

84



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

## EL NÚCLEO DE CÉLULAS HeLa: POSIBLE FUENTE DE NUCLEÓTIDOS PARA *Trichomonas vaginalis*

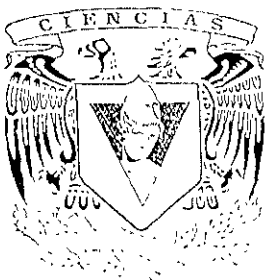
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

MONICA GONZALEZ LAZARO



DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES

DRA. ROSSANA ARROYO VERASTEGUI

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "EL NUCLEO DE  
CELULAS HELA: POSIBLE FUENTE DE NUCLEOTIDOS PARA TRICHOMONAS VAGINALIS"  
realizado por MONICA GONZALEZ LAZARO  
con número de cuenta 0-9650428-6, pasante de la carrera de BIOLOGIA  
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario	DRA. ROSSANA ARROYO VERASTEGUI	
Propietario	DRA. IMELDA LOPEZ VILLASEÑOR	
Propietario	DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA	
Suplente	DRA. LUISA ALVARINA ALBA LOIS	
Suplente	DR. ALEJANDRO CRUZ REYES	

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.

Consejo Departamental de BIOLOGIA

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ  
  
DEPARTAMENTO  
DE BIOL.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio 11 del Departamento de Patología Experimental del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Rossana Arroyo Verástegui.

La realización del presente trabajo fue posible gracias al apoyo del CONACYT (Proyecto No. 25572-N). Asimismo, el autor agradece la beca otorgada por la Fundación Telmex.

## **Agradecimientos**

A la Dra. Rossana Arroyo Verástegui, por la orientación y asesoría brindados durante la realización del presente proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, con profundo agradecimiento por su apoyo cotidiano y por sus acertadas observaciones durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Arturo González Robles, por su ayuda en el manejo del microscopio electrónico y de epifluorescencia.

A la Biol. Adriana Flores Langarica, por su valiosa colaboración en el procesamiento de las muestras para microscopía electrónica.

A mi familia y amigos, por su apoyo incondicional.

# Índice

Lista de figuras y gráficas .....	1
Lista de abreviaturas .....	3
Resumen .....	5
Introducción .....	7
Características clínicas de la infección por <i>T. vaginalis</i> .....	7
Factores de riesgo asociados a la trichomonosis .....	9
Epidemiología de la trichomonosis .....	10
Clasificación taxonómica de <i>T. vaginalis</i> .....	14
Morfología general de <i>T. vaginalis</i> .....	16
Reproducción y ciclo de vida .....	22
Nutrición, requerimientos para el crecimiento y cultivo .....	23
Patogénesis .....	24
Metabolismo de <i>T. vaginalis</i> .....	28
Metabolismo de ácidos nucleicos en eucariontes superiores .....	30
Metabolismo de ácidos nucleicos en <i>T. vaginalis</i> .....	41
Justificación .....	46
Objetivos .....	47
Estrategias experimentales .....	48
Material y métodos .....	51
Resultados .....	59
Aislamiento de los núcleos de las células HeLa .....	59
Comprobación de la integridad de los núcleos aislados .....	63
Elección del aislado de <i>T. vaginalis</i> para realizar las interacciones .....	65
Análisis de la interacción entre <i>T. vaginalis</i> y los núcleos aislados de células HeLa por microscopía de luz .....	68
Análisis de la interacción entre <i>T. vaginalis</i> y los núcleos aislados de células HeLa por microscopía electrónica de transmisión .....	71
Análisis de la interacción entre <i>T. vaginalis</i> y los núcleos aislados de células HeLa por epifluorescencia .....	77

## Lista de figuras y gráficas

### Lista de figuras

- Figura 1. Incidencia estimada de la trichomonosis urogenital a nivel mundial.
- Figura 2. Fotomicrografía electrónica de transmisión de *Trichomonas vaginalis*.
- Figura 3. Fotomicrografía electrónica de barrido de *Trichomonas vaginalis*.
- Figura 4. Estructura general de los nucleótidos.
- Figura 5. Principales bases de purina y pirimidina de los ácidos nucleicos.
- Figura 6. Estructura química de los ribonucleótidos y deoxiribonucleótidos.
- Figura 7. Origen de los átomos del anillo de las purinas.
- Figura 8. Pasos en la construcción del anillo de purina del inosinato.
- Figura 9. Síntesis del AMP y GMP a partir del IMP.
- Figura 10. Biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina UTP y CTP vía orotidilato.
- Figura 11. Vías de salvamento de purinas en *T. vaginalis*.
- Figura 12. Vías de salvamento de pirimidinas en *T. vaginalis*.
- Figura 13. Fotomicrografía electrónica de transmisión de las células HeLa.
- Figura 14. Proceso de aislamiento de los núcleos de las células HeLa analizado por microscopía de contraste de fases.
- Figura 15. Fotomicrografías electrónicas de transmisión y de barrido de los núcleos aislados de las células HeLa.
- Figura 16. Estabilidad de los núcleos aislados de las células HeLa a diferentes tiempos.
- Figura 17. Interacción de dos diferentes aislados de *T. vaginalis* con los núcleos aislados de las células HeLa analizada por microscopía de contraste de fases.
- Figura 18. Observación de cortes semifinos de *T. vaginalis*, células HeLa y núcleos aislados de las células HeLa por microscopía de luz.
- Figura 19. Cinética de interacción entre *T. vaginalis* y los núcleos aislados de las células HeLa.
- Figura 20. Fotomicrografía electrónica de transmisión de *T. vaginalis*, células HeLa y núcleos aislados de las células HeLa.

Figura 21. Fotomicrografía electrónica de transmisión de la interacción entre *T. vaginalis* y los núcleos aislados de las células HeLa (35 min.).

Figura 22. Fotomicrografía electrónica de transmisión de la interacción entre *T. vaginalis* y los núcleos aislados de las células HeLa (50 min.).

Figura 23. Fotomicrografía electrónica de transmisión de la interacción entre *T. vaginalis* y los núcleos aislados de las células HeLa (140 min.).

Figura 24. Fotomicrografía de epifluorescencia y contraste de fases de *T. vaginalis* y los núcleos aislados de las células HeLa.

Figura 25. Fotomicrografía de epifluorescencia y contraste de fases de la interacción entre *T. vaginalis* y los núcleos aislados de las células HeLa.

Figura 26. Cinética de destrucción de la monocapa de células HeLa por los parásitos del aislado CNCD 188 de *T. vaginalis* analizada por microscopía de contraste de fases.

Figura 27. Cinética de interacción entre *T. vaginalis* y las células HeLa en suspensión.

Figura 28. Fotomicrografía electrónica de transmisión de la interacción entre *T. vaginalis* y células HeLa en suspensión (35 min.).

Figura 29. Fotomicrografía electrónica de transmisión de la interacción entre *T. vaginalis* y células HeLa en suspensión (70 min.).

Figura 30. Fotomicrografía electrónica de transmisión de la interacción entre *T. vaginalis* y células HeLa en suspensión (140 min.).

Figura 31. Fotomicrografía de epifluorescencia y de contraste de fases de la interacción entre *T. vaginalis* y células HeLa en suspensión.

Figura 32. Electroforesis del DNA genómico de *T. vaginalis* y de las células HeLa.

Figura 33. Amplificación de un segmento del gen de  $\beta$ -globina.

Figura 34. Amplificación de la secuencia conservada de las CP de *T. vaginalis*.

## **Lista de gráficas**

Gráfica 1. Incidencia de la trichomonosis urogenital en México.

Gráfica 2. Evaluación de los niveles de citotoxicidad de dos diferentes aislados de *T. vaginalis*.



## Lista de abreviaturas

AICAR	5-Aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido
AIR	5-Aminoimidazol ribonucleótido
AMP	Monofosfato de adenosina
APRT	Adenina fosforibosil transferasa
ATP	Trifosfato de adenosina
CMP	Monofosfato de citidina
CNCD	Centro Nacional de Clínicas de Displasias del Hospital General de México
CP	Cisteín proteinasas
cpm	Cuentas por minuto
CTP	Trifosfato de citidina
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido deoxiribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetra acético
FAICAR	N-Formilaminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido
FGAM	Formilglicinamidina ribonucleótido
FGAR	Formilglicinamida ribonucleótido
GAR	Glicinamida ribonucleótido
GMP	Monofosfato de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
HGPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa
IMP	Monofosfato de inosina
kb	Kilobases
K <sub>M</sub>	Constante de Michaelis
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MF	Microscopía de fluorescencia
MO	Microscopía de luz
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido, forma oxidada
pb	Pares de bases

PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPi	Ion pirofosfato
PRPP	5-fosforibosil-1-pirofosfato
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
SAICAR	N-Succinil-5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido
SC	Suero de caballo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TAE	Tris acetato
TYM	Tripticasa-levadura-maltosa
UMP	Monofosfato de uridina
UTP	Trifosfato de uridina
XMP	Monofosfato de xantosina

## Resumen

*Trichomonas vaginalis* es un protozoo flagelado que parasita la superficie mucosa del tracto urogenital del humano. Dado que *T. vaginalis* es incapaz de sintetizar purinas o pirimidinas *de novo*, debe recurrir a vías de salvamento para obtener dichos nucleótidos. *T. vaginalis* también es incapaz de convertir sus ribonucleótidos en deoxiribonucleótidos y al parecer, el único medio del parásito para obtener cualquiera de los cuatro deoxiribonucleótidos necesarios para la síntesis de DNA depende del salvamento de deoxiribonucleósidos exógenos. *In vivo*, el contenido nuclear de las células epiteliales lisadas del huésped y la autólisis de bacterias podrían proveer una fuente de purinas y pirimidinas para el parásito, aunque hasta la fecha no existe ningún reporte que identifique una fuente directa de nucleótidos para el mismo. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue el estudiar la interacción de *T. vaginalis* con el núcleo de las células HeLa y determinar si éste podría actuar como una posible fuente de nucleótidos para el parásito.

La interacción entre *T. vaginalis* y el núcleo de las células HeLa se estudió a partir de dos enfoques diferentes. Por un lado, se examinó la interacción del parásito con los núcleos aislados de células HeLa en medio TYM sin suero con una relación núcleo:parásito 1:2 y por otra parte se estudió la interacción entre el parásito y las células HeLa en monocapa en medio de interacción TYM:DMEM 1:2 sin suero con una relación célula:parásito 1:5. En ambos casos, las interacciones se realizaron a 37°C a diferentes tiempos y se analizaron por microscopía de luz y por microscopía electrónica de transmisión.

Los resultados obtenidos de la interacción entre *T. vaginalis* y los núcleos aislados de las células HeLa indicaron que existe una asociación menos evidente entre el parásito y los núcleos aislados que la observada entre el parásito y los núcleos liberados de las células HeLa a los mismos tiempos. Mientras que a los 35 min. de interacción entre *T. vaginalis* y las células HeLa en monocapa el parásito fue capaz de despegar a las células HeLa del sustrato y de liberar a su núcleo, los parásitos incubados con los núcleos aislados de las células HeLa presentaron sólo algunas zonas de contacto con los núcleos aislados. A los 50 min. de interacción fue

posible observar algunas interdigitaciones entre la membrana del parásito y la envoltura nuclear de los núcleos aislados, aunque nuevamente esta asociación no fue tan estrecha como la observada con los núcleos liberados de las células HeLa en monocapa. Finalmente, a los 140 min. de interacción ya no fue posible encontrar núcleos aislados y en ambos casos los parásitos presentaron un número mayor de vacuolas con respecto al control, algunas de las cuales contenían material en su interior. La procedencia de dicho material no pudo ser corroborada con las técnicas utilizadas, pero es posible que corresponda —al menos en parte— a restos de los núcleos aislados o de los núcleos liberados por el parásito.

Finalmente, se marcó el DNA de las células HeLa en monocapa con  $^3\text{H}$ -timidina y se realizó la interacción con el parásito como se mencionó anteriormente, ya a que dicha interacción fue más eficiente que la interacción entre *T. vaginalis* y los núcleos aislados. Una vez concluida la interacción se extrajo el DNA de *T. vaginalis* y se cuantificó la incorporación de la  $^3\text{H}$ -timidina al mismo. La incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina al DNA de los parásitos fue de 4, 502.4 cpm /  $82.35 \times 10^6$  parásitos y se demostró por PCR que la marca radioactiva provenía del DNA de *T. vaginalis* y no de una contaminación por el DNA de las células HeLa.

En conclusión, los datos obtenidos en el presente trabajo indican que *T. vaginalis* interactúa de manera específica con el núcleo de las células HeLa y que utiliza el DNA de las mismas como una fuente directa de nucleótidos tales como la timidina.

## **Introducción**

### **Características clínicas de la infección por *T. vaginalis***

*T. vaginalis* infecta principalmente el epitelio del tracto urogenital (Petrin y col., 1998; Rein, 1990) del ser humano, su único huésped natural. El parásito es transmitido de una persona a otra por medio de las relaciones sexuales. Algunos datos experimentales sugieren que ocasionalmente *T. vaginalis* puede ser transmitido por artículos contaminados, pero esta forma de transmisión es poco común (Quinn y Krieger, 1990).

Una vez que la infección se ha establecido persiste por periodos prolongados en las mujeres pero sólo por periodos cortos en los hombres. La trichomonosis es básicamente una enfermedad de los años reproductivos y en raras ocasiones se observan las manifestaciones clínicas de la infección antes de la menarca o después de la menopausia. El periodo de incubación es de 4 a 28 días en alrededor del 50% de los individuos infectados. De acuerdo a la severidad de la infección, la trichomonosis puede clasificarse como aguda, crónica o asintomática (Petrin y col., 1998).

Es importante resaltar que las diferencias en las manifestaciones de la trichomonosis en hombres y mujeres se relacionan con factores de virulencia asociados al género del huésped. Entre los factores que han sido implicados se incluyen las diferencias en el pH, la influencia de las hormonas sexuales y el efecto del alto contenido de zinc de la próstata (Graves y Gardner, 1993).

### **Manifestaciones clínicas de la trichomonosis en la mujer**

El espectro de la trichomonosis clínica en las mujeres abarca desde un estado de portador asintomático hasta una vaginitis evidente. Los factores responsables de esta variabilidad no están completamente entendidos pero incluyen diferencias en la virulencia intrínseca de los aislados individuales y en la susceptibilidad individual

del huésped. Además, los síntomas de la trichomonosis pueden variar con el tiempo en una misma mujer (Rein, 1990).

Entre el 25% y el 50% de las mujeres infectadas son asintomáticas (Meysick y Garber, 1995; Petrin y col., 1998) y presentan un pH vaginal normal (de 3.8 a 4.2) y una flora vaginal normal; sin embargo, el 50% de estas mujeres desarrollarán síntomas clínicos durante los seis meses subsecuentes (Petrin y col., 1998).

La presentación clínica de la infección aguda revela una vulvitis difusa debido a una leucorrea abundante. Típicamente la descarga es espumosa, amarillenta o verde y mucopurulenta. Estos síntomas y signos son cíclicos y se agudizan cerca del periodo de la menstruación (Petrin y col., 1998).

En la infección crónica, los síntomas predominantes son ligeros con prurito y dispareunia, mientras que la secreción vaginal puede ser muy escasa y mezclada con moco. Esta forma de la enfermedad es particularmente importante desde el punto de vista epidemiológico debido a que estos individuos son la fuente principal de transmisión del parásito (Petrin y col., 1998).

### **Manifestaciones clínicas de la trichomonosis en el hombre**

En los hombres, la trichomonosis es generalmente asintomática; sin embargo, los pacientes con trichomonosis son más susceptibles a presentar descargas uretrales e inflamación que los hombres no infectados (Meysick y Garber, 1995).

La trichomonosis urogenital en los hombres puede clasificarse en tres grupos: (1) un estado de portador asintomático; (2) un estado de trichomonosis aguda, caracterizada por una uretritis purulenta profusa; y (3) un estado de enfermedad sintomática leve que clínicamente no es distinguible de otras causas de uretritis no gonocócica. En los hombres sintomáticos, las quejas comunes incluyen una descarga escasa clara a mucopurulenta, disuria y prurito ligero o una sensación de ardor inmediatamente después del coito. Las complicaciones asociadas con la trichomonosis incluyen, entre otras, uretritis no gonocócica, prostatitis, epididimitis, enfermedades de la uretra e infertilidad (Petrin y col., 1998).

Por otro lado, los hombres infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) con uretritis por trichomonosis sintomática presentan un aumento

seis veces mayor en la concentración de VIH en el semen en comparación con los hombres sin uretritis, lo que sugiere que *T. vaginalis* desempeña una función importante en la transmisión del VIH de hombres a mujeres (Hook, 1999).

### **Factores de riesgo asociados a la trichomonosis**

Diversos estudios han encontrado que la trichomonosis vaginal, al igual que otras enfermedades de transmisión sexual, puede estar asociada con un aumento en el riesgo de infección por VIH (Hook, 1999). En un estudio realizado por Laga y col. se determinó que la gonorrea, la infección por *Chlamydia* sp. y la trichomonosis están asociadas con un aumento en el riesgo de seroconversión al VIH-1 en mujeres (Laga y col., 1993).

La presencia de *T. vaginalis* a la mitad de la gestación está asociada con el parto prematuro, bajo peso neonatal y un aumento en la incidencia de endometritis post-parto (Meysick y Garber, 1995). En uno de los estudios más recientes, se ha encontrado que la trichomonosis está asociada con un aumento del 30% en partos prematuros y bajo peso neonatal (Hook, 1999). La infección por este protozooario también está asociada con complicaciones del tracto reproductivo, incluyendo infecciones post-aborto, infecciones post-cesárea y la ruptura prematura de las membranas amnióticas (Heine y McGregor, 1993).

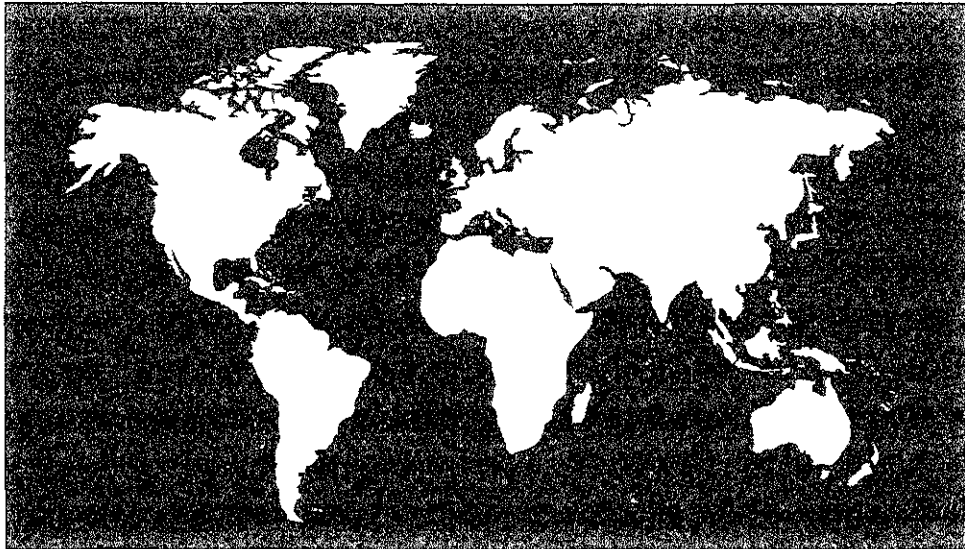
Aunque la vaginitis es la manifestación más común de la infección por *T. vaginalis* en las mujeres, la glándula de Bartholin es un foco ocasional de infección. Otras complicaciones asociadas con la trichomonosis incluyen a la endometritis, la infertilidad, la erosión cervical (Petrin y col., 1998) y un aumento en el riesgo relativo de desarrollar cáncer cervical (Fiori y col., 1999).

## **Epidemiología de la trichomonosis**

Como se mencionó anteriormente, *T. vaginalis* es el agente causal de la trichomonosis, la enfermedad de transmisión sexual no viral más común en el mundo (Lehker y Alderete, 2000). La infección por este parásito se presenta en todos los continentes y climas sin ninguna variabilidad estacional. La trichomonosis tiene una distribución cosmopolita y se ha identificado en todos los grupos raciales y estratos socioeconómicos (Petrin y col., 1998). Para 1995, la Organización Mundial de la Salud estimó que la incidencia de nuevos casos de trichomonosis a nivel mundial sería de alrededor de 170 millones de casos (World Health Organization, 1995) (Fig. 1).



## Estimated new cases of trichomoniasis among adults, 1995



North America	8 million
Latin America and the Caribbean	18 million
Western Europe	10 million
North Africa and Middle East	4.6 million
Sub-Saharan Africa	30 million
Eastern Europe and Central Asia	10 million
East Asia and Pacific	13 million
South and South-East Asia	75 million
Australasia	1 million
<b>Global total</b>	<b>170 million</b>

**Fig. 1. Incidencia estimada de la trichomonosis urogenital a nivel mundial para 1995.**

Fuente: World Health Organization. An overview of selected curable sexually transmitted diseases.

Cálculos recientes confirman que la trichomonosis es la enfermedad de transmisión sexual curable más común entre las mujeres sexualmente activas, registrándose alrededor de 5,000,000 de casos nuevos cada año en Estados Unidos (Hook, 1999).

La incidencia de la trichomonosis es de hasta el 56% en los pacientes que acuden a clínicas de enfermedades de transmisión sexual; sin embargo, esta tasa depende de numerosos factores incluyendo la edad, la actividad sexual, las costumbres sexuales, la fase del ciclo menstrual, las técnicas de examen, la recolección de especímenes y las técnicas de laboratorio utilizadas para detectar al parásito (Petrin y col., 1998).

Por otro lado, se ha demostrado que existe un aumento en el riesgo de infección en individuos con múltiples compañeros sexuales, mala higiene personal, un bajo nivel socioeconómico (Quinn y Krieger, 1990) y por la existencia previa de otras enfermedades de transmisión sexual (Heine y McGregor, 1993).

## Clasificación taxonómica de *T. vaginalis*

Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophorea
Superorden	Parabasalidea
Orden	Trichomonadida
Familia	Trichomonadidae
Subfamilia	Trichomonadinae
Género	<i>Trichomonas</i>
	<i>Trichomonas vaginalis</i> (Donné, 1836, emend. Ehrenberg, 1838)

### Características morfológicas utilizadas para la clasificación de *T. vaginalis*

**Reino Protista.** Microorganismos unicelulares eucariontes (Brusca y Brusca, 1990; Levine y col., 1980).

**Phylum Sarcomastigophora.** Núcleo de tipo único, excepto en los Foraminiferida heterocarióticos; la sexualidad, cuyo está presente, es esencialmente singámica; flagelos, pseudópodos o ambos tipos de organelos locomotores (Levine y col., 1980).

**Subphylum Mastigophora.** Típicamente, uno o más flagelos presentes en los trofozoítos; reproducción asexual básicamente por fisión binaria intracinetal; reproducción sexual conocida en algunos grupos (Levine y col., 1980).

**Clase Zoomastigophorea.** Cloroplastos ausentes; uno a varios flagelos; formas ameboides con o sin flagelos en algunos grupos; sexualidad conocida en pocos grupos; grupo polifilético (Levine y col., 1980).

**Superorden Parabasalidea.** Típicamente al menos algunos cinetosomas con flagelos o sin ellos arreglados en un patrón y asociados con filamentos radiculares característicos de los tricomonádidos; con uno o más aparatos parabasales argentófilos tipo Janicki (complejos de Golgi aplicados a filamentos con periodicidad de tipo A); sin mitocondrias; huso de división extranuclear (Levine y col., 1980).

**Orden Trichomonadida.** Típicamente cariomastigotes con cuatro a seis flagelos pero con un solo flagelo en un género y ningún flagelo en otro; cariomastigotes y acariomastigotes en una familia con una organización polimonadida permanente; en los mastigotes de géneros típicos un flagelo recurrente libre o adherido a la superficie del cuerpo sólo en su parte proximal o totalmente adherido; la membrana ondulante, si está presente, está asociada con el segmento adherente del flagelo recurrente; pelta y axostilo no contráctil en cada mastigote, excepto en un género; hidrogenosomas presentes; quistes verdaderos poco frecuentes conocidos en muy pocas especies; todos o casi todos parásitos (Levine y col., 1980).

## Morfología general de *Trichomonas vaginalis*

### Forma y tamaño

La forma y tamaño de *T. vaginalis* dependen de las condiciones del cultivo y del microambiente vaginal (Quinn y Krieger, 1990). En preparaciones fijadas y teñidas los parásitos miden, en promedio,  $9.7 \pm 0.07 \mu\text{m}$  de largo por  $7.0 \pm 0.04 \mu\text{m}$  de ancho; los organismos vivos son alrededor de un tercio más gruesos (Honigberg y Brugerolle, 1990) (Petrin y col., 1998).

Las condiciones fisicoquímicas (por ejemplo el pH, la temperatura, etc.) afectan la forma de los parásitos; sin embargo, la forma tiende a ser más uniforme entre los organismos crecidos en un medio de cultivo que entre los que se observan en las secreciones vaginales y en la orina. En general, en cultivos axénicos crecidos en medio líquido (por ejemplo TYM) con o sin bajas concentraciones de agar y sin partículas de alimento sólido, los organismos son generalmente elipsoidales, ovoides o esféricos. En presencia de mayores concentraciones de agar, de ciertas partículas de alimento y de varias capas de sustrato (células o tejidos) *in vivo* e *in vitro*, los parásitos tienden a ser ameboides (Honigberg y Brugerolle, 1990) (Petrin y col., 1998).

### Superficie y membrana celular

*T. vaginalis* presenta una membrana celular única (Müller, 1990) que está rodeada por una delgada cubierta celular (Honigberg y Brugerolle, 1990). La superficie del parásito es un mosaico de moléculas tipo adhesinas, receptores a proteínas de matriz extracelular, inmunógenos y moléculas transportadoras y almacenadoras de hierro (Petrin y col., 1998), aunque los diferentes aislados del parásito revelan una heterogeneidad con respecto a la presencia o ausencia de ciertas proteínas de superficie, especialmente de alto peso molecular (Müller, 1990). Las proteínas y glicoproteínas expuestas en la superficie del parásito desempeñan un papel importante en la adhesión, en las interacciones huésped-parásito y en la adquisición de nutrientes (Petrin y col., 1998).

Por otra parte, las pequeñas aberturas evidentes en la superficie de algunos organismos podrían corresponder a canales pinocíticos (Honigberg y Brugerolle, 1990; Warton y Honigberg, 1979) (Ovcinnikov y col., 1975).

### **Citoplasma y organelos**

El citoplasma de *T. vaginalis* es rico en gránulos de glucógeno y ribosomas (Heine y McGregor, 1993), los cuales pueden estar libres o asociados con membranas del retículo endoplásmico (Müller, 1990) que se encuentra rodeado al núcleo (Honigberg y Brugerolle, 1990). El aparato de Golgi (llamado también aparato parabasal) es prominente (Müller, 1990) y se localiza a la derecha del núcleo (Honigberg y Brugerolle, 1990) (Fig. 2).

El núcleo es alargado y se localiza en la porción anterior del organismo y, como en otros eucariontes, está rodeado por una envoltura nuclear de doble membrana que contiene poros nucleares (Honigberg y Brugerolle, 1990) (Fig. 2). El núcleo tiene una estructura granular fina y contiene un nucleolo electrón denso (Ovcinnikov y col., 1975).

El citoplasma también contiene fagosomas y estructuras análogas a los lisosomas (Müller, 1990) así como una gran variedad de vacuolas y vesículas relacionadas con la endocitosis (Kulda y col., 1986)(Fig. 2). Es importante señalar que en las células ameboides la zona periférica clara del citoplasma recibe el nombre de ectoplasma y está formada por numerosos microfilamentos (Honigberg y Brugerolle, 1990). La zona ectoplásmica carece de organelos membranosos así como de ribosomas y glucógeno y muestra una marcada fluorescencia con anticuerpos anti-actina (Kulda y col., 1986).

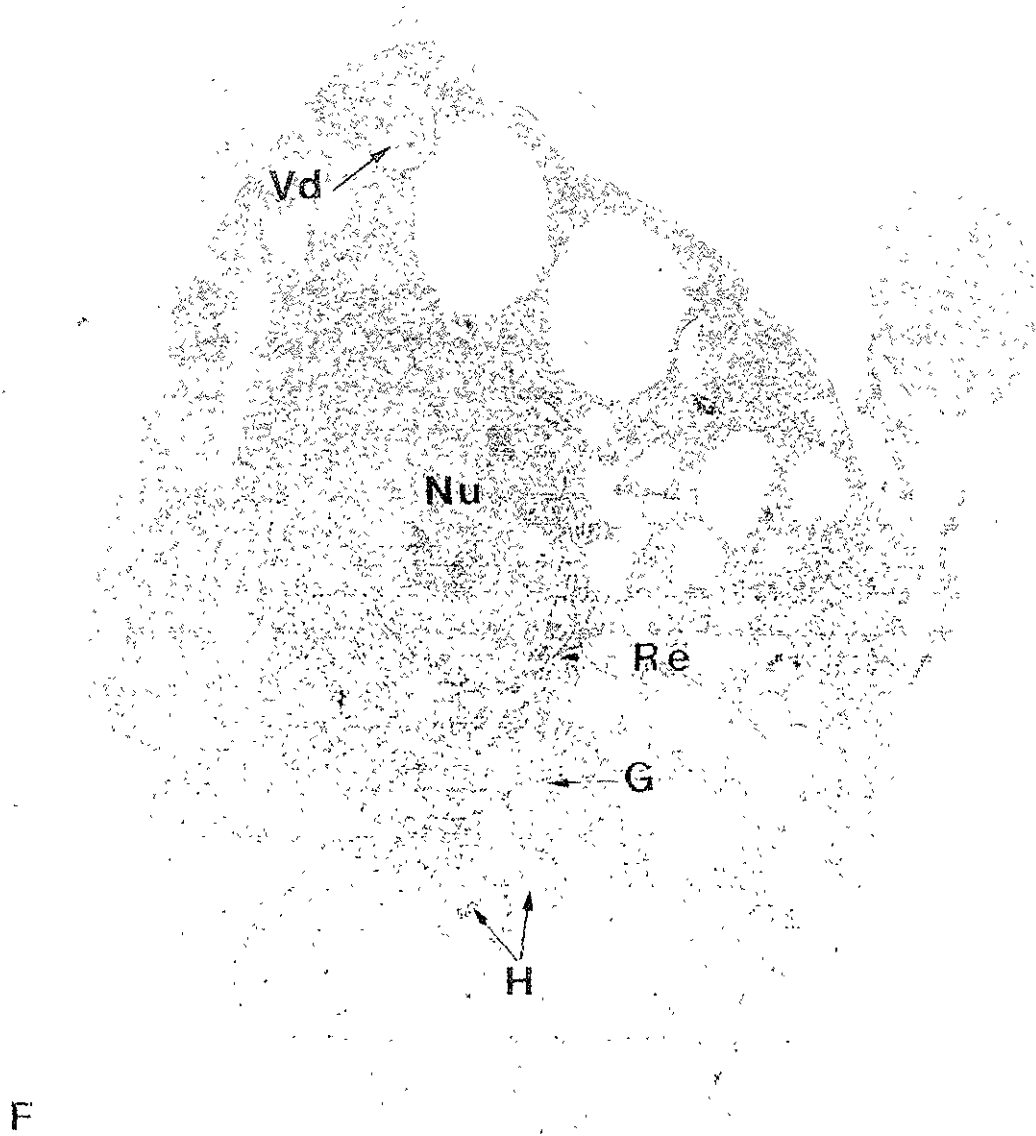
La mayoría de las células eucariontes superiores comparten un grupo invariable de organelos que incluye a las mitocondrias y peroxisomas. En contraste, algunos organismos parásitos (por ejemplo *Trypanosoma* spp. y *Plasmodium* spp.) carecen de peroxisomas mientras que otros (*Trichomonas* spp., *Giardia* spp. y *Entamoeba* spp.) carecen tanto de mitocondrias como de peroxisomas. Algunos de estos parásitos poseen otros organelos inusuales que no están presentes en las

células eucariontes superiores tales como el hidrogenosoma de *Trichomonas* spp. (Johnson y col., 1993).

Los hidrogenosomas son organelos que miden de 0.5 a 1.0  $\mu\text{m}$  de diámetro y que están rodeados por una doble membrana (Petrin y col., 1998). En el caso de *T. vaginalis* se localizan a lo largo de la costa y del axostilo (Bogitsh y Cheng, 1998). Los hidrogenosomas producen  $\text{H}_2$  bajo condiciones anaerobias y están presentes en una variedad de protistas parásitos y de vida libre no relacionados entre sí, todos los cuales viven en ambientes anóxicos o pobres en oxígeno (Müller, 1993). La distribución de los hidrogenosomas entre los protistas sigue principios ecológicos y fisiológicos. Todos los organismos que tienen hidrogenosomas viven en ambientes con un bajo contenido de oxígeno, es decir, en lugares anaerobios o microaerobios. La presencia de organelos productores de hidrógeno en diferentes eucariontes que probablemente surgieron en eventos independientes implica que dichos organelos confieren una ventaja selectiva significativa a los organismos que viven en microambientes pobres en oxígeno (Müller, 1993).

