

18
24.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**“OBTENCION Y CARACTERIZACION DE CLONAS DEL
AISLADO CNCN - 147 DE *Trichomonas vaginalis*.”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A:
LORIZ VIRIDIANA FATTEL FACENDA

ASESORES: DRA. ROSSANA ARROYO VERASTEGUI.
MVZ. PABLO MARTINEZ LABAT.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1997.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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

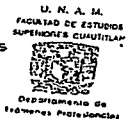
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'NI: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Obtención y caracterización de clones del aislado CHCP-147 de *Trichomonas vaginalis*"

que presenta la pasante: Loris Viridiana Farrel Pacenda,
con número de cuenta: 8310335-0 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Biológica.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlan Izcalli, Edo. de Mex., a 19 de Junio de 1997

PRESIDENTE Dra. Susana E. Hordena Elvira

VOCAL M.V.Z. Alfredo Cuellar Ordaz

SECRETARIO M.V.Z. Fabio Martínez Tabat

PRIMER SUPLENTE M.V.Z. Gloria Ortiz Casca

SEGUNDO SUPLENTE C.F.Z. Ma. Eugenia R. Posada Salazar

Susana E. Hordena Elvira
AM
Alfredo Cuellar Ordaz
Fabio Martínez Tabat
Gloria Ortiz Casca
Ma. Eugenia R. Posada Salazar

Este trabajo se realizó en el laboratorio 25 del departamento de Patología Experimental del Centro de Investigación y Estudios Superiores del IPN, bajo la dirección de la Dra. Rossana Arroyo Verástegui.

Con respeto y cariño quiero darle las gracias a la Dra. ROSSANA por ser mi Maestro, mi mentor y mi guía, en la realización de este trabajo, y sobre todo por creer en mí...

¡¡Gracias Dra!!

Con todo mi amor a mis padres.....

*Todo cuanto soy es por ustedes.
forjar el acero es difícil. pero forjar a
un hijo lo es aún más!*

*Te quiero "ma Linda"
Te quiero "papaito"*

Al regalo más preciado que la vida me ha dado...

mis hermanos

SACIA....

mi ejemplo.

SAMIA....

mi inspiración, eres increíble Sam!!

ANUAR....

*por tu apoyo en el momento más difícil de mi vida, gracias
"querito" eres único.*

CAVCA...

*tu valor y coraje para enfrentar todos los retos me impulsa
siempre a ser mejor, aunque sabes! Aún añoro tu compañía*

XARIME...

*a mi "amiga" y compañera de la niñez que hizo que fuera
inolvidable, te quiero "enana"*

Porque eres el eje de mi vida que hace que todo marche siempre en armonía..

Te amo RAMON!!

*A mi mejor amiga, porque con tu amistad incondicional has hecho que aún
el camino más difícil se torne sencillamente "azul..."*

¡¡Gracias Angeli!!

Al "circulo cerrado"...

*Caro. Sergio. Angie. Cheue. Elena. y Maru
probablemente nunca tendré 18 años otra vez.
pero. si sé que nunca tendré amigos como ustedes.*

*Al más profundo agradecimiento a mis compañeros y amigos de trabajo.
Gloria, Francisco, Carmina, Martha, Ctz. Remdios y Lety, por su ayuda
desinteresada y apoyo incondicional.*

*Al Dr. Fernando, por sus palabras siempre de aliento y porque el haberlo
conocido es algo maravilloso.*

Al Dr. Jaime por sus consejos y confianza.

!!!Gracias!!!

Mis amigas de siempre...
Patty, Aliche, y Neyva...

INDICE.

I. INTRODUCCION.....	5
A. Factores de virulencia.....	16
a. Proteinasas.....	18
b. Proteinasas en <i>Trichomonas vaginalis</i>	20
c. Citoadherencia.....	23
d. Citotoxicidad.....	25
e. Proteinas.....	27
f. Virus dsTvv.....	29
II. OBJETIVOS.....	32
A. Objetivo general.....	32
B. Objetivos particulares.....	33
III. ESTRATEGIA.....	34
IV. MATERIALES Y METODOS.....	36
A. Clonación.....	36
a. Preparación del agar.....	36
b. Sembrado.....	37
c. Recuperación de colonias.....	37
B. Caracterización de las clonas en base a sus propiedades de virulencia	
a. Proteinasas totales.....	38
b. Adhesinas.....	39
c. Preparación del extracto.....	40

d. Ligando-proteinasas.....	41
e. Preparación de la muestra.....	42
f. Obtención y cuantificación de proteínas.....	43
g. Preparación de la muestra.....	44
h. Ensayo de adhesión.....	46
i. Preparación de la muestra.....	46
j. Procesamiento de parásitos.....	48
k. Ensayo de citotoxicidad.....	49
l. Preparación monocapas de células HeLa.....	50
m. Cultivos del aislado CNCD-147 de <i>T. vaginalis</i>	50
n. Detección de virus dsTvv.....	53
o. Criopreservación.....	55
V.RESULTADOS.....	56
A. Estandarización del método de clonación.....	56
B. Caracterización de las clonas MXL	
a. Proteinasas totales.....	66
b. Análisis de las CPs que se unen a células HeLa.....	69
c. Proteínas totales.....	72
d. Adhesinas.....	74
e. Adhesión.....	78
f. Correlación entre los niveles de adhesión y adhesinas.....	81
g. Citotoxicidad.....	82
h. Participación de la CP-65 y CP-30 en citotoxicidad y adhesión.....	89
i. Detección del virus dsTvv.....	90

VI. DISCUSION.....	93
VII. CONCLUSIONES.....	100
VIII. PERPESCTIVAS.....	102
IX. APENDICE.....	103
X. BIBLIOGRAFIA	

LISTA DE FIGURAS.

- Figura 1.** Morfología de colonias de *T. vaginalis* en agar semisólido.
- Figura 2.** Patrón de las proteinasas totales de las subclonas del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis*.
- Figura 3.** Patrón de proteinasas totales de las clonas MXL del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis*.
- Figura 4.** Identificación de las cisteín-proteinasas con afinidad a células HeLa, de las clonas MXL.
- Figura 5.** Patrón de proteínas totales de las clonas MXL.
- Figura 6.** Patrón de las adhesinas de las clonas MXL.
- Figura 7.** Niveles de adhesión de cada una de las clonas MXL.
- Figura 8.** Niveles de citotoxicidad de cada una de las clonas MXL.
- Figura 9.** Análisis electroforético de los ácidos nucleicos de las clonas MXL.

LISTA DE TABLAS.

- Tabla I.** Crecimiento del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis* en agar semisólido.
- Tabla II.** Subclonas del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis*.
- Tabla III.** Actividad proteolítica de las subclonas del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis*.
- Tabla IV.** Clonas MXL del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis* obtenidas
- Tabla V.** Análisis comparativo de la cantidad de adhesinas en las clonas MXL del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis*.
- Tabla VI.** Clasificación de las clonas MXL por sus niveles de adhesión.
- Tabla VII.** Clasificación de las clonas MXL por sus niveles de citotoxicidad.
- Tabla VIII.** Cuadro comparativo de los niveles de adhesión y de citotoxicidad de las clonas MXL del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis*.

RESUMEN.

La tricomonosis, enfermedad de transmisión sexual que afecta a hombres y mujeres, es causada por el protozooario parásito *Trichomonas vaginalis*. La aparición de un mayor número de aislados de *T. vaginalis* resistentes al metronidazol, y el aumento en el número de personas con tricomonosis lo cual repercute económica y emocionalmente en nuestra sociedad, refuerza la necesidad de conocer más acerca de la biología del parásito que contribuya a entender los mecanismos involucrados en la patología de esta enfermedad.

Hasta hoy, todos los estudios encaminados a conocer y entender los posibles mecanismos de virulencia, así como los aspectos biológicos de este parásito, se han realizado con aislados de *T. vaginalis* constituídos por una población heterogénea. La heterogeneidad se traduce en que los resultados obtenidos en dichos estudios, representan la sumatoria de las propiedades de la población en su conjunto que puede conducirnos a interpretaciones erróneas. Es por esto que, resulta de suma importancia el poder trabajar con poblaciones homogéneas, obtenidas mediante la clonación de los aislados. En base a lo anterior, el objetivo general de este trabajo fue obtener poblaciones homogéneas por medio de la selección de colonias aisladas en agar semisólido y caracterizar las clonas en base a sus propiedades de virulencia.

