clonas analizadas que contienen el fragmento 1.1 kb del aislado CNCD 188 que se expresa en altas concentraciones de hierro (250 mM). **A)** gel de agarosa al 1% en TAE 1×. M: Marcadores  $\Phi$ *Hind III*. Carril (-): Control de reacción sin templado. Carril (+): Amplificación del control positivo utilizando DNA plasmídico del gen *pfor a*, utilizándose los oligonucleotidos PFOR5' y PFOA3' . Carril 1-4: Amplificación de un fragmento de 1.1 kb utilizando una porción de la clona correspondiente. Carril 5: colonia que no amplificó por PCR. **B)** Restricción de la clona 2 que se reamplificó por “PCR Colony”. Carril 1: Marcadores  $\Phi$ *Hind III*. Carril 1: Restricción de la clona Azul con *BamHI*. Carril 2: Restricción de la clona 2 con *BamHI*, para linearizar. Carril 3: Restricción de la clona 2 para liberar inserto con *Not I*.

**Figura 18. Alineamiento entre los fragmentos de 1.1 kb con las PFOR reportadas en nucleótidos de *T. vaginalis*.** Alineamiento múltiple entre las diferentes secuencias de pfor utilizando el programa CLUSTAL W (<http://workbench.sdsc.edu/>).

◆ Cambios de la secuencia PFOR A (188) ▼ Cambios en la secuencia del fragmento 1.1 kb del aislados CNCD 147 ★ Cambios en las secuencia del fragmento de 1.1 kb del aislado CNCD 188.

**Figura 19. Alineamiento entre los fragmentos de 1.1 kb con las PFOR deducidas de aminoácidos de *T. vaginalis*.** Alineamiento múltiple entre las diferentes secuencias de PFOR utilizando el programa CLUSTAL W (<http://workbench.sdsc.edu/>).  Cambios de la secuencia PFORA del aislado CNCD 188.  Cambios en la secuencia del fragmento 1.1 kb del aislado CNCD 147.  Cambios en la secuencia del fragmento de 1.1 kb del aislado CNCD 188.

**Figura 20. Dendrograma para 5 secuencias que codifican para *pfor* de *T. vaginalis* .**

El dendrograma construido con la secuencia en nucleótidos de los fragmentos 1.1 kb localizados en el sitio 2279-3457 de los dos aislados CNCD 147 y CNCD 188, la nueva secuencia del gen completo del aislado CNCD 188 y los genes ya reportados usando el programa CLUSTAL W (<http://workbench.sdsc.edu/>).

**Figura 21. Dendrograma para 5 secuencias que codifican para *pfor* de *T. vaginalis*.**

El dendrograma fue construido con la secuencia deducida de aminoácidos de los fragmentos 1.1 kb localizados en el sitio 759- 1153 de dos aislados CNCD 147 y CNCD 188, la nueva secuencia de PFOR A completa del aislado CNCD 188 y las secuencias de las proteínas ya reportados, usando el programa CLUSTAL W (<http://workbench.sdsc.edu/>).

## 8.8.-ENSAYO TIPO NORTHERN BLOT

En el ensayo de Northern blot se observó un patrón similar al de la RT-PCR, solo se detectó el transcrito de 4.2 kb en el RNAm de parásitos crecidos en alto hierro (**Fig. 22**). A pesar de que en el gel teñido con Bromuro de Etidio se observó una cantidad similar en las 2 condiciones de hierro (Datos no mostrados). El transcrito es de mayor tamaño que los genes de PFOR ya reportados y el nuevo descrito aquí de 3.4 kb.

## 8.9.- ANÁLISIS *IN SILICO* DEL GENOMA DE *T. vaginalis* EN BUSCA DE OTROS GENES *pfor a*.

Al realizar una búsqueda *in silico* en el banco de *T. vaginalis* (The *Trichomonas vaginalis* Genome Sequencing Project, TIGR), utilizando como sonda la secuencia que codifica para el fragmento de 1.1 kb obtenido a partir de cDNA del aislado CNCD 188, se encontraron diferentes clonas además de las ya reportadas. Una de ellas que tiene un 86% de homología con el fragmento de 1.1 kb, se puede ubicar con el no. de contiguo 1055608 la cual tiene un tamaño de 50,315 bases. Esta secuencia se encuentra entre los nucleótidos 2,615 y 5,315 correspondiente a un marco de lectura abierto de 3471 pb que codifica para 1157 aa, tiene el mismo tamaño que los genes de *pfor a* y *pfor b* ya reportados. En la secuencia amino terminal presenta algunas diferencias en algunos aa con respecto a PFOR A y PFOR B. En esta misma búsqueda se encontraron otras secuencias que muestran una homología del 61% y 63% con respecto al fragmento de 1.1 kb. La secuencia con el 61% de homología, se puede ubicar en el contiguo no. 1055608, de un tamaño de 36,775 pb. Esta secuencia se encuentra entre los nucleótidos 7046 y 3515 correspondiente a un marco de lectura abierto de 1189 aa. En cambio la

secuencia que tiene 63% de homología con respecto al fragmento de 1.1 kb, el contiguo no. 1055704 tiene un tamaño de 25,647 bases. Esta secuencia se encuentra entre los nucleótidos 2181 y 5822 correspondiente a un marco de lectura abierto de 1213 aa. Al hacer la comparación de la PFOR A CNCD 188 con los “motifs” de las nuevas secuencias tipo PFOR se observó que las clonas con 86 y 63% de homología, comparten 2 “cluster Fe-S” en la misma posición, el dominio de unión a tiamina pirofosfato, un sitio de fosforilación para caseína cinasa II, para tirosina cinasa y uno sitio de glicosilación. Lo más sorprendente es que la clona que tiene homología del 61% tiene únicamente el segundo “cluster” Fe-S, y presenta un segmento transmembranal único; además de que es la única secuencia que tiene un dominio para citocromo oxidasa. Por otro lado, es interesante resaltar que la clona que presenta homología del 63% no tiene segmentos transmembranales y tiene menos sitios de fosforilación por proteína cinasa C (PKC) que el resto de los genes *pfor*; aunque como se mencionó anteriormente, presenta algunos de los dominios típicos de PFOR A. Cabe señalar que los genes tipo PFOR con menor homología clona 63 y 61 son de mayor tamaño que el resto de los genes tipo PFOR (**Fig. 23**). Estos datos sugieren que existen al menos 6 diferentes genes completos para PFOR con diferentes dominios lo que indica que podrían tener diferente localización y función en *T. vaginalis* y posiblemente se expresen bajo diferentes condiciones ambientales.

Al saber que tenemos varios genes de *pfor* con diferencias significativas entre ellos se construyó un dendrograma con las secuencias de los genes que codifican para la PFOR tomando en cuenta las ya reportadas, las secuencias de otros organismos, la secuencia del aislado CNCD 188 y las secuencias encontradas en el TIGR. En este análisis se observa que existen menores diferencias entre las secuencias que codifican

para las PFOR ya reportadas y la PFOR A del aislado CNCD 188; asimismo junto con la Clona 86 que se encontró en el TIGR pertenece a este grupo. El segundo grupo lo constituyen las secuencias que codifican para la Clona 63 y la Clona 61. En el último grupo se encuentran las secuencias que codifican para la PFOR de diferentes organismos (**Fig. 24**) en la que se incluye a la de *E. histolytica*.

**Figura. 22. Ensayo tipo Northern Blot de la expresión del gen *pfor a* de *T. vaginalis*.** A) Expresión del transcrito del gen *pfor a* del aislado CNCD 188. Carril 1: en ausencia de hierro. Carril 2: Condiciones altas de hierro (250  $\mu$ M).

**Figura 23. Comparación de los “motifs” de nuevas secuencias que codifican para PFOR A.** Las secuencias de aminoácidos de diversos contiguos que codifican para PFOR A de *T. vaginalis* encontrados en el banco del genoma de *T. vaginalis* por TIGR se sometieron a un análisis por medio del programa Prosite. Además se presenta el tamaño de cada una de las PFOR y la simbología utilizada para ubicar cada uno de los “motifs”. Como sonda *in silico* se usó la secuencia del fragmento de 1.1kb del gen *pfor a* del aislado CNCD 147.

**Figura 24. Dendrograma para las secuencias completas que codifican para *pfor*.**

El dendrograma fue construido con las secuencias completas deducida de aminoácidos de las PFOR de los diferentes organismos analizados, del aislado CNC 188, las reportadas de *T. vaginalis* y las obtenidas *in silico* en el genoma de *T. vaginalis* (TIGR), usando el programa CLUSTAL W (<http://workbench.sdsc.edu/>).



## 9.-DISCUSIÓN

La banda protéica de 120 kDa inducida en altas concentraciones de hierro y con afinidad a la superficie de las células HeLa identificada y caracterizada por Yáñez-Gómez (1998; 1999) y Moreno Brito (2004) es una nueva adhesina de *T. vaginalis* con homología a PFOR A que se transcribe mejor en altas concentraciones de hierro (Moreno Brito y col., 2004). Dado que el mapeo trípico de la mancha que solo aparece en altas concentraciones de hierro confirmó que dicha mancha mostró la identidad de la AP120 con PFOR A. En este trabajo nos propusimos clonar y caracterizar el gen *pfor a* del aislado CNCD 188 de *T. vaginalis* a partir de oligonucleótidos específicos diseñados con base a la secuencia reportada por (Hrdy y Muller, 1995). Por PCR se amplificó un fragmento de aproximadamente 3.4 kb y un fragmento de 600 pb. El primer fragmento coincide con el tamaño de la secuencia que codifica para el gen *pfor a*. Del segundo fragmento amplificado se desconoce su relación, dado que los oligonucleótidos son específicos para el fragmento de 3.4 kb. Además, se confirmó por restricción con la enzima *XhoI* que se trata del gen *pfor a* y no del gen *pfor b* ya que este gen *pfor b* no tiene sitios de restricción para esta enzima. La nueva secuencia del fragmento de 3.4 kb amplificado a partir del DNA del aislado CNCD 188 mostró una identidad del 99% con respecto a la secuencia de *pfor a* ya reportada Hrdy y Muller, 1995). Sin embargo, esta nueva secuencia (*pfor a* CNCD 188) presentó 5 diferencias a nivel de aminoácidos con de los genes *pfor a* y *pfor b*. Sorprendentemente el 3<sup>er</sup> cambio localizado en el aminoácido 1024, es diferente al gen *pfor a* pero igual al gen *pfor b*, esto nos hace suponer que la nueva secuencia tiene tanto características del gen *a* como del *b* y que no es un error en la polimerasa o una mutación y que se trate de un tercer gen tipo *pfor a*.