La morfología de los hidrogenosomas varía de grupo a grupo (Müller, 1993). Los estudios morfológicos realizados principalmente en *Trichomonas* spp. han mostrado que los hidrogenosomas son estructuras esféricas o ligeramente alargadas (Fig. 2). Además, los hidrogenosomas presentan un compartimento interno especial designado como vesícula periférica que acumula calcio. También es posible observar invaginaciones de las membranas del hidrogenosoma dentro de su matriz (Benchimol y col., 1996).

Los hidrogenosomas carecen de material genético (Johnson y col., 1993; Müller, 1993) y por lo tanto las proteínas hidrogenosomales son sintetizadas en poliribosomas libres y transportadas post-traduccionalmente al organelo (Johnson y col., 1993). Estudios bioquímicos del hidrogenosoma han revelado tanto similitudes como diferencias con las mitocondrias (Petrin y col., 1998), por lo que los hidrogenosomas podrían derivar de las mitocondrias o ser descendientes de un ancestro común de ambos organelos (Kulda, 1999).



**Fig. 2. Fotomicrografía electrónica de transmisión de *Trichomonas vaginalis*.**

Al observar al parásito por microscopía electrónica de transmisión se observa el núcleo (Nu), el aparato de Golgi o aparato parabasal (G), los hidrogenosomas (H), el retículo endoplásmico rugoso (Re), numerosas vacuolas digestivas (Vd) así como algunos flagelos (F). 13,000 X.

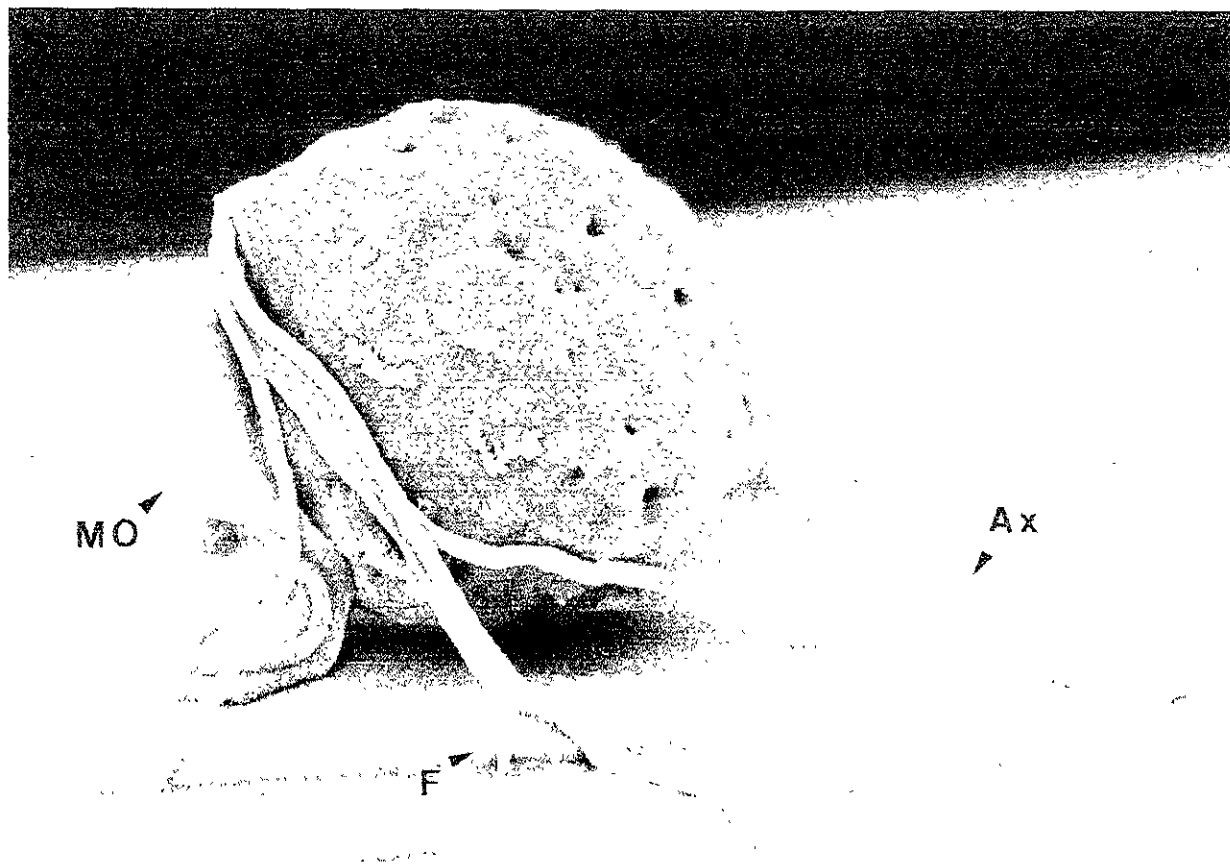


## Organelos motores

Los flagelos y la membrana ondulante son los organelos de locomoción. El principal medio de locomoción es la membrana ondulante, aunque los movimientos de los flagelos anteriores también contribuyen a la locomoción y permiten cambiar la dirección del movimiento (Kulda y col., 1986).

*T. vaginalis* posee cinco flagelos, cuatro anteriores y uno recurrente (Petrin y col., 1998). Los cuatro flagelos libres empiezan en un solo haz y posteriormente se separan (Ovcinnikov y col., 1975) (Fig. 3). En los organismos que no están en división, los flagelos de mayor tamaño miden  $12.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$  de largo (Honigberg y Brugerolle, 1990). Los cuatro flagelos anteriores emergen del canal periflagelar —localizado en el extremo anterior del organismo—mientras que el flagelo recurrente emerge independientemente de la parte dorsal del canal (Warton y Honigberg, 1979). El flagelo recurrente está incorporado en el margen libre de la membrana ondulante del parásito (Honigberg y Brugerolle, 1990) (Quinn y Krieger, 1990), la cual se extiende, en promedio, hasta la mitad o hasta dos tercios de la longitud total de la célula (Honigberg y Brugerolle, 1990) (Fig. 3). En un corte transversal, un flagelo presenta nueve pares de anillos periféricos (microtúbulos) y dos anillos separados en el centro. Cada flagelo está rodeado por una membrana externa y unido a un blefaroplasto. A su vez, cada blefaroplasto está formado por nueve tripletes de microtúbulos arreglados en forma de cilindro y en contraste con los flagelos no presenta microtúbulos centrales (Ovcinnikov y col., 1975).

El axostilo es una estructura delgada, hialina y en forma de bastón que empieza en el núcleo y bisecta al protozoo longitudinalmente (Petrin y col., 1998)(Fig. 3). La parte posterior del axostilo es ancha y forma una capítulum en el que se acomoda el núcleo. Posterior al núcleo, el capítulum se continua como un tronco axostilar delgado que pasa a través del eje anteroposterior del organismo (Honigberg y Brugerolle, 1990). El extremo inferior del axostilo protruye de la superficie celular en forma de una espícula de longitud variable (Ovcinnikov y col., 1975). La parte anterior del capítulum se continua con la pelta, una estructura membranosa que rodea el área de emergencia de los flagelos anteriores de la célula (Honigberg y Brugerolle, 1990).



**Fig. 3.** Fotomicrografía electrónica de barrido de *Trichomonas vaginalis*. Se muestra la membrana ondulante (MO) del parásito así como el axostilo (Ax) y los cuatro flagelos (F) libres.

## Reproducción y ciclo de vida

Aunque la división celular de este parásito se ha descrito extensamente mediante el uso de microscopía de luz, el ciclo de vida de *T. vaginalis* no es bien conocido. Como otros protozoarios parásitos se sabe que existe sólo como trofozoito y que carece de una etapa de quiste (Petrin y col., 1998).

La reproducción, que puede ocurrir cada 8 a 12 horas bajo condiciones óptimas, es por división mitótica y fisión longitudinal (Quinn y Krieger, 1990). El rango de pH óptimo para que el organismo se reproduzca es aproximadamente de 5 a 6. El pH normal de la vagina es de 4 a 4.5 y es mantenido por la actividad de un grupo de bacterias productoras de ácido láctico (*Lactobacillus acidophilus*); sin embargo, *T. vaginalis* puede alterar dichas bacterias haciendo que el pH se eleve por encima de 4.9, con lo que crea un ambiente propicio para su desarrollo (Bogitsh y Cheng, 1998).

En *T. vaginalis*, la mitosis dura un promedio de 45 min. y puede dividirse en cinco fases: profase, metafase, anafase temprana y tardía, telofase temprana y tardía y citocinesis. Como en otros protozoarios, la envoltura nuclear de *T. vaginalis* no desaparece durante la mitosis (Gómez-Conde y col., 2000).

El inicio de la división está marcado por la aparición de un cinetosoma suplementario que da lugar a un flagelo localizado ventralmente y por el desarrollo de dos organelos en forma de bastón —los atractóforos— que se convertirán en los polos de la división. De los atractóforos se desarrollan microtúbulos cromosomales que se extienden hacia y dentro del núcleo, posiblemente uniéndose a los cromosomas. También extendido entre los atractóforos se encuentra un huso extranuclear llamado paradesmosa (Honigberg y Brugerolle, 1990; Petrin y col., 1998). Por la elongación del huso extranuclear, los sistemas mastigotes hijos se separan y migran a polos opuestos al igual que los cromosomas hijos. Finalmente se forman dos núcleos hijos en la telofase y cada mastigote hijo reconstituye el número normal de flagelos (Honigberg y Brugerolle, 1990) y los organelos faltantes (Petrin y col., 1998).

*T. vaginalis* posee seis cromosomas visibles durante la metafase (Yeong-Seng y col., 1998; Yeong-Seng y col., 1997). De acuerdo a Leher y col., los cromosomas de

este protozooario pueden clasificarse en tres tamaños diferentes: hay tres maxicromosomas de 5,700, 4,700 y 3,500 kpb; dos cromosomas intermedios de ~1,200 kpb y 1,100 kpb y un minicromosoma de ~75 kpb. El mismo tamaño y número de cromosomas fue encontrado en 15 aislados de *T. vaginalis* obtenidos de diferentes regiones geográficas, reforzando la idea de un cariotipo altamente conservado entre los aislados del parásito a nivel mundial (Lehker y Alderete, 1999).

### **Nutrición, requerimientos para el crecimiento y cultivo**

*T. vaginalis* ha evolucionado para sobrevivir con las células del huésped y otros miembros de la flora microbiana. Este organismo es un parásito obligado debido a que carece de la capacidad para sintetizar muchas macromoléculas *de novo*, particularmente purinas, pirimidinas y varios lípidos. Estos nutrientes son adquiridos de las secreciones vaginales o a través de la fagocitosis de las células del huésped y de bacterias (Petrin y col., 1998).

La forma principal de alimentación de *T. vaginalis* está representada por la pinocitosis y la fagocitosis (Kulda y col., 1986; Ovcinnikov y col., 1975). Los canales pinocíticos se forman en cualquier parte de la superficie del flagelado y las vesículas pinocíticas pueden observarse en el citoplasma del parásito (Honigberg y Brugerolle, 1990). Por otra parte, *T. vaginalis* es capaz de fagocitar lactobacilos, células epiteliales vaginales, leucocitos y eritrocitos (Rendón-Maldonado y col., 1998). Aunque algunos autores han sugerido que el proceso de fagocitosis ocurre preferentemente en los dos tercios posteriores del parásito (Honigberg y Brugerolle, 1990), estudios recientes no han detectado dicha polarización (Rendón-Maldonado y col., 1998). La fagocitosis resulta en la formación de vacuolas alimenticias de distintos tamaños (Honigberg y Brugerolle, 1990). Es importante resaltar que la ingestión de un tipo particular de alimento no es un requerimiento esencial dado que estos organismos son capaces de crecer indefinidamente en un medio líquido sin partículas (Kulda y col., 1986).

El cultivo *in vitro* de *T. vaginalis* requiere de grandes cantidades de nutrientes esenciales, incluyendo carbohidratos, aminoácidos, purinas, pirimidinas, ácidos grasos, vitaminas y hierro (Heine y McGregor, 1993). Los aminoácidos y péptidos

pequeños pueden obtenerse a partir de péptidos digeridos de proteínas animales (peptonas), mientras que los extractos de levadura sirven como una fuente de vitaminas, purinas, pirimidinas y otros nutrientes (Linstead, 1990). En particular, el suero es esencial para el crecimiento de los parásitos dado que contiene lípidos, ácidos grasos, aminoácidos y trazas de algunos metales. El crecimiento *in vitro* óptimo de *T. vaginalis* ocurre en un pH de 6.0 a 6.3 (Petrin y col., 1998).

## **Patogénesis**

La investigación de los mecanismos patogénicos de *T. vaginalis* se ha centrado en los eventos iniciales de la infección, en particular la adherencia a las células epiteliales vaginales, el daño celular y la producción de factores de virulencia extracelulares (Meysick y Garber, 1995).

La citopatogenicidad de este parásito es un proceso multifactorial en el que la citoadherencia es seguida por un efecto citotóxico. Varias moléculas se han identificado como factores de virulencia involucrados en el mecanismo de daño a los tejidos tales como las adhesinas, un factor de desprendimiento celular, un receptor de unión a laminina y varias proteinasas (Álvarez-Sánchez y col., 2000).

## **Adherencia**

La adherencia específica de los microorganismos patógenos de las mucosas a las células huésped es un prerrequisito para la infección y patogénesis (Lehker y col., 1991). La adhesión de *T. vaginalis* a las células del epitelio vaginal está mediada por cuatro proteínas de superficie (Arroyo y col., 1992) que están reguladas por fierro (Lehker y col., 1991). La citoadherencia de los parásitos es dependiente del tiempo, temperatura y pH (Alderete y col., 1995). Asimismo, una o varias cisteín proteinasas están involucradas en el establecimiento de la infección (Arroyo y Alderete, 1989).

Cuyo *T. vaginalis* se une a las células del epitelio vaginal sufre una rápida transformación a una morfología ameboide, mientras que otra señal distinta induce a los parásitos a sintetizar mayores cantidades de adhesinas. De esta forma, se ha

propuesto que *T. vaginalis* posee un sofisticado sistema de transducción de señales que controla la expresión de genes de virulencia tales como los que codifican para las adhesinas (Arroyo y col., 1993).

Finalmente, debe destacarse que si bien estos organismos se adhieren a las células del epitelio vaginal por medio de adhesinas de superficie, la exfoliación de las células vaginales epiteliales y la citotoxicidad producida por el parásito indican que es probable que éstos residan por debajo de la superficie epitelial (Crouch y Alderete, 1999). Dado que *T. vaginalis* posee proteínas de superficie que se unen a la laminina (una glicoproteína de 800 kDa que se encuentra en todas las membranas basales), se ha sugerido que dicha molécula podría mediar la unión del parásito a las células epiteliales (Silva Filho y col., 1988; Silva Filho y col., 1998). De esta forma, *T. vaginalis* podría utilizar componentes de la matriz extracelular y de la membrana basal —tales como la fibronectina y la laminina— para establecer la colonización y causar una infección persistente (Crouch y Alderete, 1999).

### **Relación con células epiteliales**

La relación entre *T. vaginalis* y las células epiteliales es peculiar. Frecuentemente, el parásito desarrolla proyecciones de su superficie dirigidas hacia la célula epitelial en forma de pseudópodos, que están rodeados por dos membranas externas y consisten en material homogéneo carente de organelos. Las proyecciones pueden penetrar el citoplasma epitelial cortando fragmentos y en ocasiones la célula entera es capturada y destruida (Ovcinnikov y col., 1975). Estos parásitos colonizan el tejido del huésped en grupos formados por numerosos organismos densamente agrupados. Por lo general los parásitos están mutuamente interdigitados por sus extensiones ectoplásmicas. Ocasionalmente se presenta la fusión parcial de las membranas y se forman poros que permiten la comunicación intercelular directa (Kulda y col., 1986).

Observaciones ultraestructurales han demostrado que *T. vaginalis* puede destruir rápidamente monocapas de células epiteliales en cultivo. En primer lugar, los parásitos tienden a agruparse y unirse a las células, lo que ocasiona un cambio

en el parásito a una morfología ameboide y posteriormente se produce la lisis de las células epiteliales (González-Robles y col., 1995).

### **Factor de desprendimiento celular**

Hasta la fecha se han reportado varios factores de virulencia que son secretados por *T. vaginalis*, entre los cuales se incluye un factor de desprendimiento celular (Meysick y Garber, 1995). El factor de desprendimiento celular es una glicoproteína de 200 kDa lábil al calor y al ácido (Garber y col., 1989) que produce el redondeamiento y desprendimiento de monocapas de células en cultivo (Garber y col., 1989; Meysick y Garber, 1995). Las células desprendidas permanecen viables y son capaces de formar monocapas confluentes (Garber y col., 1989). Al parecer, la producción del factor de desprendimiento celular se asocia significativamente con la presentación clínica de la enfermedad (Garber y Lemchuk-Favel, 1990).

### **Hemólisis**

La lisis de los eritrocitos producida por *T. vaginalis* ocurre *in vivo*, donde se piensa que representa un medio para adquirir lípidos y hierro. La actividad hemolítica y la consecuente adquisición de nutrientes, especialmente hierro, se han sugerido como los responsables de la exacerbación de los síntomas observados durante y después de la menstruación (Fiori y col., 1999).

Algunos autores consideran que la hemólisis resulta del contacto directo con los eritrocitos y que se lleva a cabo en tres etapas: el reconocimiento y unión del parásito al eritrocito; la liberación de citolisinas que forman poros en la membrana de la célula y finalmente la separación del parásito y la lisis subsecuente del eritrocito. Sin embargo, la dependencia de contacto para la hemólisis es controversial dado que se ha observado que filtrados de *T. vaginalis* pueden ejercer un efecto hemolítico en los eritrocitos (Meysick y Garber, 1995). Es importante mencionar que *T. vaginalis* también es capaz de fagocitar eritrocitos, lo que proveería al parásito con recursos para su crecimiento y multiplicación (Rendón-Maldonado y col., 1998).

## Proteinasas

Neale y col. encontraron que *T. vaginalis* posee hasta 23 diferentes cisteín proteinasas (Neale y Alderete, 1990). Las cisteín proteinasas han sido implicadas como posibles factores líticos en la hemólisis de eritrocitos (Dailey y col., 1990); asimismo, se ha demostrado que participan en mecanismos de citotoxicidad (Álvarez-Sánchez y col., 2000) y que su actividad es requerida para la adherencia de *T. vaginalis* a las células epiteliales (Arroyo y Alderete, 1989).

Las cisteín proteinasas de *T. vaginalis* también son capaces de degradar a las inmunoglobulinas humanas IgG, IgM e IgA. Dado que las proteinasas que degradan a las Igs fueron encontradas en los lavados vaginales de pacientes con trichomonosis, es posible que esta propiedad constituya un mecanismo del parásito para evadir la respuesta inmune del huésped (Provenzano y Alderete, 1995).



## Metabolismo de *Trichomonas vaginalis*

*T. vaginalis* es un organismo eucarionte que difiere de la mayoría de las células eucariontes en varios aspectos importantes, principalmente en sus requerimientos nutricionales y en su metabolismo energético. Estos parásitos dependen de una gran cantidad de metabolitos preformados tales como purinas, pirimidinas y diversos lípidos, lo que revela la ausencia de importantes vías biosintéticas en dicho parásito (Müller, 1990).

### Metabolismo de carbohidratos

*T. vaginalis* es básicamente un organismo anaerobio aerotolerante (Quinn y Krieger, 1990) (Johnson y col., 1993) que obtiene mucha de su energía de la degradación incompleta de azúcares simples acompañado por la producción de ácidos orgánicos de cadena corta tales como el ácido láctico y el ácido acético. El ácido acético es producido en el hidrogenosoma a partir del ácido pirúvico. Este último compuesto es producido en el citoplasma vía glicólisis y una parte entra en el hidrogenosoma mientras que el resto es reducido a ácido láctico en el citoplasma y excretado (Bogitsh y Cheng, 1998).

Los hidrogenosomas intactos aislados de *T. vaginalis* y *Tritrichomonas foetus* producen, bajo condiciones anaerobias, cantidades aproximadamente equimolares de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> y acetato a partir del piruvato. Este proceso está acompañado por la desaparición de ADP del medio y por la aparición de ATP en el mismo. En presencia de oxígeno, los organelos también producen CO<sub>2</sub> y acetato y fosforilan el ADP en ATP; sin embargo, no se forma H<sub>2</sub> y el oxígeno es consumido, es decir, el organelo asume una función respiratoria. Este metabolismo aerobio es inactivado rápidamente, indicio que el oxígeno es tóxico para los organelos aislados (Müller, 1993).

Es importante resaltar que el mantenimiento de la homeostásis interna de *T. vaginalis* requiere de la utilización de hasta la mitad de su consumo de carbohidratos, lo que le permite sobrevivir en un ambiente donde el abastecimiento de nutrientes y otras condiciones varían ampliamente (Ter Kuile, 1994).

## Metabolismo de lípidos

*T. vaginalis* contiene colesterol, triacilgliceroles, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y esfingomielina como sus principales lípidos; sin embargo, el parásito es incapaz de biosintetizar ácidos grasos y colesterol a partir de sus precursores (Beach y col., 1990). Beach y col. han demostrado que el parásito es capaz de incorporar ácidos grasos y colesterol exógenos. Los ácidos grasos no son utilizados como fuente de energía ni son alterados estructuralmente, sino que son utilizados directamente en la formación y el recambio de fosfoglicéridos y esfingolípidos para mantener la integridad de las membranas del parásito (Beach y col., 1991).

*In vivo*, los eritrocitos podrían ser una fuente de lípidos para el parásito. Lehker y col. mostraron que los lípidos purificados de eritrocitos y la hemoglobina purificada son capaces de proveer lípidos y hierro para el crecimiento y multiplicación de los parásitos (Lehker y col., 1990).

## Metabolismo de aminoácidos

Los carbohidratos son la fuente principal de energía para *T. vaginalis*; sin embargo, en condiciones en donde los carbohidratos están ausentes el parásito consume grandes cantidades de aminoácidos—tales como la arginina, la treonina y la leucina—que le permiten sobrevivir y crecer. Es probable que cuando los carbohidratos están disponibles los aminoácidos sean consumidos para otros propósitos tales como la síntesis de proteínas (Zuo y col., 1995).

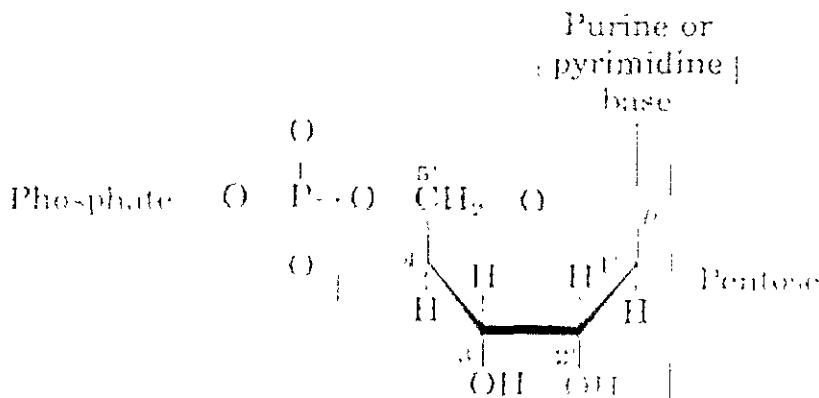
Hasta la fecha, se ha encontrado que *Giardia lamblia* y las dos especies de *Entamoeba* también consumen arginina y otros aminoácidos, por lo que se piensa que la habilidad de catabolizar algunos aminoácidos para la producción de energía sería una adaptación común de estos parásitos para la sobrevivir en un ambiente anaerobio (Zuo y col., 1995).

## Metabolismo de ácidos nucleicos en eucariontes superiores

### Características generales de los nucleótidos

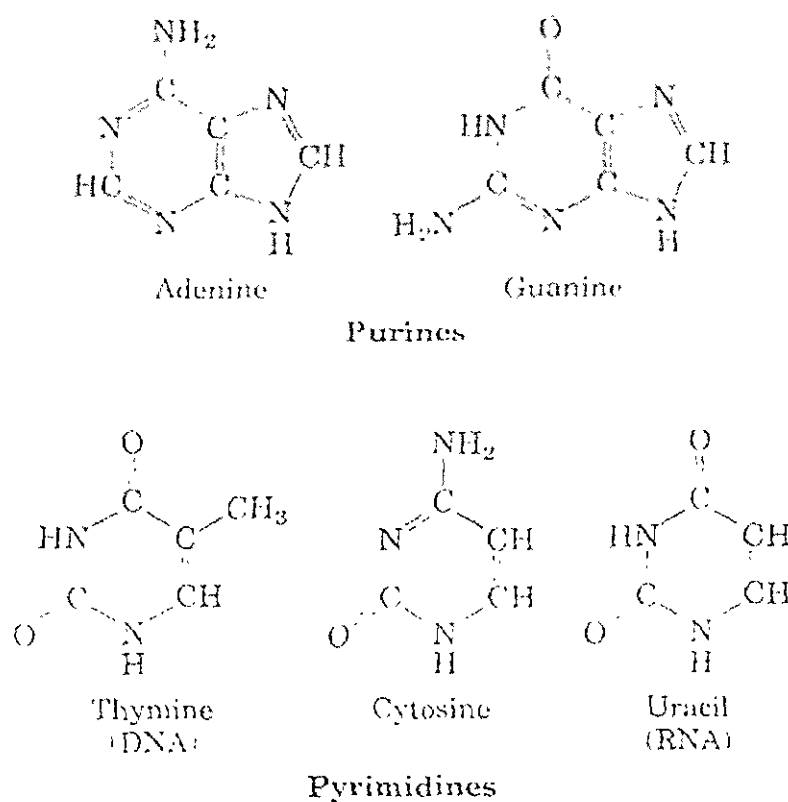
Los nucleótidos son compuestos ricos en energía que dirigen procesos metabólicos (principalmente biosíntesis) en todas las células. También actúan como señales químicas y son componentes estructurales de algunos cofactores enzimáticos e intermediarios metabólicos. Los ácidos nucleicos -DNA y RNA- son los acarreadores moleculares de la información genética (Lehninger y col., 1993).

Los nucleótidos están formados por tres compuestos característicos: (1) una base nitrogenada, (2) una pentosa (azúcar de cinco carbonos) y (3) un grupo fosfato. Sin el grupo fosfato, la molécula es llamada nucleósido (Fig. 4) (Lehninger y col., 1993).



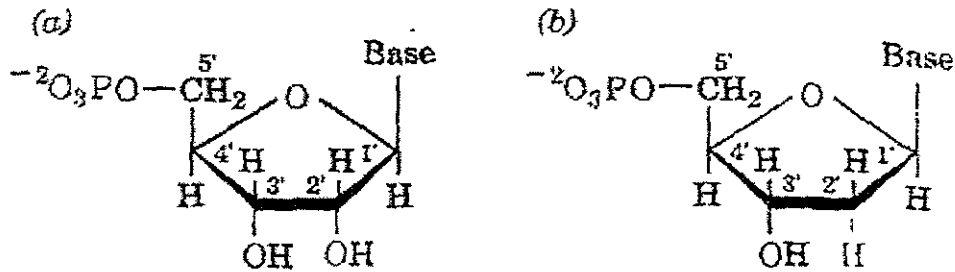
**Fig. 4. Estructura general de los nucleótidos.** La estructura que se muestra corresponde a un ribonucleótido. Tomado de Lehninger y col., 1993.

Las bases nitrogenadas derivan de dos compuestos básicos, las pirimidinas y las purinas. La base está unida covalentemente (en el N-1 de las pirimidinas y el N-9 de las purinas) al C1' de la pentosa, mientras que el grupo fosfato está esterificado al C5'. Tanto el DNA como el RNA contienen dos bases de purina principales, adenina y guanina. El DNA y RNA también contienen dos pirimidinas principales; en ambos tipos de ácidos nucleicos una de ellas es la citosina. La única diferencia entre las bases del DNA y las del RNA es la naturaleza de la segunda pirimidina: timidina en el DNA y uracilo en el RNA (Fig. 5) (Lehninger y col., 1993).



**Fig. 5. Principales bases de purina y pirimidina de los ácidos nucleicos.** Tomado de Lehninger y col., 1993.

Por otro lado, en el RNA la pentosa es siempre una D-ribosa mientras que en el DNA es una 2'-deoxi-D-ribosa (Fig. 6) (Lehninger y col., 1993).



**Fig. 6. Estructura química de (a) ribonucleótidos y (b) deoxiribonucleótidos.** Tomado de Voet y Voet, 1995.

### Biosíntesis y degradación de los nucleótidos

Hay dos tipos de vías que dan lugar a los nucleótidos: las vías *de novo* y las vías de salvamento. La síntesis *de novo* de los nucleótidos empieza con sus precursores metabólicos: aminoácidos, ribosa-5-fosfato,  $CO_2$  y  $NH_3$ , mientras que las vías de salvamento reciclan las bases libres y los nucleósidos liberados por la degradación de los ácidos nucleicos. Es importante hacer notar que las bases libres guanina, adenina, timina, citidina y uracilo no son intermediarios en estas vías; es decir, las bases no son sintetizadas y luego unidas a la ribosa como podría esperarse. La estructura del anillo de purina es construida con uno o varios átomos a la vez y es unida a la ribosa a lo largo del proceso. Por su parte, el anillo de pirimidina es sintetizado como orotato, unido a la ribosa fosfato y luego convertido a los nucleótidos de pirimidina comunes utilizados en la síntesis de ácidos nucleicos; sin embargo, aunque las bases libres no son intermediarias en las vías de síntesis *de novo*, si son intermediarias en algunas de las vías de salvamento (Lehninger y col., 1993).

Existen varios precursores importantes que son compartidos por las rutas de biosíntesis *de novo* de pirimidinas y purinas: (1) el PRPP participa en ambas vías y

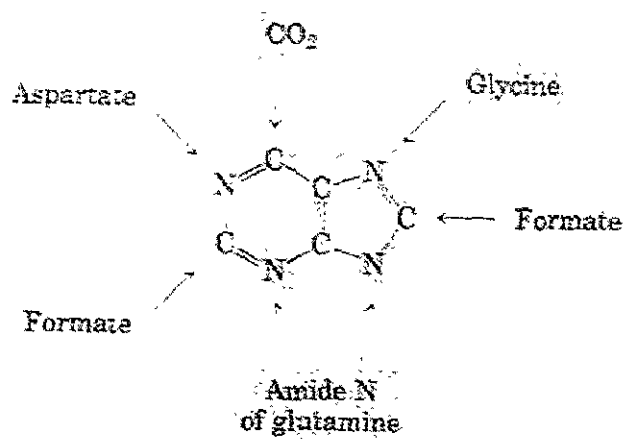
(2) un aminoácido es un precursor importante en cada vía: glicina en el caso de las purinas y aspartato para las pirimidinas (Lehninger y col., 1993).

Es importante mencionar que las reservas de nucleótidos en las células (a excepción del ATP) son muy pequeñas; de hecho, representan el 1% o menos de las cantidades requeridas para sintetizar el DNA celular, razón por la cual la síntesis de nucleótidos debe continuar durante la síntesis de ácidos nucleicos y en algunos casos puede limitar las tasas de replicación y transcripción del DNA (Lehninger y col., 1993).