Después de la tercera clonación se obtuvieron un total de 12 clonas independientes del aislado CNCD-147 de *Trichomonas vaginalis*.

Estas clonas fueron caracterizadas en base a su capacidad de adhesión y citotoxicidad, de su actividad de proteinasas, determinando el

patrón de proteinasas totales y ligando proteinasas, del patrón de proteínas totales y de adhesinas, así como también la detección del virus de RNA de doble cadena (dsTvv).

Los resultados de la caracterización de las clonas MXL nos permitieron encontrar clonas que son muy adhesivas, pero poco citotóxicas, como la clona MXL-5214, clonas muy citotóxicas pero poco adhesivas, clonas MXL-221 y MXL-521, y clonas infectadas por un virus de doble cadena de RNA, clonas MXL-431, MXL-511 y MXL-521, a pesar de que el aislado parental está reportado como virus negativo (Yañez, 1997). Estos resultados nos permitieron confirmar que el aislado CNCD-147 de *T. vaginalis* está constituido por una población heterogénea y que al clonarse podemos obtener poblaciones con características diferentes entre ellas. Este estudio, presenta una alternativa para analizar los mecanismos y factores de virulencia de *T. vaginalis* en poblaciones homogéneas. La ventaja que presenta el trabajar con clonas, es que permitirá realizar: a) Análisis a nivel molecular para estudiar las moléculas que participan en la virulencia de *T. vaginalis*, responsables de algún proceso patológico en el hospedero como adhesinas, proteinasas, receptores, etc., b) Estudios controlados de variabilidad para determinar el tipo, adaptación fisiológica, mutaciones, y la tasa de cambio. Todo esto, nos permitirá entender un poco más los procesos de virulencia de este protozooario y conocer las moléculas que están participando, así como la posibilidad de buscar nuevas alternativas para el control y tratamiento de la tricomonosis.

I. INTRODUCCION.

La tricomonosis es una enfermedad de transmisión sexual, crónica no mortal, causada por el parásito *Trichomonas vaginalis*. Esta enfermedad es una de las más comunes en el mundo entero, ya que afecta alrededor de 180 millones de personas, en México se estima una tasa de incidencia de 108.1 casos por cada 100,000 habitantes, y en 1997, hasta la cuarta semana de julio el número de casos reportados por el sistema nacional de vigilancia epidemiológica fue de 48,159, siendo los estados de Veracruz, Jalisco, D. F. y Tabasco los de mayor incidencia.

La tricomonosis presenta una sintomatología típica de una vaginitis en la mujer y de una uretritis no gonocócica en el hombre. Los signos y síntomas de la vaginitis incluyen la presencia de descargas vaginales (flujo o leucorrea) abundantes, malolientes y espumosas, de color blanco verdoso, algunas veces sanguinolentas, dolor en el bajo vientre, irritación y picazón en los genitales externos. En ocasiones se presenta inflamación del cervix conocida como "cervix de fresa", signo típico de la tricomonosis.

Trichomonas vaginalis es un protozoario flagelado, de 10 a 20 μm de largo, adopta una forma globular en suspensión, ó una forma ameboide cuando se encuentra adherida al epitelio vaginal *in vitro* (Arroyo y col., 1993) e *in vivo*, es aereotolerante, y parasita el tracto urogenital de los humanos, carece de mitocondrias, de peroxisomas, y en su lugar posee hidrogenosomas. Los hidrogenosomas son organelos electrodensos especializados en la producción de hidrógeno molecular acoplado a la producción de ATP durante la oxidación del piruvato, la presencia de este organelo es una de las características propias de las especies de *Trichomonas* (Johnson y Lathi, 1992). Este microorganismo posee además 4 flagelos anteriores libres y un flagelo unido a la membrana ondulante. El flagelo más largo es de 6-18 μm mientras que su membrana ondulante se extiende dos terceras partes de la célula. En la parte posterior presenta una prolongación en forma de espina llamada axóstilo que recorre axialmente el cuerpo del parásito. Este parásito es muy móvil, y sus movimientos se deben a las sacudidas de sus flagelos y de la membrana ondulante. El metabolismo de este flagelado es esencialmente fermentativo tanto en condiciones aerobias como en anaerobias (Ter Kuile, 1994). Este protista primitivo depende de un gran

número de metabolitos preformados como nutrientes, al carecer de las vías metabólicas biosintéticas (Honigberg, 1990). Los carbohidratos como glucosa y maltosa, son la principal fuente de energía además de ser indispensables para su multiplicación; también necesita de ácidos grasos como el colesterol, para la formación de su membrana plasmática (Rubino y col., 1991). Este protozoario requiere de elevadas concentraciones de hierro inorgánico, tanto que presenta diversos mecanismos específicos mediados por receptores para la captación y utilización del hierro presente en los componentes del huésped (Peterson y Alderete, 1984; Lehker y Alderete, 1992). El hierro además de favorecer el crecimiento y la multiplicación de los parásitos en cultivo, participa en la regulación de algunas propiedades de virulencia de *T. vaginalis* tales como la adhesión, (Lehker y col., 1991), la degradación de inmunoglobulinas (Provenzano y Alderete, 1995), resistencia a la lisis por complemento (Alderete y col., 1995), además de regular negativamente la citotoxicidad y la actividad de la CP-65 (Alvarez y Arroyo, 1997; Yañez, 1997), entre otras. Por ejemplo, en presencia de altas concentraciones de hierro en el cultivo, los parásitos se adhieren mejor a las células del epitelio vaginal al sintetizarse

un mayor número de adhesinas (Lehker y col., 1991), en consecuencia se han postulado tres premisas sobre lo que pudiera ocurrir *in vivo*;

- 1.- Durante la menstruación existe un aumento de la adhesión del parásito.
- 2.- La adhesión es un mecanismo que el parásito utiliza para evitar ser arrastrado por el flujo menstrual.
- 3.-El aumento en el número de adhesinas favorece un anclaje más fuerte al epitelio vaginal (Lehker y col., 1991).

Es importante apuntar que la sintomatología de la tricomonosis se agudiza durante o inmediatamente después de la menstruación (Honigberg, 1990), lo cual puede explicarse tomando en cuenta que el aumento en la adhesividad del parásito favorece la multiplicación y posiblemente el daño citotóxico dependiente de adhesión de las tricomonas a las células del epitelio vaginal (Pearlman y Alderete, 1984).

La heterogenicidad antigénica de este microorganismo entre diferentes aislados y subpoblaciones de tricomonas (Alderete y Garza, 1988), se debe en gran parte a la disposición de protefnas inmunogénicas en la membrana de dicho parásito (Dailey, y Alderete, 1991). Esta

heterogenicidad antigénica entre diferentes aislados ha sido estudiada por medio de un estudio electroforético en geles de una y dos dimensiones (Alderete y col, 1986), revelando sorprendentemente una conservación y gran diversidad en el patrón de proteínas totales entre estos, así como la presencia de un prominente inmunógeno de superficie de alto peso molecular de 270 kDa (p270), el cual ha sido asociado con la diversidad antigénica que posee este flagelado (Alderete y col., 1987). La presencia de dicho inmunógeno fue caracterizada por medio de anticuerpos monoclonales y sueros de mujeres con tricomonosis, los cuales contenían anticuerpos para numerosa proteínas de superficie de alto peso molecular (Alderete, y col., 1985).

Los resultados de estos ensayos demostraron la existencia de dos tipos de aislados; aislados tipo I y aislados tipo II (Dailey y Alderete 1991), los aislados de tipo I estan constituidos por una población homogénea de parásitos, los cuales sintetizan el inmunógeno de 270 kDa pero no lo expresan en su superficie y no presentan variación antigénica. Los del tipo II esta compuestos por una población heterogénea de organismos con respecto a la expresión del inmunógeno sobre su superficie y llevan a cabo variación antigénica de la p270 (Alderete y col., 1986).