Cuando se hizo una comparación entre las diferentes PFOR de otros protozoarios y bacterias anaeróbicas, con las PFORs de *T. vaginalis* se localizaron los “motifs” más importantes funcionalmente. De ahí se observó los tres segmentos transmembranales que posee el gen *pfor a* reportado. La secuencia del gen *pfor a* CNCD 188 solo presenta 2; el 1<sup>er</sup> cambio se localiza en el sitio 112 correspondiente al sitio transmembranal, el cual deja de considerarse como un segmento transmembranal que podría modificar su conformación tridimensional y por ende la función de la proteína. Notablemente, los 5 cambios de aminoácidos encontrados en este gen no se encuentran entre los seis genes encontrados en el genoma de *T. vaginalis* que confirme que estos 4 cambios son reales. A diferencia de lo que sucede en el cambio que comparte con *pfor b*. Por otro lado, estas 4 diferencias podrían deberse a la variabilidad entre aislados ya que el gen obtenido en este trabajo pertenece al aislado CNCD 188 y la secuenciación del genoma se realiza del aislado ATTC30001..

Como parte de la caracterización de la AP120 Moreno Brito y col., 2004 localizaron con un anticuerpo anti-EhPFO a la AP120 en la superficie del parásito en el citoplasma y asociada a organelos citoplásmicos que pueden ser hidrogenosomas. Esto nos hace pensar que se pudiera tratar de una proteína con características de PFOR y de adhesina (“moonlighting protein” Jeffery 1999; 2003). El anticuerpo que se utilizó para este experimento se preparó contra un fragmento recombinante de 648 aa de la parte carboxi-terminal de la PFOR de *Entamoeba histolytica* (del nucléotido 1260 a 3498 del gen *pfor a*) (Rodríguez y col., 1996; 1998). El alineamiento múltiple entre los fragmentos (648 aa) de la PFO de *E. histolytica* y *T. vaginalis* mostró una identidad y homología del 44.1% y 65%, respectivamente. Además 11 de los 22 péptidos

identificados en la AP120 con identidad de PFOR se encontraron en este fragmento de 648 aa (Moreno-Brito y col., 2004).

Tomando en cuenta estos antecedentes, se diseñaron oligonucleótidos que amplificaran por RT-PCR un fragmento de 1.1 kb comprendido de este fragmento. Cuando se utilizaron 30 ciclos de amplificación se observó la expresión diferencial del transcrito de *pfor a* en los parásitos de dos aislados de *T. vaginalis* crecidos en diferentes concentraciones de hierro. Solo hubo expresión del transcrito en altas concentraciones de hierro. Estos datos correlacionan directamente con lo observado a nivel de proteínas para la mancha numero 1 correspondiente a la adhesina AP120 que se induce en altas concentraciones de hierro y se relocaliza a la superficie del parásito en estas concentraciones de hierro (Moreno-Brito y col., 2004), como ocurre con la AP65 (García y col., 2003). Sin embargo, es incomprensible que PFOR A siendo una enzima del metabolismo energético del parásito de expresión constitutiva, esta debería expresarse continuamente aún en condiciones normales de cultivo (20  $\mu$ M), aunque no lo hiciera en ausencia de hierro. De ahí que decidimos extender los ciclos de amplificación de la PCR a 35 ciclos. Bajo estas condiciones, el patrón de expresión cambia, observándose una baja expresión de PFORs en ausencia de hierro que aumenta en condiciones normales y se duplica en condiciones de alto hierro. Aunque este patrón es más complejo, es más comprensible por lo descrito anteriormente. Debido a la alta identidad que existe entre las secuencias de PFORs ya reportadas con las nueva secuencia en este fragmento de 1.1 kb y ya que los oligonucleótidos utilizados se localizan en una región muy conservada entre los diferentes genes de PFOR, existe la posibilidad que los oligonucleótidos utilizados pueden pegar específicamente en las demás secuencias de PFORs y el patrón que se observa incluya la transcripción de los

diferentes genes conocidos o que puedan existir otros aún no identificados, ya que todavía no se termina de secuenciar el genoma de *T. vaginalis*.

En estos experimentos de expresión también se pudo comparar la variabilidad que hay entre aislados (CNCD 188 y CNCD147) en relación al gen *pfor a* ya que la amplificación a partir de cDNA fue una manera de tener una evidencia más de que estos genes se están expresando en el parásito, al menos a nivel transcripcional. La comparación de las secuencias de los fragmentos de 1.1 kb de los dos aislados, mostró que hay 2 cambios en la secuencia de este fragmento de 1.1 kb entre los 2 aislados respecto a los genes ya reportados, sugiriendo un grado de variabilidad de estos genes entre aislados. El aminoácido 1024 de este fragmento se pudo comparar con la nueva secuencia de 3.4 kb y presenta el mismo cambio. Este dato sugiere que podrían existir más genes PFOR en *T. vaginalis* además de los identificados, ya que las secuencias aunque tienen alta homología entre ellas, una de las pocas modificaciones que tienen entre ellas son suficientes para que se estructuren como proteína de diferente conformación por lo que su función podría ser distinta.

Los dendrogramas construidos mediante las secuencias tanto en nucleótidos como de aminoácidos reflejan la presencia de tres grupos de genes PFOR en *T. vaginalis*, ya que existen más diferencias en la secuencia de DNA, que en la secuencia traducida de aminoácidos. Esto pudiera explicar la necesidad de mantener la estructura y función de los productos de los diferentes genes de PFOR en este parásito además de las posibles funciones alternativas de algunos de ellos, como el caso de la AP120 con identidad a PFOR A.

La expresión a nivel de transcripción en los ensayos tipo Northern Blot apoya lo observado por RT-PCR que este gen tipo *pfor a* CNCD 188 se transcribe mejor en presencia de altas concentraciones de hierro. Además, el tamaño del transcrito (4.2 kb) es mayor al tamaño del gen *pfor a* (3.4 kb), lo cual sugiere que presenta una cola larga de poliadeninas y que no corresponde a los genes tipo *pfor* de mayor tamaño ya que la secuencia de cDNA es diferente a la de los genes de mayor tamaño.

A partir del dendrograma en el cual se compararon las secuencias los 6 genes y las secuencias de otros organismos se observaron tres grupos de genes; donde el primer grupo lo integran las PFOR del mismo tamaño como lo son las PFOR reportadas, la PFOR A del aislado CNCD 188, la clona 86 la cual podría ser un gen distinto al gen *pfor a* y *pfor b*. El segundo grupo lo integran las clonas que son de mayor tamaño encontradas en el TIGR (Clona 61 y 63) esta diferencia con respecto al grupo anterior se debe a que no presentan todas las características típicas de PFOR. El tercer grupo está constituido por organismos distintos a *T. vaginalis* que se agrupan de esta manera ya que aunque tienen todas las características de una PFOR tienen tamaños distintos entre ellas. Así mismo en este último grupo se pueden observar las diferencias entre un organismo amitocondriado y las bacterias. Sin embargo llama la atención que en el grupo de las bacterias anaerobias se encuentre el gen *pfo* de *Entamoeba histolytica*, un protozooario amitocondriado que no posee hidrogenosomas sino un organelo atípico llamado mitosoma, Ehko (León Avila y col., 2004; Orozco E. y col., 1997).

## CONCLUSIONES

En este trabajo se obtuvo a partir del DNA del aislado CNCD 188 la secuencia del tercer gen tipo *pfor a*, con solo 5 cambios de aminoácidos.

Se demostró que el gen *pfor a* del aislado CNCD 188 se regula positivamente por altas concentraciones de hierro de manera similar a la AP120.

No se observó variabilidad entre los aislados CNCD 188 y CNCD 147 en cuanto a la expresión del gen *pfor a* bajo diferentes concentraciones de hierro. En ambos se observó una regulación positiva por hierro.

.

El tamaño del transcrito del gen *pfor a* detectado con la sonda 1.1 kb fue de 4.2 de mayor tamaño que los genes ya reportados.

Evolutivamente, los genes de *pfor* reportados y los obtenidos en este trabajo a partir de dos aislados se agrupan en 3 clades.



## 13.-APÉNDICE

### SOLUCIONES

#### Gel de Agarosa al 1%

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

#### Amortiguador TAE 50x (pH ~ 8.5 )

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

Se afora a 1 litro con H<sub>2</sub>O destilada, se ajusta el pH a 8.5.

#### Bromuro de Etidio ( 0.5 mg/ml )

Bromuro de Etidio (Sigma)	0.5 mg
H <sub>2</sub> O destilada	1 ml

## EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

### **PBS 1x**

NaCl (MERCK)	8 gr.
KCl	8 gr.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.65 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 gr

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

### **Amortiguador de Lisis**

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

### **Etanol al 70%**

Para 50 ml

Etanol al 100% 35 ml

H<sub>2</sub>O destilada 15 ml

### **Amortiguador TE**

Tris-HCl	10 mM
EDTA	0.2 mM

Se esteriliza por autoclave. Se ajusta el pH 7.6

## EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

### Solución I (Estéril)

Glucosa 50 mM

Tris-HCl 25 mM, pH 8.0

EDTA 10 mM, pH 8.0

### Solución II (recién preparada)

NaOH 0.2 M

SDS (Dodecil sulfato de Sodio) 1%

### Solución III

Acetato de sodio 5M 60 ml

Ácido acético glacial 11.5 ml

H<sub>2</sub>O destilada 28.5 ml

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

### X-Gal Stock 40mg/ml

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

## MEDIOS DE CULTIVO

### Medio Luria Bertani (LB)

Cloruro de sodio 10 g

Triptona 10 g

Extracto de Levadura 5 g

Se ajusta el pH a 7.0 y se afora con H<sub>2</sub>O destilada a 1 litro. Por último se esteriliza en autoclave.