### **Biosíntesis *de novo* de las purinas**

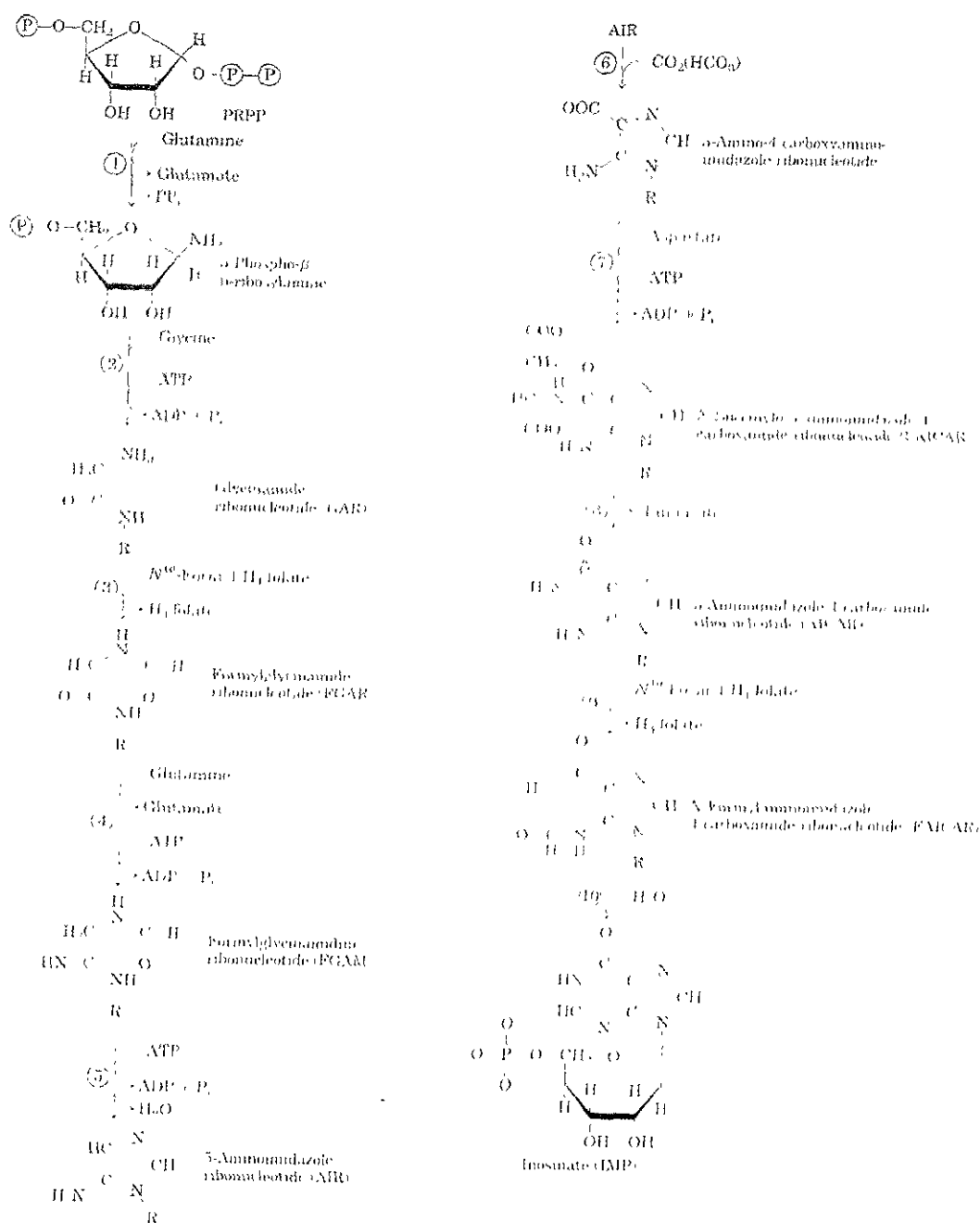
La mayoría de las células pueden sintetizar purinas *de novo* a partir de moléculas precursoras de menor tamaño. Como se mencionó anteriormente, en la síntesis *de novo* de los nucleótidos de purina las bases no son sintetizadas en su forma libre, sino que el anillo de purina es ensamblado unido a una ribosa-5-fosfato, de manera que el anillo de purina está armado ya es un nucleótido (Elliott y Elliott, 1997).

Los dos nucleótidos de purina principales son la adenosina 5'-monofosfato (AMP) y la guanosina 5'-monofosfato (GMP). Estos nucleótidos contienen las bases adenina y guanina respectivamente. En la figura 7 se muestra el origen de los átomos de carbono y nitrógeno del sistema de anillos de las purinas (Lehninger y col., 1993).



**Fig. 7. Origen de los átomos del anillo de las purinas.** El formate es provisto en forma de  $\text{N}^{10}$ -formiltetrahidrofolato. Tomado de Lehninger y col., 1993.

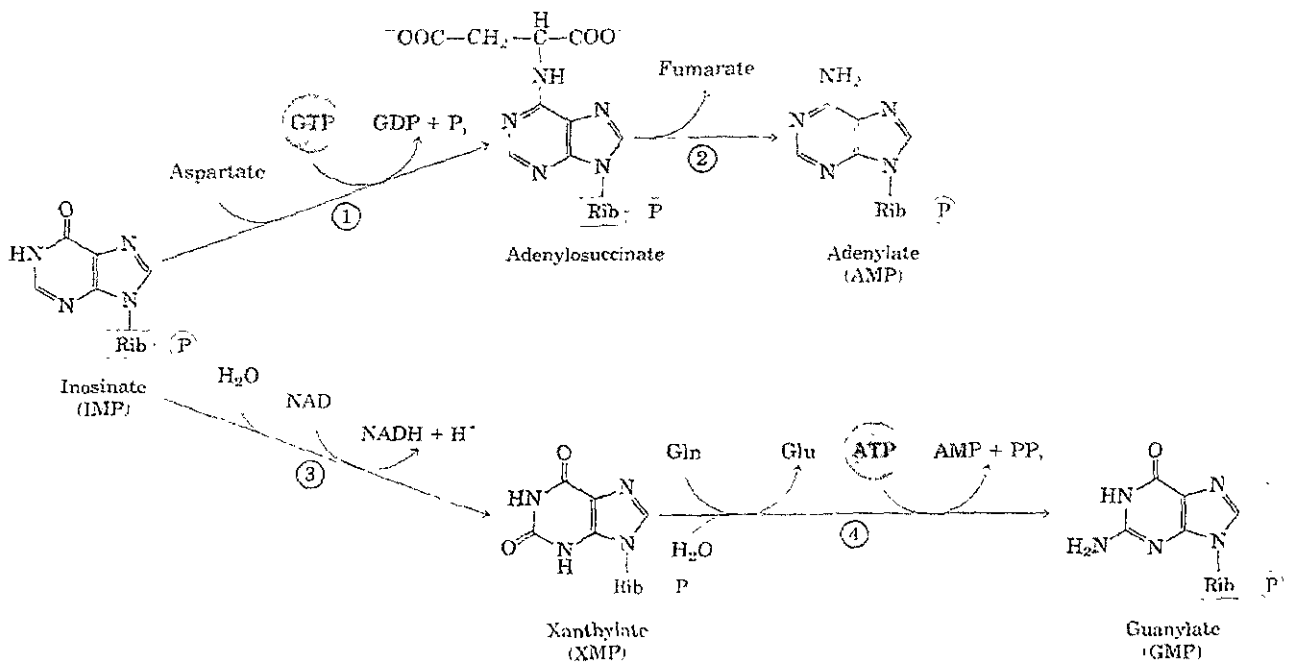
En el primer paso (1) de la ruta de biosíntesis *de novo* de las purinas, un grupo amino donado por la glutamina se une al C-1 de la PRPP (Fig. 8). La 5-fosforibosilamina resultante es la estructura sobre la que se construirá el anillo de purina. El siguiente paso es la adición de tres átomos de la glicina (2). Para esta reacción de condensación se consume un ATP para activar el grupo carboxilo de la glicina. El grupo amino añadido es entonces formilado por el  $\text{N}^{10}$ -formiltetrahidrofolato (3) y un nitrógeno es donado por la glutamina (4) antes de que la deshidratación y el cierre del anillo produzcan el anillo de imidazol de cinco miembros que constituye el núcleo de la purina (5). En este punto, tres de los seis átomos necesarios para el segundo anillo en la estructura de la purina están en su lugar. Para completar el proceso, se añade un grupo carboxilo (6). Esta carboxilación es poco usual dado que no requiere biotina sino que utiliza el bicarbonato que generalmente está presente en las soluciones acuosas. El aspartato dona entonces su grupo amino al anillo de imidazol en dos pasos (7 y 8) que involucran la formación de un enlace amida seguido por la eliminación del esqueleto de carbono del aspartato como fumarato. El último carbono es donado por la  $\text{N}^{10}$ -formiltetrahidrofolato (9) y el cierre del anillo da lugar al segundo de los dos anillos unidos del núcleo de las purinas (10). El primer intermediario en tener un anillo de purina completo es el inosinato (IMP) (Lehninger y col., 1993).



**Fig. 8. Pasos en la construcción del anillo de purina del inosinato.** Después del paso 2, la R simboliza el grupo 5-fosfo-D-ribosil sobre el que se construye el anillo de purina. Las enzimas son: 1) glutamina-PRPP-amidotransferasa, 2) GAR sintetasa, 3) GAR transformilasa, 4) FGAR amidotransferasa, 5) FGAM ciclasa (AIR sintetasa), 6) AIR carboxilasa, 7) SAICAR sintetasa, 8) SAICAR liasa, 9) AICAR transformilasa y 10) IMP sintetasa. Tomado de Lehninger y col., 1993.



La conversión de inosinato a adenilato (Fig. 9) requiere de la inserción de un grupo amino derivado del aspartato; lo anterior se lleva a cabo mediante dos reacciones similares a las utilizadas para introducir el N-1 del anillo de purina (pasos 7 y 8 de la figura anterior). Una diferencia importante es que se utiliza GTP en lugar de ATP como fuente de un fosfato de alta energía al sintetizar el adenilosuccinato. El guanilato se forma por la oxidación del inosinato en el C-2 utilizo  $\text{NAD}^+$  seguido por la adición de un grupo amino derivado de la glutamina. En el paso final, el ATP es convertido a AMP y  $\text{PPi}$  (Lehninger y col., 1993).

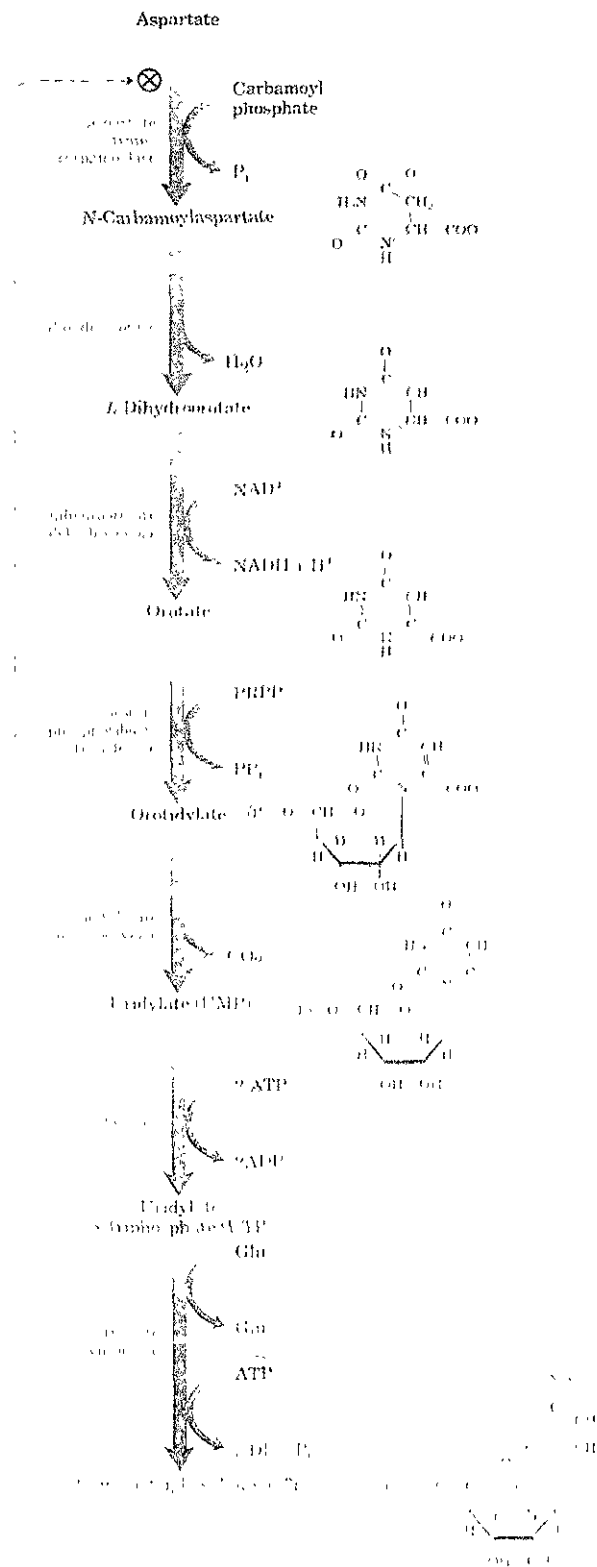


**Fig. 9. Síntesis del AMP y GMP a partir del IMP.** Las enzimas son: 1) adenilosuccinato sintetasa, 2) adenilosuccinato liasa, 3) IMP dehidrogenasa y 4) XMP-glutamina amidotransferasa. Tomado de Lehninger y col., 1993.

## Biosíntesis *de novo* de las pirimidinas

Los ribonucleótidos de pirimidinas más comunes son la citidina 5'-monofosfato (CMP) y la uridina 5'-monofosfato (UMP) los cuales contienen las pirimidinas citosina y uracilo respectivamente. La biosíntesis de nucleótidos de pirimidina (Fig. 10) procede de forma un tanto diferente de la síntesis de nucleótidos de purina ya que en este caso el anillo de seis miembros de las pirimidinas es construido primero y luego es unido a la ribosa-5-fosfato.

En el primer paso de la ruta de biosíntesis, el carbamoil fosfato reacciona con el aspartato para producir N-carbamoilaspartato. Esta reacción es catalizada por la aspartato transcarbamoilasa. Al retirar el agua del N-carbamoilaspartato —reacción catalizada por la dihidroorotasa— el anillo de pirimidina se cierra para formar L-dihidroorotato. Este compuesto es oxidado para producir un derivado de la pirimidina, el orotato, en una reacción en la que el  $\text{NAD}^+$  es el último aceptor de electrones. Una vez que se ha formado el orotato, la cadena lateral de la ribosa-5-fosfato, provista por la PRPP, se une al orotato para producir orotidilato. El orotidilato es entonces descarboxilado para producir uridilato, que es fosforilado a UTP. El CTP es formado a partir del UTP por la acción de la citidilato sintetasa. En esta reacción el donador de nitrógeno es una glutamina (en animales) o  $\text{NH}_4^+$  (en algunas bacterias) (Lehninger y col., 1993).



**Fig. 10. Biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina UTP y CTP vía orotidilato.** La ribosa-5-fosfato es añadida al anillo de pirimidina por la orototato fosforibosil transferasa. Tomado de Lehninger y col., 1993.

## Vías de salvamento de purinas y pirimidinas

Dado que las purinas son moléculas energéticamente costosas de producir un mecanismo para reutilizar las bases de purina libres puede reducir la tasa de síntesis *de novo* que debe realizar una célula. De hecho, algunas células tales como los eritrocitos no tienen vías *de novo* para la síntesis de nucleótidos y por lo tanto deben depender de las vías de salvamento (Elliott y Elliott, 1997).

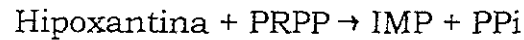
Aunque la dieta contiene purinas en forma de ácidos nucleicos, se sabe que la mayoría de ellas son destruidas por las células epiteliales del intestino y no son absorbidas. En contraste, las purinas inyectadas al torrente sanguíneo sí son utilizadas por las células. El hígado es una de las fuentes principales de síntesis de purinas y hay evidencias de que libera las bases a la sangre para que sean utilizadas por otras células —tales como los reticulocitos— que carecen de la vía *de novo* completa. Por otra parte, también es probable que la vía de salvamento recicle, dentro de las células, las bases de purina liberadas por la degradación de los ácidos nucleicos. La destrucción lisosomal de los componentes celulares que contienen ácidos nucleicos podría liberar dichas bases (Elliott y Elliott, 1997).

El reciclaje de las bases de purina preformadas tiene la ventaja de ahorrar energía siempre y cuyo la vía de síntesis *de novo* sea reducida de manera correspondiente. Lo anterior puede lograrse de dos formas: (1) el salvamento reduce el nivel de PRPP y por lo tanto el de la vía y (2) el AMP y GMP producidos por el salvamento ejercen una retroalimentación negativa de la vía (Elliott y Elliott, 1997).

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de las células tienen una degradación activa de muchos de sus ácidos nucleicos (particularmente algunos tipos de RNA) que resultan en la liberación de adenina, guanina e hipoxantina (el producto de deaminación de la adenina). Estas purinas libres son reconvertidas a sus nucleótidos correspondientes por medio de las vías de salvamento. En contraste con la vía de síntesis de purinas *de novo*, que es básicamente igual en todas las células, las vías de salvamento varían en su tipo y distribución (Voet y Voet, 1995).

En los mamíferos, las purinas son salvadas por dos enzimas diferentes. La APRT cataliza la formación de AMP por la transferencia de adenina al PRPP con la

liberación de PPi, mientras que la HGPRT cataliza una reacción análoga tanto para la hipoxantina como para la guanina (Voet y Voet, 1995):



En algunos microorganismos existe una vía de salvamento similar para las bases de pirimidina, pero las pirimidinas no son salvadas en cantidades significativas en los mamíferos (Lehninger y col., 1993).

### **Conversión de ribonucleótidos a deoxiribonucleótidos**

Los deoxiribonucleótidos son sintetizados a partir de sus ribonucleótidos correspondientes por la reducción de su C2'. Las enzimas que catalizan la formación de deoxiribonucleótidos por la reducción de los ribonucleótidos correspondientes son llamadas ribonucleótido reductasas (Voet y Voet, 1995).

## **Metabolismo de ácidos nucleicos en *Trichomonas vaginalis***

El metabolismo de ácidos nucleicos en protozoarios parásitos anaerobios (*T. vaginalis*, *T. foetus*, *G. lamblia* y *E. histolytica*) se ha estudiado intensamente en años recientes. Al habitar la superficie mucosa del tracto urogenital o intestinal del huésped, estos parásitos están rodeados por las células epiteliales del huésped, las cuales pueden ser dañadas rápidamente por las reacciones inflamatorias a la infección parasítica. El daño celular proveería a dichos parásitos con una rica fuente de ácidos nucleicos del huésped, los cuales podrían utilizar efectivamente debido a su alta capacidad fagocítica y a su elevada actividad lisosomal. De esta forma, los parásitos podrían simplificar su metabolismo de ácidos nucleicos y sobrevivir mediante el salvamento de nucleósidos y bases preformadas. Hasta la fecha, varios investigadores han demostrado que *T. vaginalis*, *T. foetus*, *G. lamblia* y *E. histolytica* son incapaces de sintetizar nucleótidos de purinas o pirimidinas *de novo*. La falta total de síntesis *de novo* de nucleótidos es compensada con vías de salvamento de nucleósidos o bases de purina y pirimidina (Wang, 1990).

### **Metabolismo de purinas en *Trichomonas vaginalis***

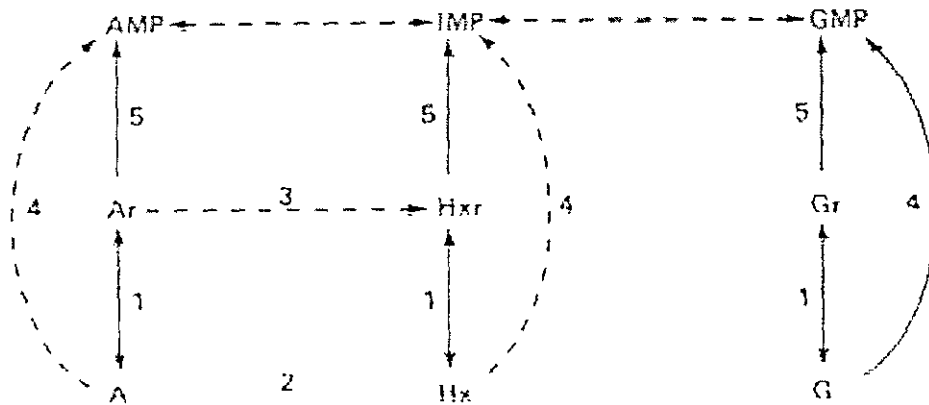
La incapacidad de *T. vaginalis* para incorporar cuatro precursores potenciales de las purinas (glicina, bicarbonato, formato y serina) en bases de ácidos nucleicos en ausencia de purinas exógenas indica que este organismo —al igual que otros protozoarios parásitos— es incapaz de sintetizar el anillo de purina, por lo que la capacidad para salvar purinas preformadas es esencial para este parásito (Heyworth y col., 1982; Miller y Lindstead, 1983).

De acuerdo a Heyworth y col., *T. vaginalis* puede salvar eficientemente bases de guanina y adenina y sus nucleósidos; sin embargo, la falta de interconversión entre los mononucleótidos de purina es poco usual dado que la mayoría de las células, incluyendo a los protozoarios parásitos, son capaces de interconvertir AMP y GMP vía IMP. La ausencia aparente de enzimas que interconviertan purinas en *T. vaginalis* implica que el organismo tiene un requerimiento absoluto tanto de adenina como de guanina o de sus nucleósidos y también explica la no incorporación de

hipoxantina y del anillo de inosina en nucleótidos de guanina y adenina (Fig. 11) (Heyworth y col., 1982).

La incapacidad de *T. vaginalis* para incorporar hipoxantina o inosina en ácidos nucleicos y su incapacidad para interconvertir nucleótidos de guanina y adenina sugiere un bloqueo tanto en la vía IMP a AMP como en la vía IMP a GMP. La inoperabilidad de dichas vías y la falta de síntesis *de novo* de purinas implican que *T. vaginalis* depende de la adenosin cinasa para obtener nucleótidos de adenina y de la guanosin cinasa —una enzima que al parecer está ausente en los sistemas de los mamíferos— para obtener nucleótidos de guanina (Miller y Lindstead, 1983).

La incapacidad de la guanosin cinasa para fosforilar deoxiribonucleósidos de purina sugiere que la ruta principal para el salvamento de deoxiribonucleósidos es por medio de una nucleósido fosfotransferasa (Miller y Miller, 1991).



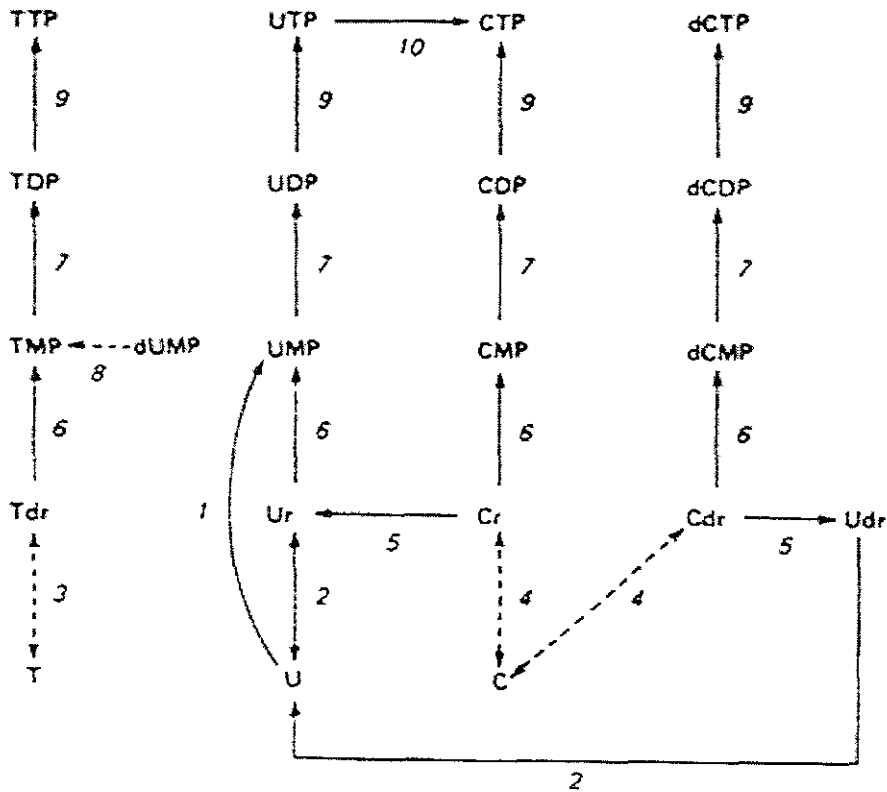
**Fig. 11. Vías de salvamento de purinas en *T. vaginalis*.** La flecha continua indica las vías presentes mientras que la flecha discontinua indica las vías aparentemente ausentes. Las enzimas son: 1) purina nucleósido fosforilasa; 2) adenina deaminasa; 3) adenosina deaminasa; 4) purina fosforibosiltransferasa; 5) purina nucleósido cinasa. A, adenina; Ar, adenosina; Hx, hipoxantina; Hxr, inosina; G, guanina; Gr, guanosina. Tomado de Heyworth y col., 1982.

## Metabolismo de pirimidinas en *Trichomonas vaginalis*

La incapacidad de incorporar bicarbonato, orotato y aspartato en el anillo de pirimidina (Heyworth y col., 1984; Miller y Lindstead, 1983; Wang y Cheng, 1984) y la ausencia aparente de las dos enzimas finales de la vía sintética *de novo* indican que *T. vaginalis* es incapaz de sintetizar el anillo de pirimidina y por lo tanto depende del salvamento de pirimidinas preformadas exógenas para sobrevivir (Heyworth y col., 1984). Heyworth y col. demostraron la presencia de varias enzimas de salvamento de pirimidinas en *T. vaginalis* —incluyendo nucleosidasas y fosforilasas de nucleósidos— lo que indica que dichas vías están involucradas activamente en el salvamento de bases y nucleósidos de pirimidina (Heyworth y col., 1984). Sin embargo, en *T. vaginalis*, la uridina y el uracilo sólo pueden ser incorporados al RNA pero no al DNA. La falta de conversión de UMP a TMP indica que existe una vía totalmente aislada para la obtención de TMP en *T. vaginalis* (Fig. 12) (Wang y Cheng, 1984).

Wang y Cheng (Wang y Cheng, 1984) reportaron que la timidina es convertida a TMP por la acción de la deoxirribonucleosido fosfotransferasa, la cual fosforila a la timidina, deoxicitidina, deoxiadenosina y deoxiguanosina (Wang y Cheng, 1984). En contraste, Miller y Lindstead (Miller y Lindstead, 1983) no encontraron ninguna actividad de deoxirribonucleosido fosfotransferasa pero observaron que tanto los ribonucleósidos como los deoxiribonucleósidos de purina y pirimidina son fosforilados en presencia de ATP, lo que indicaría la presencia única de actividades de cinasa en *T. vaginalis*. La discrepancia entre los datos de unos y otros sobre la presencia o ausencia de actividades de cinasa en *T. vaginalis* fue resuelta por Strosselli y col., quienes demostraron que tanto la timidina cinasa como la deoxirribonucleosido fosfotransferasa están presentes en extractos de *T. vaginalis* (Strosselli y col., 1998).





**Fig. 12. Vías de salvamento de pirimidinas en *T. vaginalis*.** La flecha continua representa las vías presentes según lo indican estudios metabólicos o enzimáticos, mientras que la flecha discontinua indica las vías aparentemente ausentes. Las enzimas son: 1) uracilo fosforibosiltransferasa; 2) (deoxi) uridina fosforilasa; 3) timidina fosforilasa; 4) (deoxi) citidina fosforilasa; 5) (deoxi) citidina deaminasa; 6) pirimidina nucleosido cinasa; 7) nucleosido monofosfato cinasa; 8) timidilato sintasa; 9) nucleosido difosfato cinasa; 10) CTP sintetasa. U, uracilo; C, citosina; Ur, uridina; Udr, deoxiuridina; Cr, citidina; Cdr, deoxicitidina; T, timina; Tdr, timidina. Tomado de Heyworth y col., 1984.

## **Metabolismo de deoxiribonucleótidos en *Trichomonas vaginalis***

*T. vaginalis* también es incapaz de convertir sus ribonucleótidos en deoxiribonucleótidos. Al parecer, el único medio aparente del parásito para obtener cualquiera de los cuatro deoxiribonucleótidos necesarios para la síntesis de DNA depende del salvamento de deoxiribonucleósidos exógenos por la actividad de deoxiribonucleósido fosfotransferasa, una enzima que se localiza en la membrana del parásito y que sólo reconoce a la timidina, deoxiadenosina, deoxiguanosina y deoxicitidina como sustratos (Wang y Cheng, 1984).

De acuerdo a Wang y col., el pH óptimo relativamente bajo (5.0-6.0) de la deoxiribonucleósido fosfotransferasa sugiere que la enzima podría localizarse en la membrana lisosomal de *T. vaginalis*, lo que apoyaría la idea de que el DNA del huésped es digerido en las vacuolas intracelulares del parásito y salvado de las vacuolas en forma de deoxiribonucleósidos. Este mecanismo de salvamento también explicaría la  $K_M$  relativamente alta de la enzima, ya que ésta estaría frente a altas concentraciones de los cuatro sustratos en las vacuolas después de la inclusión y digestión del DNA del huésped (Wang y Cheng, 1984).

## Justificación

Dado que *T. vaginalis* no incorpora glicina, formato, serina y bicarbonato en el anillo de purina, es incapaz de sintetizar purinas *de novo* (Miller y Lindstead, 1983); sin embargo, el parásito es capaz de salvar bases de purina y sus nucleósidos (Heyworth y col., 1982). De igual forma, la incapacidad del parásito para incorporar bicarbonato, orotato y aspartato en el anillo de pirimidina indica que *T. vaginalis* no puede sintetizar dichas moléculas, aunque se ha demostrado que puede salvar bases y nucleósidos de pirimidina (Heyworth y col., 1984; Wang y Cheng, 1984). Asimismo, *T. vaginalis* es incapaz de convertir sus ribonucleótidos en deoxiribonucleótidos y al parecer el único medio aparente del parásito para obtener cualquiera de los cuatro deoxiribonucleótidos necesarios para la síntesis de DNA depende del salvamento de deoxiribonucleósidos exógenos (Wang y Cheng, 1984).

Autores como Strosselli y col. han sugerido que el parásito adquiere a los precursores de sus ácidos nucleicos utilizando el DNA y RNA de las células lisadas del huésped y degradándolos por medio de sus nucleasas y fosfatasas (Strosselli y col., 1998). Otros autores proponen que la autólisis de bacterias *in vivo* y las células endometriales dañadas (Harris y col., 1988) proveerían a *T. vaginalis* con una abundante fuente de ácidos nucleicos del huésped, los cuales podría utilizar efectivamente debido a su alta capacidad fagocítica y a su elevada actividad lisosomal (Wang, 1990).

Hasta la fecha, no existe ningún reporte que identifique directamente a una posible fuente de ácidos nucleicos para el parásito, por lo que en el presente trabajo se pretende determinar si el DNA de las células HeLa marcado con  $^3\text{H}$ -timidina podría actuar como una posible fuente de nucleótidos para *T. vaginalis* y si para ello el parásito interacciona de manera específica con los núcleos de las células HeLa.

# Objetivos

## Objetivo general

- ❖ Determinar si *Trichomonas vaginalis* utiliza el DNA de las células HeLa como una fuente de nucleótidos.

## Objetivos particulares

1. Aislar a los núcleos de las células HeLa.
2. Analizar la interacción entre *T. vaginalis* y los núcleos aislados de las células HeLa.
3. Analizar la interacción entre *T. vaginalis* y las células HeLa en monocapa.
4. Demostrar la incorporación de nucleótidos al DNA de *T. vaginalis* a partir del DNA de células HeLa previamente marcadas con  $^3\text{H}$ -timidina.

# Estrategia Experimental 1

Resuspender a las células HeLa en la Solución 1 y centrifugar a 2,200 rpm durante 7 min. a 4°C



Resuspender a las células HeLa en la Solución 2 e incubar a 4°C durante 15 min.