El hallazgo de estos dos tipos de aislados también fue posible evaluarlo por medio del ensayo de inmunoprecipitación de células (Alderete 1983b; 1987; Alderete y col., 1985), en donde, los anticuerpos del suero de pacientes con tricomonosis primero se unen con los parásitos vivos, seguido por la solubilización y precipitación de complejos inmunes, demostrándose de igual manera que algunas de las secreciones vaginales poseían un repertorio de anticuerpos de unión a proteínas de superficie detectables rápidamente por autoradiografía, y que otras carecían de anticuerpos de unión al inmunógeno, pareciendo como si estos estuvieran "desnudos" (Alderete, y col., 1992). Empleando la inmunofluorescencia indirecta con los sueros de los pacientes, se demostró la naturaleza heterogénea de la población de tricomonas (Alderete, y col., ed. 1992). La generación de anticuerpos monoclonales reactivos para la superficie de *T. vaginalis* fue fortuita, ya que un anticuerpo monoclonal, específicamente el C20A3, dió un patrón citofluorométrico (en algunos de los aislados de tricomonas) idéntico al que se detectó con el banco de sueros de pacientes (Alderete y col., 1985; Alderete, y col., 1986). Este anticuerpo es una herramienta para confirmar la propiedad de variación fenotípica basada en la expresión de inmunógenos en la superficie de los

parásitos (Alderete y col., 1986), así como también la existencia de dos tipos de poblaciones de *T. vaginalis* parasitando a los humanos (Alderete y col., 1986b; 1986, 1987). Otros datos indican que la variación fenotípica *in vivo* del inmunógeno de 270 kDa es un excelente marcador molecular de los aislados más virulentos. Por otro lado, se encontró que dicho inmunógeno presenta un sólo epítope accesible a la unión de anticuerpos de parásitos vivos (Dailey y Alderete, 1991).

Otros hallazgos encontrados sobre la variación de la virulencia en diferentes aislados de este parásito, es el hecho de que se ha encontrado niveles de actividad β -hemolítica en aislados frescos y ésto, se ha correlacionado con la virulencia clínica (Krieger y col., 1983). Estudios realizados en pacientes con síntomas severos de infección por tricomonas, se encontró una alta actividad hemolítica, mientras que pacientes asintomáticos presentaron una actividad hemolítica baja, detectada por las zonas de hemólisis alrededor de las colonias sembradas en agar sangre (Krieger y col., 1983), postulando que la hemólisis es importante para proveer nutrientes para el parásito, a partir de las lisis de eritrocitos (Krieger y col., 1983).

La capacidad de parasitar que posee *T. vaginalis*, se ha relacionado con la expresión de proteínas de adhesión sobre la superficie del microorganismo (Alderete y col., 1988; Alderete y Garza, 1985), de las cuales se han identificado cuatro proteínas de superficie como moléculas putativas de adhesión (Alderete y Garza, 1988), caracterizadas posteriormente como las adhesinas de *T. vaginalis*, con pesos moleculares de 65, 51, 33 y 23 kilodaltones (AP-65, AP-51, AP-33 y AP-23). La cantidad de estas adhesinas es directamente proporcional a los niveles de adhesión del parásito (Arroyo y col., 1992). Dado que aislados frescos son más adherentes que aislados mantenidos en cultivo por largo tiempo, se sugiere que factores ambientales propios de la vagina regulan la expresión de las adhesinas (Arroyo y col., 1992), tal como lo hace altas concentraciones de hierro en el medio de cultivo, regulando a nivel de transcripción y de manera coordinada para las cuatro adhesinas (Ishker y col., 1991). Por otro lado, otros estudios han demostrado que entre aislados frescos de tricomonas y aislados mantenidos en cultivo por pases prolongados difieren la cantidad de proteinasas, ya que previamente se ha reportado que *T. vaginalis* posee altos niveles de actividad proteolítica, detectada utilizando geles de poliacrilamida copolimerizados con

hemoglobina desnaturalizada (Coombs y North, 1983). La actividad proteolítica de este flagelado también ha sido detectada en geles de poli-acrilamida copolimerizados con gelatina como sustrato (Lockwood y col., 1987) empleándose cultivos frescos y cultivos mantenidos por pases sucesivos, para lo cual se realizó en electroforesis de una y dos dimensiones (Neale y Alderete, 1990). Este análisis demostró la complejidad y heterogenicidad de las proteinasas presentes en ambos tipos de cultivo. Aunque el perfil representativo de proteinasas es similar tanto en los aislados frescos como en los mantenidos por varios pases en cultivo, existe heterogenicidad en la actividad proteolítica de algunas proteinasas. Estas diferencias fueron detectadas en los aislados frescos mantenidos en cultivo por varias semanas, mostrando un aumento en el número y en la expresión de las proteinasas. Finalmente, en los experimentos con animales inmunizados con sueros y secreciones vaginales de pacientes con tricomonosis se observó la presencia de anticuerpos para algunas proteinasas de *T. vaginalis*, mostraron la naturaleza inmunogénica de las mismas (Neale y Alderete, 1990).

Debido a que *T. vaginalis* reside en el tracto urogenital de los humanos, la adquisición de nutrientes como lípidos y hierro (Pettersson y

Alderete, 1984) es limitada, sin embargo, posee mecanismos específicos para adquirir lípidos de las secreciones de la mucosa (Pettersson y Alderete, 1984). La adquisición de lipoproteínas puede ocurrir a través de una proteína de superficie de $M_r > 250\ 000$, el receptor unido a la apoproteína CIII, se encuentra en varias subfracciones de lipoproteínas, las cuales ayudan a demostrar la habilidad de los parásitos para internalizar lipoproteínas y acumular los lípidos dentro de membranas del mismo parásito, descartando la apoproteína (Alderete, y col., ed. 1992). De hecho, el medio complejo de tripticasa-levadura suplementado con lipoproteínas da una tasa de crecimiento y multiplicación iguales a los niveles de crecimiento en medio suplementado con suero como una fuente de lípidos para las tricomonas (Pettersson y Alderete, 1984). Esto muestra la importancia que tiene *in vivo* la presencia de una fuente de lípidos, por ejemplo, diferencias en lipoproteínas entre pacientes puede afectar el perfil antigénico de la infección parasitaria, ó alterar la susceptibilidad del huésped para resistir la infección. Finalmente, los niveles de lipoproteínas en las secreciones mucosas de la vagina puede no ser suficiente para reproducirse (Alderete, y col., ed. 1992).

Trichomonas vaginalis también se une de manera específica a eritrocitos fijados, para posteriormente internalizarlos, para ello utiliza dos proteínas de superficie con un peso molecular relativo de 12,500 y 27,500, llamadas proteínas de unión a eritrocitos (EPBs). Estas adhesinas de eritrocitos fueron identificadas por medio del ensayo modificado de ligandos usando eritrocitos fijados con glutaraldehído e incubados con un extracto de detergente combinando SDS-Tritón X-100. Además, las IgG de ratón anti-EPBs inhibieron la unión a eritrocitos, con lo que se demuestra la especificidad de la interacción (Lehker y col., 1990).

El nivel de unión de eritrocito entre aislados individuales, aunque es reproducible por varias generaciones en pruebas de cultivo, también se ha encontrado que varía ampliamente en un periodo de semanas, si no días, exhibiendo una variación fenotípica en la expresión en las adhesinas del eritrocito similar a la descrita previamente para otros inmunógenos (Lehker y col., 1990).

Este parásito, también requiere de altos niveles de hierro $>200 \mu\text{M}$ para una actividad metabólica máxima (Gorrel, 1985). La manera de adquirir hierro del hospedero, a pesar de que no encontrarse libre en los fluidos normales del cuerpo, es a través de la presencia de receptores para

lactoferrina sobre la superficie del parásito (Pettersson y Alderete, 1984), identificado, por cromatografía de afinidad con lactoferrina, como un heterodímero de proteínas complejas (Pettersson y Alderete, 1984). La unión de lactoferrina pero no de transferrina, que es la proteína del plasma que une hierro, resultó en la acumulación de hierro, medido por la recaptura de hierro radioactivo (^{59}Fe) cuando se comparó con la unión molar de ^{125}I -lactoferrina.