### Ampicilina (100 µg/ml)

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

### Placas LB-Ampicilina

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

### MEDIO “Terrific Broth” (TB)

Bactotriptona 12 g

Extracto de Levadura 24 g

Glicerol 4 ml

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

## **MEDIO SOC**

Para 1 litro

H<sub>2</sub>O destilada            950 ml

Bactotripton            20 g

Extracto de Levadura    5 g

NaCl                    0.5 g    Antes de agregar la glucosa se esteriliza por

autoclave

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

## **Amortiguador de Fosfatos**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>            2.31 gr

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>            12.54 gr

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

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

## **EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL**

### **Solución de Fe<sup>2+</sup>**

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

### **Solución de Ácido Sulfosalicílico**

La solución stock se prepara a una concentración 25 mM. Se pesan 0.1271 g de Acido sulfosalicílico (Sigma) y se disuelven en 10 ml de H<sub>2</sub>O.

### **Solución 2-2, Dipirilo**

La solución stock se prepara a una concentración 15 mM. Se pesan 0.0234 g de 2-2. dipiryl (Sigma) y se disuelven en 10 ml de H<sub>2</sub>O. Se esteriliza por filtración en una membrana de 0.22 µm. Se almacena a 4°C por no más de una semana.

### **PBS 1x**

NaCl	8 g
KCl	8 g.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.65 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g

Se ajusta el pH a 7.4 con NaOH o HCl se afora a 1 litro con H<sub>2</sub>O-DEPC y se esteriliza por autoclave.

### **H<sub>2</sub>O DEPC**

Para 1 litro

H<sub>2</sub>O 1000 ml

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

### **Etanol al 70%**

Etanol absoluto 700 ml

H<sub>2</sub>O-DEPC 300 ml

## **OBTENCIÓN DE RNA poli A+**

### **TES**

Tris-Cl 10 mM, pH 7.5

EDTA 1 mM, pH 7.5

SDS 0.1 %

### **AMORTIGUADOR LAVADO Y ABSORCIÓN**

TES con NaCl 0.5 M

### **OLIGO dT Celulosa**

Para cada muestra se pesan 0.05 g y se equilibra con 500 µl de amortiguador de Lavado y absorción, por media hora en agitación a temperatura ambiente. Después se centrifuga 5 min a 3,000 rpm, se elimina el sobrenadante.

## **NORTHERN BLOT**

### **Gel de agarosa formaldehído al 1%**

Se pesa 0.36 g de agarosa (Sigma), se agrega 3 ml de MOPS 10× y 22.35 ml de agua destilada tratada con DEPC, la agarosa se fundió en el microondas, se dejó enfriar un poco y posteriormente, se le agregaron 4.65 ml de formaldelhído al 37%, se vació sobre la cámara, se dejó polimerizar, se agregó el amortiguador de corrida (MOPS 1×) y el gel se precorrió a 80 volts sin muestra. Posteriormente, las muestras y los marcadores se agregaron, se dejó reposar por 10 min y se realizó la corrida a 40 volts por 2.5 h.

### **MOPS 10×**

Para 800 ml de agua-DEPC agregar:

MOPS 41.8 g , ajustar a pH 7.0 con NaOH o con ácido acético

Acetato de sodio 3M 16.6 ml, pH 5.2 tratado con agua-DEPC

EDTA 0.5 M 20 ml, pH 8.0 tratado con agua-DEPC

Esterilizar por filtración (0.22  $\mu$ m).

### **Sephadex G-50**

A 5 g de Sephadex G-50 (Pharmacia), se les agregó agua destilada estéril hasta cubrir el Sephadex para hidratarlo, se dejó sedimentar y se eliminó la solución acuosa; se repitió este procedimiento por cinco veces más en el transcurso de un día. Finalmente, se agregó amortiguador TE, pH 7.6, se dejó toda la noche, al día siguiente se esterilizó por autoclave y se almacenó a temperatura ambiente.

### **Solución de prehibridación**

Formamida 50% (v/v)

SSC 5×

Tris-HCl, 50 mM pH 7.4

Solución Denhard's 5×

SDS 1% (peso/vol)

**SSC 20x**

NaCl 175.3g

Citrato de Sodio 88.2g

H<sub>2</sub>O destilada tratada con DEPC ajustar a un volumen de 1 litro. Se esteriliza por autoclave.

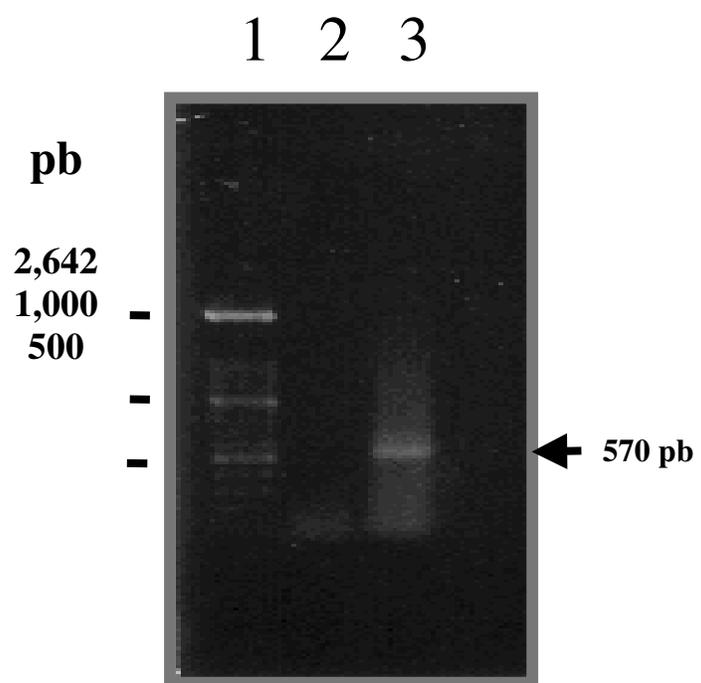


Figura 6

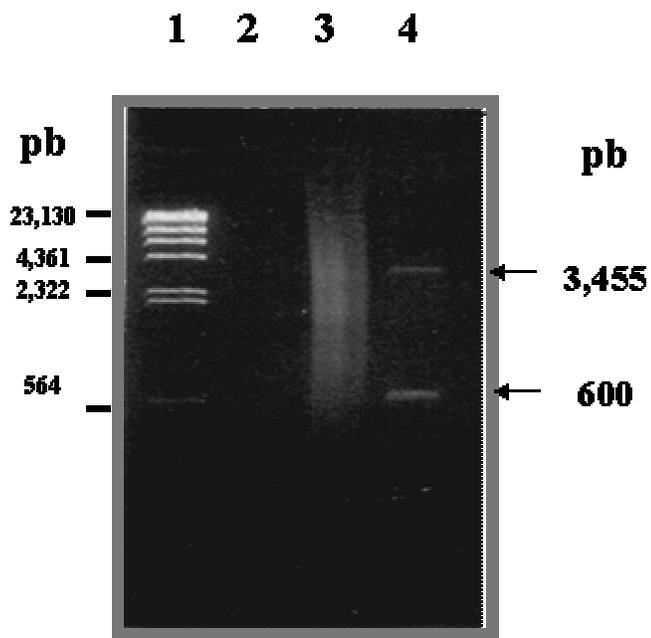


Figura 7

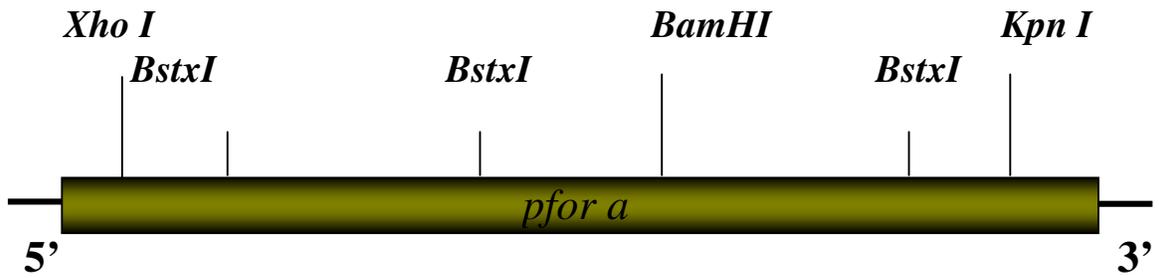
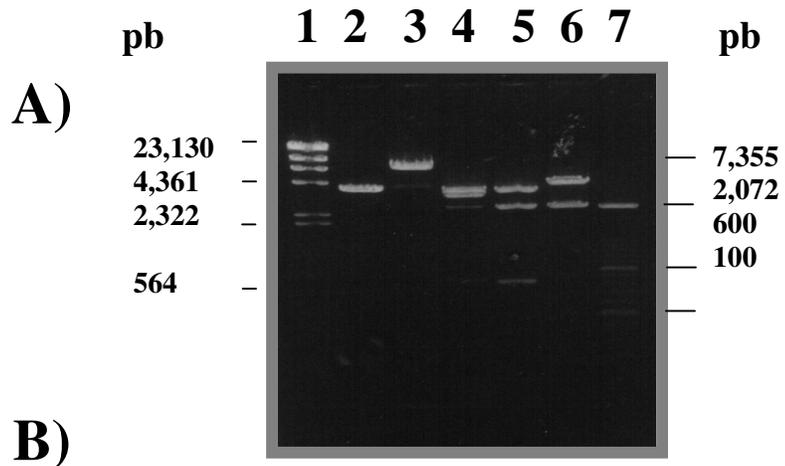