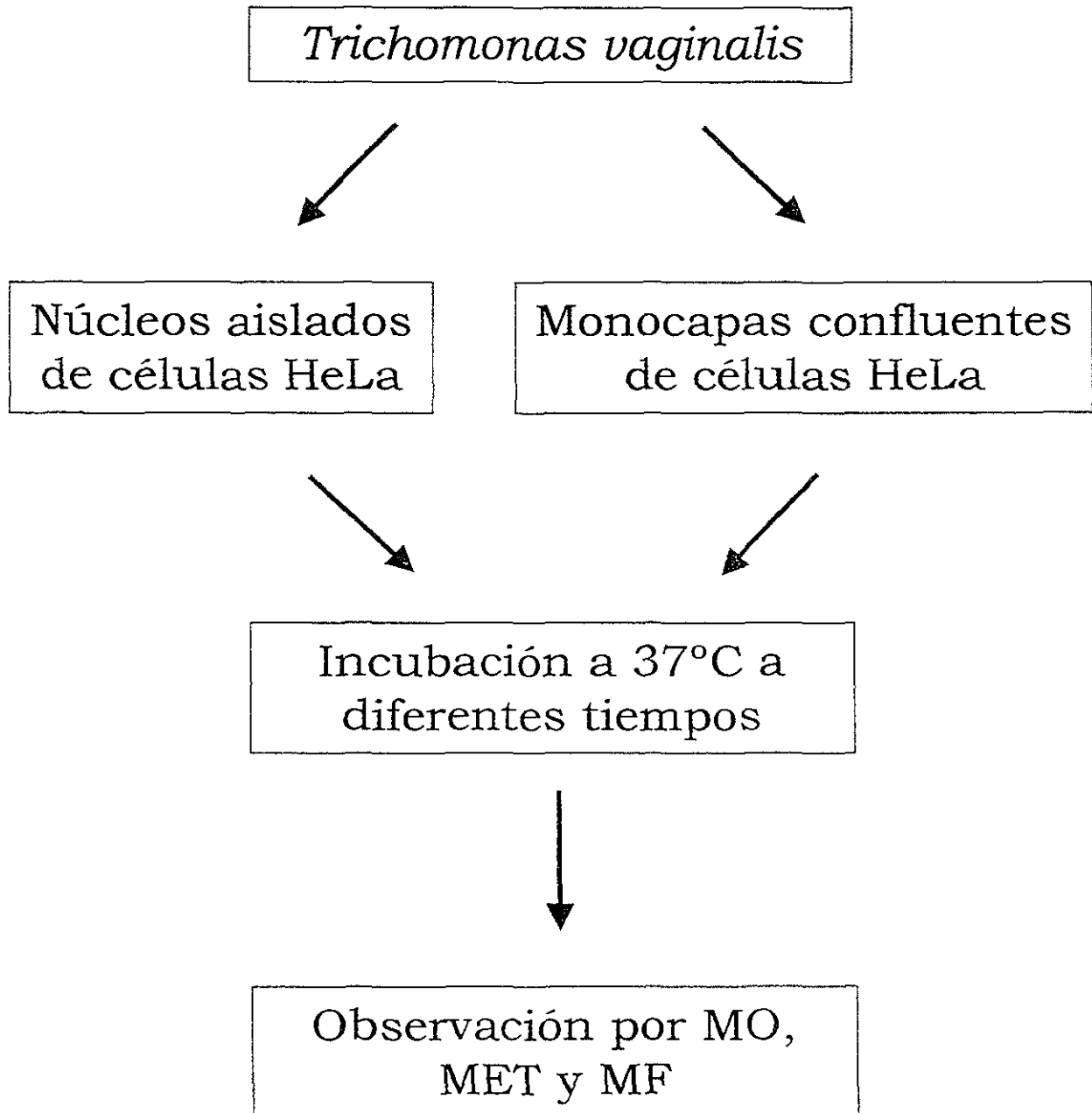


Resuspender a las células HeLa en la Solución 3 y lisar las células a través de una aguja de 22 mm (20 pases). Centrifugar a 2,000 rpm durante 10 min. a 4°C

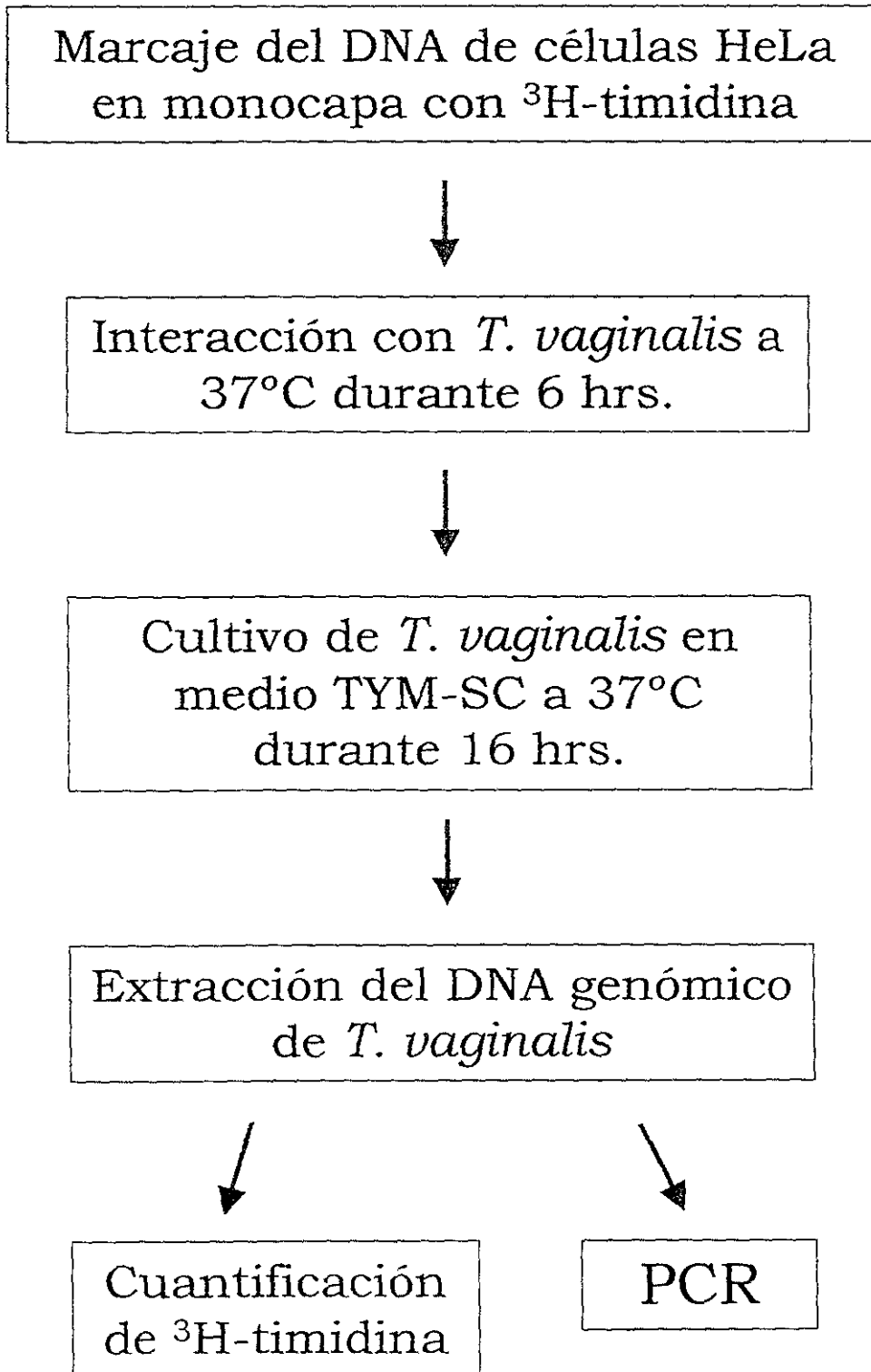


Resuspender a los núcleos en la Solución 1 y cuantificar en el hematocitómetro

## Estrategia Experimental 2



## Estrategia Experimental 3



# Material y métodos

## 1. Protocolo para el cultivo de *Trichomonas vaginalis*

En el presente estudio se utilizaron dos aislados de *Trichomonas vaginalis* obtenidos en el Centro Nacional de Clínicas de Displasias del Hospital General de México. El aislado CNCD 147 fue obtenido en 1996 mientras que el aislado CNCD 188 fue obtenido en 1995.

Los parásitos se cultivaron a 37°C por pases diarios en 6 ml de medio de cultivo TYM pH 6.2 suplementado con 10% de SC inactivado por calor en su fase exponencial de crecimiento.

## 2. Protocolo para el cultivo de células HeLa

Para despegar a las células HeLa se desechó el medio de cultivo usado, se añadieron 5 ml de PBS-EDTA al 0.2% pH 7.0 estéril a las células de la monocapa y se incubaron durante 10 min. Posteriormente, las células se despegaron con golpes suaves, se resuspendieron varias veces con una pipeta, se cuantificaron en el hematocitómetro y se centrifugaron durante 5 min a 1,800 rpm en una centrífuga Sorvall RT 6000 D. La pastilla de células se resuspendió en medio DMEM-SC, inoculándose  $1.0 \times 10^6$  células en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> hasta obtener un 80% de confluencia en la monocapa (~ 48 horas).

## 3. Protocolo para el aislamiento de núcleos de las células HeLa

### Modificación del método propuesto por Berkowitz y col., 1969

Las células HeLa en monocapa confluyente se despegaron como se describió anteriormente y se lavaron con 10 ml de PBS pH 7.0, centrifugándose a 2,200 rpm durante 7 min. en una centrífuga Sorvall RT 6000 D. Las células se resuspendieron en la solución 1 (50 ml/10<sup>8</sup> células), se centrifugaron a 2,200 rpm durante 7 min. a



4°C, se resuspendieron en un volumen similar de solución 2 y se incubaron durante 15 min a 4°C. La suspensión se centrifugó a 2,000 rpm durante 10 min, la pastilla se resuspendió en solución 3 (25 ml/10<sup>8</sup> células) y las células se lisaron a través de una aguja de 22 mm (10 pases). La suspensión se volvió a centrifugar a 2,000 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió nuevamente en la solución 3. La suspensión se pasó nuevamente a través de una aguja de 22 mm (10 pases) y se centrifugó a 2,000 rpm durante 10 min. Finalmente, los núcleos se resuspendieron en la solución 1 para evitar que se pegaran. Todo el procedimiento se realizó a 4°C.

#### **4. Protocolo para el ensayo colorimétrico de citotoxicidad**

**(Alderete y Pearlman, 1984)**

En primer lugar se prepararon monocapas confluentes de células HeLa en placas de 96 pozos de fondo plano (Nunc Bry Products), inoculó 5.5 x 10<sup>4</sup> células en 100 µl de medio DMEM-SC por pozo. La placa se incubó durante 24 hrs a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> hasta obtener un 100% de confluencia en la monocapa (4 x 10<sup>4</sup> células por pozo).

Por otro lado, se prepararon 2 x 10<sup>6</sup> parásitos por ml en medio de interacción TYM:DMEM sin suero en relación 1:2, se inocularon 100 µl (2 x 10<sup>5</sup> parásitos) por pozo (relación célula:parásito 1:5) y la interacción se incubó durante una hora a 37°C. A continuación, las monocapas se lavaron suavemente con PBS pH 7.0, se fijaron con 50 µl por pozo de formaldehído al 2% durante 10 min, se lavaron cinco veces con PBS pH 7.0 y se tiñeron con 50 µl por pozo de cristal violeta al 0.13% en etanol-formaldehído 5:2. Posteriormente, las monocapas se lavaron con 200 µl de PBS pH 7.0 hasta eliminar el colorante y la placa se dejó secar en obscuridad durante 24 hrs. Para finalizar, el colorante se eluyó con 50 µl de SDS al 1% en etanol al 50% durante 10 min y la densidad óptica se obtuvo en un Lector de ELISA Multiskan a 570 nm.

Como controles se utilizaron monocapas incubadas con 100 µl de medio de interacción TYM:DMEM sin suero en relación 1:2 sin parásitos, las cuales se trabajaron de la misma manera que el resto de los pozos. De esta forma, el promedio

de la densidad óptica de los pozos control equivale al 100% de monocapa, mientras que el promedio de la densidad óptica de los pozos con parásitos equivale al porcentaje de monocapa no destruida. El porcentaje de citotoxicidad se calculó como se indica a continuación:

$$\text{Porcentaje de citotoxicidad} = 100\% \text{ monocapa} - \text{Porcentaje monocapa no destruida}$$

## **5. Protocolo para microscopía electrónica de transmisión**

Las muestras fijadas con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M se centrifugaron durante 10 min a 2,000 rpm, se lavaron con amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M y se postfijaron con OsO<sub>4</sub> al 1% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M durante 20 min a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron nuevamente con amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M y se deshidrataron en alcoholes graduales de 70%, 90% y 100% durante 5 a 10 min. Posteriormente, las muestras se trataron con óxido de propileno durante 10 min a temperatura ambiente y se dejaron en una mezcla 1:1 de epón y óxido de propileno (resina de preinclusión) durante toda la noche en agitación constante.

Al día siguiente, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 5,000 rpm en una microcentrífuga Fisher Scientific 59 V; se les retiró la resina de preinclusión, se les añadió resina de inclusión nueva, se centrifugaron y se vertieron en un molde de inclusión que se colocó en un horno a 56°C durante 24 hrs para permitir que la resina polimerizara. Una vez que la resina endureció, se talló una pirámide al bloque y se realizaron los cortes en un ultramicrotomo Ultracut E (Reichert-Jung) iniciando con una cuchilla de vidrio para obtener cortes semifinos (tinción con azul de toluidina para observación por microscopía de luz) y continuando con una cuchilla de diamante para obtener cortes finos, los cuales se montaron en rejillas para microscopía electrónica.

Para contrastar las rejillas éstas se colocaron sobre gotas de acetato de uranilo de manera que los cortes permanecieran en contacto con la solución durante 10 min, se lavaron con alcohol al 30% y se secaron con papel filtro. Finalmente, las rejillas se colocaron sobre gotas de citrato de plomo durante 3 min,

se enjuagaron con agua bidestilada, se secaron con papel filtro y se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 910.

## **6. Protocolo para microscopía electrónica de barrido**

Las muestras fijadas con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M se centrifugaron durante 10 min a 2,000 rpm y se deshidrataron con alcoholes graduales de 70%, 90% y 100% durante 10 min. Posteriormente, las muestras se secaron a punto crítico en un secador Samdri 780 (Tousimis) a 29°C y 1,100 psi de presión, se montaron con una gota de plata coloidal sobre un soporte para microscopía electrónica de barrido y se cubrieron con oro en un aparato de recubrimiento iónico JFC 1100 (Jeol) durante 5 min bajo condiciones estándar (5 mA y 1.5 kV). Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM 982 Gemini.

## **7. Ensayo de interacción entre *T. vaginalis* y los núcleos aislados de células HeLa**

Los núcleos aislados y resuspendidos en la solución 1 se cuantificaron en el hematocitómetro, se centrifugaron a 2,000 rpm durante 10 min a 4°C y se resuspendieron en 3 ml de medio TYM pH 6.2 sin suero.

Por otra parte, los parásitos en fase exponencial de crecimiento se lavaron tres veces con PBS pH 7.0 centrifugándose a 1,800 rpm durante 5 min a 4°C, se cuantificaron en el hematocitómetro y se resuspendieron en medio TYM pH 6.2 sin suero. Los núcleos aislados y los parásitos se transfirieron a un tubo de vidrio en una relación núcleo:parásito 1:2 y se incubaron a 37°C a diferentes tiempos.

## **8. Ensayo de interacción entre *T. vaginalis* y las células HeLa en monocapa**

**Modificación del método propuesto por Alderete y Pearlman, 1984.**

Los parásitos en fase exponencial de crecimiento se lavaron tres veces con PBS pH 7.0, se centrifugaron a 1,800 rpm durante 5 min a 4°C, se cuantificaron en el hematocitómetro y se resuspendieron  $15 \times 10^6$  parásitos en 9 ml de medio de interacción TYM:DMEM sin suero en relación 1:2.

Por otro lado, a la monocapa confluyente de células HeLa sembrada en una botella de 25 cm<sup>2</sup> se le retiró el medio de cultivo usado, se lavó con PBS pH 7.0 y se le añadió el medio de interacción con los parásitos en una relación 1:5 ( $3 \times 10^6$  células en monocapa por  $15 \times 10^6$  parásitos). La botella de cultivo se incubó a 37°C y se tomaron muestras del sobrenadante a diferentes tiempos.

## **9. Protocolo para microscopía de epifluorescencia con yoduro de propidio**

**Modificación del método propuesto por Gómez-Conde y col., 2000**

Las muestras se fijaron con metanol:ácido acético en relación 3:1 durante 60 min a 4°C y se centrifugaron a 2,000 rpm durante 10 min. Posteriormente, las muestras se trataron con Tris-HCl 0.1 M pH 7.3 y se centrifugaron a 2,000 rpm durante 10 min. A continuación las muestras se trataron con RNasa al 1% durante 30 min a 37°C y se lavaron con PBS pH 7.0. Las muestras se incubaron con 50 µl de yoduro de propidio 1:1000 durante 3 min a 4°C, se lavaron con PBS pH 7.0, se resuspendieron en 15 µl de resina Fluorogard y se montaron en un portaobjetos para ser analizadas en un microscopio Zeiss Axiophot.

## **10. Protocolo para el marcaje del DNA de las células HeLa con <sup>3</sup>H-timidina**

**Modificación del método propuesto por Alderete y Pearlman, 1984.**

A una botella de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> inoculada con 1.0 x 10<sup>6</sup> células HeLa e incubada durante 30 hrs a 37°C se le añadieron 125 µl de <sup>3</sup>H-timidina (actividad específica 83.60 Ci/mmol) y se incubó a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 18 hrs. hasta obtener una monocapa confluyente.

## **11. Ensayo de interacción entre *T. vaginalis* y las células HeLa en monocapa marcadas con <sup>3</sup>H-timidina**

Los parásitos en fase exponencial de crecimiento se lavaron tres veces con PBS pH 7.0, se centrifugaron a 1,800 rpm durante 5 min a 4°C, se cuantificaron en el hematocitómetro y se resuspendieron 15 x 10<sup>6</sup> parásitos en 9 ml de medio de interacción TYM:DMEM sin suero en relación 1:2.

Por otro lado, a la monocapa confluyente de células HeLa marcada con <sup>3</sup>H-timidina se le retiró el medio de cultivo usado, se lavó con PBS pH 7.0, se le añadió el medio de interacción con los parásitos (3 x 10<sup>6</sup> células en monocapa por 15 x 10<sup>6</sup> parásitos) y la botella de cultivo se incubó a 37°C durante 6 hrs.

Después de la incubación, los parásitos se cuantificaron en el hematocitómetro, se determinó su viabilidad por el método de exclusión de azul tripano y se inocularon en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con 27 ml de medio TYM y 3 ml de suero de caballo inactivado por calor. Las botellas de cultivo se incubaron durante 18 hrs a 37°C. Después de la incubación, los parásitos se lavaron con PBS pH 7.0, se cuantificaron en el hematocitómetro y se realizó la extracción del DNA genómico y la cuantificación de la marca de <sup>3</sup>H-timidina incorporada al DNA de los parásitos en un contador de centelleo Beckman LS6500.

## 12. Protocolo para la extracción de DNA genómico por el método de DNAzol ©

Alrededor de  $40 \times 10^6$  parásitos (o en su caso células HeLa) se transfirieron a un tubo de microcentrifuga y se les añadió 1 ml de DNAzol (Gibco BRL). La solución se mezcló por inversión durante uno a tres min y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min. a  $4^\circ\text{C}$  en una centrifuga Sorvall Biofuge. Posteriormente el sobrenadante se transfirió a otro tubo de microcentrifuga y se le añadieron 500  $\mu\text{l}$  de etanol al 100%, mezcló la solución por inversión e incubándola durante 30 min. a  $-70^\circ\text{C}$ . La solución se centrifugó a 5,000 rpm durante 15 min. a  $4^\circ\text{C}$ , se desechó el sobrenadante por decantación y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 95%. La solución se volvió a centrifugar a 5,000 rpm durante 5 min. a  $4^\circ\text{C}$ , se desechó el sobrenadante por decantación y se permitió que el DNA se secase durante 5 min. Finalmente, el DNA se disolvió en 300  $\mu\text{l}$  de NaOH 8 mM y una vez disuelto se le añadieron 12  $\mu\text{l}$  de HEPES 0.1 M por cada 100  $\mu\text{l}$  de NaOH 8 mM utilizados.

Del total del DNA extraído de los parásitos se tomaron 10  $\mu\text{l}$  de DNA genómico y se transfirieron a un vial con 2 ml de líquido de centelleo, encontrándose una lectura de 67 cpm. Por otra parte, la calidad del DNA obtenido se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en amortiguador TAE 1 X a un voltaje de 80 volts durante una hora. La bya del DNA genómico de los parásitos que habían interactuado con las células HeLa (5  $\mu\text{l}$ ) se cortó y se transfirió a un vial con 2 ml de líquido de centelleo, obteniéndose una lectura de 34 cpm. De esta forma, en  $41.175 \times 10^6$  parásitos se encontraron 2,251.2 cpm que equivalen a 4,502.4 cpm en  $82.35 \times 10^6$  parásitos.

### 13. Protocolo para la amplificación de la región conservada de las cisteín proteinasas de *T. vaginalis*

Para preparar la reacción de PCR se mezclaron 45 µl de PCR Supermix (Gibco BRL), 5 µl del primer CP 3', 5 µl del primer CP 5' y 5 µl del DNA de *T. vaginalis* como templado (para el DNA de las células HeLa se utilizó 1 µl de DNA más 4 µl de agua destilada). A la solución anterior se le añadieron 0.05 ml de aceite de silicón y se amplificó en un termociclador Robocycler (Stratagene).

#### ❖ Condiciones para la reacción de amplificación (PCR)

Desnaturalizar a 94°C por 2 min., hibridar a 44°C por 30 seg, extender a 61°C por 45 seg por 35 ciclos y realizar una extensión final a 61°C por 7 min. El producto de PCR esperado es de 570 pb.

### 14. Protocolo para la amplificación de una región del gen de β-globina

Para preparar la reacción de PCR se mezclaron 45 µl de PCR Supermix, 1 µl del primer BG1, 1 µl del primer BG2 y 5 µl del DNA de *T. vaginalis* como templado (para el DNA de las células HeLa se utilizó 1 µl de DNA más 4 µl de agua destilada). A la solución anterior se le añadieron 0.05 ml de aceite de silicón y se amplificó en un termociclador Robocycler (Stratagene).

#### ❖ Condiciones para la reacción de amplificación (PCR)

Desnaturalizar a 94°C por 2 min., hibridar a 55°C por 1 min., extender a 60°C por 2 min. por 30 ciclos y realizar una extensión final a 72°C por 5 min. El producto de PCR esperado es de 242 pb.

## Resultados

### 1. Aislamiento de los núcleos de las células HeLa

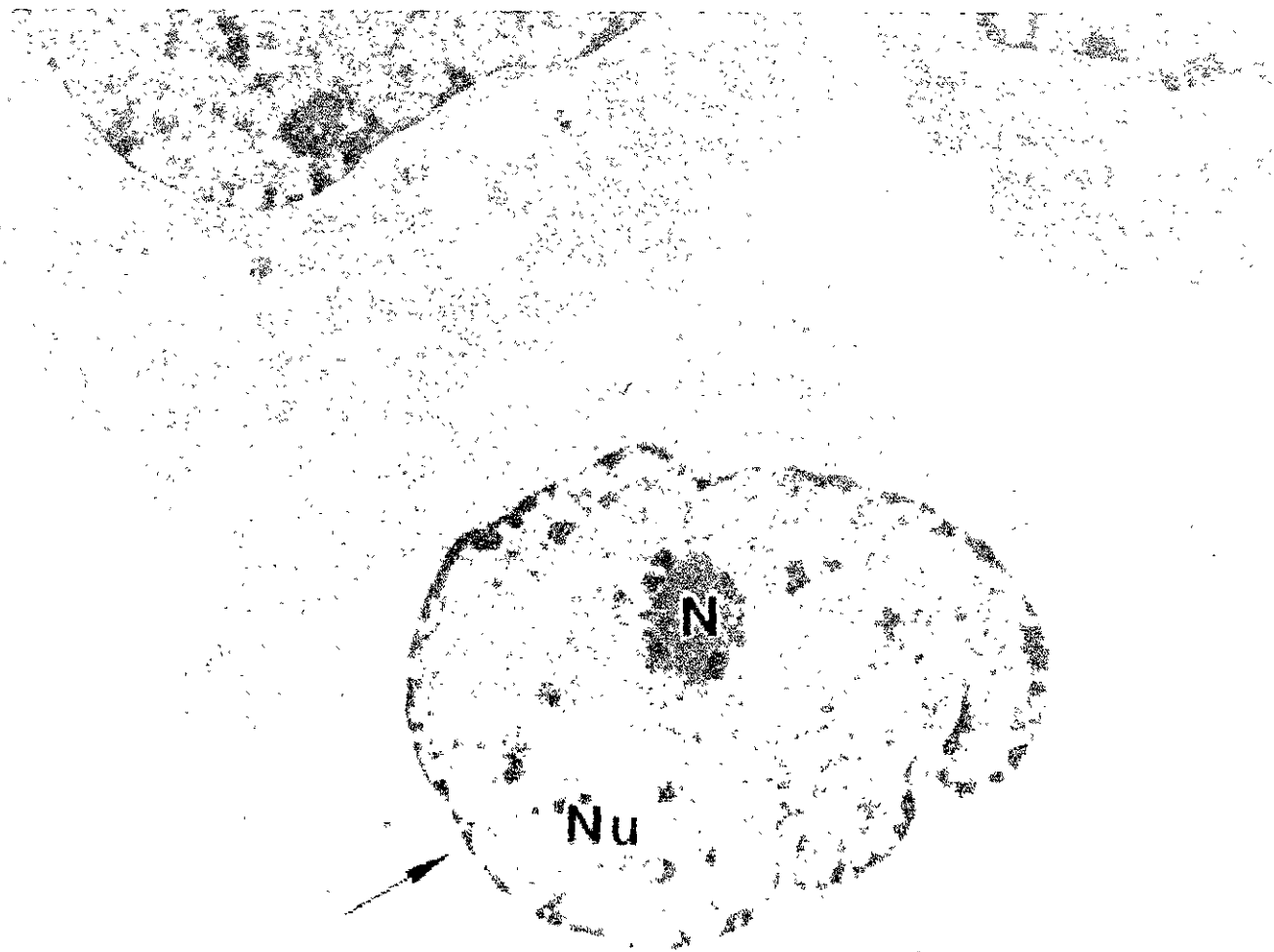
#### Modificación del método propuesto por Berkowitz y col., 1969.

Al analizar la estructura de las células HeLa por microscopía electrónica de transmisión, se observó que las células presentaron un núcleo prominente de forma irregular que ocupa la mayor parte de la superficie celular. La envoltura nuclear mostró un contorno bien definido y la matriz nuclear presentó una estructura granulosa. En el interior del núcleo se observaron uno o dos nucleolos electrón densos (Fig. 13).

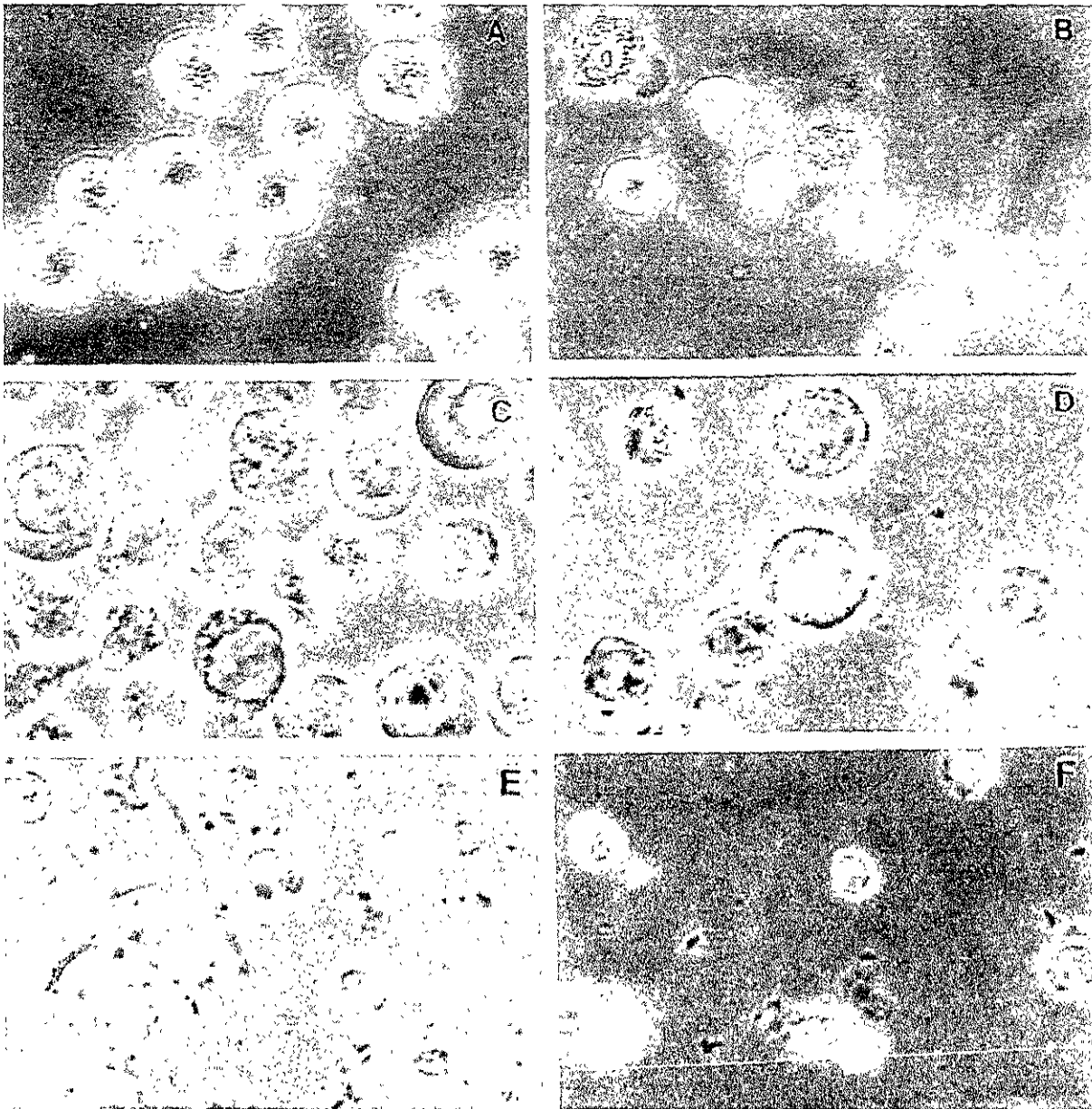
En la figura 14 se muestran los cambios sufridos por las células HeLa durante el proceso de aislamiento de los núcleos de acuerdo a una modificación del método propuesto por Berkowitz y col. Al resuspender a las células HeLa en la Solución 2, éstas aumentaron de tamaño drásticamente en comparación con las células en suspensión en el medio DMEM. Posteriormente, las células se pasaron a través de una aguja de 22 mm de diámetro, lo que permitió separar a los núcleos del resto del material celular. Los núcleos obtenidos de esta manera presentaron pocos restos de material citoplásmico y no se observaron células enteras (Fig. 14 F). En promedio, el método de aislamiento utilizado tuvo un rendimiento del 55%, aunque en ocasiones se obtuvo un rendimiento de hasta el 75%, el cual fue muy similar al reportado por Berkowitz y col.

Para verificar la calidad de los núcleos obtenidos con la metodología antes mencionada, éstos se analizaron por microscopía electrónica. Al observar a los núcleos por microscopía electrónica de transmisión, se encontró que poseen un contorno bien definido y un nucleolo electrón denso prominente. La mayoría de los núcleos no presentaron restos de citoplasma, aunque se pudieron detectar algunos restos de material celular en las muestras analizadas (Fig. 15 A y B). Finalmente, por microscopía electrónica de barrido se obtuvo el tamaño promedio de los núcleos aislados, el cual fue de 12  $\mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 15 C y D).

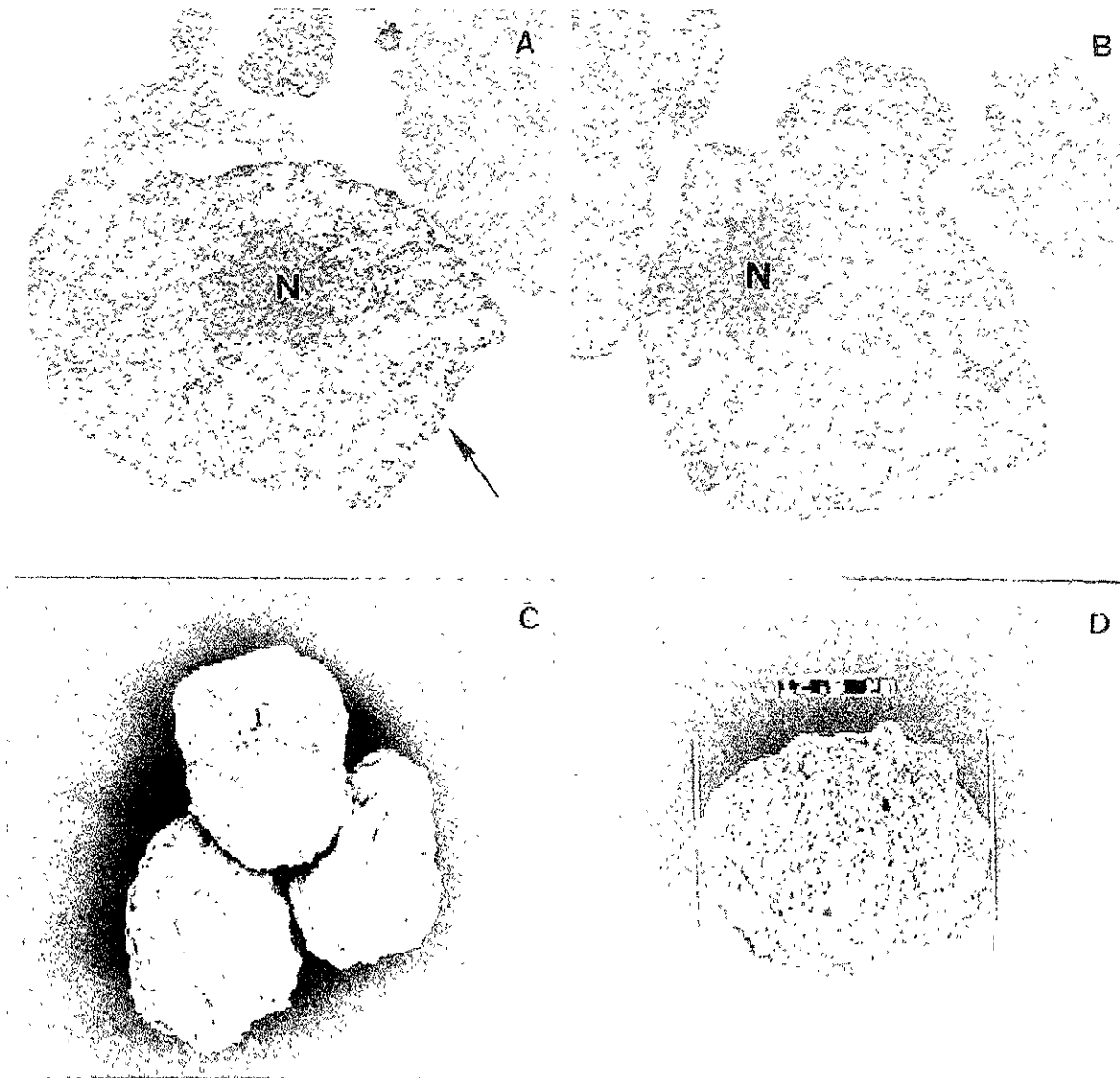




**Fig. 13. Fotomicrografía electrónica de transmisión de las células HeLa.** Obsérvese el tamaño y la forma del núcleo (Nu) en relación con la célula. La envoltura nuclear (flecha) está bien definida y se observa un nucleolo (N) electrón denso. 12,000 X.