A) FACTORES DE VIRULENCIA

La patogenicidad de *T. vaginalis* es un fenómeno multifactorial y complejo que depende de la combinación de factores de virulencia del parásito con la susceptibilidad del huésped a la infección y de la participación de factores ambientales. Se sabe que la tricomonosis depende de la capacidad del parásito para atravesar la mucosa vaginal, de adherirse a las células del epitelio vaginal, de su capacidad de colonizar al epitelio, y multiplicarse en el tejido urogenital del humano, a pesar de la hostilidad del microambiente del huésped (Honigberg 1990).

Algunos de los factores y propiedades de virulencia que participan en la citopatogenicidad de *T. vaginalis* se enlistan a continuación:

- 1.- Citoadherencia.
- 2.- Citotoxicidad.
- 3.- Fagocitosis.
- 4.- Hemólisis.
- 5.- Resistencia a lisis por complemento.
- 6.- Degradación de inmunoglobulinas.
- 7.- Adquisición de nutrientes como el hierro.
- 8.- Adhesinas.
- 9.- Algunas cisteín-proteinasas.
- 10.- Presencia de virus dsTvv.

Aunque son numerosos los factores y propiedades de virulencia que presenta este parásito, el presente estudio se enfocará únicamente al análisis de los niveles de citoadherencia y citotoxicidad y el análisis de las moléculas como adhesinas, cisteín-proteinasas y la presencia del virus dsTvv.

a) PROTEINASAS.

Generalidades.

Las proteasas son enzimas, que catalizan el corte de las uniones peptídicas. En general, el término "proteasa" se refiere tanto a enzimas que cortan uno o dos aminoácidos terminales de las cadenas polipeptídicas (peptidasas o exopeptidasas), así como también a enzimas que son capaces de cortar uniones peptídicas dentro de la cadena polipeptídica (endopeptidasas o proteinasas) (McDonald, 1985).

De acuerdo al sitio activo que poseen y a la secuencia primaria de estas enzimas, las proteinasas se clasifican en cuatro grupos: serin-proteinasas, metalo-proteinasas, cistein-proteinasas, y aspartil-proteinasas. Se ha encontrado que estas proteinasas intervienen en la patogénesis de enfermedades parasitarias al facilitar la invasión al tejido del hospedero, ayudar al parásito a evadir la respuesta inmune, a la digestión de proteínas del huésped (McKerrow, 1989), y contribuir a cambios morfológicos (McKerrow, 1988), en organismos multicelulares complejos como *Schistosoma*, algunas de las proteinasas son elaboradas en las diferentes fases del ciclo de vida de dicho organismo. Es evidente, que el papel de las proteinasas está directamente relacionado con su localización.

Así mismo, en *Saccharomyces sake*, se ha descrito que las enzimas proteolíticas están unidas a la pared celular (Kusunose y col., 1980). En protozoarios como *Tetrahymena pyriformis*, se ha reportado actividad de proteinasas extracelulares (Suprynowicz y Allewell, 1980), sobre la superficie de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* (Gonzalez-Garza y col., 1977), y de *Trypanosoma cruzi* en diferentes etapas de su desarrollo (Rangel y col., 1989). En cuatro especies de *Leishmania* se ha encontrado actividad de proteinasas. Para *Leishmania mexicana mexicana*, North y Coombs en 1981, empleando electroforesis en geles de poliacrilamida con hemoglobina desnaturalizada, demostraron múltiples formas de proteinasas activas a pH 4.0 tanto en amastigotes como promastigotes. Los extractos de amastigotes tienen 4 proteínas mayores con seis formas menores. En promastigotes, el patrón es cualitativamente y cuantitativamente diferente, estos promastigotes poseen menor actividad en proteinasas que los amastigotes, mostrando una hidrólisis sobre azocaseína en un rango de pH de 2.5 a 8.5 (Coombs 1982). En *Tritrichomonas foetus*, un parásito flagelado del tracto genitourinario de bovinos, se purificaron proteinasas responsables de la hidrólisis de hemoglobina desnaturalizada, con un peso molecular relativo entre 17,500 y 20,000 Da. (MacLaughlin y Muller 1979).

b) Proteinasas en *Trichomonas vaginalis*.

Trichomonas vaginalis en comparación con otros flagelados posee una gran actividad proteolítica, debida a las múltiples formas de cisteín-proteinasas que posee este parásito. Un análisis electroforético de las proteinasas de *T. vaginalis*, en geles con hemoglobina reveló un sistema proteolítico complejo (Coombs y North, 1983), que participa en la degradación de un inmunógeno de superficie del parásito, la p270 (Alderete y Neale, 1989). Dicha actividad de degradación del inmunógeno se encontró en sobrenadantes de cultivos, indicando que la actividad proteolítica de algunas moléculas de tricomonas puede ser común durante el crecimiento normal de este parásito, y que algunas proteinasas pueden residir sobre la superficie del flagelado (Arroyo y Alderete, 1989; Neale y Alderete, 1990). Sin embargo, la cisteín-proteínasa responsable particularmente de la degradación del inmunógeno P270 aún se desconoce (Arroyo y Alderete 1989). El uso de geles copolimerizados con gelatina como sustrato es un método sensitivo para detectar las enzimas presentes en los lisados de este protista primitivo (Lockwood y col., 1984), las cuales tienen un peso molecular aparente en el rango de 20 a 110 kDa (North y Coombs, 1990).

En el análisis electroforético en geles de hemoglobina en una dimensión, se identificaron por lo menos 11 diferentes cisteín-proteinasas (Coombs y North, 1983), el análisis electroforético en dos dimensiones con geles de gelatina reveló la presencia de hasta 23 diferentes cisteín-proteinasas en algunos aislados (Neale y Alderete, 1990). Todas estas enzimas detectadas, fueron caracterizadas como cisteín-proteinasas por su sensibilidad a inhibidores específicos como Leupeptín, N- α -p-tosyl-L-lisina clorometil cetona (TLCK), ácido iodoacético, y porque son activadas por ditioneitol (DIT) (North y col., 1990). Algunas proteinasas de *T.vaginalis*, se encuentran en las secreciones vaginales (Alderete y col., 1991a), así mismo, se han detectado anticuerpos en suero de pacientes y en secreciones vaginales (Alderete y col., 1991b). Recientemente, se ha demostrado que dichas proteinasas participan *in vitro* en importantes propiedades de virulencia como la citoaderencia y la citotoxicidad hacia las células blanco del huésped (Arroyo y Alderete, 1989), en la adquisición de nutrientes (Lehker y col., 1989), la hemólisis (Dailey y Alderete, 1990), en la degradación de inmunoglobulinas (Provenzano y Alderete, 1995), y en la resistencia a la lisis por complemento (Lehker y col., 1996). Se ha establecido, que la acción de las cisteín-proteinasas de *T. vaginalis* es un

prerrequisito para la citoadherencia, se postula que el efecto proteolítico de éstas, sea necesario para desenmascarar o activar a las adhesinas del parásito, las cuales son muy sensibles a la proteólisis por las proteinasas del patógeno ó externas (Arroyo y Alderete, 1989). En 1995, Arroyo y Alderete identificaron dos cisteín-proteinasa presentes en la superficie de *T. vaginalis*, con un peso molecular de 65 kDa (CP-65), y 30 kDa (CP-30). Estas dos proteinasas, se unen a células del epitelio vaginal, se relacionan con la citotoxicidad y la citoadherencia, y se distinguen por su inhibición diferencial con inhibidores de cisteín-proteinasa como el Leupeptín, y el TLCK. En su trabajo demostraron que cuando *T. vaginalis* se pretrata con Leupeptín, se inhibe la actividad de la proteínasa CP-30, y la citoadherencia del parásito se reduce drásticamente. Así mismo, demostraron que el TLCK inhibe tanto a la proteínasa CP-30, como a la CP-65, observándose una reducción en los niveles de citoadherencia, y una abolición del efecto citotóxico sobre la célula blanco. Además, se sabe que la producción de proteinasas extracelulares puede estar involucrada en la alteración de la flora vaginal y en el pH (Garber y col., 1994). *In vitro*, *T. vaginalis* causa una caída en el pH por los ácidos productos de su metabolismo. *In vivo*, la infección es acompañada por una elevación en

el pH normal de la vagina, de pH de 4.5 a pH mayor de 5.0 hasta 7.0. La causa de la elevación del pH no ha sido aún identificada, pero se asocia con la pérdida de *Lactobacillus sp.* Este cambio puede jugar un papel relevante en la patogénesis (Garber y col., 1994).

c) Citoadherencia.