Figura 8

1	atgctccggagcttcgggcaaggaatccaggagatggcaacaccgctgcaacatcagtt	60	aagaaatcaccagttccagaaaccagatccacccacccagctgcaacaggctggcaacccctg	220
	<u>MLHDFGKREIPGDGNTYAATS</u>	120	<u>KNYQFRIQITPLDCTGCA</u>	220
	gtctcccaaccctctggaactccctccatccaccatccaccagctacacacatgggt	180	gtccacatctctggccacacaggctctctccatggacatccggcaacggccagctcagatgag	230
	A Y Q L S E Y S F I Y P I T P A Y T H G	240	V T S C P T K A L S B T Y R N A K L D E	230
	gaactcgttgcgttggatcgtccgggagccaggaactctggggcaacaggctccac	300	gaagaggccaggaactgggatcagtgcttgcgtcccaaacctggccaccctcccca	240
	ELVDAMVIAQGRKNIMGNKVH	360	<u>KEGKNMBOCLAAPNRHGLL</u>	240
	atggcatatcagactcgaaggtgctgctggggagccactccaggtgctccagccggt	420	<u>cccaaaagctccggaaactccagttccggcagccactccagatccaaagctgctg</u>	240
	MAHHQSEGGAAA AA AVHGA TA V	480	PTNVRNVQFRQPLIEFNGAC	240
	ggtgctctctgggtacattccagctcccaaggtgctctctctatgatccagccagctc	540	cagggatcgggtgaacagctatctccagagctccctaccagctctatggggccagctc	240
	GALCATPTASQAALLMIFDH	600	QSCGETAICRLLTGLVGD	250
	taaaagatctcaggtgaactcggggaggtctcccaactctctcgtctcagctcgt	660	taactcgtcaagctccaggtctccactcgtctgggtgctccatcccatccaccca	250
	YKIIIGEMCFAVSHISARCIA	720	YLANATGCSLVMGATFFPNF	250
	acatctgctctccatcccaagctccggggatctcagctcggctcggcagcagc	780	ttccacacaaagagcggggagcagctccagctcgggtcgaactccctctccagatcag	250
	T S A L S I Y N P H G D A Y A C R A T G	840	F Y T T N E R G H G P A W A N S L F E D N	250
	atgcaactcctctcccaactcgtcggcaagagctccagctctcgtgcttgcgtccca	900	gctgaatccgggtccggtatgctccagagctcggggcccgctgaactcccaagag	250
	M P I L F S N G V Q E A H D L A A V A H	960	ctcgtctcggactccctcagctccgggcaactccaggccagctccaggaactcttcgag	270
	ctcccaactccacacagggctccatccatccacacactccagctcctcgtccactcc	1020	taactcgtcaagctccaggtctccactcgtctgggtgctccatcccatccagatcag	270
	<u>LT TI HT TGLFFIHTFDGFR</u>	1080	<u>QLLLKVMDDQDKESGDLAEKIK</u>	270
	ccggaaatcccaactccaggaactcgtccaggaacactccggccactccatccagccag	1140	ccactccctcaggtctccagccactccaggaactcagctcagctccctccagctccaggt	280
	K E I N T Y E E L D N E T L V F L I D Q	1200	P L L A K V Q H P S E K H Y A L G S Q A	280
	aaagcctcgtcgtcctcgtcgtcgtctctcccaactccagccactccagccagcggg	1260	gaactcctcccaaggaagcagctcggactcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgt	280
	K A L A A F R A R S L N P E H P S E R G	1320	P I L B K K Q V W I V G G D G W A Y D I	280
	acactcggggcccaagatcagctcggcagatccaggaagagctccggcaagcactccag	1380	ggctatggtggcttgactcagctctctcgtctccggcaaaagctcaagatccactccatcc	280
	T I C G P E Y V V W Q H H E K L R K P F Q	1440	G Y G G L D H V L A S G E N V K I I I Y	3000
	gctctcccaactgaagctccgggaagatgctgaagctctccggcagcaagcagggcgtcac	1500	gaactcctcccaaggaagcagctcggactcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgt	3000
	A L P T E V E F H H K A L G D K T C R Y	1560	V A N F S A A G Y T E A K K D L G A I A	3000
	taaaagcactaccagatgctcggccaccgctgaccgaacactccactcactcagtggt	1620	atgcaactcccaaggaactctctcgtccctcccaatgctctctcgtcgtcccaacaggt	3120
	Y K P Y Q Y A G F R D S P E N V I I H N G	1680	ctccagagctctccctcccaactcgtcggcactgctccaggtcactccctcgtcgtcgt	3120
	tctcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgt	1740	D T E V Y S N T Y G G C S K A T S R G A	3000
	S G C D P V E Y I T E R P E F K T G L	1800	gctcgaactctcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgt	3000
	atcaagctcccaactctcccaactctctcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgt	1860	V A N F S A A G Y T E A K K D L G A I A	3000
	I K V H L F R P F S V E R F N A A I P A	1920	atgcaactcccaaggaactctctcgtccctcccaatgctctctcgtcgtcccaacaggt	3120
	tcggcaggaagatctcgtctccggcaaggtctcgtcccaacagggccaccgtgaaacca	1980	ctccagagctctccctcccaactcgtcggcactgctccaggtcactccctcgtcgtcgt	3120
	S V K K I C V L D K V V D P T G P R E P	2040	L K A L Q E A K E Y N G P A I I I N Y S	3240
	ctctccagagatgctcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgt	2100	actcgtcccaacagggatccaggaagggatcggctcccaacacaaagcactccagagct	3240
	L F E D V A A L L I G E R N V K I I G Q	2160	P C I N H G I K K G L G S T P K H C K D	3240
	gctccaggtatctccctccggactcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgt	2220	ctccctcaagcaggttccctcccaactctcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgt	3300
	R Y G I S S R D F A P V H V E A I V K N	2280	llctcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgt	3300
	ctcgtctccggactcccaaggaagcagctccagctcggcgtcgtcccaacacagagaccag	2340	acagctcgtcccaaggaagcagctcccaactccggccactcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgt	3300
	L A S E L P K D R F T V G V V N P E T Q	2400	T V D T K Q P D Y N L D P L V K G E N R	3300
	ctcccaactccggcaagcactcgtcccaactcccaaggaagcagcagcagcagcagcagcag	2460	ttcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgt	3420
	L P L G K K P F D H L P E G T K Q C H F W	2520	F A A L K K D I Y P K E A E T A K P P Q L I	3420
	ggtctcggctcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgt	2580	natgctcaggaactcgtccagggctcccaagagatcccaaggaactcccaaggaactaa	3480
	G L G S D G T V G A N K Q A I K L I V S	2640	<u>N D R K K T R Y E G Y F E I H E T Q</u>	3480
	aaacaaaggttccggccaggtctactcgtctccatgcccacaaagctccggaggtgct	2700		
	N T K L Y G Q A Y F A Y D A H K S G G V	2760		
	acacacccccactcgtctcggcgaagcactccagctccatcactcagctccaggaac	2820		
	T P H I D F C A K P T M A D P V V V Q N	2880		
	gctgatcactcgttcccaacacccatcctcactcccaagctccagatcccaagcag	2940		
	A D Y I A C H N P S Y L K F D H T K Q	3000		
	ctcaagaggggtggtgctcgtcactcccaactcccaaggtctcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgt	3060		
	L K K G G V F V I N F P G S A D L N K D	3120		
	ctccagagatcactccggcaagcactcgtcaggaaggtcctcaagctcccaacactcagat	3180		
	L P G S F R K A I A E K D A K L Y T I D	3240		
	gctcaccagatcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgt	3300		
	A T Q I A I D L K L P G R I N H L H Q T	3360		
	gctctctccggctcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgt	3420		
	V F F G L A N I I P A E E C I A L L K K	3480		
	tcactcgtcagcagctcagctccgggggtcaggaagctcccaaggaactccggccactg			
	S I A K Q Y A R K G K E V I O K N M D H			
	gctcaccatgctcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgt			
	V D H A L Q G L K E F K Y N K A E M L N			
	gctccagctcccaacagcaccagcagcagggcactccggccacatcactcagcactcactc			
	A P V E P R P K N E G I R H I I D H S I			
	ctccagaggggtcagctcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgt			
	L Q E G E S V S V D E M V E I O G L V P N			
	gacacagcaggtccaggaagcgtgctcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgt			
	D T A K Y E K R G I A V T V P K V E E K			
	aagctcactcagctcccaactcggccactggtcgtcccaacagcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgt			
	K C I I Q C N T C A H V C P H A V I R P F			
	ctctctcccaaggaagcagctcagggcctcccaactccaggtcagggcagggagct			
	L L T Q E E A K G L T T L K A K G K E I			

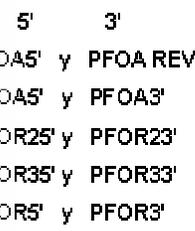


Figura 9

### Sequence alignment

Consensus key (see documentation for details)  
\* - single, fully conserved residue  
- - no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```
pfe_a[stec] -----
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] CAATTTGCTATCTCACACTCAATTTTADAGACTTTCTGTCAATAAATDAGADGACTTT

pfe_a[stec] -----
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] TCTAAATTTGCTTGTCAATTTCTTTGAAATGTTAGAGTTTAAACAATTCACGGGAC

pfe_a[stec] TC--TTCATTTTCGT---GATGCTCCGCAAGCTTCGGCAAGAGAATTCACAGGATGTCG 39
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] TCACCTCATTTTAAATTCGGAAATGCTTCGGCAATTTTCAGCAAAAGAGTTCCAGSAGATGTC

pfe_a[stec] AACACCGCTGGCCACATCAGTTGCTTACCAACTTCTGAAACATCTCTACATCTACCCAAATC 99
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] AATACCGCTGGCCACTTCGGTTGCTTACCAAGCTTACAGAAACATCATTCATCTACCGCAATC

pfe_a[stec] ACACCAAGTACACAAATGGGTAACTGTTTGAATGCTTGGATGCTTCAGGACGCAAGAAAC 159
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] ACACCAAGTACACAAATGGGTAACTGTTTGAATGCTTGGATGCTTCAGGACGCAAGAAAC