**Fig. 14. Proceso de aislamiento de los núcleos de las células HeLa analizado por microscopía de contraste de fases.** A. Células HeLa en suspensión en medio DMEM; B. Células HeLa en Solución 1; C. Células HeLa en Solución 2; D. Células HeLa en Solución 2 (15 min. de incubación a 4°C); E. Núcleos aislados de las células HeLa en Solución 3; F. Núcleos aislados de las células HeLa en Solución 1. 40 X OPT 1.25.

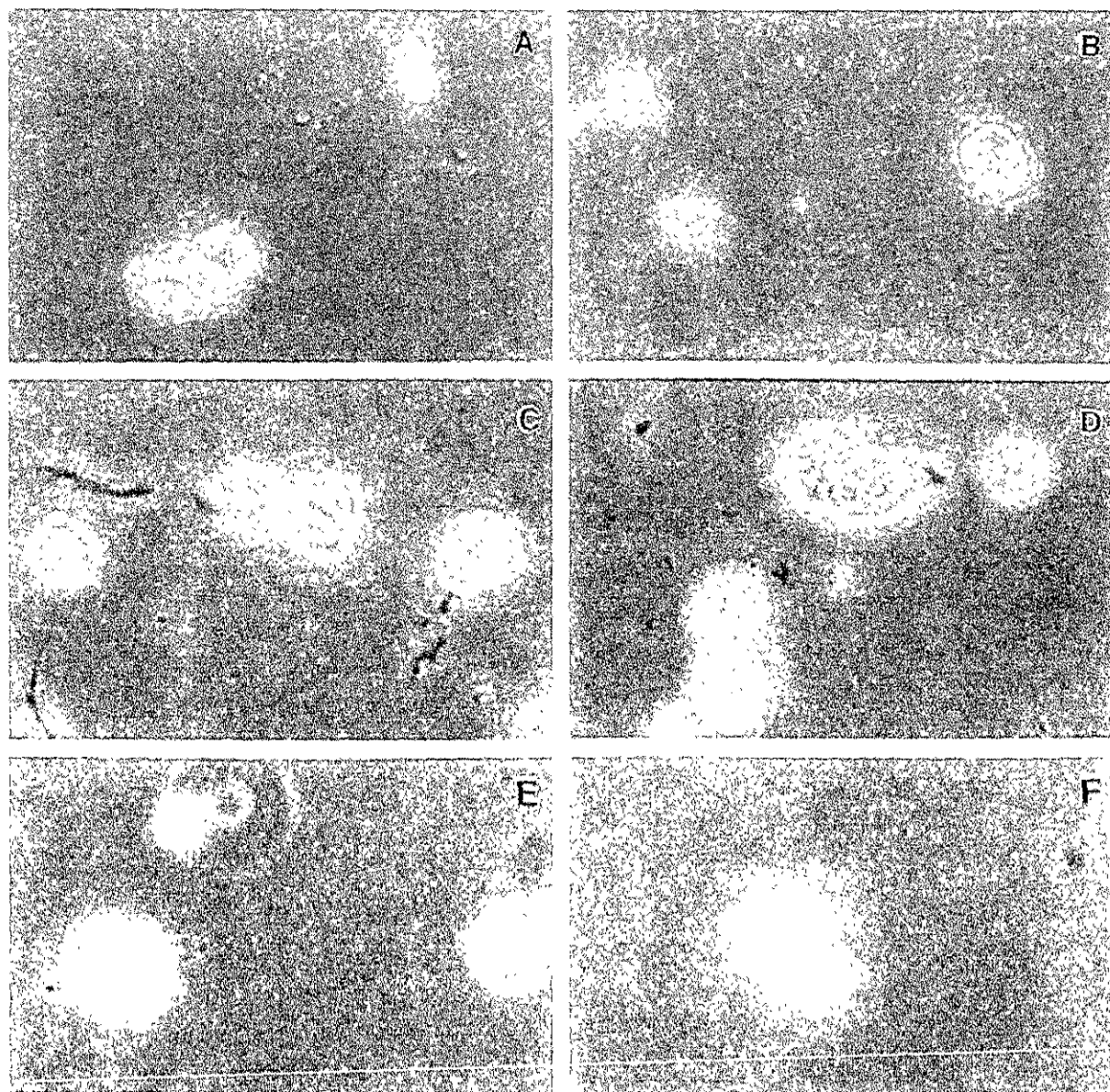


**Fig. 15. Fotomicrografías electrónicas de transmisión y de barrido de los núcleos aislados de las células HeLa.** A y B. Fotomicrografías electrónicas de transmisión de los núcleos aislados de las células HeLa. Los núcleos poseen un contorno bien definido (flecha) y un nucleolo (N) electrón denso. Es posible observar algunos restos de citoplasma. A. 6,000 X; B. 7,000 X. C y D. Fotomicrografías electrónicas de barrido de los núcleos aislados de las células HeLa. Se muestra una vista general de tres núcleos aislados (C) y la determinación del tamaño de uno de los núcleos (D). 3,000 X.

## 2. Comprobación de la integridad de los núcleos aislados

Dado que los núcleos recién aislados se emplearían para realizar interacciones con *T. vaginalis* a diferentes tiempos en medio TYM y a 37°C, se determinó la estabilidad de los núcleos aislados a estos tiempos mediante su observación por microscopía de luz a los 0, 30, 60, 120, 180 y 240 min.

Como se muestra en la fig. 16, no se observó ningún cambio aparente en la morfología de los núcleos durante el periodo de incubación: la envoltura nuclear permaneció intacta y se observaron uno o más nucleolos prominentes. De esta manera se pudo comprobar que los núcleos no se destruyeron bajo las condiciones experimentales empleadas, por lo que se procedió a realizar las interacciones con el parásito sabiendo que los cambios que se observaran en los núcleos serían debidos a su interacción con el parásito y no a las condiciones del experimento.

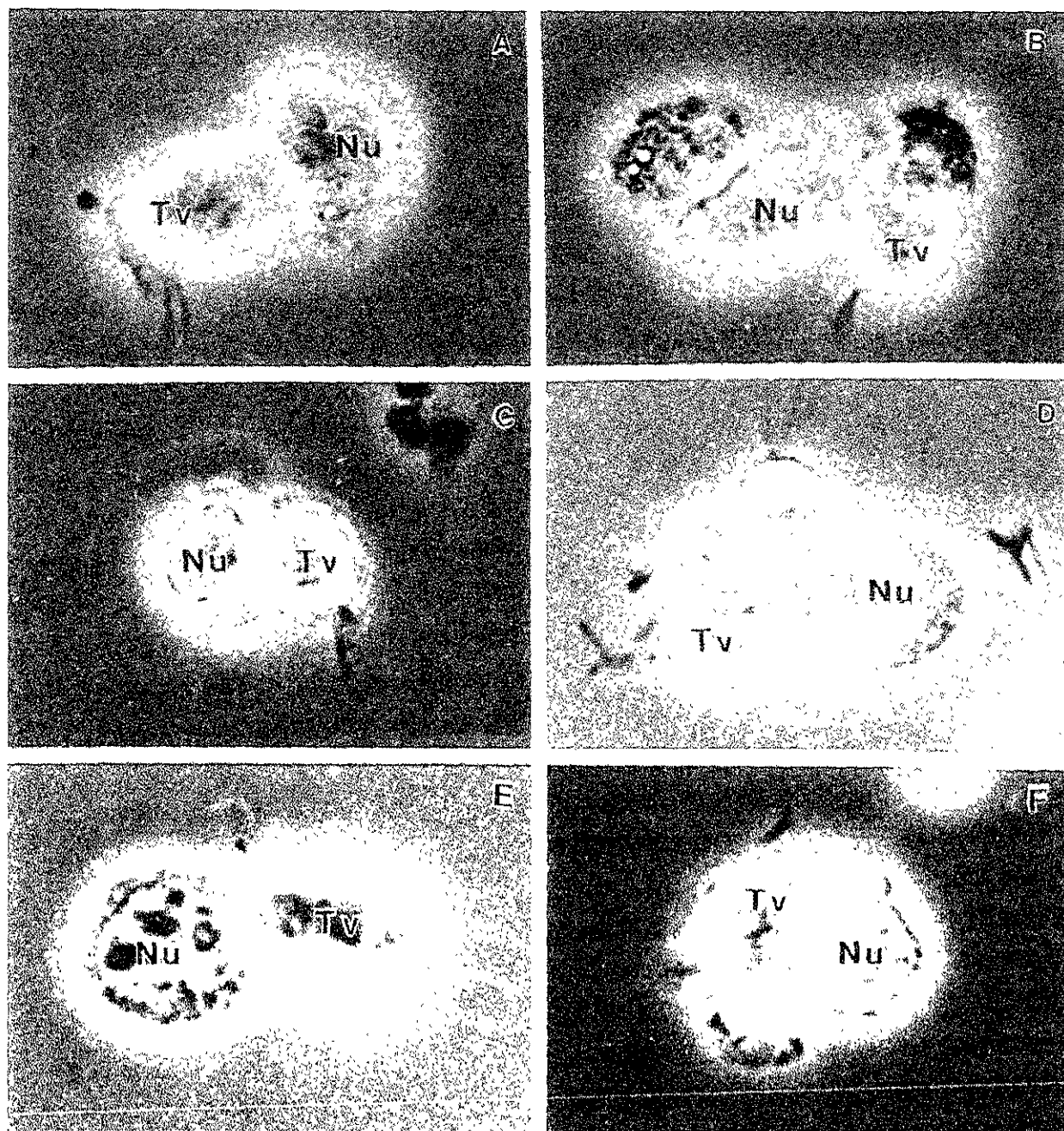


**Fig. 16. Estabilidad de los núcleos aislados de las células HeLa a diferentes tiempos.** Los núcleos aislados se incubaron en medio TYM a 37°C a diferentes tiempos y se observaron por microscopía de contraste de fases para comprobar su integridad en las condiciones experimentales. A. 0 min.; B. 30 min.; C. 60 min.; D. 120 min.; E. 180 min.; F. 240 min. 40 X OPT 1.6.

### 3. Elección del aislado de *T vaginalis* para realizar las interacciones

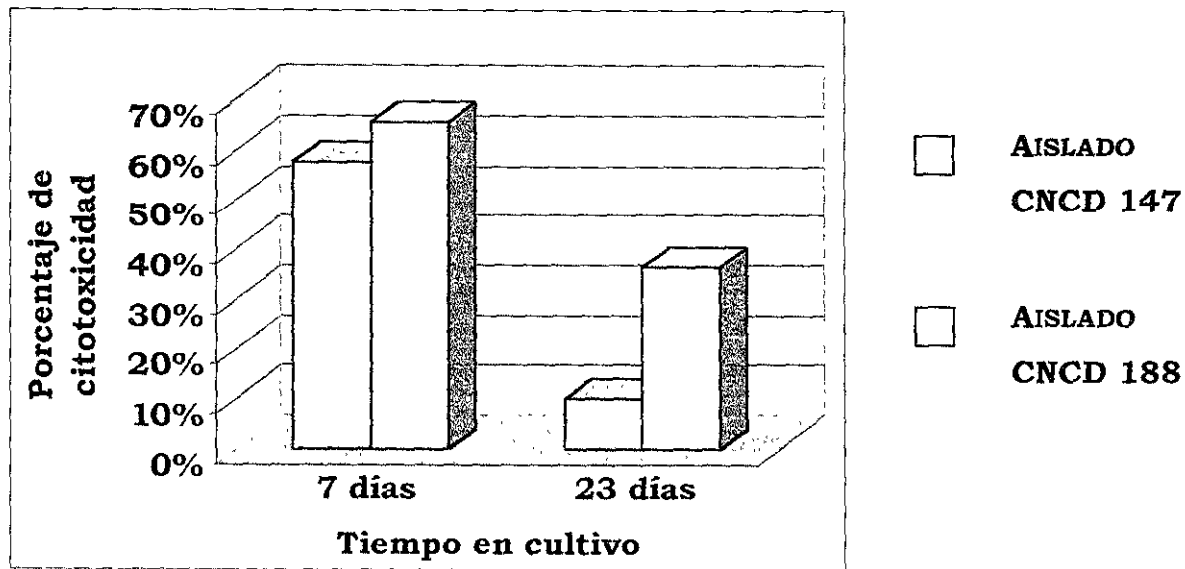
Dado que en el laboratorio se cuenta con varios aislados de *T. vaginalis* que presentan diferentes niveles de citotoxicidad (Álvarez-Sánchez y col., 2000), se realizaron ensayos a tiempos cortos entre los núcleos aislados de las células HeLa y parásitos provenientes de dos aislados diferentes (CNCD 147 y CNCD 188) en medio TYM sin suero a 37°C (relación núcleo:parásito 1:1) para seleccionar el aislado más eficiente en la interacción con los núcleos.

El análisis por microscopía óptica mostró que a los 30 min. de interacción los parásitos de ambos aislados se encontraban asociados a los núcleos de las células HeLa en una relación 1:1, aunque el área de contacto entre *T. vaginalis* y los núcleos aislados fue muy pequeña (Fig 17 A y B). A los 60 min. la interacción entre los núcleos y *T. vaginalis* fue más estrecha en el aislado CNCD 188 que en el CNCD 147. De igual forma, fue más frecuente encontrar varios parásitos del aislado CNCD 188 asociados a un solo núcleo que en el caso del aislado CNCD 147 (Fig. 17 C y D). Finalmente, a los 240 min de interacción las diferencias observadas entre los dos aislados fueron más notorias y nuevamente se observó que la asociación entre los núcleos y los parásitos del aislado CNCD 188 fue más estrecha que la observada con el aislado CNCD 147. En particular, el área de contacto entre los parásitos del aislado CNCD 188 de *T. vaginalis* y los núcleos aislados de las células HeLa fue muy amplia y casi no se observaron núcleos íntegros (Fig. 17 E y F).



**Fig. 17.** Interacción de dos diferentes aislados de *T. vaginalis* (Tv) con los núcleos aislados de las células HeLa (Nu) analizada por microscopía de contraste de fases. A, C y E. Aislado CNCD 147 a los 30, 60 y 240 min. de interacción con los núcleos aislados de las células HeLa. B, D y F. Aislado CNCD 188 a los 30, 60 y 240 min. de interacción con los núcleos aislados de las células HeLa. En ambos casos las interacciones se realizaron con una relación núcleo:parásito 1:1 en medio TYM sin suero a 37°C. 1,800 X.

Debido a las diferencias observadas entre ambos aislados se realizó además una evaluación de los niveles de citotoxicidad de ambos aislados de *T. vaginalis* por medio de un ensayo colorimétrico (Alderete y Pearlman, 1984). A través de dicho ensayo se determinó que después de siete días en cultivo el aislado más citotóxico fue el CNCD 188 con un nivel de citotoxicidad del 65.9 %, mientras que en el CNCD 147 el nivel de citotoxicidad fue del 57.8 %. Después de 23 días en cultivo los niveles de citotoxicidad disminuyeron drásticamente a 10.4 % para el aislado CNCD 147 y a 36.5 % para el aislado CNCD 188, por lo que las diferencias entre ambos fueron más notorias (Gráfica 2). Dado que ambos aislados son más citotóxicos si tienen pocos días de cultivo *in vitro* después de haber sido descongelados, el resto de los ensayos del estudio se realizaron con el aislado CNCD 188 con dos días de cultivo *in vitro*.



**Gráfica 2. Evaluación de los niveles de citotoxicidad de dos diferentes aislados de *T. vaginalis*.** Los niveles de citotoxicidad se midieron de acuerdo al método propuesto por Alderete y Pearlman, 1984. El ensayo se realizó con una relación célula:parásito 1:5 en medio de interacción TYM:DMEM 1:2 sin suero durante 60 min. a 37° C.



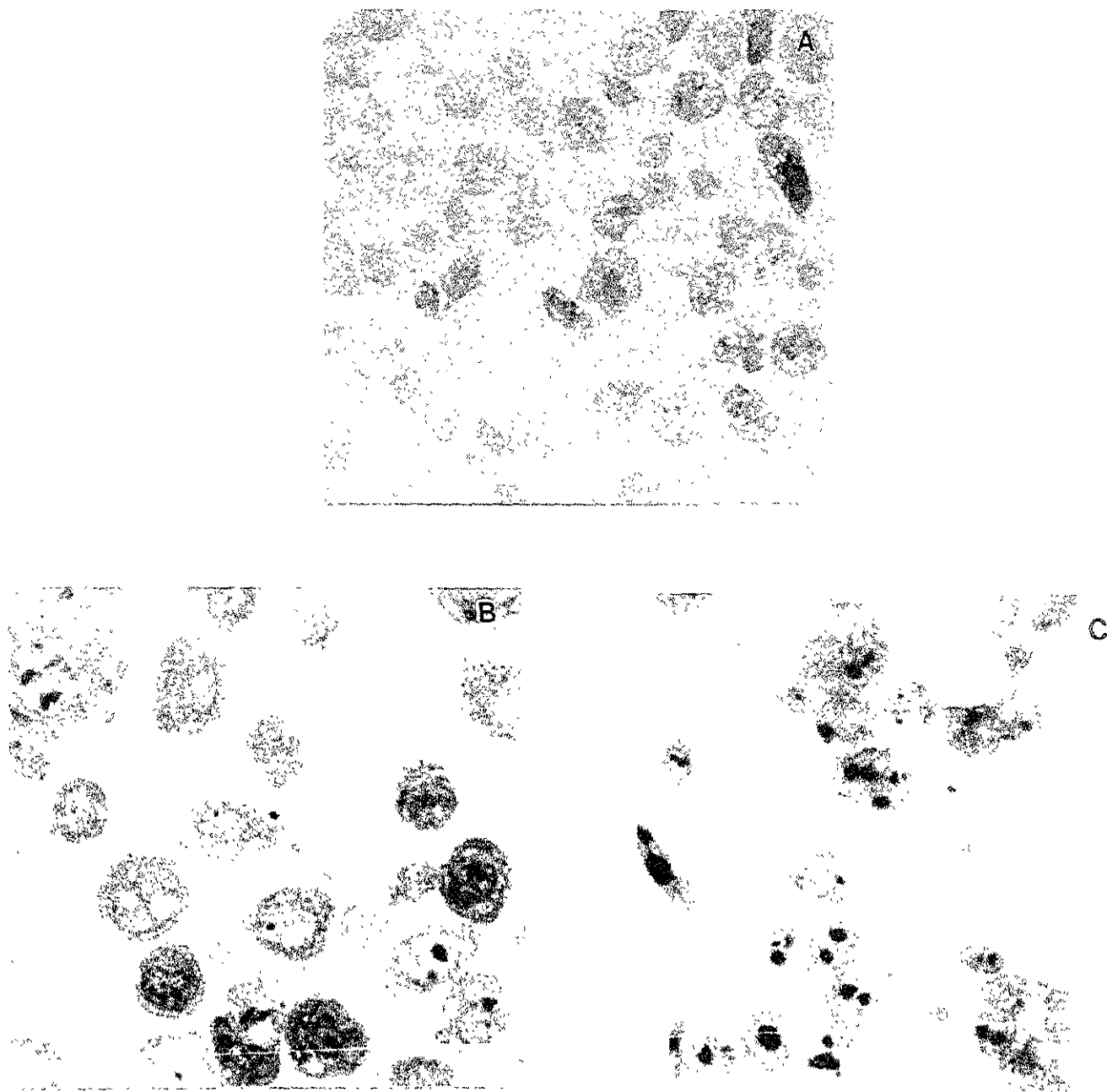
#### **4. Análisis de la interacción entre *T. vaginalis* y los núcleos aislados de células HeLa por microscopía de luz**

Para observar la interacción entre *T. vaginalis* y los núcleos aislados de las células HeLa las muestras de la interacción se incluyeron en resinas epóxicas, obteniéndose cortes semifinos que se tiñeron con azul de toluidina y se observaron por microscopía de luz. En primer lugar, se analizaron en forma individual a los parásitos, a las células HeLa y a los núcleos aislados de las células HeLa (Fig. 18) como los controles de la interacción.

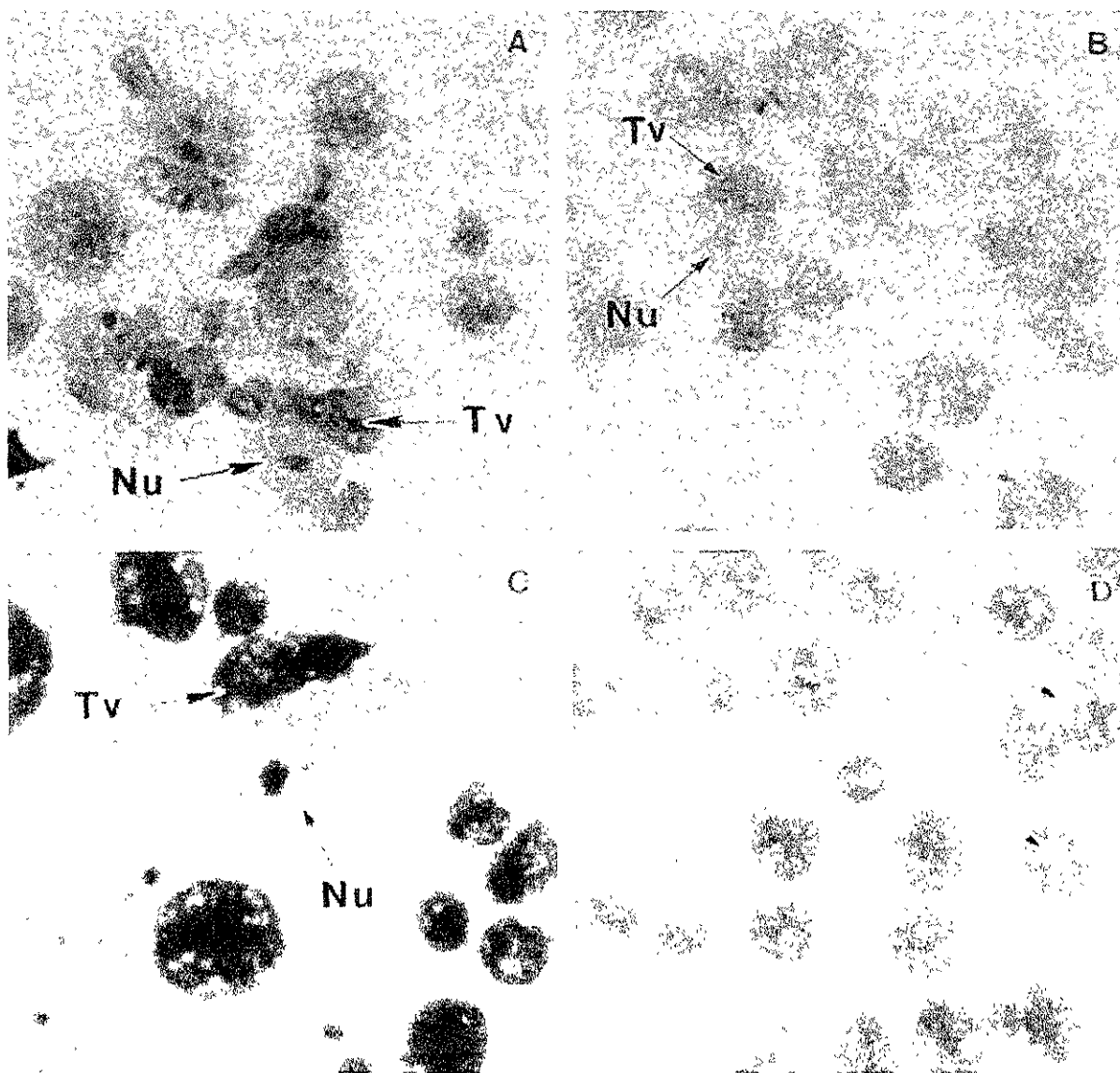
Los parásitos del aislado CNCD 188 presentaron formas y tamaños variables en los que se observaron numerosas vacuolas, aparentemente sin material en su interior (Fig 18 A). Las células HeLa en suspensión presentaron un núcleo que ocupa la mayor parte de la superficie celular, observándose uno o varios nucleolos en su interior (Fig. 18 B). Por otro lado, los núcleos aislados presentaron un tamaño uniforme y en su interior se observaron uno o varios nucleolos prominentes. En general, los núcleos se encontraron en grupos pequeños o aislados y algunos presentaron restos de material citoplásmico (Fig. 18 C).

#### **❖ Cinética de la interacción entre *T. vaginalis* y los núcleos aislados de las células HeLa por microscopía de luz**

En la figura 19 se muestra la cinética de interacción entre *T. vaginalis* y los núcleos aislados de las células HeLa a diferentes tiempos. A los 35 min. de interacción el parásito se encontró asociado a los núcleos aislados, observándose algunas áreas de contacto entre la membrana plasmática del parásito y la envoltura nuclear de los núcleos (Fig. 19 A). Después de 50 min. y 70 min. de interacción (Fig. 19 B y C) la asociación entre el parásito y los núcleos aislados fue más estrecha, observándose una transformación morfológica del parásito en las áreas de contacto con los núcleos. Finalmente, a los 140 min. de interacción ya no se observaron núcleos de células HeLa, pero los parásitos presentaron numerosas vacuolas, algunas de las cuales contenían material de gran tamaño en su interior (Fig. 19 D).



**Fig. 18. Observación de cortes semifinos de *T. vaginalis*, células HeLa y núcleos aislados de células HeLa por microscopía de luz. Los cortes se tiñeron con azul de toluidina al 0.5%. A. *Trichomonas vaginalis*, aislado CNCD 188; B. Células HeLa; C. Núcleos aislados de las células HeLa. 40 X OPT 1.6.**



**Fig. 19. Cinética de interacción entre *T. vaginalis* (Tv) y los núcleos aislados de las células HeLa (Nu).** El análisis se realizó por microscopía óptica de cortes semifinos teñidos con azul de toluidina al 0.5%. La interacción se realizó en medio TYM sin suero a 37°C con una relación núcleo:parásito 1:2. A. 35 min.; B. 50 min.; C. 70 min.; D. 140 min. Las flechas señalan el material en el interior de las vacuolas de los parásitos. 40 X OPT 2.0.

## **5. Análisis de la interacción entre *T. vaginalis* y núcleos aislados de las células HeLa por microscopía electrónica de transmisión**

Para continuar con el estudio de la interacción entre *T. vaginalis* y los núcleos aislados de las células HeLa se realizaron cortes finos que se observaron al microscopio electrónico de transmisión. Nuevamente, se analizó a los parásitos, a las células HeLa y a los núcleos aislados de las células HeLa (Fig. 20) como los controles de la interacción.

En la figura 20 A se muestra la estructura típica del aislado CNCD 188 de *T. vaginalis*. El parásito presentó un núcleo prominente localizado en su parte anterior así como algunos hidrogenosomas y vacuolas de distinto tamaño sin material en su interior. En la fig. 20 B se muestra a una célula HeLa con su estructura típica: un núcleo de gran tamaño con una envoltura nuclear bien definida así como un nucleolo electrón denso. Finalmente, en la fig. 20 C se muestra un núcleo aislado de una célula HeLa, el cual presenta una envoltura nuclear aparentemente intacta y un nucleolo electrón denso.

### **❖ Cinética de interacción entre *T. vaginalis* y los núcleos aislados de las células HeLa por microscopía electrónica de transmisión**

A los 35 min. de interacción entre *T. vaginalis* y los núcleos aislados de las células HeLa se observó que los parásitos presentaron algunas áreas de contacto con los núcleos, los cuales no mostraron alteraciones morfológicas evidentes con respecto al control (Fig. 21). La morfología de los parásitos también es muy semejante a la de los controles y al igual que éstos presentan pocas vacuolas citoplásmicas (Fig. 21).

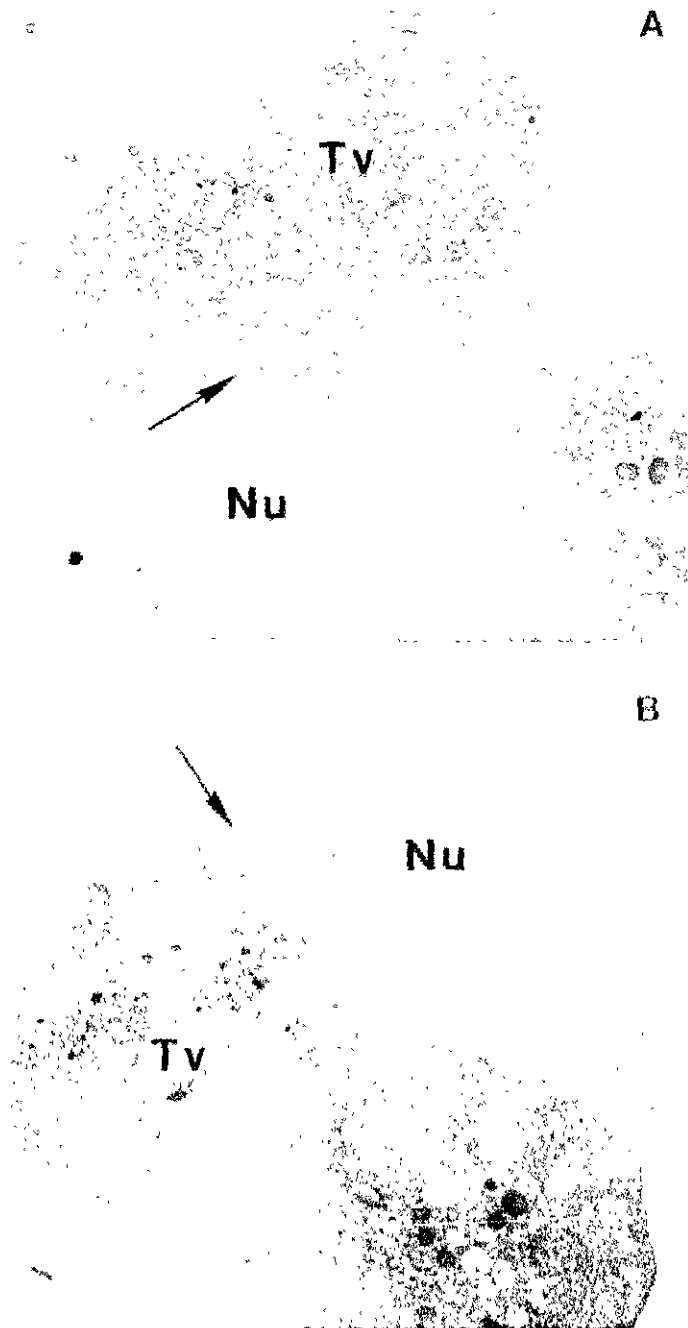
A los 50 min. de interacción se encontró que la asociación entre el parásito y los núcleos fue más estrecha, observándose interdigitaciones entre las membranas de ambos así como una transformación morfológica parcial del parásito en el área de contacto con el núcleo (Fig. 22 A). También se observaron varios parásitos en interacción con un solo núcleo (Fig. 22 B y C) y en algunos casos la envoltura

nuclear de los núcleos aislados presentó daños evidentes en la zona de contacto con el parásito (Fig. 22 D).