La adhesión de *T.vaginalis* a las células del epitelio vaginal favorece la colonización, la infección del aparato urogenital del humano, y es esencial para la persistencia de este flagelado en el huésped (Alderete y Garza, 1985).

La citoadherencia de *T. vaginalis* es un fenómeno altamente específico, en el que participan interacciones de tipo adhesina-receptor (Arroyo y col., 1992; Alderete y Garza, 1985; 1988). El mecanismo de adhesión de este parásito es complejo, participan reacciones en cascada además de las reacciones típicas entre adhesina y receptor, incluyendo la actividad de cisteín-proteinasas (Arroyo y Alderete, 1989) y la transducción de señales transmembranales después del contacto inicial (Arroyo y col., 1993).

En la adhesión de las tricomonas a las células de la vagina participan cuatro proteínas de superficie, llamadas adhesinas, con un peso molecular relativo de 65 kDa, 51 kDa, 33 kDa, y 23 kDa (AP-65, AP-51, AP-33, y AP-23). Estas proteínas de superficie se obtuvieron mediante el ensayo de ligandos (Arroyo y col., 1992; Alderete y Garza, 1988). La regulación de la adhesión y la cantidad de adhesinas depende de señales proporcionadas por factores ambientales, tales como el hierro (Lehker y col., 1991).

En el proceso de transducción de señales transmembranales que se generan al contacto del parásito con las células del epitelio vaginal se detectan al menos tres señales distintas. La primera promueve el aumento coordinado de la síntesis de las cuatro adhesinas. La segunda induce al parásito a cambiar su morfología, de piriforme a ameboide, este evento es dependiente del tipo celular, ya que sólo ocurre en células vaginales y no en células HeLa. La tercera señal consiste en ayudar en el reclutamiento de un mayor número de tricomonas hacia la célula recién parasitada, generándose focos de infección que favorecen el daño celular y la posible comunicación interparasitaria, probablemente promoviendo el intercambio de información genética entre las tricomonas (Arroyo y col., 1993).

d) Citotoxicidad.

Una forma de determinar la citotoxicidad de *T. vaginalis* a la célula blanco es medir el efecto citotóxico *in vitro* de diferentes aislados de *T.vaginalis* por daño ó destrucción a monocapas de células vaginales humanas normales como células blanco (Rasmussen y col., en 1986), así como monocapas de células HeLa (Alderete y Pearlman, 1984; Christian y col., 1983; Gentry y col., 1985), células Mckoy (Brasseur y Savel, 1982; Kotcher y Hoogasian, 1957), células Vero (Alderete y Pearlman, 1984), células CHO (Krieger y col., 1985). En casi todos estos estudios, se observó, que la presencia de *T. vaginalis* fue acompañada por cambios morfológicos definitivos en las células, sin embargo, la búsqueda de una exotoxina de este patógeno no tuvo éxito.

En cambio, en todos los cultivos, la proliferación de *T. vaginalis* fue acompañada por la desintegración progresiva de las monocapas de los cultivos celulares (Pindak y col., 1986). Los focos de lesión iniciales observados, consistieron en el atacamiento a las células, y una acumulación de tricomonas alargadas gradualmente, hasta que la monocapa entera es destruida (Pindak y col., 1986).

Sobre el efecto citotóxico que ejerce *T.vaginalis* sobre la célula blanco, Krieger y col., en 1985 postularon tres mecanismos:

- 1.- Contacto-dependiente.
- 2.- Por citofagocitosis.
- 3.- Por citotoxinas extracelulares.

Contacto-dependiente.

Basándose en este mecanismo de citopatogenicidad, se expusieron monocapas de células de ovario de hamster chino (celulas CHO), con *T. vaginalis* viables, y observaron que los parásitos forman agregados, los cuales se adhieren a la monocapa de células, y la destrucción de la monocapa, ocurrió sólo en areas en las cuales los parásitos estaban en contacto con las células. Las células que no entraban en contacto con los parásitos permanecieron intactas (Krieger y col., 1985).

Citofagocitosis.

Los estudios con celulas CHO marcadas con óxido de Indio-111 ($^{111}\text{InOx}$), y teñidas simultaneamente con azul de tripano, confirmaron que la muerte de las células en cultivo por tricomonas se lleva acabo por un

proceso extracelular, ya que después de 6 hrs, el 33% de la marca inicial permanece en la pastilla celular, esta cantidad representa la suma de la actividad de células CHO viables, marca retenida en células intactas y el $^{111}\text{-InOx}$ en células CHO fagocitadas por el parásito (Krieger y col., 1985).

Citotoxinas extracelulares.

La evaluación del papel potencial de citotoxinas secretadas al medio de cultivo de *T.vaginalis*, se realizó sobre monocapas de células CHO, observándose, que la monocapa no sufrió cambios, indicando con ésto, que *T.vaginalis* no secreta citotoxinas (Krieger y col., 1985).

f) Proteínas.

El análisis antigénico de *T. vaginalis*, se ha realizado con distintos aislados patógenos, así como en clonas de este parásito, con el propósito de encontrar posibles variaciones antigénicas entre un aislado y otro. Dicho estudio fue realizado por Alderete en 1983, empleando técnicas de fluorografía y electroforesis en SDS-PAGE en una dimensión.

Los parásitos vivos, y altamente móviles se marcaron con metionina (S^{35}), las proteínas totales se obtuvieron por precipitación con ácido

tricloroacético (Alderete y Baseman, 1980; Peterson y col., 1982) y fueron analizadas posteriormente por electroforesis en geles de poliacríamida-SDS (SDS-PAGE), obteniéndose un patrón de proteínas con un peso molecular de 200,000 a 20,000 Da. (Alderete, 1983).

Las proteínas inmunogénicas marcadas, fueron identificadas por radioinmunodifusión (Kessler, 1976), y posteriormente por fluorografía.

El análisis electroforético de los diferentes aislados de *T. vaginalis*, proporcionó dramáticas evidencias de que existe una gran similitud en la composición de proteínas que posee este parásito, de acuerdo a la migración, intensidad y número de bandas obtenidas en los geles, independientemente del aislado de donde provenga. Así mismo, se examinaron 30 clonas de *T. vaginalis*, las cuales se obtuvieron por el método modificado de Hollander (Hollander, 1976), el patrón de proteínas totales obtenido, no presentó diferencias tanto por fluorometría como por el análisis del patrón electroforético, concluyéndose, que tanto los distintos aislados, como las clonas, no presentan diferencias en su composición de proteínas inmunogénicas (Alderete, 1983).

f) Virus de doble cadena de RNA en *T. vaginalis* (dsTw).

En estudios recientes se han identificado virus específicos en protozoarios como *T. vaginalis*, *Giardia lamblia*, *Leishmania braziliensis*, y en *Elmeria stiedae*. Estos virus comparten algunas características: todos son virus de RNA, algunos son de doble cadena, icosaédricos y tienen un diámetro promedio de 30-40 nm y su genoma es no segmentado aunque con diferentes propiedades de sedimentación (Wang y Wang, 1991).

A diferencia de los genomas virales de *G. lamblia* y de *E. stiedae*, los cuales tienen la misma movilidad electroforética e hibridación cruzada, el genoma viral de *T. vaginalis* no comparte secuencias homólogas con estos parásitos. Es interesante notar, que la replicación del virus dsTvv de parásitos infectados, se correlaciona con la expresión de superficie y la variación antigénica de la proteína altamente inmunogénica p270. Los pases extensivos *in vitro* de parásitos infectados por el virus dsTvv resulta en la pérdida de éste, y por consiguiente la pérdida de la capacidad de expresión de la p270 en la superficie del parásito.

La caracterización de los mecanismos de replicación viral y los productos de codificación aún no han sido reportados (Khosshnan, y Alderete, 1994).