pfe_a[stec] ATCTGGGGCAACAAGGTCCACATGGCCATGATGCACTCTGAAAGTGGTCTGGCCAGCA 219
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] ATCTGGGGCAACAAGGTCCACATGGCCATGATGCACTCTGAAAGTGGTCTGGCCAGCA

pfe_a[stec] GTCCACGGTGTCTACAGCGCTTGGTGTCTCTTGGCTACATTCACAGCTTCACAAAGTGTCT 279
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] GTCCACGGTGTCTACAGCGCTTGGTGTCTCTTGGCTACATTCACAGCTTCACAAAGTGTCT

pfe_a[stec] CTCCCTTATGATCCAGACATGTACAAGATTAAGGTTAAATGTGGCCAGCAATCTTCCAC 339
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] CTCCCTTATGATCCAGACATGTACAAGATTAAGGTTAAATGTGGCCAGCAATCTTCCAC

pfe_a[stec] ATCTCTGCTGTGGCAATGCTACATCTGCTCTTTCCATCTACAAGGATCACAGGCGATATC 399
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] ATCTCTGCTGTGGCAATGCTACATCTGCTCTTTCCATCTACAAGGATCACAGGCGATATC

pfe_a[stec] TAGGCTTGGCTGTCAAGAGGATGCAATCTTTCTTCAAAATGCTTCAAGAGGCTTCAAC 459
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] TAGGCTTGGCTGTCAAGAGGATGCAATCTTTCTTCAAAATGCTTCAAGAGGCTTCAAC

pfe_a[stec] GATCTGGCTGTCTTGGTCACTCACAACATTCACACAGGCTTCCGATTCATCCAGCA 519
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] GATCTGGCTGTCTTGGTCACTCACAACATTCACACAGGCTTCCGATTCATCCAGCA

pfe_a[stec] TTGATGCGCTTGGCTACATCCACGAAATCAACACATACAGAGAACTCTGATACGAAACA 579
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] TTGATGCGCTTGGCTACATCCACGAAATCAACACATACAGAGAACTCTGATACGAAACA

pfe_a[stec] CTTTGGCCACTCAAGAGGCAAGGCACTGGCTGCTTTCCGGCTGGCTCTCTTAAAGCGA 639
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] CTTTGGCCACTCAAGAGGCAAGGCACTGGCTGCTTTCCGGCTGGCTCTCTTAAAGCGA

pfe_a[stec] GAACACCGATCTGAGCGGGCCACATCTTGGGGCCAGAAATCTTGGCAGATGCGACGAG 699
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] GAACACCGATCTGAGCGGGCCACATCTTGGGGCCAGAAATCTTGGCAGATGCGACGAG
```

```
pfe_a[stec] AAGCTGGGCAAGGCATTCGAGGCTCTGGCACTGAAATGAGAAATGATGAAAGGCTCTC 759
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] AAGCTGGGCAAGGCATTCGAGGCTCTGGCACTGAAATGAGAAATGATGAAAGGCTCTC

pfe_a[stec] GGGCAAGGCAAGGCGTTACTACAGGCATAGCAATATGCTGGGGCAAGTGGAGGAA 819
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] GGGCAAGGCAAGGCGTTACTACAGGCATAGCAATATGCTGGGGCAAGTGGAGGAA

pfe_a[stec] AACGTCATCATATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 879
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] AACGTCATCATATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT

pfe_a[stec] CCAGATTTCAAGCAAGGCTGATCAAGGTCACCTCTTCCGCCCATTTCTCTGTTAGATG 939
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] CCAGATTTCAAGCAAGGCTGATCAAGGTCACCTCTTCCGCCCATTTCTCTGTTAGATG

pfe_a[stec] TTTCAAGCTGTATCTCCAGCTCTCTCAAGAAATCTGCTGCTTCCAGCAAGGTTGTGAT 999
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] TTTCAAGCTGTATCTCCAGCTCTCTCAAGAAATCTGCTGCTTCCAGCAAGGTTGTGAT

pfe_a[stec] CCACAGGGCCAGCTGAGCACTCTTCCAGGATGTTGCTGCTGCTCTCATTTGGCGAGGCG 1059
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] CCACAGGGCCAGCTGAGCACTCTTCCAGGATGTTGCTGCTGCTCTCATTTGGCGAGGCG

pfe_a[stec] AAGGTCAGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1119
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] AAGGTCAGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT

pfe_a[stec] GTGGAAAGCTATGCTCAAGAGGCTGGCTTGGGAGCTTCCAGAGGCGGCTTCCAGCTGGCG 1179
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] GTGGAAAGCTATGCTCAAGAGGCTGGCTTGGGAGCTTCCAGAGGCGGCTTCCAGCTGGCG

pfe_a[stec] GTTGTCAAGCCAGAGCACAGCTTCCAGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGGCG 1239
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] GTTGTCAAGCCAGAGCACAGCTTCCAGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGGCG

pfe_a[stec] ACAAAAGCATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1299
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] ACAAAAGCATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT

pfe_a[stec] GCTATCAAGCTTATGCTTCCAGCAAGGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGGCT 1419
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] GCTATCAAGCTTATGCTTCCAGCAAGGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGGCT

pfe_a[stec] GGGCAAGTGGGAGGTTTCAAGCAATGCAAGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGG 1479
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] GGGCAAGTGGGAGGTTTCAAGCAATGCAAGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGG

pfe_a[stec] GCTGCATACAGCTCCAGAGGCTGATTAATGCTTGGCAAGGCTTCCAGAGGCTTCCAGAG 1539
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] GCTGCATACAGCTCCAGAGGCTGATTAATGCTTGGCAAGGCTTCCAGAGGCTTCCAGAG

pfe_a[stec] AAGTTCAGATGACAAAGCAAGCTCAAGAGGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1599
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] AAGTTCAGATGACAAAGCAAGCTCAAGAGGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGAT

pfe_a[stec] TCTGCTGAGCTCAAGAGGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGG 1659
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] TCTGCTGAGCTCAAGAGGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGG

pfe_a[stec] GCTAAGCTTACAAATGATGCTACAGAGGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGG 1719
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] GCTAAGCTTACAAATGATGCTACAGAGGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGG

pfe_a[stec] ATCAACATGCTTATGCAAGAGGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGGCTTCCAG 1779
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] ATCAACATGCTTATGCAAGAGGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGGCTTCCAG