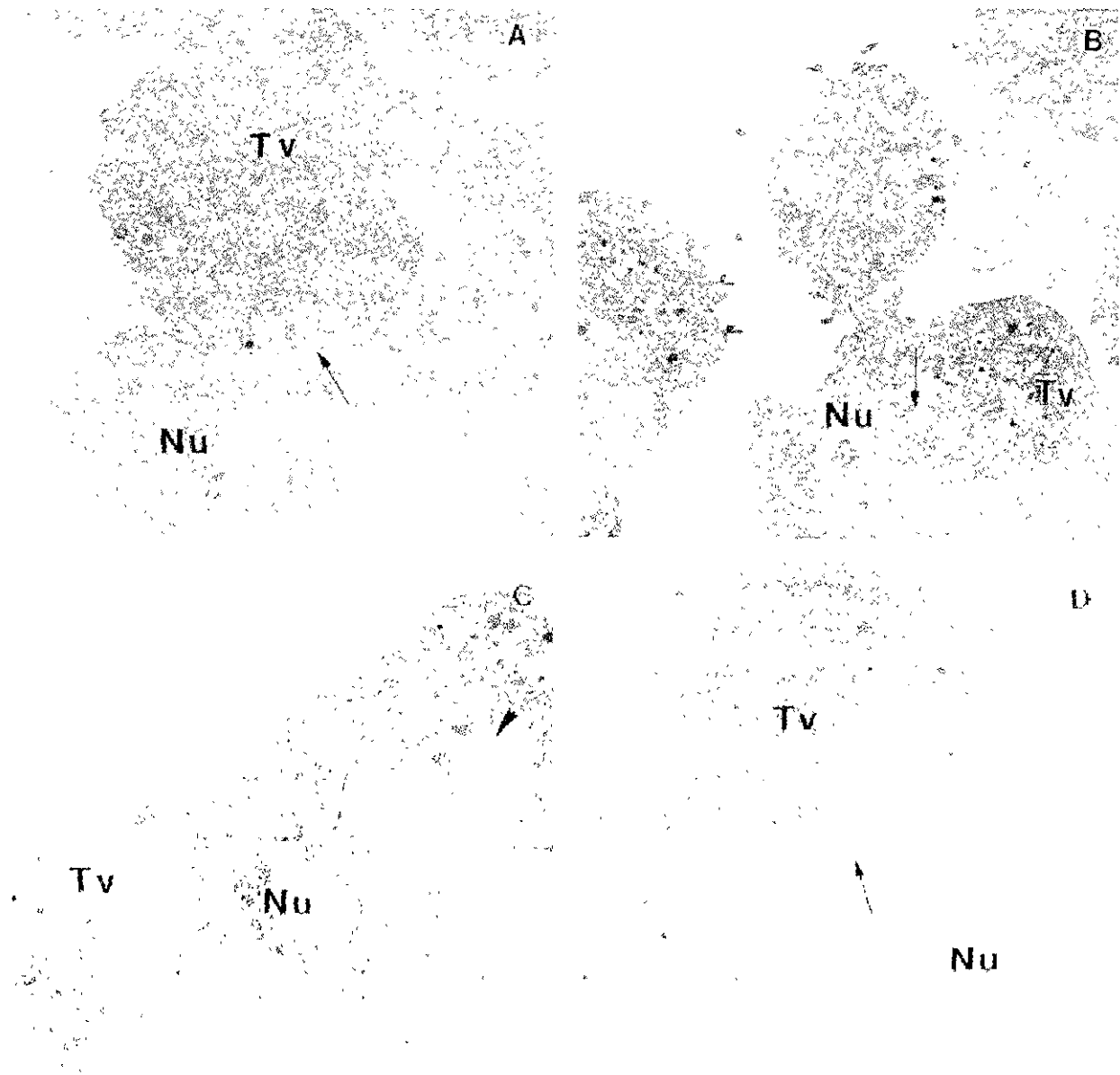
A los 140 min. de interacción ya no se encontraron núcleos aislados (Fig. 23). Los parásitos mostraron numerosas vacuolas con material en su interior (Fig. 23 A) y en algunos casos se observaron parásitos con vacuolas de gran tamaño que contenían material granuloso en su interior (Fig. 23 B).



**Fig. 20. Fotomicrografía electrónica de transmisión de *T. vaginalis*, células HeLa y núcleos aislados de las células HeLa.** A. *Trichomonas vaginalis*, aislado CNCD 188. Se observa claramente al núcleo (Nu) así como algunos hidrogenosomas (H) y numerosas vacuolas aparentemente vacías (V). 6,900 X. B. Células HeLa. Se observa al núcleo (Nu) con un nucleolo electrón denso (N) así como algunas mitocondrias (M). 3,800 X. C. Núcleos aislados de las células HeLa. Se observa un nucleolo electrón denso (N) y algunos restos de citoplasma. 5,500 X.



**Fig. 21. Fotomicrografía electrónica de transmisión de la interacción entre *T. vaginalis* (Tv) y los núcleos aislados de las células HeLa (Nu) (35 min.). A y B. Las zonas de contacto entre la membrana del parásito y la envoltura nuclear de los núcleos aislados son escasas (flecha). El núcleo presenta una envoltura nuclear bien definida y un nucleolo prominente. A. 6,000 X; B. 4,800 X.**



**Fig. 22. Fotomicrografía electrónica de transmisión de la interacción entre *T. vaginalis* (Tv) y los núcleos aislados de las células HeLa (Nu) (50 min.).** A. Interdigitaciones entre la membrana del parásito y la envoltura nuclear de los núcleos aislados (flecha). 6,400 X. B y C. Varios parásitos en interacción con un solo núcleo. Obsérvese el material granuloso dentro de las vacuolas de los parásitos (punta de flecha). B. 3,000 X; C. 4,800 X; D. La envoltura nuclear de los núcleos aislados presenta daños evidentes en el área de contacto con el parásito (flecha). 6,000 X.





**Fig. 23. Fotomicrografía electrónica de transmisión de la interacción entre *T. vaginalis* (Tv) y los núcleos aislados de las células HeLa (Nu) (140 min.).** A. Los parásitos presentan una gran cantidad de vacuolas de distinto tamaño. 7,200 X. B. En algunos parásitos se observa una vacuola de gran tamaño con material granuloso en su interior (flecha). 5,200 X.

## 6. Análisis de la interacción entre *T. vaginalis* y los núcleos aislados de las células HeLa por epifluorescencia

Para continuar con la caracterización de la interacción entre *T. vaginalis* y los núcleos aislados de las células HeLa, se identificó el DNA de ambos tipos celulares por microscopía de fluorescencia utilizo una tinción con yoduro de propidio. Debido a que el yoduro de propidio se intercala de manera inespecífica tanto en el DNA como en el RNA, las muestras se trataron con RNasa para observar únicamente al DNA.

En primer lugar, se analizó a los parásitos y a los núcleos aislados de las células HeLa (Fig. 24). En la fig. 24 A y B se muestra al aislado CNCD 188 de *T. vaginalis* tratado únicamente con yoduro de propidio. Como se observa, los parásitos mostraron una fluorescencia intensa y difusa que abarcó el total de su área; sin embargo, cuyo los parásitos fueron tratados con RNasa y yoduro de propidio (Fig. 24 C y D) presentaron una fluorescencia de color rojo intenso en una estructura de forma ovoide localizada en la parte anterior, la cual corresponde al núcleo del parásito. En algunos casos se observaron dos núcleos en un mismo parásito, lo que indicaría que el parásito se encontraba en la última fase de la mitosis, después de la cariocinesis y antes de la citocinesis (Gómez-Conde y col., 2000).

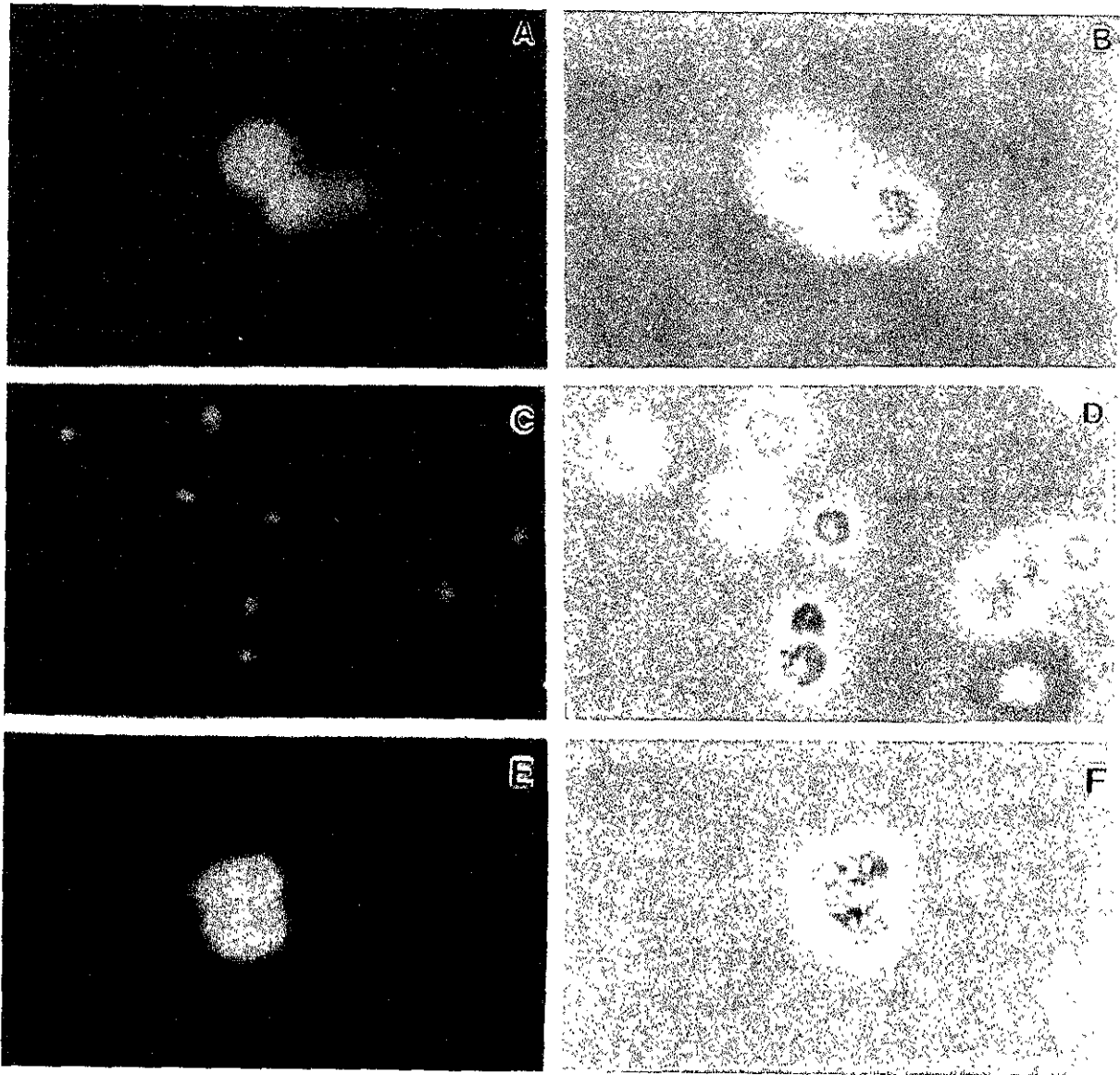
En la fig. 24 E y F se muestra a los núcleos aislados de las células HeLa tratados con RNasa y yoduro de propidio. Los núcleos presentaron una fluorescencia de color rojo intenso que abarcó el total de su área.

De esta forma, el tratamiento de los parásitos y de los núcleos de las células HeLa con RNasa y yoduro de propidio permitió distinguir unos de otros con base en el tamaño y en el patrón de fluorescencia observado.

❖ **Cinética de la interacción entre *T. vaginalis* y los núcleos aislados de las células HeLa por epifluorescencia**

Al inicio de la interacción los núcleos de las células HeLa presentaron una fluorescencia intensa de color rojo que permitió distinguirlos claramente de los parásitos, en los que sólo se observaba una fluorescencia de menor tamaño en su parte anterior (Fig. 25 A y B).

A los 60 min. de interacción se observaron varios parásitos asociados con uno o varios núcleos (Fig. 25 C y D). A los 120 min. de interacción se observó un aumento en la cantidad de material celular disperso así como una menor proporción de núcleos intactos (Fig. 25 E y F). Finalmente, a los 270 min. de interacción ya no se encontraron núcleos intactos y únicamente se observaron parásitos aislados (Fig. 25 G y H).



ESTA FIGURA NO SALE  
DE LA FOLIOGRAFIA

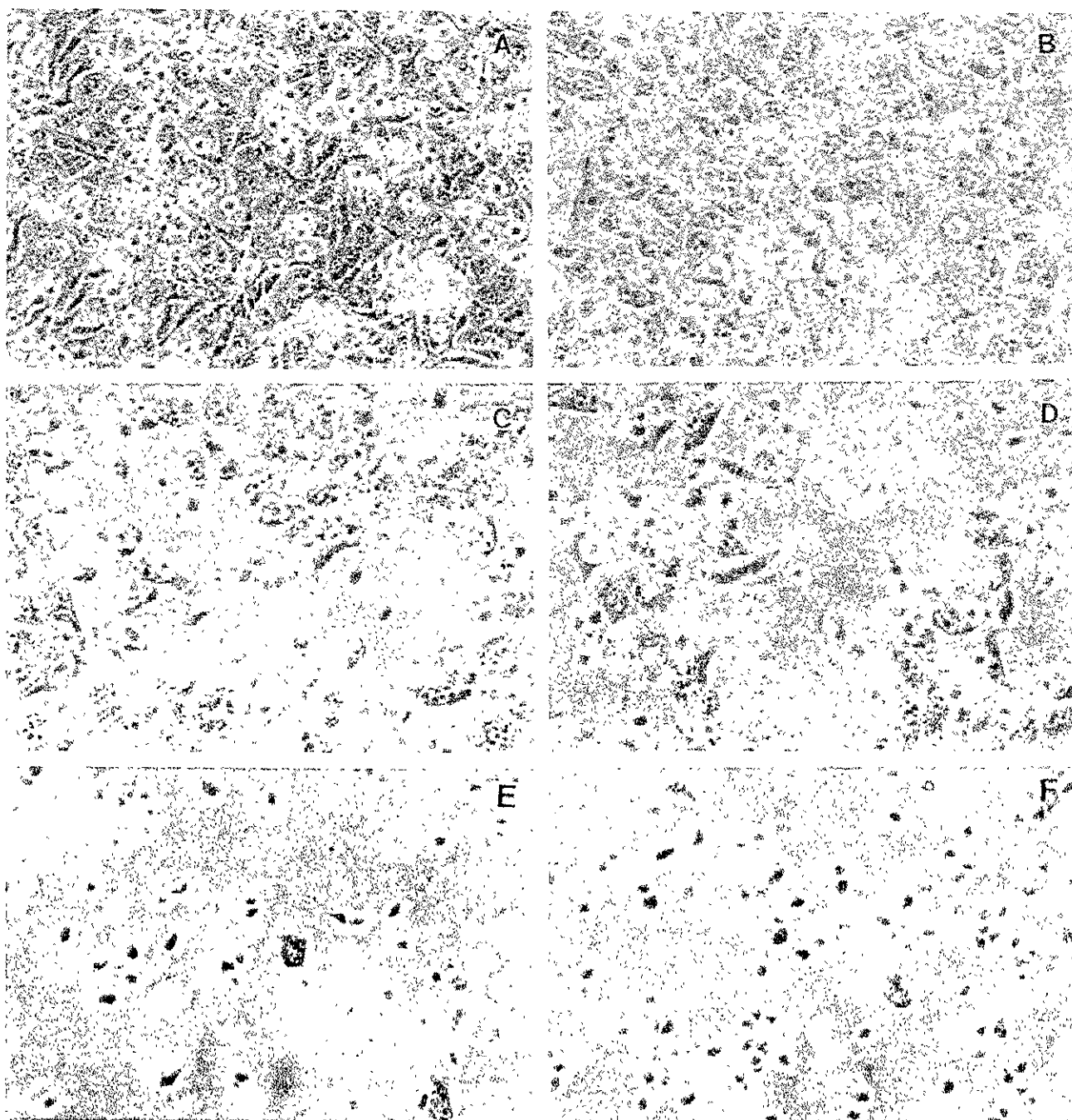
**Fig. 24. Fotomicrografía de epifluorescencia y contraste de fases de *T. vaginalis* y los núcleos aislados de las células HeLa.** Las muestras se fijaron con metanol:ácido acético 3:1 y yoduro de propidio. A y B. *T. vaginalis*, aislado CNCD 188 sin tratamiento con RNasa; C y D. *T. vaginalis*, aislado CNCD 188 tratado con RNasa al 1%; E y F. Núcleos aislados de la células HeLa tratados con RNasa al 1%. A, C y E, epifluorescencia; B, D y F, contraste de fases. 40 X OPT 2.0.

## 7. Análisis de la interacción entre *T. vaginalis* y las células HeLa en monocapa por microscopía de luz

De la interacción entre *T. vaginalis* y las células HeLa en monocapa se analizaron dos aspectos. Por un lado se estudió el efecto del parásito sobre la monocapa confluyente y por el otro se analizaron los sobrenadantes a los diferentes tiempos de interacción, ya que después de que el parásito ha estado en contacto con la monocapa de las células HeLa algunas células son destruidas por el parásito mientras que otras se despegan del sustrato.

En la fig. 26 se muestra el efecto del parásito sobre la monocapa de células HeLa a diferentes tiempos. En la fig. 26 A se observa la monocapa confluyente de células HeLa antes de la interacción con los parásitos. Las células presentaron un contorno bien definido y un núcleo prominente en cuyo interior se observaron uno o varios nucleolos. La incubación de la monocapa de las células HeLa con los parásitos en el medio de interacción a 37°C mostró una destrucción gradual de la monocapa, encontrándose áreas carentes de células. Dichas áreas aumentaron progresivamente hasta que a los 180 min. de interacción ya no se encontraron células HeLa unidas al sustrato y únicamente se observaron parásitos.

En cuanto a los parásitos, inicialmente éstos se adhirieron en cúmulos de gran tamaño en diferentes partes de la monocapa y conforme progresó la destrucción de la misma los parásitos se empezaron a separar, aunque fue posible observar grupos de parásitos en suspensión (Fig. 26). Es importante señalar que una vez que las células se desprendieron del sustrato fue difícil distinguirlas de los parásitos en suspensión, ya que éstas se redondean y presentan un tamaño similar al de los protozoarios, razón por la cual también se analizaron los sobrenadantes de la interacción.

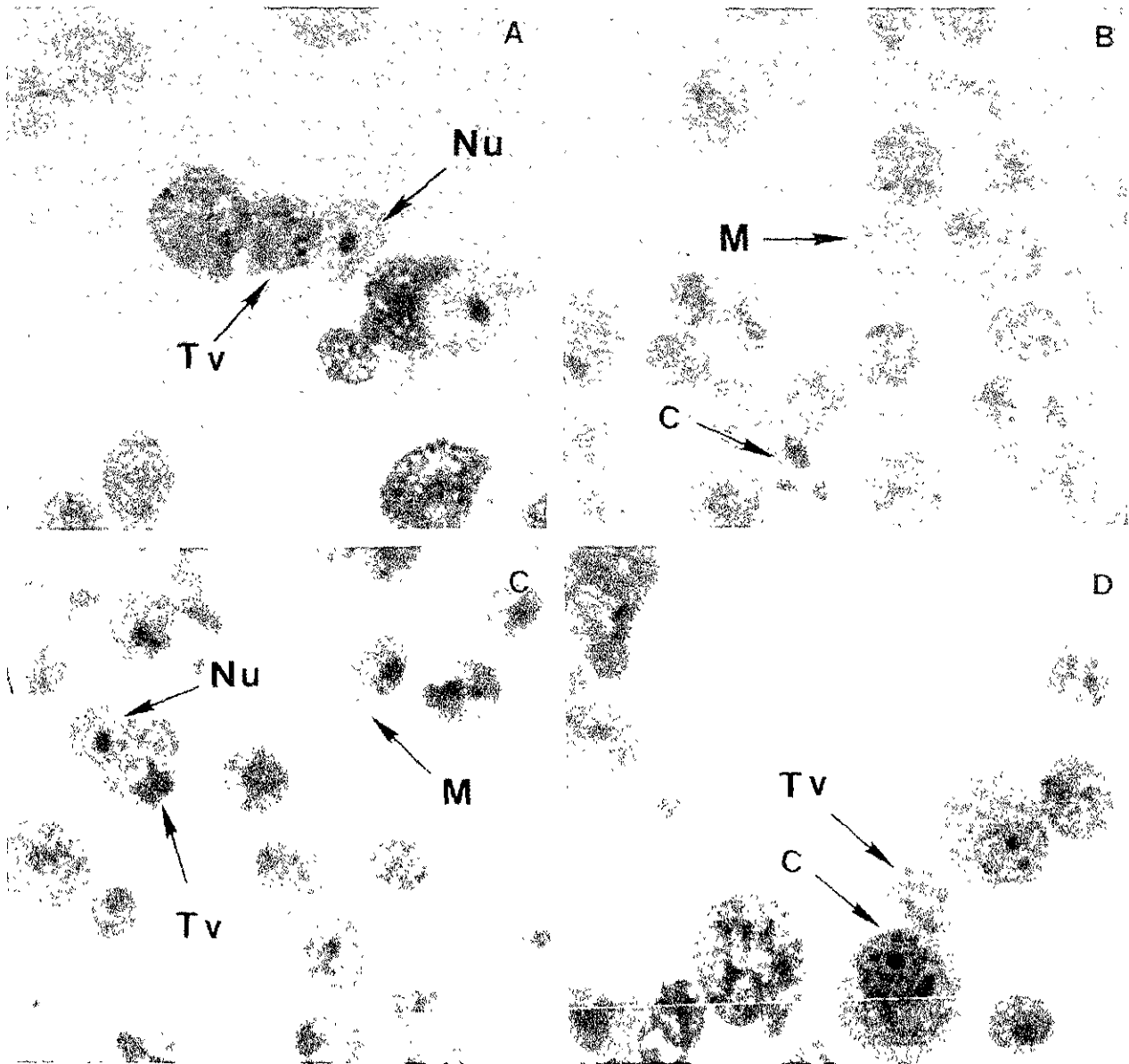


**Fig. 26. Cinética de destrucción de la monocapa de células HeLa por los parásitos del aislado CNCD 188 de *T. vaginalis* analizada por microscopía de contraste de fases. A. Monocapa confluyente de células HeLa en medio DMEM; B. Monocapa confluyente de células HeLa con los parásitos en medio de interacción TYM:DMEM 1:2 (0 min.); C. 60 min. de interacción; D. 120 min. de interacción; E. 180 min. de interacción; F. 240 min. de interacción. 90 X.**

## **8. Análisis de la interacción entre *T. vaginalis* y las células HeLa desprendidas de la monocapa por microscopía de luz**

Para observar la interacción entre *T. vaginalis* y las células HeLa desprendidas de la monocapa, diversas muestras del sobrenadante se incluyeron en resinas epóxicas, obteniéndose cortes semifinos que se tiñeron con azul de toluidina y se analizaron por microscopía de luz.

A los 35 min. de interacción se observaron predominantemente parásitos aislados y células HeLa intactas, aunque también se encontraron parásitos adheridos a las células HeLa y parásitos asociados estrechamente a los núcleos de las células HeLa, los cuales fueron liberados por los parásitos (Fig. 27 A). Después de 70 min. de interacción, se observaron básicamente todas las condiciones descritas anteriormente, aunque se redujo la proporción de parásitos y células aisladas y predominaron los parásitos adheridos a las células y a los núcleos liberados, además de que se observó una cantidad significativamente mayor de material celular disperso (Fig. 27 B). A los 140 min. de interacción (Fig. 27 C) se observó una gran cantidad de material celular disperso y algunas células enteras con o sin parásitos asociados a ellas; sin embargo, la presencia de núcleos liberados por el parásito ya no fue evidente y algunos parásitos presentaron material en el interior de sus vacuolas. Finalmente, a los 220 min. de interacción (Fig. 27 D) se observaron principalmente parásitos con una gran cantidad de vacuolas y algunas células intactas.



**Fig. 27. Cinética de interacción entre *T. vaginalis* (Tv) y las células HeLa (C) en suspensión.** El análisis se realizó por microscopía óptica de cortes semifinos teñidos con azul de toluidina al 0.5%. La interacción se realizó en medio TYM:DMEM 1:2 con una relación célula:parásito 1:5 a diferentes tiempos. A. 35 min.; B. 70 min.; C. 140 min.; D. 220 min. M, material celular. 40 X OPT 2.0.

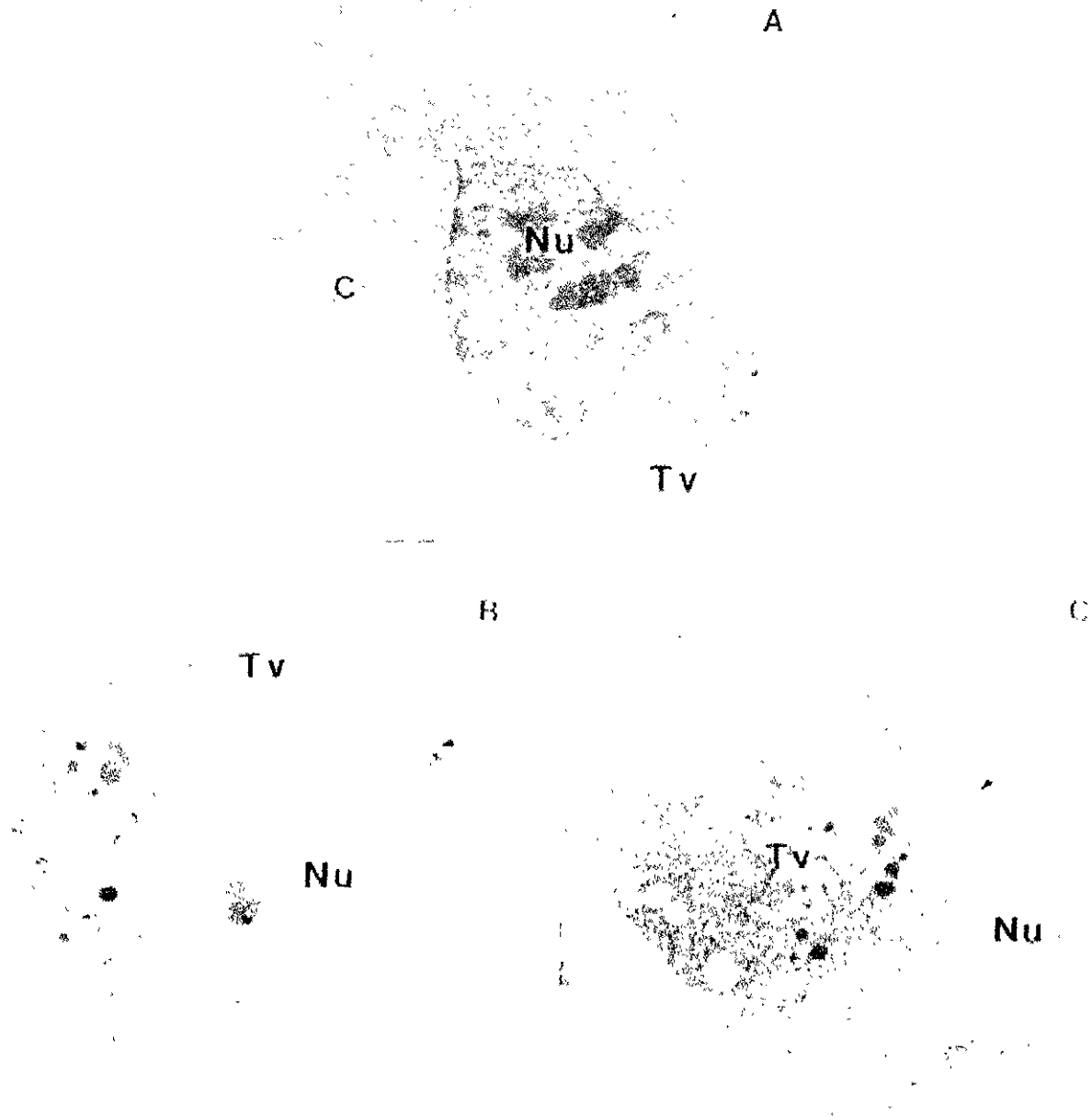


## 9. Análisis de la interacción entre *T. vaginalis* y las células HeLa desprendidas de la monocapa por microscopía electrónica de transmisión

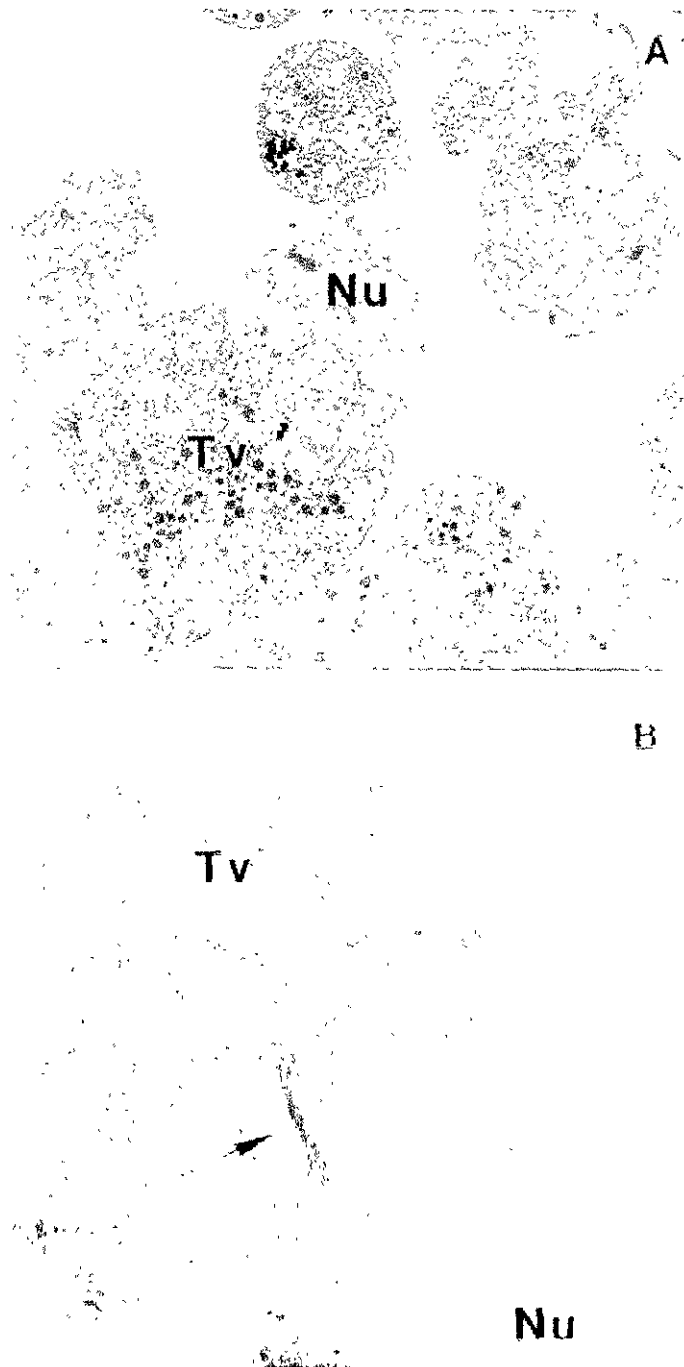
A los 35 min. de interacción entre el parásito y las células HeLa desprendidas de la monocapa se observaron parásitos adheridos a las células HeLa en suspensión. Dichos parásitos presentaron una transformación morfológica parcial en el área de contacto con la célula (Fig. 28 A). Asimismo, algunos de los parásitos se encontraron asociados a los núcleos liberados (Fig. 28 B y C). Es importante mencionar que la morfología de los núcleos liberados por el parásito es muy similar a la de los núcleos aislados según el método de Berkowitz y col. aunque el área de los núcleos que estaba en contacto con el parásito presentó daños evidentes. Además, debe hacerse notar que el parásito tiende a adoptar la forma de los núcleos liberados como ocurre al contacto de *T. vaginalis* con las células del epitelio vaginal (Arroyo y col., 1993).

A los 70 min. de interacción (Fig. 29) nuevamente se observó que los parásitos fueron capaces de lisar a las células HeLa y de liberar a su núcleo. Los núcleos expuestos presentaron algunos restos de citoplasma asociados a ellos, además de que se observó una gran cantidad de material celular disperso (Fig. 29 A). En algunos casos, los parásitos presentaron un mecanismo de succión que incluyó la formación de un canal fagocítico similar al reportado por Rendón-Maldonado y col. (Fig. 29 B).