Por otra parte, dentro de los dos tipos de aislados de *T. vaginalis* descritos anteriormente como aislados tipo I y aislados tipo II, se encontró que los de tipo II están infectados por el dsTvv (Wang, y col., 1987), los cuales, al perder el virus resultaba en una transición a tipo I (Alderete y col., 1986). La caracterización de los parásitos infectados reveló que el mRNA de P270 tiene una regulación positiva, en contraste con los parásitos que no están infectados por el virus (Khoshnan y Alderete, 1994). Bajo condiciones de cultivo continuo (Lehker, y Alderete, 1990), las tricomonas infectadas con el dsTvv cosechadas, son pleomórficas, en contraste con la forma elipsoidal de los aislados en donde no se detectó el virus así como de las tricomonas que lo perdieron (Khoshnan y Alderete 1994).

La inhabilidad para infectar tricomonas que son virus negativo, ha sido el mayor impedimento para entender las propiedades biológicas del virus, la relación virus-parásito, y la influencia del virus, si es que existe alguna, sobre la expresión del parásito y/o factores de virulencia (Khoshnan, y Alderete, 1993).

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios orientados a entender los mecanismos de virulencia del parásito, así como los factores desencadenantes que provoca la enfermedad en el hospedero, se han realizado con cultivos de aislados de *T. vaginalis* que corresponden a una población heterogénea.

Este trabajo, presenta una alternativa para el estudio de los mecanismos y factores de virulencia de este parásito, al obtener poblaciones homogéneas y caracterizarlas en base a sus propiedades de virulencia. Esto permitirá entender la variabilidad genética de este protozoario, estudiar la adaptación fisiológica, y/o mutaciones, y poder establecer un punto de comparación entre un aislado y otro.

II. OBJETIVOS.

A. OBJETIVO GENERAL:

Obtener y caracterizar poblaciones homogéneas del aislado CNCD-147 de *Trichomonas vaginalis* respecto a algunas de las propiedades de virulencia, y actividades biológicas relacionadas con la citopatogenicidad de este parásito.

B. OBJETIVOS PARTICULARES:

1.- Obtención de clonas del aislado CNCD-147 de *Trichomonas vaginalis*.

2.- Caracterización y selección de mutantes naturales deficientes en proteinasas.

3.- Caracterización de las clonas obtenidas por medio del análisis de los patrones de :

- 1) Proteinasas totales.
- 2) Adhesinas.
- 3) Ligando-proteinasas.
- 4) Proteínas totales

Por sus niveles de:

- 5) Adhesión.
- 6) Citotoxicidad.

La detección de:

- 7) virus de doble cadena de RNA (dsTvv), que infecta a este parásito.

III. ESTRATEGIA.

La estrategia utilizada en esta tesis, consistió en clonar el aislado CNC-147 de *T. vaginalis* por crecimiento en agar semisólido en anaerobiosis, aislando colonias individuales, las cuales se reclonaron en tres ocasiones para asegurar la obtención de poblaciones homogéneas y su posterior caracterización en cuanto a sus niveles de adhesión y citotoxicidad y el análisis de moléculas como adhesinas, proteinasas y virus dsTvv. Para lograr los objetivos planteados, se llevaron a cabo los siguientes pasos generales:

1) Se estableció el inóculo adecuado de parásitos, para obtener colonias aisladas en agar semisólido.

2) Se escogieron colonias aisladas, y se resuspendieron en medio líquido TYM suplementado con 10 % de suero de caballo.

3) Se realizó una segunda clonación en agar semisólido, con las cinco primeras clonas obtenidas, y se seleccionaron 3 colonias de cada caja.

4) Se determinó el patrón de actividad de proteinasas totales a cada una de las 15 clonas obtenidas, para identificar alguna mutante natural (deficiente de proteinasas).

5) De cada grupo se seleccionaron dos clonas en base a su actividad proteolítica la más alta y la más baja, de acuerdo al patrón obtenido.

6) Se realizó una tercera clonación con las clonas obtenidas.

7) Se llevo a cabo la caracterización de las 12 clonas obtenidas en base a sus propiedades de virulencia, por medio del análisis de los patrones de

a) Proteinasas totales.

b) Ligando-proteinasas.

c) Adhesinas.

d) Proteínas totales,

por sus niveles de:

e) Adhesión.

f) Citotoxicidad.

Por la presencia de:

g) Virus de doble cadena de RNA (dsTvv), que infecta a este parásito.

Los materiales empleados en cada ensayo, se describen al inicio de cada uno, seguidos por la descripción de la metodología realizada en cada uno.

IV. MATERIALES Y METODOS.

A. CLONACION del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis* (Hollander, 1976).

Material.

Medio TYM pH 6.2 (Diamond, 1957).

T. vaginalis CNCD -147 en fase logarítmica.

Agar Noble al 0.6% (Difco).

Suero de caballo (JHR), inactivado por calor.

Cajas petri 100 x 15 mm de vidrio.

Tubos cónicos desechables de 50 ml (Corning).

Sistema Gas-Pack para anaerobiosis (BBL).

a) PREPARACIÓN DEL AGAR SEMISÓLIDO

Preparar 150 ml de medio TYM, ajustar el pH 6.2.

Agregar 0.6% de agar Noble.

Disolver con calor.

Esterilizar por autoclave a 121 lb de presión por 20 min.

b) Sembrado.

El número de parásitos se ajusta por diluciones dobles, de tal manera que en 0.1 ml de inóculo se tomen 14,000 parásitos como primera dilución, y 1,400 parásitos como segunda dilución. En un tubo cónico de 50 ml estéril, se dispensan 0.1ml de inóculo, se agregan 3 ml de suero de caballo y 27 ml de medio TYM con agar, el cual debe estar a 40°C, se mezcla invirtiendo suavemente el tubo 4 ó 5 veces y posteriormente se vierte en una caja petri esteril. Se deja gelificar a temperatura ambiente y se incuba a 37°C en anaerobiosis por 5 días.

c) Recuperación de colonias.

Al quinto día, se sacan las cajas, se revisan bajo el microscopio invertido para observar la morfología de las colonias, en condiciones de esterilidad se toma una colonia con una pipeta Pasteur estéril y se resuspende en 6 ml de medio TYM suplementado con 10 % de suero de caballo. Se incuba a 37°C y el primer pase, se realiza hasta que los parásitos se han liberado del agar, lo cual ocurre entre el tercer y cuarto día de incubación.

B. CARACTERIZACION DE LAS CLONAS DE *T. vaginalis* POR SUS PROPIEDADES DE VIRULENCIA.

a) PROTEINASAS TOTALES (Coombs y North, 1983; Neale y Alderete 1995).

Material

Clonas de *T.vaginalis* CNCD-147 en fase logarítmica tardía.

Buffer de muestra 1X (BM 1X).

PBS pH 7.0.

Buffer de activación (acetato de sodio 0.1M, pH 5.5, y 0.1% de β -mercaptoetanol)

Tritón X-100 al 2.5%.

Azul de Coomassie R-25 al 0.25%.

Los parásitos se lavan tres veces con PBS pH 7.0 centrifugando a 1,800 rpm/5 min/4°C y se cuentan en el último lavado.

Se resuspenden 2×10^6 parásitos en 50 μ l de BM 1X, se transfieren a un tubo Eppendorf estéril, se incuban a 37°C/20 min, y para eliminar material

insoluble, se centrifugan las muestras a 14,000 rpm/3min. Se toman 12 μ l del sobrenadante, y se corren en un gel de sustrato por 1 hr a 110 volts. Después, el gel se incuba 1 hr con Tritón X-100 al 2.5%, enseguida, se deja 20 hrs en buffer de activación a 37°C. Para hacer visibles las bandas, se tiñe el gel con azul de Coomassie R-25 al 0.25%. Las bandas de actividad se observan como bandas claras contra un fondo azul.

b) ADHESINAS (Arroyo y col., 1992).

Material.

Se requieren 20×10^6 de parásitos.

Células HeLa fijadas, 1×10^6 por vial.

Inhibidores de proteasas : Leupeptin 1mg/ml (solución stock) y TLCK 10 mM (solución stock).

Deoxicolato de sodio (DOC) al 10%.