pfe_a[stec] TGCATGCTTCTCTTAAAGAGTCCATGCTAAGCAATGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGGCT 1839
pfe_c[100] -----
pfe_b[stec] TGCATGCTTCTCTTAAAGAGTCCATGCTAAGCAATGCTTCCAGAGGCTTCCAGAGGCT
```





Figura 11

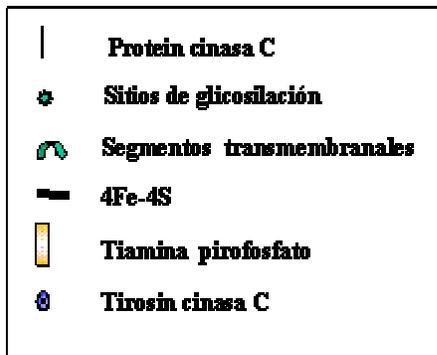
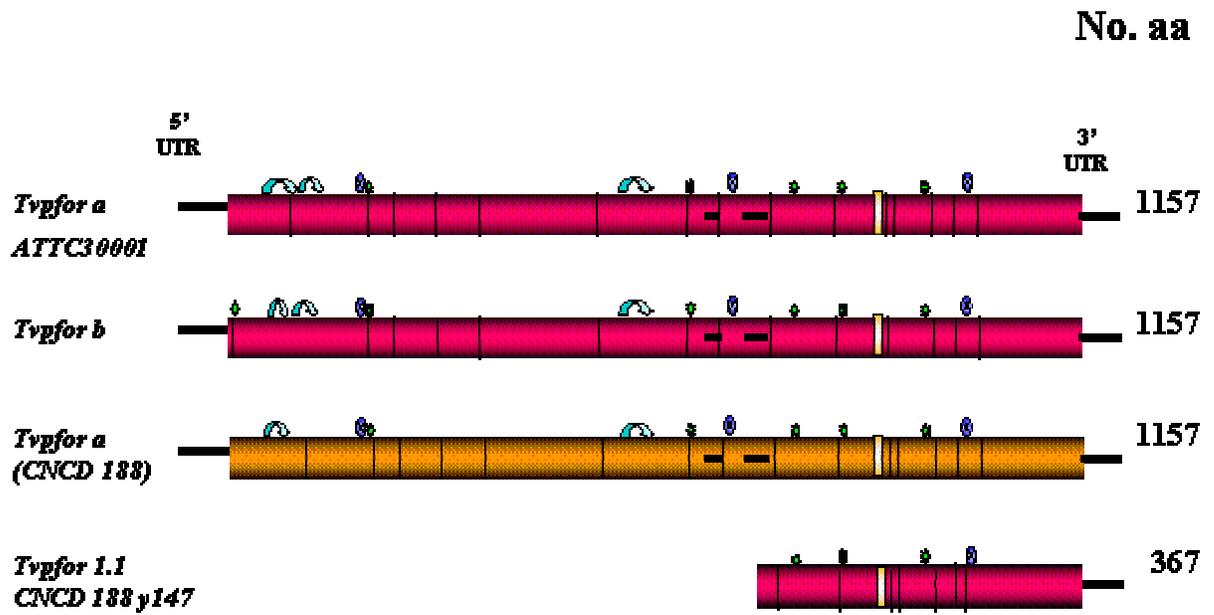
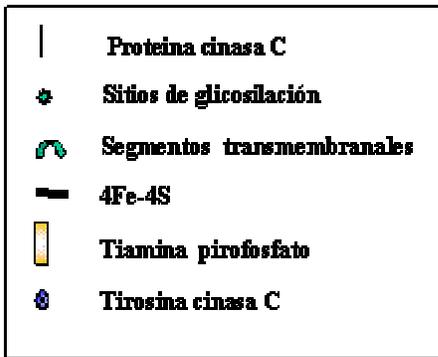
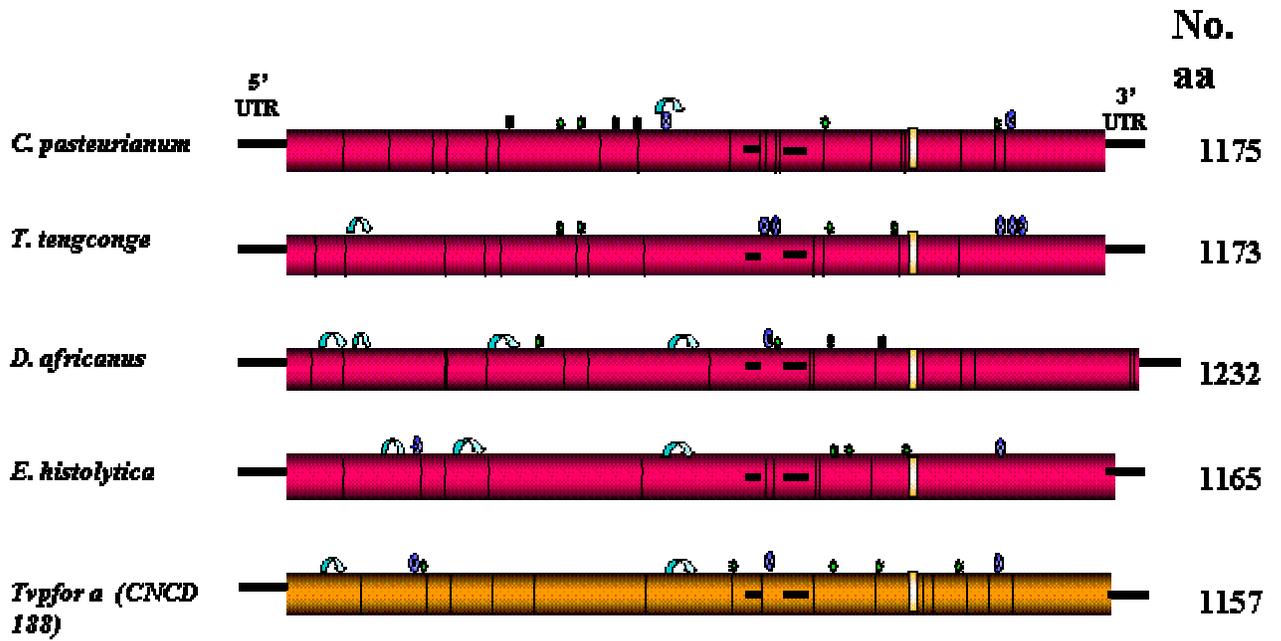


Figura 12



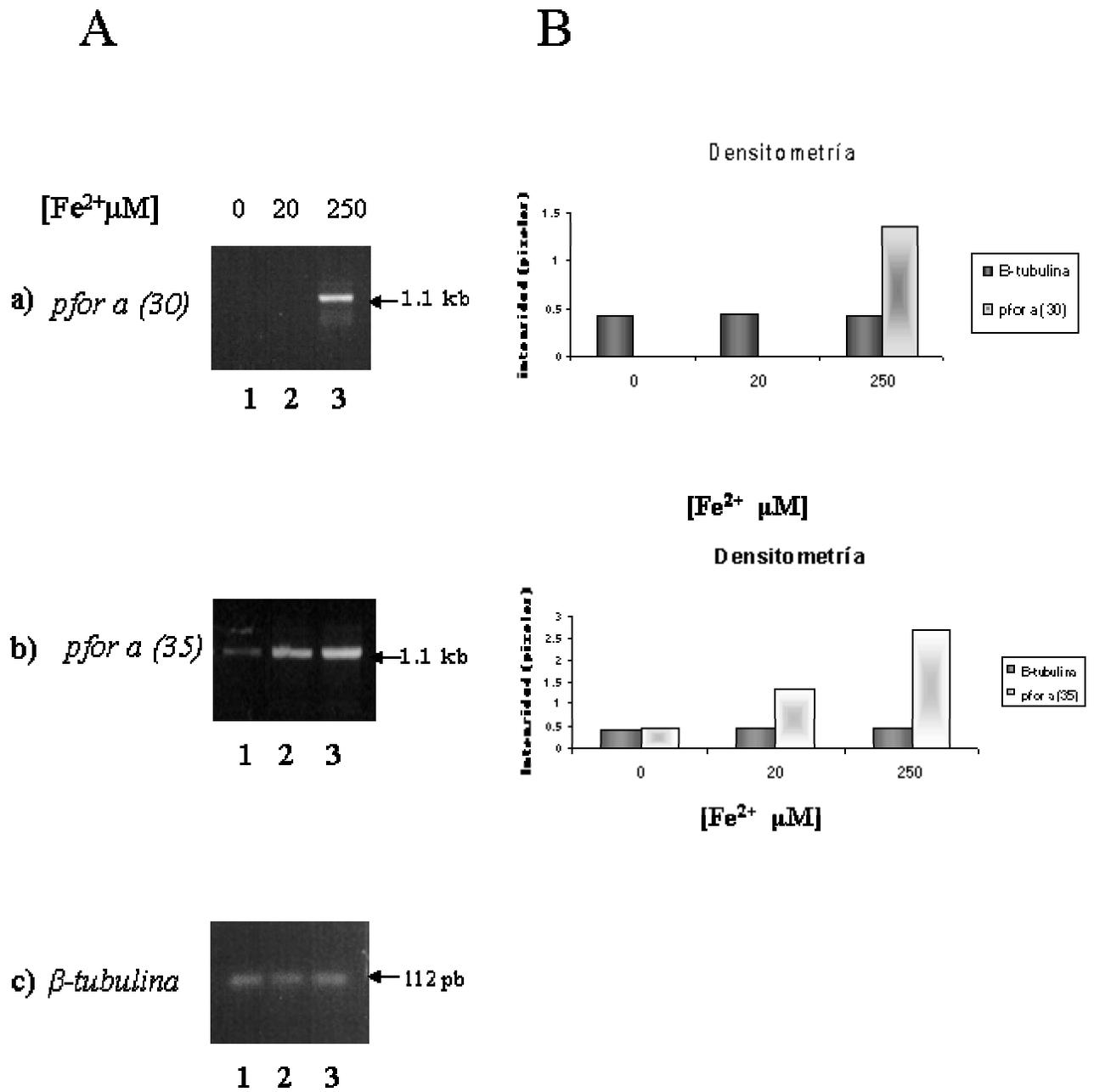


Figura 14

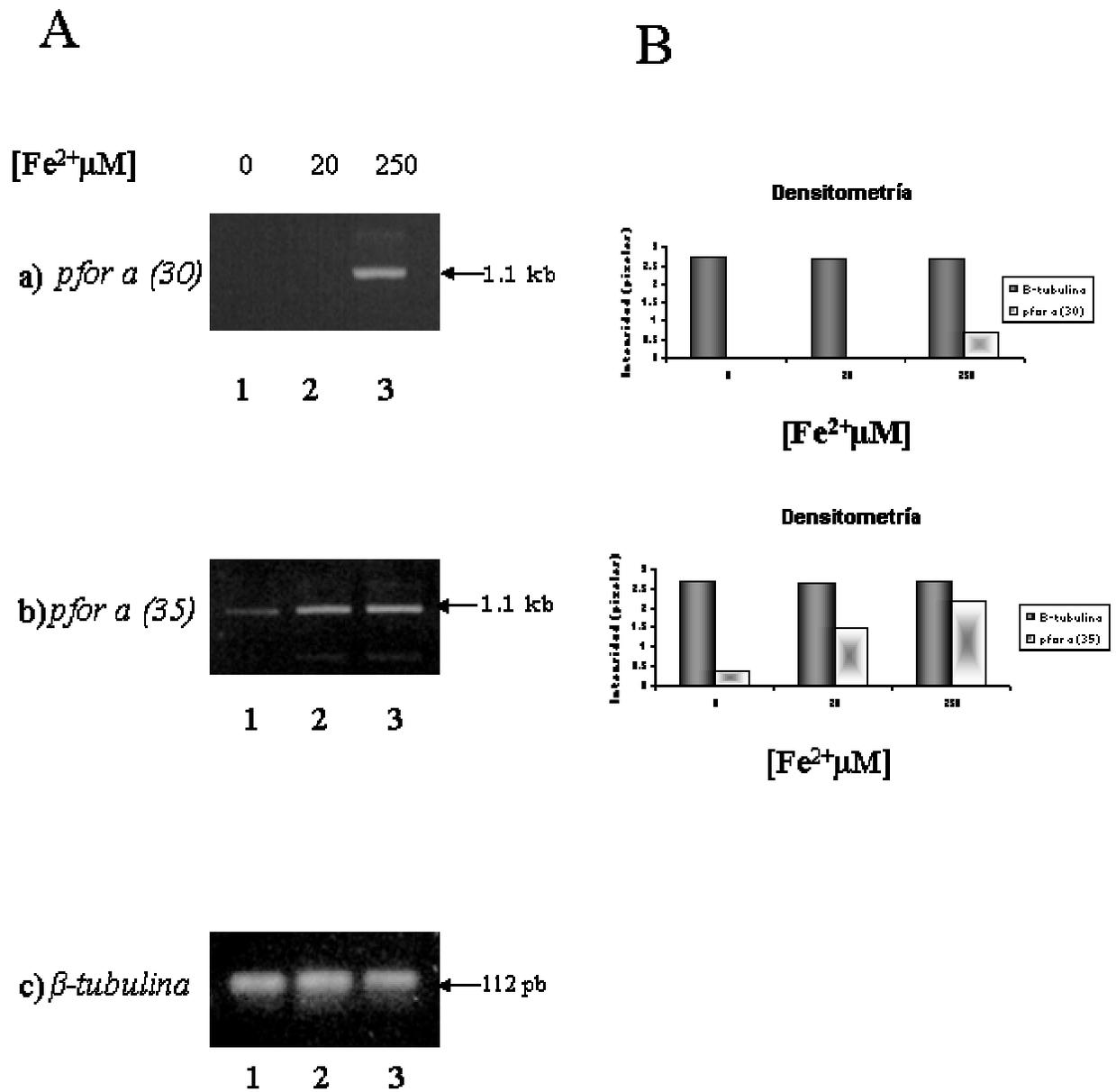
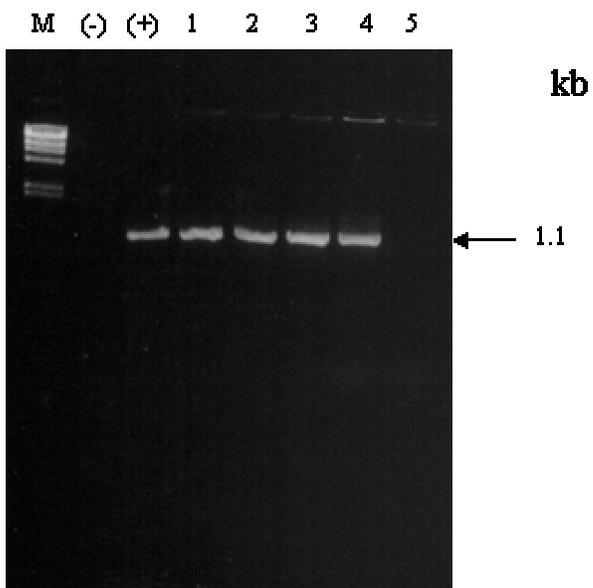


Figura 15

**A)**



**B)**

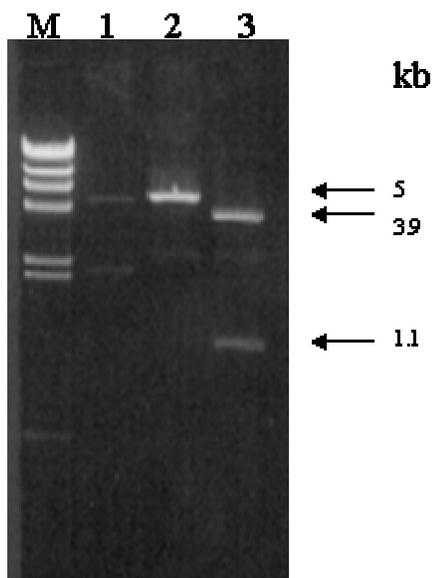
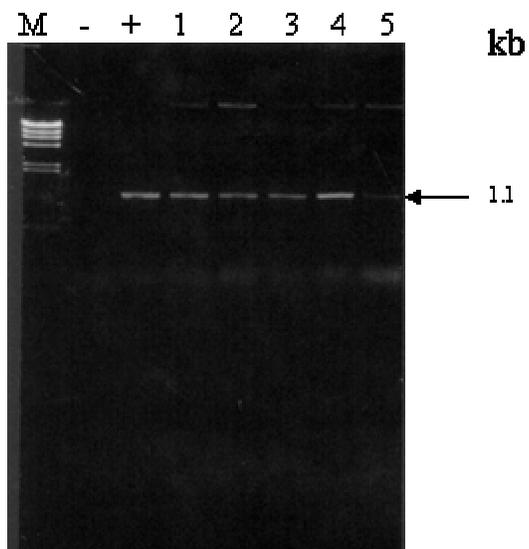


Figura 16

A



B

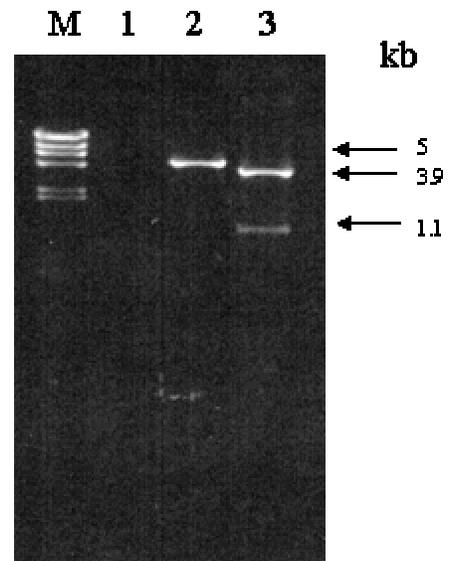
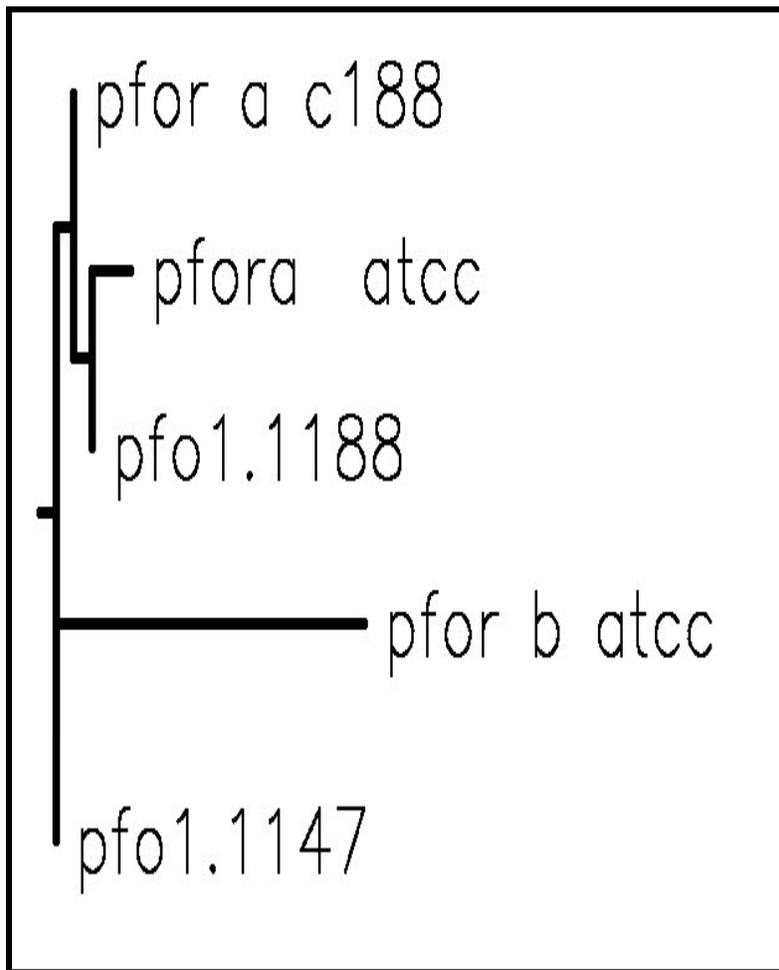


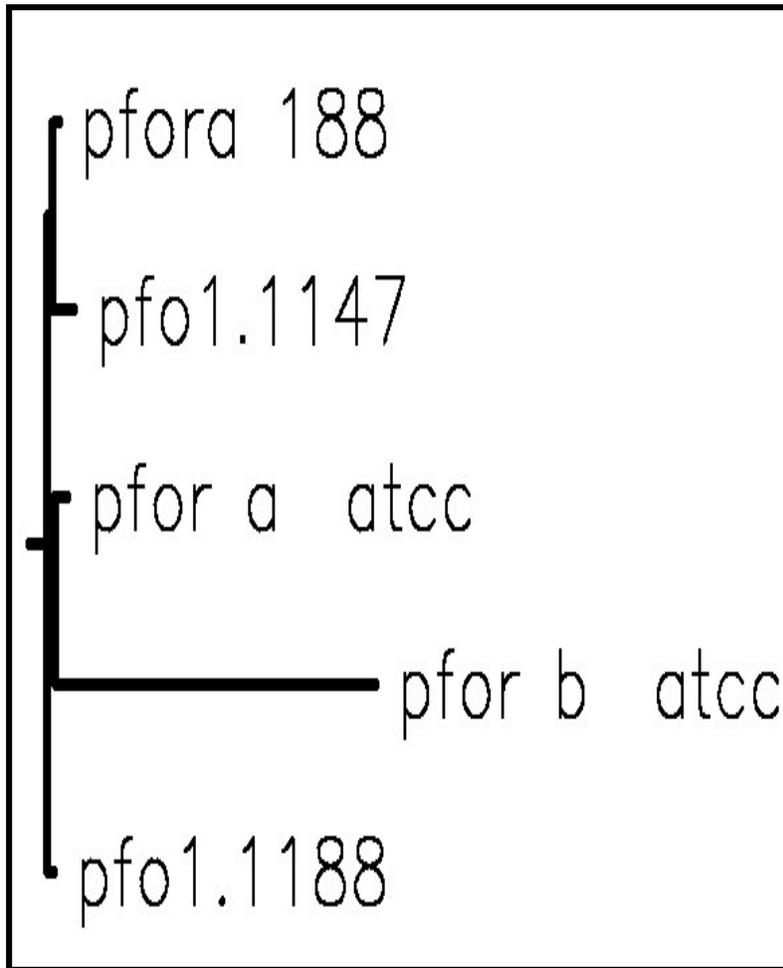
Figura 17



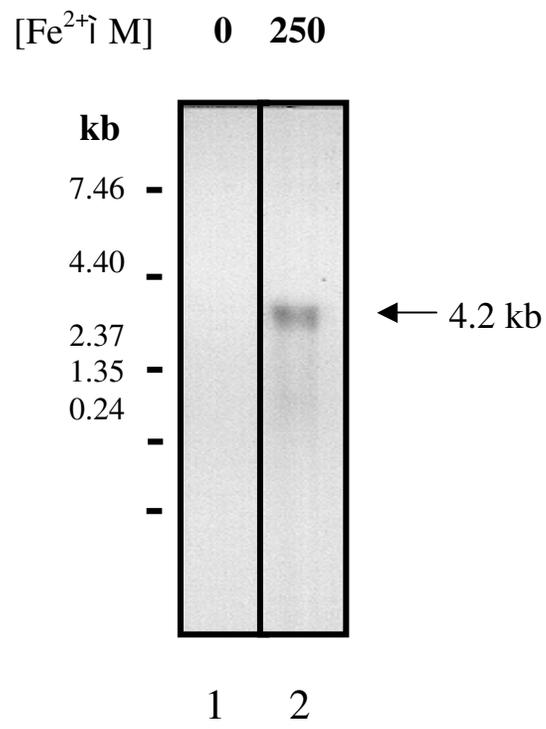


Figura 19





A)





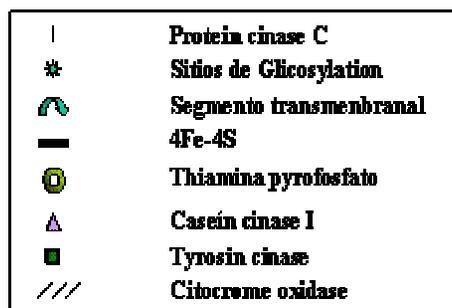
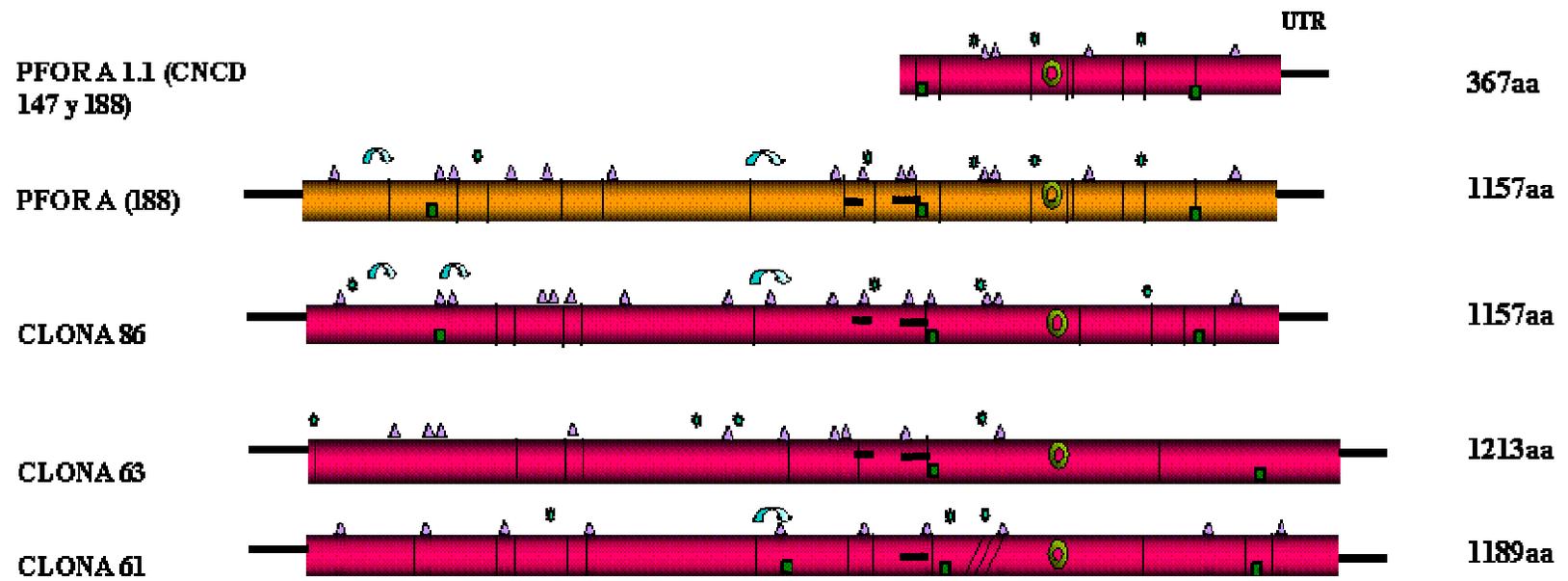


Figura 23

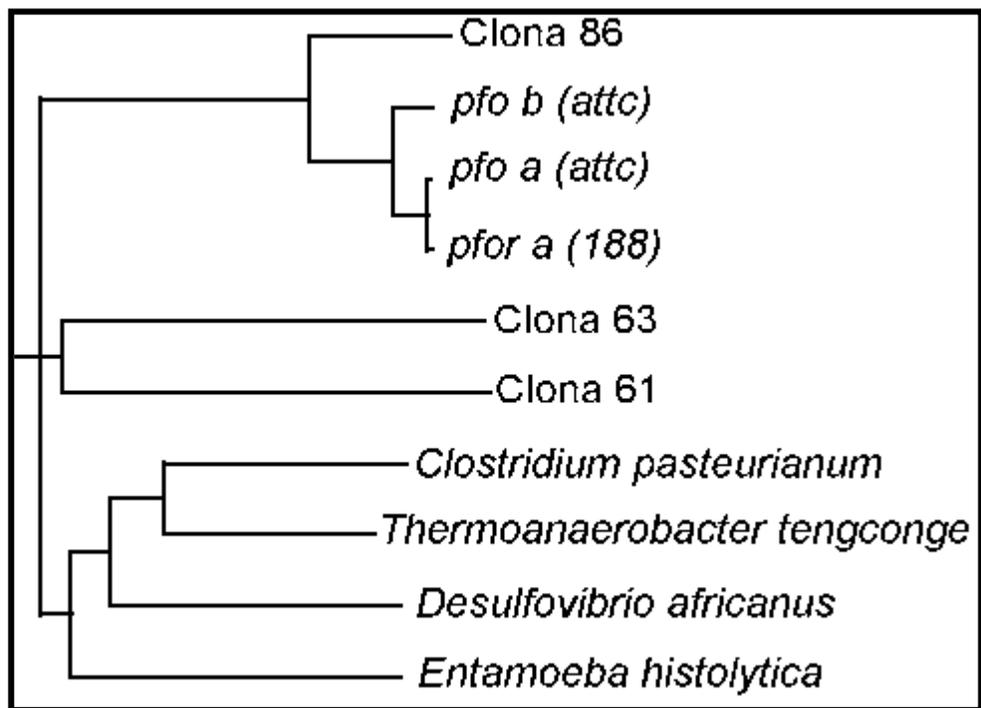


Figura 24

## BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

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

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

ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, M.E. 2001. Participación de la cisteín proteínasa de 65 kDa (CP65) de *Trichomonas vaginalis* en la citotoxicidad a la célula blanco. Tesis de doctorado. Centro de investigaciones Avanzadas del IPN.

ANORLU R.I., FAGBENRO-BEYIOKU A.F., FAGORALA T. 2001 Prevalence of *Trichomonas vaginalis* in patients with vaginal discharge in Lagos Nigeria. *Nigerian Postgrad. Med. J.* 8: 183-186.

ARROYO R., AND ALDERETE J.F. 1989. *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infect. Immun.* 57: 2991-2997.

ARROYO R, ENGBRING J. AND ALDERETE J.F. 1992. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. Mol Microbiol 6:853-62.

ARROYO R.,GONZÁLEZ-ROBLES, MARTÍNEZ PALOMO A., AND ALDERETE, J.F. 1993. Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence. Mol. Microbiol. 7: 299 – 309.

ARROYO R., AND J.F. ALDERETE. 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.

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

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

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

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

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