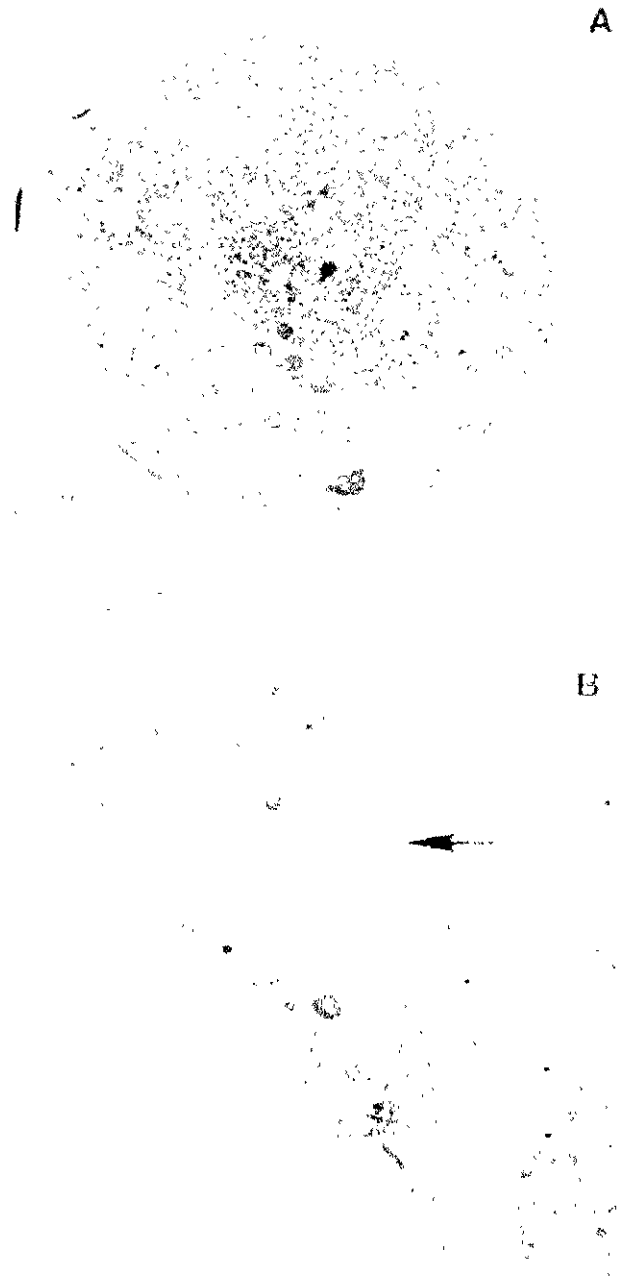
Finalmente, a los 140 min. de interacción (Fig. 30) los parásitos presentaron una gran cantidad de vacuolas (Fig. 30 A) mientras que otros presentaron vacuolas de distinto tamaño con material granuloso en su interior (Fig. 30 B). Es importante hacer notar que aún en este punto de la interacción es posible encontrar células HeLa intactas (no mostrado).



**Fig. 28. Fotomicrografía electrónica de transmisión de la interacción entre *T. vaginalis* (Tv) y células HeLa (C) en suspensión (35 min.).** A. El parásito entra en contacto con la célula desprendida del sobrenadante. 4,800 X. B y C. El núcleo (Nu) de la célula HeLa es liberado por el parásito. Obsérvese el cambio en la morfología de la membrana del parásito. B. 3,800 X; C. 4,800 X.



**Fig. 29. Fotomicrografía electrónica de transmisión de la interacción entre *T. vaginalis* (Tv) y células HeLa en suspensión (70 min.).** A. Los parásitos interactúan con los núcleos liberados (Nu) y se observa una gran cantidad de material celular disperso. 2,400 X. B. El parásito forma un canal fagocítico en un proceso de succión (flecha). 6,000 X.

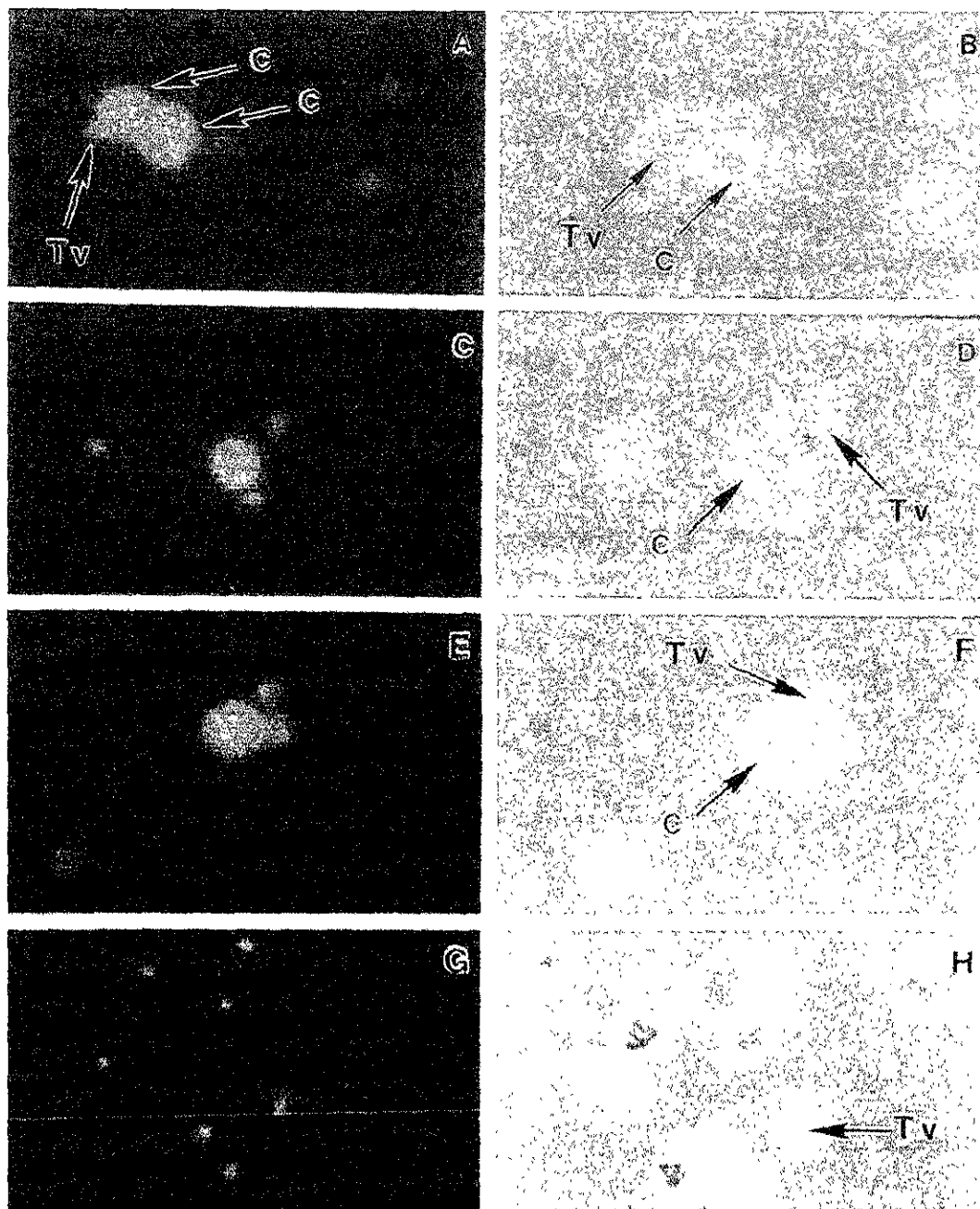


**Fig. 30. Fotomicrografía electrónica de transmisión de la interacción entre *T. vaginalis* (Tv) y células HeLa en suspensión (140 min.). A. Parásito con numerosas vacuolas. 6,000 X. B. En el interior de algunas de las vacuolas del parásito se observa material granuloso de gran tamaño (flecha). 4,800 X.**

## 10. Análisis de la interacción entre *T. vaginalis* y las células HeLa desprendidas de la monocapa por epifluorescencia

De la interacción entre *T. vaginalis* y las células HeLa en monocapa a diferentes tiempos (60, 120, 180 y 360 min.) se analizaron únicamente los sobrenadantes por microscopía de epifluorescencia en muestras fijadas con metanol: ácido acético 3:1 y tratadas con RNasa al 1% y yoduro de propidio 1:1000 (Fig. 31).

A los 60 min. de interacción se observaron parásitos y células HeLa aparentemente intactas en el sobrenadante. Las células HeLa desprendidas presentaron una fluorescencia intensa que abarcó la totalidad de su área. En contraste, los parásitos presentaron una fluorescencia intensa pero sólo en el área correspondiente al núcleo, lo que permite distinguir a los unos de las otras. Algunos parásitos se encontraron asociados a las células HeLa presentes en el sobrenadante (Fig. 31 A y B). A los 120 y 180 min. de interacción fue posible observar varios parásitos asociados a las células HeLa así como parásitos aislados (Fig. 31 C, D, E y F). Finalmente, a los 360 min. de interacción ya no se observaron células HeLa y únicamente se encontraron parásitos aislados y algunos restos de material celular (Fig. 31 G y H).



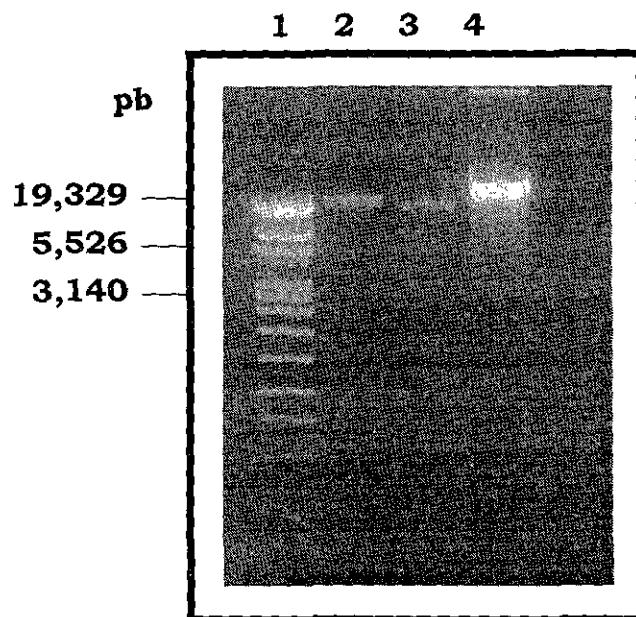
**Fig. 31. Fotomicrografía de epifluorescencia y contraste de fases de la interacción entre *T. vaginalis* (Tv) y células HeLa (C) en suspensión.** Las muestras se fijaron con metanol:ácido acético 3:1 y trataron con RNasa al 1% y con yoduro de propidio. A y B. 60 min. de interacción; C y D. 120 min. de interacción; E y F. 180 min. de interacción; G y H. 360 min. de interacción. A, C, E y G, epifluorescencia; B, D, F y H, contraste de fases. 40 X OPT 1.6.

## 11. Determinación de la incorporación de $^3\text{H}$ -timidina del DNA de las células HeLa al DNA de *T. vaginalis*

Para determinar si el núcleo de las células HeLa podría actuar como una fuente directa de nucleótidos para *T. vaginalis*, se realizó la interacción entre el parásito ( $15 \times 10^6$  parásitos) y las células HeLa en monocapa ( $3 \times 10^6$  células) previamente marcadas con  $^3\text{H}$ -timidina en medio de interacción TYM:DMEM 1:2 sin suero durante 6 hrs. a  $37^\circ\text{C}$ . Después de ese tiempo, el número de parásitos aumentó a  $20 \times 10^6$  individuos, los cuales presentaron un 100% de viabilidad según se determinó por el método de exclusión de azul tripano. En este punto no se observaron células HeLa ni en el sobrenadante ni en la monocapa debido al tiempo largo de interacción y a la relación parásito:célula utilizada, las cuales corresponden a las condiciones preestablecidas en las que el parásito destruyó casi por completo a las células HeLa.

Para permitir la incorporación de la  $^3\text{H}$ -timidina al DNA de *T. vaginalis*, la totalidad de los parásitos se resembraron en medio de cultivo fresco con suero y se incubaron durante 18 hrs. a  $37^\circ\text{C}$ . Después de dicho periodo de incubación, se obtuvieron  $82.35 \times 10^6$  parásitos (dos duplicaciones) a los cuales se les extrajo el DNA para cuantificar la marca de  $^3\text{H}$ -timidina asociada a la bya del DNA genómico, encontrándose 4, 502.4 cpm en  $82.35 \times 10^6$  parásitos.

El DNA de los parásitos que interactuaron con las células HeLa presentó un alto peso molecular, no mostró signos de degradación y su patrón de migración fue muy similar al DNA proveniente de parásitos crecidos en condiciones normales y al DNA de las células HeLa, utilizados éstos dos últimos como controles (Fig. 32).

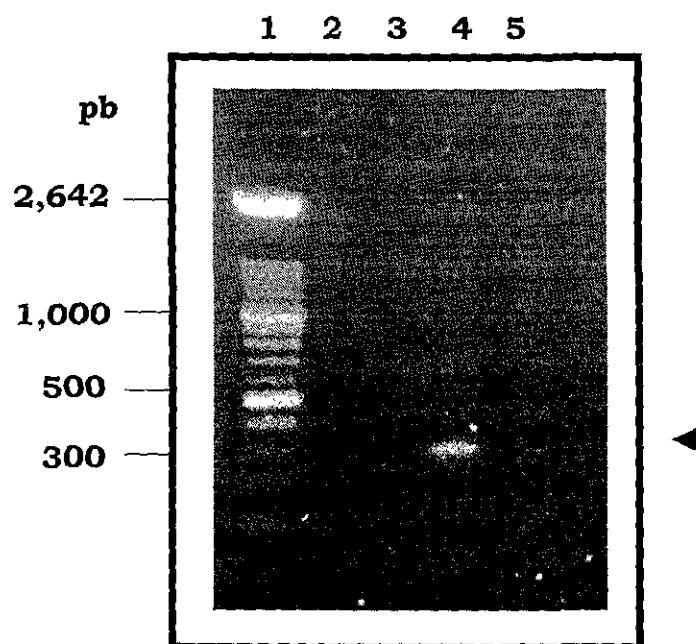


**Fig. 32. Electroforesis del DNA genómico de *T. vaginalis* y de las células HeLa.**

El DNA de *T. vaginalis* y de las células HeLa se extrajo con DNazol y se analizó en un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TAE 1 X. 1. Marcadores de tamaño molecular de DNA IV (0.07-19.3 kpb); 2. DNA genómico de los parásitos crecidos en condiciones normales; 3. DNA genómico de los parásitos provenientes de la interacción con las células HeLa en monocapa; 4. DNA genómico de las células HeLa crecidas en condiciones normales.

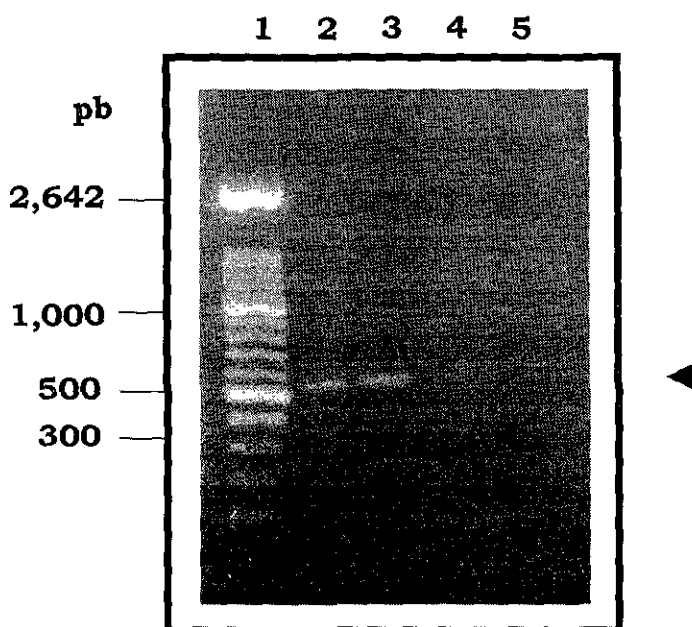


Finalmente, se procedió a realizar dos reacciones de PCR como un control para descartar una posible contaminación del DNA de *T. vaginalis* con el DNA proveniente de células HeLa intactas. La amplificación de una región del gen de  $\beta$ -globina, presente en eucariontes superiores –el cual estaría presente en las células HeLa pero no en *T. vaginalis*– se muestra en la figura 33. Como se observa, se obtuvo un producto de amplificación de entre 200 y 300 pb únicamente en el DNA de las células HeLa pero no el DNA de los parásitos que habían estado en contacto con la monocapa ni en el DNA de los parásitos crecidos en condiciones normales. De esta forma, se comprobó que no había células HeLa presentes al extraer el DNA de los parásitos.



**Fig. 33. Amplificación de un segmento del gen de  $\beta$ -globina.** El producto de PCR se analizó en un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TAE 1 X. La flecha indica el producto de PCR obtenido. 1. Marcadores de tamaño molecular de DNA XIV (100 pb). Reacción de PCR utilizo como templado: 2. DNA de parásitos crecidos en condiciones normales; 3. DNA de los parásitos provenientes de la interacción con las células HeLa en monocapa marcadas con  $^3\text{H}$ -timidina; 4. DNA de las células HeLa crecidas en condiciones normales; 5. Control de PCR sin DNA templado.

La segunda reacción de PCR se realizó utilizando oligonucleótidos degenerados diseñados para amplificar la región conservada de las cisteín proteinasas de *T. vaginalis*, la cual estaría presente en los parásitos pero no en las células HeLa. Según se muestra en la figura 34, se obtuvo un producto de amplificación de entre 500 y 600 pb en el DNA de los parásitos normales y en el DNA de los parásitos que habían estado en contacto con la monocapa, pero no en el DNA de las células HeLa.



**Fig. 34. Amplificación de la secuencia conservada de las CP de *T. vaginalis*.** El producto de PCR se analizó en un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TAE 1 X. La flecha señala el producto de PCR obtenido. 1. Marcadores de tamaño molecular de DNA XIV (100 pb). Reacción de PCR utilizo como templado: 2. DNA de parásitos crecidos en condiciones normales; 3. DNA de los parásitos provenientes de la interacción con células HeLa en monocapa marcadas con  $^3\text{H}$ -timidina; 4. DNA de células HeLa crecidas en condiciones normales; 5. Control de PCR sin DNA templado.

## Discusión

Las vías metabólicas de diversos protozoarios parásitos se han estudiado intensamente durante los últimos años, ya que muchos microorganismos patógenos dependen de sus huéspedes para obtener metabolitos importantes y por lo tanto se podría explotar dicha dependencia para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos. Por ejemplo, todos los protozoarios parásitos (*Plasmodium* spp., *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp., etc.) son incapaces de sintetizar nucleótidos de purina *de novo* y por lo tanto dependen de las enzimas de las vías de salvamento para obtener bases y nucleósidos de purina de su huésped y convertirlos en los nucleótidos correspondientes (Somoza y col., 1998). De esta forma, un acercamiento racional para el desarrollo de drogas sería la identificación de compuestos que puedan ser dirigidos a blancos metabólicos únicos del parásito tales como las enzimas involucradas en el salvamento de purinas y pirimidinas. Por ejemplo, a diferencia de los humanos, *Plasmodium falciparum* no puede sintetizar purinas *de novo* y por lo tanto debe obtener bases y nucleósidos de purina de los eritrocitos del huésped para metabolizar dichos nucleótidos por vías de salvamento. Por lo tanto, las drogas capaces de bloquear el salvamento de purinas deberían de tener una importante actividad contra la malaria (Queen y col., 1990).

Como se mencionó anteriormente, todos los protozoarios parásitos y helmintos examinados hasta la fecha son incapaces de sintetizar el anillo de purina *de novo* y por lo tanto deben salvar purinas preformadas del huésped para sobrevivir; sin embargo, la identificación de una fuente directa de purinas del huésped que es crítica para la sobrevivencia del parásito aún no ha sido definida claramente (Ngo y col., 2000).

En el caso de *Trichomonas vaginalis*, diversos autores han postulado que las células epiteliales lisadas del huésped infectado (Wang y Cheng, 1984), la autólisis de bacterias *in vivo* y las células endometriales dañadas (Harris y col., 1988) podrían proveer al parásito con una abundante fuente de ácidos nucleicos, los cuales probablemente serían almacenados en las vacuolas alimenticias del parásito y degradados por las nucleasas y fosfatasa de *T. vaginalis* (Wang y Cheng, 1984); sin

embargo, hasta la fecha no existe ningún reporte que identifique a las diferentes fuentes de nucleótidos para el parásito.

De esta manera, en el presente trabajo se determinó experimentalmente si el parásito interacciona de manera específica con los núcleos de las células HeLa y si éstos podrían actuar como una fuente directa de nucleótidos para *T. vaginalis*.

## **1. Aislamiento de los núcleos de las células HeLa**

Para el aislamiento de los núcleos de las células HeLa se utilizó una modificación del método original propuesto por Berkowitz y col. De acuerdo con dichos autores, el método propuesto es adecuado ya sea para volúmenes grandes o pequeños de cultivos celulares y permite obtener núcleos que no están agregados y que pueden ser resuspendidos fácilmente en alícuotas reproducibles. Los núcleos obtenidos de esta manera no presentan componentes citoplásmicos y tampoco se observan células enteras, además de que presentan una ultraestructura bien definida y tienen altas actividades de RNA polimerasa y exoribonucleasa (Berkowitz y col., 1969).

Una de las diferencias principales entre el método propuesto por Berkowitz y col. y el utilizado en el presente trabajo radica en el método de ruptura de las células. Mientras que Berkowitz y col. utilizaron un homogenizador tipo Dounce para obtener a los núcleos, en el presente trabajo se utilizó una aguja de 22 mm de diámetro para lisar a las células. Lo anterior, aunado al hecho de que se extrajeron los núcleos a partir de células HeLa crecidas en monocapa —y no de células crecidas en suspensión como lo realizado por los autores— resultó en un rendimiento menor al reportado por los autores; sin embargo, la cantidad y la calidad de núcleos obtenidos permitió realizar los experimentos adecuadamente.

En la mayoría de los tipos celulares, el núcleo está anclado dentro de la célula por medio de la continuidad de la envoltura nuclear y por el retículo endoplásmico, así como por conexiones entre la superficie nuclear y el citoesqueleto, en particular por el sistema de filamentos intermedios. De esta forma, el hecho de que se obtuvieran núcleos relativamente puros es notable. Es importante enfatizar que el aislamiento de núcleos puros a partir de líneas celulares de mamíferos crecidas como monocapas unidas a un sustrato de plástico es muy diferente del aislamiento

de núcleos a partir de células crecidas en suspensión. Las células que crecen unidas a un sustrato se deben despegar de su matriz extracelular, ya sea por medio de quelantes de  $\text{Ca}^{++}$  o por raspado mecánico. Comúnmente, este procedimiento lleva a un fraccionamiento celular menos limpio. De hecho, muchas líneas celulares que crecen unidas a un sustrato muestran una elaboración más extensa de filamentos intermedios enredados en el núcleo, lo que puede constituir una importante barrera para lograr el aislamiento de núcleos limpios (Spector y col., 1998). Sin embargo, aunque los núcleos fueron aislados a partir de células HeLa crecidas en monocapa se obtuvo un rendimiento aceptable y los núcleos no presentaron una contaminación con material celular significativa.

## **2. Comprobación de la integridad de los núcleos aislados**

Con respecto a la integridad de los núcleos aislados de las células HeLa, los resultados indican que los núcleos obtenidos por esta modificación del método de Berkowitz y col. no sufren alteraciones morfológicas evidentes al incubarse en medio TYM sin suero a  $37^{\circ}\text{C}$ . En todos los casos, los núcleos analizados mantuvieron la morfología observada al inicio de la interacción: la envoltura nuclear se observó intacta y los nucleolos fueron evidentes. En cuanto a la cantidad de material celular disperso, no se observó un aumento significativo al paso del tiempo, lo que indica que la cantidad de núcleos que pudieron haberse dañado durante la incubación no fue apreciable.

Por otra parte, se intentó realizar una cuantificación de los núcleos a través del tiempo como otra forma de estimar la estabilidad de los núcleos en el medio TYM a  $37^{\circ}\text{C}$ . La tendencia observada fue que no hay una pérdida significativa en el número de núcleos en los diferentes tiempos analizados; sin embargo, los datos no permitieron realizar una gráfica que lo corroborara ya que el número de núcleos tendía a aumentar al paso del tiempo. Lo anterior puede deberse a que inicialmente los núcleos formaron agregados de diferentes tamaños que tendían a dispersarse gradualmente, por lo que la cantidad de núcleos estimada inicialmente era menor a la que se estimaba a periodos posteriores. Sin embargo, las observaciones por microscopía de luz permitieron establecer que las condiciones experimentales no

afectaban a los núcleos de forma apreciable, por lo que los cambios observados a lo largo de los experimentos podrían ser atribuidos directamente de su interacción con el parásito.

### **3. Elección del aislado de *T vaginalis* para realizar las interacciones**

Para seleccionar el aislado de *T. vaginalis* más eficiente para la interacción con los núcleos, se realizaron ensayos entre los núcleos aislados de células HeLa y parásitos provenientes de dos aislados diferentes (CNCD 147 y CNCD 188) a diferentes tiempos. Los resultados de ambos experimentos indicaron que el aislado CNCD 188 mostraba una interacción más estrecha con los núcleos que el aislado CNCD 147 a los mismos tiempos, por lo que se seleccionó al aislado CNCD 188 para el resto de las interacciones.

Debido a las diferencias observadas entre ambos aislados se realizó además una evaluación de los niveles de citotoxicidad por medio del ensayo colorimétrico propuesto por Alderete y Pearlman. Dicho ensayo permite medir los efectos citopatogénicos de *T. vaginalis* sobre células eucariontes (en este caso células HeLa) en cultivo. Las células restantes en los pozos después de incubarse con los parásitos se tiñen con cristal violeta y de esta manera se puede obtener una correlación entre el material celular teñido y la absorbancia a 570 nm (Alderete y Pearlman, 1984).

Los resultados obtenidos en este ensayo indicaron que el aislado CNCD 188 es más citotóxico (es decir, produce una mayor destrucción de las monocapas de células HeLa) que el aislado CNCD 147 a los mismos tiempos de incubación. Durante el desarrollo de este ensayo también se observó que el grado de citotoxicidad del aislado CNCD 188 —bajo las mismas condiciones experimentales— es mayor si tiene pocos días en cultivo, por lo que se determinó que los parásitos que se utilizarían en los ensayos posteriores sólo tendrían dos días en cultivo para evitar que éste factor afectara el resultado de los experimentos.

#### **4. Análisis de la interacción entre *T. vaginalis* y los núcleos aislados de las células HeLa por microscopía de luz y por microscopía electrónica de transmisión**

En el presente proyecto se decidió estudiar la interacción entre el parásito y el núcleo de las células HeLa desde dos perspectivas diferentes. Por una parte, se estudió la interacción específica entre los núcleos aislados de las células HeLa y el parásito, mientras que por otra parte se decidió estudiar la interacción entre el parásito y las células HeLa crecidas en monocapa.

Los resultados obtenidos de la interacción entre *T. vaginalis* y los núcleos aislados de las células HeLa mostraron una asociación específica entre el parásito y los núcleos aislados. A los 35 min. de interacción los parásitos incubados con los núcleos aislados de las células HeLa presentaron sólo algunas zonas de contacto con los núcleos; sin embargo, a los 50 min. de interacción se observaron algunas interdigitaciones entre la membrana del parásito y la envoltura nuclear de los núcleos aislados. A los 140 min. de interacción ya no fue posible detectar núcleos aislados y los parásitos presentaron un número mayor de vacuolas con respecto al control, algunas de las cuales contenían material de gran tamaño en su interior. La procedencia de dicho material no pudo ser corroborada con las técnicas utilizadas, pero es posible que correspondan —al menos en parte— a restos de los núcleos aislados.

#### **5. Análisis de la interacción entre *T. vaginalis* y las células HeLa en monocapa por microscopía de luz y por microscopía electrónica de transmisión**

Las interacciones entre el parásito y las células blancas han sido estudiadas principalmente en sistemas *in vitro* basados en cultivos celulares. Este sistema ha permitido la caracterización del proceso citopático, el cual puede resumirse de la siguiente manera: los parásitos, que inicialmente nadan libremente en el medio, forman groyes agregados. Al contacto con las células, los parásitos presentan una

transformación de una forma ovoide típica a una forma ameboide, aplanada y altamente adherente, reclutyo a otros parásitos y formyo gryes agregados donde los parásitos se asocian estrechamente. Después de algunas horas aparecen áreas libres de células y se observa una retracción, redondeamiento y separación de las células epiteliales (Fiori y col., 1999).

El efecto descrito por Fiori y col. se observó claramente en las interacciones entre el parásito y las células HeLa en monocapa, las cuales se despegaron del sustrato después de haber estado en contacto con el parásito a diferentes tiempos. Una vez que las células se separaron del sustrato, no fue posible distinguirlas del parásito debido a su tamaño y forma. Es importante resaltar que el hecho de que las células se separaran del sustrato no implicaba que éstas estuvieran dañadas ya que al analizar los sobrenadantes por microscopía electrónica de transmisión y por microscopía de epifluorescencia se pudieron identificar tanto células intactas como células en contacto con el parásito con diferentes niveles de destrucción.

Con relación al daño producido a las monocapas de las células HeLa debe mencionarse que aunque generalmente se acepta que el contacto entre el parásito y la célula blanco es un prerrequisito para la citopatogenicidad, es posible que algunos de los cambios observados en las células blanco sean debidos a sustancias liberadas por el parásito hacia el medio. Pindak y col., por ejemplo, reportaron que la exposición de una monocapa de células epiteliales a un filtrado libre de parásitos obtenido del medio inducía el redondeamiento y desprendimiento de las células epiteliales en cultivo, aunque sin afectar la viabilidad. El factor responsable del desprendimiento celular fue reportado por Garber y col. como una proteína de 200 kDa llamada factor de desprendimiento celular, la cual es liberada al medio por *T. vaginalis* al estar en contacto con las células epiteliales. De igual forma, la liberación al medio de un gran número de proteinasas, algunas de las cuales están involucradas en la patogenicidad, ha sido descrita en el parásito (Fiori y col., 1999).

Al analizar el sobrenadante de las interacciones entre *T. vaginalis* y las células HeLa en monocapa se encontró que el parásito entraba en contacto con las células desprendidas y era capaz de liberar al núcleo de las mismas. El núcleo liberado por el parásito era morfológicamente muy similar a los núcleos aislados obtenidos de acuerdo a la modificación del método de Berkowitz y col., es decir, los núcleos



liberados presentaban algunos restos de material citoplásmico aunque en general se observaron casi intactos, con su envoltura nuclear aparentemente íntegra y uno o varios nucleolos prominentes. Debe señalarse que la mayoría de los parásitos que se asociaron a los núcleos liberados presentaron una transformación morfológica similar a la observada al contacto del parásito con células del epitelio vaginal (Arroyo y col., 1993). Finalmente, a los 140 min. de interacción la mayoría de los parásitos presentaron un mayor número de vacuolas con respecto a los controles, algunas de las cuales contenían material granuloso de gran tamaño en su interior.

En 1981, Heath reportó que la interacción entre *T. vaginalis* y células epiteliales resultaba en la producción de cambios patogénicos que concluían con la ruptura de la membrana plasmática de las células epiteliales y con la consiguiente liberación de los componentes citoplasmáticos al medio, entre los cuales se encontraba el núcleo. Dicho autor también refiere que la adhesión de *T. vaginalis* a la superficie de las células epiteliales fue seguido por cambios estructurales entre los que se incluían un aumento en el tamaño de las mitocondrias y del núcleo así como una disminución en la densidad del citoplasma (Heath, 1981). De esta forma, se podría explicar porque los núcleos liberados de las células HeLa por el parásito presentaron un tamaño similar al de los núcleos aislados que se utilizaron en las interacciones, que por ser extraídos utilizo soluciones hipotónicas presentaron un tamaño mayor al normal.

En resumen, cuyo *T. vaginalis* es incubado con las células HeLa en monocapa en medio de interacción a 37°C, los parásitos tienden a formar gries agregados sobre la monocapa y conforme pasa el tiempo se observan áreas libres de células que se extienden progresivamente hasta que la monocapa es destruida totalmente. Las células desprendidas del sustrato se redondean y se localizan en el sobrenadante, donde el parásito se asocia con ellas. Inicialmente, el parásito entra en contacto con la célula y la lisa, observándose una liberación del núcleo casi intacto. Una vez que el núcleo ha sido liberado, el parásito entra en contacto con él, observándose una asociación muy estrecha entre la membrana plasmática de *T. vaginalis* y la envoltura nuclear de los núcleos liberados. Finalmente, se ha sugerido que *T. vaginalis* posee un sofisticado sistema de transducción de señales que controlan la expresión de genes de virulencia (Arroyo y col., 1993), por lo que es

posible que al contacto del parásito con el núcleo se produzca una transducción de señales en el parásito que expliquen, al menos en parte, el fenómeno observado.