Amortiguador TDSET (solución stock; Tris-HCl 0.01M pH 7.8, DOC al 0.2 %, SDS al 0.1%, EDTA 0.0.1M , Tritón X-100 al 1%).

Amortiguador NET (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5mM) pH 7.4.

Sacarosa al 10% en TDSET, con rojo de fenol.

e) Preparación del extracto de detergente de proteínas totales en presencia de inhibidores de proteinasas.

Los 20×10^6 parásitos de cada clona se lavan tres veces con PBS pH 7.0 frío y se resuspenden en 500 μ l de buffer NET. Se agregan 50 μ l de TLCK 10 mM, para una concentración final de 1mM, y 50 μ l de leupeptin 1mg/ml (concentración final 100 μ g/ml) y se incuban 10 min a 4°C. Enseguida, los parásitos se lisan con 50 μ l de DOC al 10 % (concentración final 1%) se homogeniza en vortex y se incuban 20 min a 4 °C. Después, se agregan nuevamente 50 μ l de cada inhibidor y 250 μ l de TDSET para un volumen final de 1 ml, y se incuban otra vez 10 min a 4°C.

Se colocan en el fondo de cada tubo 100 μ l de sacarosa al 10% con rojo de fenol, se centrifuga a 14,000 rpm/30 min a 4°C y se colecta el sobrenadante

El sobrenadante, conteniendo las proteínas totales del parásito, se hace interaccionar por 24 hrs a 4 °C y con agitación suave con 1×10^6 células HeLa fijadas. Después, las muestras se centrifugan y la pastilla se lava 5 veces con buffer TDSET. La elución de las adhesinas de la superficie de células HeLa se hace con 30 μ l de buffer de muestra 1X, e hierviéndolas 3 min, y antes de cargar en el gel se centrifugan a 14,000 rpm/3 min. El gel

se prepara al 9% de poliacrilamida y SDS, en cada carril se cargan 20 μ l de muestra, el gel se corre a 110 volts/1 hr y se tiñe con azul de Coomassie para hacer visibles las bandas de proteínas asociadas a la superficie de células HeLa.

d) ENSAYO LIGANDO-PROTEINASAS (Arroyo y Alderete, 1995).

Material.

Células HeLa fijadas, 1×10^6 células por vial.

15-20 ml de cultivos de 24 hrs de cada una de las clonas de *T.vaginalis* CNCD-147 en fase logarítmica tardía (20×10^6 parásitos).

PBS pH 7.0

PBS pH 8.0

DOC al 10%.

Sacarosa al 10% en PBS pH 8.0, con rojo de fenol.

Buffer de muestra 1X con 5% de β -mercaptoetanol.

Tritón X-100 al 2.5%.

Buffer de activación.

e) Preparación del extracto de detergente de proteinasas totales.

Se cosechan los parásitos de cada una de las clonas, se lavan tres veces con PBS pH 7.0 y se cuentan en el último lavado. Posteriormente, se resuspenden 20×10^6 de parásitos en 500 μ l de PBS pH 8.0, se transfieren a un tubo Eppendorf, se lisan con 50 μ l de DOC al 10%, se homogenizan y se dejan 20 min a 4°C. Después de este tiempo, se agregan 450 μ l de PBS pH 8 y se homogenizan. Con una micropipeta se depositan en el fondo de cada tubo 100 μ l de sacarosa al 10 % con rojo de fenol, se centrifugan a 14,000 rpm/30 min a 4°C, y se colecta el sobrenadante clarificado.

Ligando-proteinasas-

El sobrenadante conteniendo a las proteinasas totales del parásito, se hace interaccionar por 24 hrs a 4°C y agitación suave con 1×10^6 células HeLa fijadas. Después de la interacción, las muestras se centrifugan y se desecha el sobrenadante. La pastilla de células HeLa se lava 5 veces con PBS pH 8.0, DOC al 10%, a 4°C y las proteínas asociadas a la superficie de las células HeLa se eluyen en 30 μ l de buffer de muestra 1X e incubandolas a 37°C/20 min . Luego, se centrifugan a 14,000 rpm/3 min para

recuperar el sobrenadante. Se prepara un gel de sustrato, y se carga en cada carril 20 μ l del sobrenadante conteniendo las proteinasas eluidas de la superficie de las células HeLa. Después de correr el gel a 110 volts por 1 hr, éste se renaturaliza con Tritón X-100 al 2.5 %, se activa 20 hrs a 37 °C en buffer de activación (ver ápendice), y se tiñe con azul de Coomassie para hacer visibles las bandas de actividad.

ñ. OBTENCION Y CUANTIFICACION DE PROTEINAS TOTALES (Alderete, 1983).

Material.

Clonas de *T.vaginalis* CNCD-147 en fase logaritmica tardía (20×10^6).

Acido tricloroacético (TCA) al 100%.

Hisopos estériles.

Tubos Eppendorf estériles.

PBS pH 7.0 estéril.

Buffer de muestra 1X sin β -mercaptoetanol y sin azul de bromofenol (ver ápendice).

La obtención de proteínas se hizo por el método de precipitación con ácido tricloroacético al 10 %.

En este ensayo, también se requieren de 20×10^6 parásitos de cada una de las clonas. Los parásitos se cosechan por centrifugación a 1,800 rpm/5 min, se lavan tres veces con PBS pH 7.0 estéril, y en el último lavado se cuenta el número de microorganismos. En un tubo Eppendorf de 1.5 ml, la pastilla de 20×10^6 de parásitos se resuspende en 900 μ l de PBS pH 7.0 a 4 °C, se le adiciona 100 μ l de ácido tricloroacético al 100 % (concentración final 10%) y se incuba a 4°C/18 hrs para precipitar las proteínas. Se centrifuga a 14,000 rpm/3 min/4°C, se decanta el sobrenadante, la pastilla se seca con un hisopo para eliminar el TCA residual y se resuspende completamente en PBS. Se lava cinco veces con PBS pH 7.0 frío secando la pastilla en cada lavado, esto es crucial para que el ensayo sea exitoso.

g) Preparación de la muestra.

La pastilla de proteínas precipitadas se resuspende en 400 μ l de buffer de muestra 1X, se toman 5 μ l para cuantificar proteínas por el micrométodo de

Lowry modificado (Bio-Rad) en placas de 96 pozos. A cada muestra se le agregaron 25 μ l de la solución A y 200 μ l de la solución B.

Se dejó reposar 10 min y se leyó en un lector de ELISA a 630 nm, como control se utilizó albúmina y se construyó la siguiente curva de calibración:

	Bco	STD	STD	STD	STD	STD	STD	Mta
		1	2	3	4	5		
Muestra de proteínas TCA								5
STD de Albúmina	μ l	--	1	2	3	4	5	--
Buffer de muestra 1X	μ l	5	4	3	2	1	0	--
Solución A	μ l	25	25	25	25	25	25	25
Solución B	μ l	200	200	200	200	200	200	200

Concentración del estandar de albúmina 10 mg/ml.

Para analizar el patrón de proteínas totales de cada una de las clonas, se corrió una electroforesis discontinua y desnaturalizante en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 9% y 0.75 mm de grosor, cargándose en cada carril 30 μ g de proteína.

h) ENSAYO DE ADHESION (Alderete y Garza, 1985; Arroyo y Alderete, 1989).

Material.

Monocapa confluyente de células HeLa, sembrada en caja de 96 pozos de fondo plano.

Células de *T.vaginalis* CNCD-147 marcadas con 40 μ Ci de timidina tritiada (3 H-Thy) (Amersham LIFE SCIENCE, actividad específica 48.0 Ci/mmol).
PBS-EDTA al 0.2%.

PBS pH 7.0 tibio.

Medio DMEM suplementado con 10 % de suero de caballo (DMEM-SC).

Cultivo de células HeLa.

Medio de interacción TYM/DMEM sin suero (1:2 vol/vol).

Líquido de centelleo para muestras acuosas.

En este ensayo, la relación parásito-célula HeLa es de 4:1.

i) Preparación de monocapas de células HeLa.

En condiciones de esterilidad, se retira el medio de la botella de 75 cm² donde se cultivaron las células HeLa a un 80% de confluencia, se

agregan 10 ml de PBS - EDTA al 0.2% tibio para despegar la monocapa y se deja reposar 5 min a temperatura ambiente.