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

CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY. AUSOBEL 1999

John Wiley & Sons, Inc. 2:10.8 – 10.9

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

DUNNE R.L., DUNN L.A., UPCROFT P., DONOGHUE P.J. AND UPCROFT L.A. 2003. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. Cell Research 13 (4): 239-249.

DUREL P., COUTURE J., BASSOULLET M.T. 1967. The rapid detection of metronidazole in urine. Br. J. Vener Dis. 43:111-3.

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

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

EPIDEMIOLOGIA MUNDIAL DE LAS ETS, se pueden consultar en:

<http://www.saludpublica.com/ampl/ampl08/jul159.htm>

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

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

PARA REALIZAR LA TRADUCCIÓN DE LAS SECUENCIAS DE GENES A PROTEÍNA:

<http://us.expasy.org/>

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

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

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

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

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

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

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

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

KERSCHER, L. AND OESTERHELT, D. (1982) Pyruvate: ferredoxin oxidoreductase new findings on an ancient enzyme. Trends Biochem. Sci. 7: 371-374.

KHOSHMAN A. AND J.F. ALDERETE. 1994. *Trichomonas vaginalis* with a double-stranded RNA virus has upregulated levels of phenotypically variable immunogen mRNA. *J Virol.* 68: 4035–4038.

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

KRIEGER, J., RAVDIN, J., AND REIN, M. 1985. Contact-dependant cytopathogenic mechanisms of *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.* 50: 778-786.

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

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

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

LEHKER, M., ARROYO, R., AND ALDERETE, J. 1991. The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *J. Exp. Med.* 174, 311-8.

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

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

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