Por último, debe mencionarse que el hecho de que en todos los tiempos analizados se observaran diferentes etapas del proceso descrito podría deberse a que el cultivo utilizado en las interacciones no era un cultivo sincrónico. De esta forma, algunos de los parásitos se encontrarían en la fase de crecimiento y se asociarían a las células desprendidas y a los núcleos liberados, mientras que otros —por ejemplo, los que acaban de dividirse o los que están a punto de hacerlo—tardarían más entrar en contacto con las células. Por otra parte, es probable que algunas células HeLa permanecieran intactas a lo largo de la interacción debido a la fase de crecimiento en la que se encontraban, por lo que es posible que algunos de los receptores que son reconocidos por el parásito estuvieran ausentes o enmascarados.

Finalmente, en cuanto al aumento en el número de vacuolas en los parásitos, las técnicas utilizadas no permitieron determinar cuál es la naturaleza de material que se encontraba en su interior, aunque es probable que al menos parte de éste correspondiera a material nuclear de las células HeLa.

## **6. Análisis de la interacción entre *T. vaginalis* y los núcleos aislados de las células HeLa / células HeLa en monocapa por epifluorescencia**

En cuanto al análisis de la interacción entre el parásito y los núcleos aislados de las células HeLa, el tratamiento de las muestras con RNasa al 1% permitió eliminar el RNA del parásito, lo que facilitó la diferenciación entre los núcleos aislados de las células HeLa y *T. vaginalis*. Los resultados obtenidos confirman lo observado tanto por microscopía de luz como por microscopía electrónica de transmisión, es decir, algunos parásitos presentan un acercamiento inicial a los núcleos y después de 270 min. de interacción ya no es posible encontrar núcleos aislados.

En cuanto a la interacción entre *T. vaginalis* y las células HeLa en monocapa, las observaciones por microscopía de epifluorescencia también permitieron

distinguir a los parásitos de las células despegadas del sustrato debido a las diferencias en el tamaño entre ambos. El propósito principal de dicho ensayo fue determinar el tiempo en el que las células HeLa eran totalmente eliminadas del sobrenadante, de manera que al realizar los experimentos con células HeLa marcadas con  $^3\text{H}$ -timidina, éstas no se encontraran presentes con los parásitos y alteraran los resultados del experimento. Los datos obtenidos indicaron que ya no fue posible encontrar células HeLa en el sobrenadante después de 360 min. de interacción con el parásito, por lo que éste fue el tiempo utilizado para realizar los experimentos subsecuentes.

## **7. Determinación de la incorporación de $^3\text{H}$ -timidina del DNA de las células HeLa al DNA de *T. vaginalis***

El ensayo para determinar la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina al DNA de *T. vaginalis* se realizó con las células HeLa en monocapa y no con los núcleos aislados de dicha línea celular ya que las observaciones ultraestructurales y de microscopía de epifluorescencia indicaron que la interacción entre el parásito y las células en monocapa fue más eficiente que la interacción del parásito con los núcleos aislados.

En primer lugar, se analizó el DNA de los parásitos que interactuaron con las células HeLa y se comparó con el DNA de parásitos crecidos en condiciones normales. De acuerdo a Wang y col., el DNA de *T. vaginalis* tiene un tamaño de más de 23.5 kilobases (Wang y Wang, 1985). El DNA de los parásitos que interactuaron con las células HeLa y el de los parásitos crecidos en condiciones normales presentó un alto peso molecular (mayor a las 19,000 pb) y no mostró signos de degradación, por lo que se determinó que el método de extracción de DNA genómico era adecuado.

Al analizar el DNA de los parásitos que interactuaron con las células HeLa se encontró  $^3\text{H}$ -timidina asociada a la bya del DNA genómico observada en un gel de agarosa, encontrándose una lectura de 4, 502.4 cpm en  $82.35 \times 10^6$  parásitos. El hecho de que en el DNA genómico de *T. vaginalis* se encontrara  $^3\text{H}$ -timidina indica que el parásito obtuvo dicho nucleótido partir del DNA de las células HeLa

marcadas, lo que implica que el DNA de las células HeLa puede actuar como una fuente de nucleótidos para el parásito. Sin embargo, existe la posibilidad de que material no digerido de las células HeLa almacenado en las vacuolas del parásito fuera extraído y se observara en la bya de DNA genómico de *T. vaginalis*.

Para descartar una posible contaminación del DNA de *T. vaginalis* con el DNA proveniente de células HeLa intactas se realizaron dos reacciones de PCR. Los resultados de las reacciones de PCR permitieron demostrar que la marca de  $^3\text{H}$ -timidina asociada al DNA de *T. vaginalis* fue debida a la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina proveniente de los núcleos de las células HeLa y no por una contaminación de células HeLa en los cultivos de parásitos al momento de realizar la extracción del DNA.

Como se mencionó anteriormente, *T. vaginalis* es incapaz de convertir sus ribonucleótidos en deoxiribonucleótidos y el único medio del parásito para obtener cualquiera de los cuatro deoxiribonucleótidos necesarios para la síntesis de DNA depende del salvamento de deoxiribonucleósidos exógenos por la actividad de deoxiribonucleósido fosfotransferasa, una enzima que se localiza en la membrana del parásito y que sólo reconoce a la timidina, deoxiadenosina, deoxiguanosina y deoxicitidina como sustratos (Wang y Cheng, 1984). De acuerdo a Wang y col., el pH óptimo relativamente bajo (5.0-6.0) de la deoxiribonucleósido fosfotransferasa sugiere que la enzima podría localizarse en la membrana lisosomal de *T. vaginalis*, lo que apoyaría la idea de que el DNA del huésped es degradado en las vacuolas intracelulares del parásito y recuperado de las vacuolas en forma de deoxiribonucleósidos. Este mecanismo de salvamento también explicaría la  $K_M$  relativamente alta de la enzima, ya que ésta estaría frente a altas concentraciones de los cuatro sustratos en las vacuolas después de la inclusión y digestión del DNA del huésped (Wang y Cheng, 1984).

De esta forma, es posible que la timidina proveniente del DNA de las células HeLa marcadas pase a las vacuolas intracelulares del parásito, donde sería degradado por nucleasas para posteriormente ser incorporado al DNA de *T. vaginalis*.

## Conclusiones

1. Cuando *T. vaginalis* interactúa con los núcleos aislados de las células HeLa, se observan sólo algunas zonas de contacto entre la membrana del parásito y la envoltura nuclear de los núcleos aislados, aunque después de 50 min. de interacción la asociación entre ambos es más estrecha y es posible observar una transformación morfológica del parásito en las zonas de contacto con los núcleos.
2. Cuando *T. vaginalis* interactúa con las células HeLa en monocapa, el parásito es capaz de lisar a las células HeLa desprendidas del sustrato y de liberar a sus núcleos. En todos los tiempos analizados los parásitos estaban asociados a núcleos liberados y en este caso también se encontró una transformación morfológica del parásito —incluso más pronunciada que en el caso anterior— en las zonas de contacto con los núcleos.
3. El DNA genómico de los parásitos que estuvieron en contacto con las células HeLa marcadas con  $^3\text{H}$ -timidina también contenía dicho isótopo, lo que indica que la  $^3\text{H}$ -timidina del DNA de las células HeLa se incorporó al DNA del parásito. De esta forma, *T. vaginalis* utiliza el DNA de las células HeLa como una fuente directa de nucleótidos tales como la timidina.

## Perspectivas

Los datos obtenidos en el presente estudio permitieron identificar una de las posibles fuentes directas de nucleótidos que el parásito podría utilizar en el microambiente vaginal; sin embargo es necesario investigar otros aspectos relacionados con la adquisición de nucleótidos en *T. vaginalis*, por lo que se proponen las siguientes perspectivas:

- ❖ Marcar el DNA de las células HeLa (por ejemplo, con 5-bromo-2'-deoxiuridina) para demostrar la presencia del DNA de las células HeLa en las vacuolas del parásito y posteriormente en los ácidos nucleicos de *T. vaginalis*.
- ❖ Demostrar la degradación del material ingerido (nucleótidos) en las vacuolas endocíticas del parásito.
- ❖ Identificar las señales transmembranales que pudieran intervenir en la liberación de los núcleos de las células y en la consiguiente adquisición de nucleótidos.
- ❖ Identificar a las moléculas del parásito que intervienen en la interacción con el núcleo de las células.
- ❖ En 1981 Heath reportó la lisis de células epiteliales por *T. vaginalis*, mostrando imágenes por microscopía electrónica de barrido de la interacción entre el parásito y componentes citoplasmáticos tales como pequeñas vesículas y el núcleo celular, los cuales aparentemente fueron liberados por la ruptura de la membrana plasmática (Heath, 1981). Por esta razón, sería de interés el realizar un ensayo similar al efectuado en el presente trabajo utilizando células vaginales epiteliales para determinar si la liberación del núcleo observada en el caso de las células HeLa también se observa cuando el parásito interactúa con células normales del epitelio vaginal como se sugiere en dicho artículo. Asimismo, podrían realizarse observaciones por microscopía de luz y por microscopía electrónica de transmisión de lavados vaginales provenientes de pacientes con

trichomonosis para tratar de determinar si el núcleo de las células vaginales epiteliales constituye una fuente de nucleótidos para *T. vaginalis in vivo*.

- ❖ Realizar experimentos similares a los presentados en este trabajo utilizo células DU145 (línea celular prostática), para determinar si los resultados obtenidos utilizo células HeLa son similares en dicha línea celular. De esta forma, se podría establecer una posible fuente de nucleótidos para el parásito en el huésped masculino.
  
- ❖ Realizar experimentos con miembros de la flora vaginal que estarían presentes en el microambiente de *T. vaginalis* para determinar cuál es su posible contribución como una fuente de nucleótidos para el parásito.

## Referencias

- Alderete, J. F., Leher, M. W., y Arroyo, R. (1995). The mechanisms and molecules involved in cytoadherence and pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Today* 11, 70-74.
- Alderete, J. F., y Pearlman, E. (1984). Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers. *British Journal of Venereal Diseases* 60, 99-105.
- Álvarez-Sánchez, M. E., Ávila-González, L., Becerril-García, C., Fattel-Facenda, L. V., Ortega-López, J., y Arroyo, R. (2000). A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microbial Pathogenesis* 28, 193-202.
- Arroyo, R., y Alderete, J. F. (1989). *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infection and Immunity* 57, 2991-2997.
- Arroyo, R., Engbring, J., y Alderete, J. F. (1992). Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Molecular Microbiology* 6, 853-862.
- Arroyo, R., González-Robles, A., Martínez-Palomo, A., y Alderete, J. F. (1993). Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence. *Molecular Microbiology* 7, 299-309.
- Beach, D. H., Holz Jr, G. G., Singh, B. N., y Lindmark, D. G. (1990). Fatty acid and sterol metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 38, 175-190.
- Beach, D. H., Holz Jr, G. G., Singh, B. N., y Lindmark, D. G. (1991). Phospholipid metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 44, 97-108.



Benchimol, M., Johnson, P. J., y De Souza, W. (1996). Morphogenesis of the hydrogenosome: an ultrastructural study. *Biology of the Cell* 87, 197-205.

Berkowitz, D. M., Kakefuda, T., y Sporn, M. B. (1969). A simple and rapid method for the isolation of enzymatically active HeLa cell nuclei. *Journal of Cell Biology* 42, 851-854.

Bogitsh, B. J., y Cheng, T. C. (1998). *Human Parasitology*. USA: Academic Press. 484 pp.

Brusca, R. C., y Brusca, G. J. (1990). *Invertebrates*. USA: Sinauer Associates, Inc. 922 pp.

Crouch, M.-L., y Alderete, J. F. (1999). *Trichomonas vaginalis* interactions with fibronectin and laminin. *Microbiology* 145, 2835-2843.

Dailey, D. C., Chang, T.-H., y Alderete, J. F. (1990). Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Parasitology* 101, 171-175.

Elliott, W. H., y Elliott, D. C. (1997). *Biochemistry and Molecular Biology*. Hong Kong: Oxford University Press. 437 pp.

Epidemiología. (1998). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, SSA. Vol. 15, No. 1. Semana 1; del 4 al 10 de enero de 1998.

Epidemiología. (2000). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, SSA. Vol. 17, No. 2. Semana 2; del 9 al 15 de enero del 2000.

Fiori, P. L., Rappelli, P., y Addis, M. F. (1999). The flagellated parasite *Trichomonas vaginalis*: new insights into cytopathogenicity mechanisms. *Microbes and Infection* 1, 149-156.

Garber, G. E., y Lemchuk-Favel, L. T. (1990). Association of production of cell-detaching factor with the clinical presentation of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 2415-2417.

Garber, G. E., Lemchuk-Favel, L. T., y Bowie, W. R. (1989). Isolation of a cell-detaching factor of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Clinical Microbiology* 27, 1548-1553.

Gómez-Conde, E., Mena-López, R., Hernández-Jaúregui, P., González-Camacho, M., y Arroyo, R. (2000). *Trichomonas vaginalis*: Chromatin and mitotic spindle during mitosis. *Experimental Parasitology* 96, 130-138.

González-Robles, A., Lázaro-Häller, A., Espinosa-Cantellano, M., Anaya-Velázquez, F., y Martínez-Palomo, A. (1995). *Trichomonas vaginalis*: Ultrastructural bases of the cytopathic effect. *Journal of Eukariotic Microbiology* 42, 641-651.

Graves, A., y Gardner, W. A. J. (1993). Pathogenicity of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 36, 145-152.

Harris, D. I., Beechey, R. B., Linstead, D., y Barrett, J. (1988). Nucleoside uptake by *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 29, 105-116.

Heath, J. P. (1981). Behaviour and pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* in epithelial cell cultures. A study by light and scanning electron microscopy. *British Journal of Venereal Diseases* 57, 106-117.

Heine, P., y McGregor, J. A. (1993). *Trichomonas vaginalis*: a reemerging pathogen. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 36, 137-144.

Heyworth, P. G., Gutteridge, W. E., y Ginger, C. D. (1982). Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Letters* 141, 106-109.

Heyworth, P. G., Gutteridge, W. E., y Ginger, C. D. (1984). Pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Letters* 176, 55-60.

Honigberg, B. M., y Brugerolle, G. (1990). Structure. En *Trichomonads parasitic in humans*, B. M. Honigberg, ed. USA: Springer-Verlag. 424 pp.

Hook, E. W. I. (1999). *Trichomonas vaginalis* - No longer a minor STD. *Sexually Transmitted Diseases* 26, 388-389.

Hunter, E. (1993). *Practical Electron Microscopy*. Canada: Cambridge University Press. 173 pp.

Johnson, P. J., Lahti, C. J., y Bradley, P. J. (1993). Biogenesis of the hydrogenosome in the anaerobic protist *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Parasitology* 79, 664-670.

Kulda, J. (1999). Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *International Journal for Parasitology* 29, 199-212.

Kulda, J., Nohýnková, E., y Ludvík, J. (1986). Basic structure and function of the trichomonad cell. En *Proceedings of the International Symposium on Trichomonads and Trichomoniasis*, J. Kulda y J. Cerkasov, eds. Prague, pp. 181-198.

Laga, M., Manoka, A., Kivuvu, M., Malele, B., Tuliza, M., Nzila, N., Goeman, J., Behets, F., Batter, V., Alary, M., Heyward, W. L., Ryder, R. W., y Piot, P. (1993). Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS* 7, 95-102.

Lehker, M. W., y Alderete, J. F. (2000). Biology of trichomoniasis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 13, 37-45.

Lehker, M. W., y Alderete, J. F. (1999). Resolution of six chromosomes of *Trichomonas vaginalis* and conservation of size y number among isolates. *Journal of Parasitology* 85, 976-979.

Lehker, M. W., Arroyo, R., y Alderete, J. F. (1991). The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Experimental Medicine* 174, 311-318.

Lehker, M. W., Chang, T. H., Dailey, D. C., y Alderete, J. F. (1990). Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Experimental Medicine* 171, 2165-2170.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., y Cox, M. M. (1993). *Principles of Biochemistry*. USA: Worth Publishers. 1013 pp.

Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., y Wallace, F. G. (1980). A newly revised classification of the Protozoa. *Journal of Protozoology* 27, 37-58.

Linstead, D. (1990). Cultivation. En *Trichomonads parasitic in humans*, B. M. Honigberg, ed. USA: Springer-Verlag. 424 pp.

Martínez-Contreras, R. (1999). Identificación de tres elementos que modulan el procesamiento alternativo del dominio alfa de la proteína de uniones estrechas zo-1. Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias. México, D.F.: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. 71 pp.

Meysick, K., y Garber, G. E. (1995). *Trichomonas vaginalis*. *Current Opinion in Infectious Diseases* 8, 22-25.

- Miller, R. L., y Lindstead, D. (1983). Purine and pyrimidine metabolizing activities in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 7, 41-51.
- Miller, W. H., y Miller, R. L. (1991). Guanosine kinase from *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 48, 39-46.
- Müller, M. (1990). Biochemistry of *Trichomonas vaginalis*. En *Trichomonads parasitic in humans*, B. M. Honigberg, ed. USA: Springer-Verlag. 424 pp.
- Müller, M. (1993). The hydrogenosome. *Journal of General Microbiology* 139, 2879-2889.
- Neale, K. A., y Alderete, J. F. (1990). Analysis of the proteinases of representative *Trichomonas vaginalis* isolates. *Infection and Immunity* 58, 157-162.
- Ngo, H. M., Ngo, E. O., Bzik, D. J., y Joiner, K. A. (2000). *Toxoplasma gondii*: Are host cell adenosine nucleotides a direct source for purine salvage? *Experimental Parasitology* 95, 148-153.
- North, M. J., Mottram, J. C., y Coombs, G. H. (1990). Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitology Today* 6, 270-275.
- Ovcinnikov, N. M., Delektorskij, V. V., Turanova, E. N., y Yashkova, G. N. (1975). Further studies of *Trichomonas vaginalis* with transmission and scanning electron microscopy. *British Journal of Venereal Diseases* 51, 357-375.
- Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., y Garber, G. (1998). Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews* 11, 300-317.
- Provenzano, D., y Alderete, J. F. (1995). Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity* 63, 3388-3395.

Queen, S. A., Vyer Jagt, D. L., y Reyes, P. (1990). *In vitro* susceptibilities of *Plasmodium falciparum* to compounds which inhibit nucleotide metabolism. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34, 1393-1398.

Quinn, T. C., y Krieger, J. N. (1990). Trichomoniasis. En *Tropical and Geographical Medicine*, K. S. Warren y A. A. F. Mahmoud, eds. USA: McGraw-Hill. 1159 pp.

Rein, M. F. (1990). Clinical manifestations of urogenital trichomoniasis in women. En *Trichomonads parasitic in humans*, B. M. Honigberg, ed. USA: Springer-Verlag. 424 pp.

Rendón-Maldonado, J. G., Espinosa-Cantellano, M., González-Robles, A., y Martínez-Palomo, A. (1998). *Trichomonas vaginalis*: *In vitro* phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes and erythrocytes. *Experimental Parasitology* 89, 241-250.

Silva Filho, F. C., De Souza, W., y Lopes, J. D. (1988). Presence of laminin-binding proteins in trichomonads and their role in adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85, 8042-8046.

Silva Filho, F. C., Ortega-López, J., y Arroyo, R. (1998). YIGSR is the preferential laminin-1 residing adhesion sequence for *Trichomonas vaginalis*. *Experimental Parasitology* 88, 240-242.

Somoza, J. R., Skillman, G. A., Munagala, N. R., Oshiro, C. M., Knegt, R. M. A., Mpoke, S., Fletterick, R. J., Kuntz, I. D., y Wang, C. C. (1998). Rational design of novel antimicrobials: blocking purine salvage in a parasitic protozoan. *Biochemistry* 37, 5344-5348.

Spector, D. L., Goldman, R. D., y Leinwy, L. A. (1998). *Cells. A laboratory manual*. Volume 1: Culture and Biochemical Analysis of Cells. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Strosselli, S., Spadari, S., Walker, R. T., Basnak, I., y Focher, F. (1998). *Trichomonas vaginalis* thymidine kinase: purification, characterization and search for inhibitors. *Biochemical Journal* 334, 15-22.

Ter Kuile, B. H. (1994). Carbohydrate metabolism and physiology of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis* studied in chemostats. *Microbiology* 140, 2495-2502.

Voet, D., y Voet, J. G. (1995). *Biochemistry*. USA: John Wiley and Sons, Inc. 1361 pp.

Wang, A. L., y Wang, C. C. (1985). Isolation and characterization of DNA from *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 14, 323-335.

Wang, C. C. (1990). Nucleic acid metabolism in *Trichomonas vaginalis*. En *Trichomonads parasitic in humans*, B. M. Honigberg, ed. USA: Springer-Verlag. 424 pp.

Wang, C. C., y Cheng, H.-W. (1984). The deoxyribonucleoside phosphotransferase of *Trichomonas vaginalis*. A potential target for anti-trichomonal chemotherapy. *Journal of Experimental Medicine* 160, 987-1000.

Wang, C. C., y Cheng, H.-W. (1984). Salvage of pyrimidine nucleosides by *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 10, 171-184.

Warton, A., y Honigberg, B. M. (1979). Structure of trichomonads as revealed by scanning electron microscopy. *Journal of Protozoology* 26, 56-62.

World Health Organization. (1995). WHO Initiative on HIV/AIDS and sexually transmitted infections (HIS). An overview of selected curable sexually transmitted diseases. WHO Global Programme on AIDS.

Yeong-Seng, Y., Jah-Yao, L., y Men-Fang, S. (1998). Chromosome number of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Parasitology* 84, 28.

Yeong-Seng, Y., Jah-Yao, L., y Men-Fang, S. (1997). Chromosome number of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Parasitology* 83, 551-553.

Zuo, X., Lockwood, B. C., y Coombs, G. H. (1995). Uptake of amino acids by the parasitic, flagellated protist *Trichomonas vaginalis*. *Microbiology* 141, 2637-2642.



## Apéndice I

### Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR

1. Secuencias de los oligonucleótidos empleados en las reacciones de amplificación por PCR de la región conservada de las cisteín proteinasas de *T. vaginalis*. Tomado de North y col., 1990.

❖ Oligonucleótido CP 5'

Tamaño: 24 bases

Orientación: 5' a 3'

Secuencia de nucleótidos: 5' car ggi car tgy ggi xni tgy tgg 3'

Secuencia de aminoácidos: Q G Q C G S C W

❖ Oligonucleótido CP 3'

Tamaño: 24 bases

Orientación: 5' a 3'

Secuencia de nucleótidos: 5' cca inx rtt ytt iac pat cca rta 3'

Secuencia de aminoácidos: W S N K V I W Y

❖ x = t/a; n = g/c; y = t/c; r = a/g; i = inosina; p = a/g/t

❖ El producto de PCR esperado es de 570 pb.

2. Secuencias de los oligonucleótidos empleados en las reacciones de amplificación por PCR de una región del gen de  $\beta$ -globina. Tomado de Martínez-Contreras, 1999.

Los oligonucleótidos fueron proporcionados por el Dr. Jesús Valdés del Departamento de Bioquímica del CINVESTAV-IPN.

❖ Oligonucleótido BG1

Tamaño: 20 bases

Orientación: -

Posición en el gen de  $\beta$ -globina: 917-936

Secuencia de nucleótidos: 5' ggtgaacgtggatgaagttg 3'

❖ Oligonucleótido BG2

Tamaño: 20 bases

Orientación: +

Posición en el gen de  $\beta$ -globina: 669-688

Secuencia de nucleótidos: 5' gaagagccaaggacaggtac 3'

- ❖ BG1 y BG2 corresponden al gen de  $\beta$ -globina con número de acceso L26470 en el GenBank.
- ❖ El producto de PCR esperado es de 242 pb.

## Apéndice II

### Preparación de soluciones

#### 1. Reactivos para el cultivo de *Trichomonas vaginalis*

##### Medio TYM

❖ Para 1000 ml de H<sub>2</sub>O destilada:

20 g Bacto-triptona

10 g Extracto de levadura

5.0 g Maltosa

1.0 g Cisteína

0.2 g Ácido ascórbico

0.8 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3 H<sub>2</sub>O

0.8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Ajustar a pH 6.2 y esterilizar por autoclave.

Almacenar a - 20°C.

## 2. Reactivos para el cultivo células HeLa

### Medio DMEM–SC 10 %

❖ Para 1000 ml de H<sub>2</sub>O destilada:

- 3.70 g Bicarbonato de sodio
- 4.00 g Glucosa
- 5.96 g HEPES
- 10.0 g DMEM bajo en glucosa

Ajustar a pH 7.2 y esterilizar por filtración.

Almacenar a 4°C.

Para 10 ml de medio DMEM estéril se adiciona 1 ml de suero de caballo inactivado por calor y 100 µl de penicilina (63.72 µM)/estreptomicina (33.34 µM).

### Amortiguador de Fosfatos Salino (PBS)

❖ Para 1000 ml de H<sub>2</sub>O destilada:

- 8.00 g NaCl
- 0.20 g KCl
- 0.65 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0.20 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Ajustar el pH a 7.0 y esterilizar por autoclave.

Almacenar a 4°C.

### PBS-EDTA al 0.2 %

❖ Para 500 ml de PBS pH 7.0 se agrega 1 g de EDTA y se esteriliza por autoclave.

Almacenar a 4°C.

### 3. Reactivos para el aislamiento de los núcleos de las células HeLa

#### ❖ Solución 1

0.320 M sacarosa

0.002 M  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

0.001 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$

Ajustar a pH 6.8 y esterilizar por autoclave.

Almacenar a 4° C.

#### ❖ Solución 2

0.010 M NaCl

0.001 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$

Ajustar a pH 6.8 y esterilizar por autoclave.

Almacenar a 4° C.

#### ❖ Solución 3

0.320 M sacarosa

0.001 M  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

0.001 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$

0.3% Tritón X-100

Ajustar a pH 6.2-6.4 y esterilizar por autoclave.

Almacenar a 4°C.

#### **4. Reactivos para el ensayo de citotoxicidad**

##### **Formaldehído al 2%**

- ❖ Para 100 ml de PBS pH 7.0 se añaden 8.10 ml de formaldehído al 37%.  
Almacenar en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

##### **SDS al 1% en etanol al 50%**

- ❖ Para preparar 50 ml se toman 25 ml de etanol al 100%, se diluyen en 25 ml de agua destilada y se agregan 500 mg de SDS.  
Almacenar a temperatura ambiente.

##### **Cristal violeta al 0.13% en etanol-formaldehído en relación 5:2**

- ❖ Para 100 ml de etanol-formaldehído 5:2 se añaden 28.57 ml de formaldehído al 37% y 71.42 ml de etanol al 100% y posteriormente se agregan 130 mg de cristal violeta.  
Almacenar en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

#### **5. Reactivos para el procesamiento de muestras para microscopía electrónica**

##### **Amortiguador de cacodilato de sodio 0.2 M**

- ❖ Para 100 ml de H<sub>2</sub>O se añaden 17.12 g de sal de cacodilato de sodio. El pH se ajusta a 7.2 con HCl 0.2 N y se afora a 400 ml. Para utilizarse se diluye al doble, por lo que el rendimiento final es de 800 ml a una concentración de 0.1 M.  
Almacenar a 4°C.

**Glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M**

- ❖ Para 95 ml de cacodilato de sodio 0.2 M se agregan 95 ml de agua destilada y se añaden 10 ml de glutaraldehído al 50%.  
Almacenar a 4°C.

**Tetraóxido de osmio al 2%**

- ❖ Disolver en 50 ml de agua bidestilada 1 g de  $\text{OsO}_4$  durante 24 hrs. Para utilizarse se diluye a la mitad con amortiguador de cacodilato de sodio 0.2 M pH 7.2.  
Almacenar en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

**Resina EPON**

- ❖ Stock A: 62 g de eponato 12 (resina) + 100 g de dodecenil anhídrido succínico (DDSA).  
Mezclar y almacenar a 4°C.
- ❖ Stock B: 100 g de eponato 12 (resina) + 89 g de anhídrido metil nádic (NMA).  
Mezclar y almacenar a 4°C.
- ❖ Mezclar las resinas A y B en proporción 2:3 (4 g stock A + 6 g stock B).  
Agregar 0.15 ml de catalizador (tridimetilaminometil-fenol DMP-30) por cada 10 g de resina.

**Azul de toluidina al 0.5%**

- ❖ Calentar 100 ml de agua destilada y agregar 1 g de tetraborato de sodio. Antes de ebulir agregar lentamente 0.5 g de azul de toluidina y filtrar.  
Almacenar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

**Acetato de uranilo**

Preparación de acuerdo al método propuesto por Hunter, 1993

- ✦ Pesar 0.6 g de acetato de uranilo y disolver en 20 ml de etanol al 30%.  
Filtrar y almacenar en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

**Citrato de plomo**

Preparación de acuerdo al método propuesto por Hunter, 1993

- ✦ Pesar 1.33 g de acetato de plomo y 1.76 g de citrato de sodio y disolver en 30 ml de agua destilada. Mezclar durante 30 min, agregar 8 ml de NaOH 1 N y diluir a 50 ml con agua destilada.  
Almacenar en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

**5. Reactivos para el procesamiento de muestras para microscopía de fluorescencia****Tris-HCl 0.1 M pH 7.3**

- ✦ Para preparar 20 ml se pesan 0.2422 g de trizma base, se disuelven en agua destilada y se ajusta el pH a 7.3 con HCl fumante.  
Almacenar a 4°C.

**RNasa al 1%**

- ✦ Para preparar 1 ml se toman 2  $\mu$ l del stock de RNasa (5 mg/ml) y se añaden 998  $\mu$ l de Tris-HCl 0.1 M pH 7.3.  
Almacenar a -20°C.



### **Yoduro de propidio**

- ❖ Para preparar el stock de yoduro de propidio se toman 10 mg del colorante y se disuelven en 1 ml de agua destilada. Las diluciones se realizan utilizando PBS pH 7.0 y se pueden almacenar a 4°C hasta por una semana.

## **7. Reactivos para la determinación de viabilidad**

### **Azul tripano al 0.4%**

- ❖ Para preparar 10 ml se pesan 0.04 g de azul tripano y se disuelven en PBS pH 7.0.  
Almacenar a temperatura ambiente.

## **8. Reactivos para la extracción de DNA**

### **NaOH 8 mM**

- ❖ Para preparar 100 ml se pesan 0.032 g de NaOH y se disuelven en agua destilada.  
Almacenar a temperatura ambiente.

### **HEPES 0.1 M**

- ❖ Para preparar 100 ml se pesan 2.38 g de HEPES y se disuelven en agua destilada.  
Almacenar a temperatura ambiente.

## 9. Reactivos para la electroforesis de DNA en gel de agarosa

### TAE 1 X

- ❖ Para preparar 1000 ml se toman 100 ml del stock de buffer TAE 10 X (400 mM tris-acetato, 10 mM EDTA) y se añaden 900 ml de agua destilada.  
Almacenar a temperatura ambiente.

### Buffer LB IV 6 X

- ❖ Para el buffer 6 X se prepara azul de bromofenol al 0.25% y se disuelve en una solución de sacarosa al 40%.  
Almacenar a 4°C.

### Gel de agarosa al 1.5%

- ❖ Para preparar un gel de agarosa al 1.5% se pesan 0.30 g de agarosa y se disuelven por calentamiento en 20 ml de TAE 1 X. Una vez que la agarosa se ha disuelto se añaden 5 µl de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y se vacía a la cámara de electroforesis.

## Apéndice III

### Marcas de los reactivos

Aceite de silicón	Gibco BRL
Acetato de plomo (Pb (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> 3 H <sub>2</sub> O)	Baker
Acetato de uranilo	Polysciences
Ácido acético glacial (CH <sub>3</sub> COOH)	Merck
Ácido ascórbico (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> )	Merck
Ácido clorhídrico fumante (HCl)	Merck
Agarosa	Gibco BRL
Azul de bromofenol (C <sub>19</sub> H <sub>9</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>5</sub> SNa)	Sigma
Azul de toluidina	Sigma
Azul tripano (C <sub>34</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> O <sub>14</sub> S <sub>4</sub> Na <sub>4</sub> )	Sigma
Bacto-triptona	Difco
Bicarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma
Bromuro de etidio (C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> Br)	Sigma
Cacodilato de sodio trihidrato (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> AsNaO <sub>2</sub> 3 H <sub>2</sub> O)	Electron Microscopy Sciences
Cisteína (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S)	Sigma
Citrato de sodio (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> 2 H <sub>2</sub> O)	Merck
Cloruro de magnesio hexahidrato (MgCl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O)	Merck
Cloruro de potasio (KCl)	Sigma
Cloruro de sodio (NaCl)	Merck
Cristal violeta (C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> ClN <sub>3</sub> )	Merck
di-potasio hidrogenofosfato trihidrato (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3 H <sub>2</sub> O)	Merck
di-sodio hidrogenofosfato anhidro (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck
DMEM	Gibco BRL
DNAzol	Gibco BRL
EDTA (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O)	Sigma
Estreptomina	Sigma
Etanol absoluto (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O)	Merck