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

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

MORENO BRITO V., YÁÑEZ-GÓMEZ C., MEZA-CERVANTEZ P., ÁVILA-GONZÁLEZ L., RODRÍGUEZ M.A. ORTEGA-LÓPEZ J., GONZÁLEZ-ROBLES A. AND ARROYO R. 2004. A *Trichomonas vaginalis* 120-kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate: ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. Cel. Microbiol. (En prensa).

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

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

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

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

PROVENZANO, D., AND ALDERETE J.F. 1995. Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. Infect. Immun. 63: 3388-3395.

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

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

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

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

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

SAMBROOK J. RUSSELL, W.D. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 3ra Edición. Vol 1 y 2

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

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

SISTEMA ÚNICO DE INFORMACIÓN PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA SSA. 2004.

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

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

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

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

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

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

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

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

## **PERSPECTIVAS**

Subclonar en un vector de expresión el fragmento 1.1 kb del aislado CNCD 188, para su inducción y su posterior purificación por cromatografía de afinidad.

Producir anticuerpos anti-PFOR A por medio del antígeno PFORA recombinante y con estos anticuerpos probar si inhiben la adhesión de *T. vaginalis* a monocapas de células HeLa, de una manera dependiente de concentración.

Localizar a la proteína PFOR A por medio de inmunofluorescencia indirecta.

Determinar si todos los genes tipo PFOR de *T. vaginalis* se expresan en el parásito y bajo que condiciones lo hacen.