La monocapa se desprende con un suave golpeteo en el canto de la mano, las células se resuspenden 5 veces, y se transfieren a un tubo cónico de 15 ml, se toma una alícuota para contar el número de células, y se centrifugan a 2,000 rpm/ 5min a 4°C. La pastilla se resuspende en 5 ml de medio DMEM-SC, de aquí se toman 5.5×10^6 células y se resuspenden en un volumen final de 11 ml de medio DMEM-SC. Se siembran 5.0×10^4 células en 100 μ l de medio en cada pozo, se incuban 24 hrs a 37°C y 5% de CO₂ hasta obtener 100% de confluencia, a este tiempo, se retira el medio de los pozos, se lava la monocapa con PBS pH 7.0 tibio y se fijan con glutaraldehído al 2.5% por 1 hr a 4°C. Posteriormente, la monocapa se lava 3 veces con PBS pH 7.0, y se bloquea con 100 μ l de glicina 0.2M/30 min a temperatura ambiente. Finalmente, la monocapa se lava nuevamente con PBS pH 7.0.

En este ensayo, las células HeLa se fijan (ver apéndice) para evitar que haya destrucción de la monocapa por el efecto citotóxico de los parásitos, lo cual interferiría en los resultados.

j) Procesamiento de Parásitos.

Para este ensayo se requieren por lo menos 2×10^6 parásitos de cada clona marcados con ^3H -Tritiada por 18 hr. Para marcar los parásitos, a cada cultivo de 6 ml (en tubos cónicos de plástico de 15 ml) se le agregan $40 \mu\text{Ci}$ de timidina tritiada y se incuban con la marca por 18 hrs a 37°C . Los parásitos se cosechan despegandolos primero de las paredes del tubo con un hisopo, enseguida se centrifugan a 1,800 rpm/ 5 min a 4°C . El sobrenadante se decanta en desechos radioactivos, los parásitos se lavan 3 veces con PBS pH 7.0 y en el tercer lavado se cuentan. La pastilla de parásitos se resuspende en medio TYM/DMEM sin suero a una concentración de 2×10^6 parásitos/ml.

El ensayo de adhesión se inicia al agregar a la monocapa de células HeLa fijadas, $100 \mu\text{l}$ de parásitos por pozo (2×10^5), y la placa se incuba 20 min a 37°C , cada muestra se hace por triplicado. Posteriormente, el sobrenadante se remueve de cada pozo con una pipeta Pasteur y se lavan tres veces con PBS pH 7.0 tibio, eliminando el sobrenadante en los desechos radioactivos. La marca radioactiva se eluye con $100 \mu\text{l}$ de SDS al 0.1% por pozo durante 1 hr. Transcurrido este tiempo, con una micropipeta se toman los $100 \mu\text{l}$ de cada pozo y se depositan en viales de plástico para centelleo

previamente marcados, y conteniendo 2 ml de líquido de centelleo. Para las cuentas totales, se depositan 100 μ l de la suspensión de parásitos (2×10^5) de cada una de las clonas usada en el ensayo. Se leen cuentas por millón (cpm) en un contador de centelleo en el canal para tritio (^3H). El porcentaje de adhesión para cada una de las clonas se obtiene de la siguiente manera:

$$\frac{\text{media de las lecturas de cada muestra en cpm}}{\text{cuentas totales de cada muestra en cpm}} \times 100 = \% \text{ adhesión}$$

k) Ensayo de Citotoxicidad (Alderete y Pearlman, 1984).

Material.

Clonas de *T. vaginalis* CNCD-147 en fase logarítmica tardía (2×10^6).

Placa de 96 pozos de fondo plano con monocapa confluyente de células HeLa (5×10^4 cels. por pozo).

Medio de interacción TYM/DMEM en una relación 1:2, sin suero.

PBS pH 7.0.

Formaldehído al 2% en PBS pH 7.0.

Cristal violeta al 0.13% .

SDS al 1% en Etanol al 50%.

Medio de cultivo de células HeLa (DMEM suplementado con 10% de suero de caballo, inactivado por calor).

l) Preparación de monocapas de Células HeLa.

La preparación de las monocapas confluentes de células HeLa se hace de igual manera que para el ensayo de adhesión . Brevemente, en placas de 96 pozos se siembran 5.0×10^4 células HeLa por pozo. Se incuban 24 hrs a 37°C y 5% de CO_2 hasta obtener una monocapa confluyente. A diferencia de las monocapas para el ensayo de adhesión, éstas no se fijan, pues el ensayo se basa en medir la destrucción de la monocapa.

m) Cultivos del aislado CNCD-147 de *T.vaginalis*.

Los parásitos de un cultivo de 24 hrs se despegan de las paredes del tubo con un hisopo estéril, se transfieren a un tubo cónico de 15 ml estéril, y se centrifugan a 1,800 rpm/5 min. El sobrenadante se decanta y los parásitos se lavan tres veces con PBS pH 7.0 estéril. En el último lavado, se cuenta el número de parásitos (se debe tener por lo menos 2×10^6 de

parásitos de cada una de las clonas, ya que la relación de parásitos células HeLa es de 1:4) se centrifugan y la pastilla se resuspende en medio de interacción a una concentración de 2×10^6 parásitos/ml. La monocapa confluyente de células HeLa se lava tres veces con medio DMEM a 37°C y 5 % de CO_2 , sin suero, decantando primero el medio en el que se cultivaron. Esto se debe hacer con cuidado para no desprender la monocapa de células. A cada pozo se le agregan $100 \mu\text{l}$ de la suspensión de parásitos, excepto a los tres primeros pozos de cada hilera, ya que estos serán blancos que representarán el 100 % de monocapa, y sólo se les agrega $100 \mu\text{l}$ de medio de interacción sin parásitos. Posteriormente, la placa se incuba 1 hr a 37°C y 5 % de CO_2 , suavemente se retira el medio y se enjuaga tres veces con $100 \mu\text{l}$ de PBS pH 7.0 tibio para eliminar los parásitos. Después, se agregan $50 \mu\text{l}$ de formaldehído al 0.2% en PBS pH 7.0 para su fijación, y se deja reposar 10 min a temperatura ambiente. Por último, la monocapa remanente se tiñe con $50 \mu\text{l}$ de cristal violeta al 0.13%, el colorante se retira inmediatamente, se enjuaga con PBS pH 7.0 y la placa se deja secar por 24 hrs protegida de la luz. El colorante se eluye con $100 \mu\text{l}$ de SDS/etanol, se deja por 30 min, y la placa se lee en un lector de ELISA, a una longitud de onda 550 nm.

Los cálculos para obtener el porcentaje de citotoxicidad se realizan de la siguiente manera:

media de las 3 lecturas problema en O.D.

----- x 100 = % de monocapa.

lectura media del blanco en O.D.

100 - % monocapa = % de citotoxicidad.

n) DETECCION DE VIRUS DE DOBLE CADENA (*dsTvv*).

Material.

20x10⁶ de parásitos de cada clona.

PBS pH 7.0.

Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%.

Fenol equilibrado pH 8.0.

Fenol:cloroformo (1:1)

Cloroformo.

Acetato de sodio 3M, pH 4.5.

Etanol absoluto a -20 °C.

Etanol al 70% a -20 °C.

TE (Tris 10 mM pH 8.0 y EDTA 1mM).

Agarosa al 0.75% en TAE 1X.

TAE 10X (Trisma-base 48.4g, NaEDTA-2H₂O 7.4g, Acetato de sodio, 16.4 g, ajustar pH 7.8)

Buffer de muestra tipo IV para ácidos nucleicos (Maniatis).

Bromuro de etidio 0.5 mg/ml

Se requieren 20x10⁶ de parásitos de cada clona, para lo cual, se prepara un cultivo de 24 hrs de 15 ml. Después se despegan los parásitos de las

paredes del tubo con un hisopo estéril, se lavan tres veces con PBS pH 7.0, se resuspenden en 500 μ l de PBS pH 7.0, se agregan 25 μ l de SDS al 10 %, 525 μ l de fenol y se extraen los componentes orgánicos con agitación utilizando vortex por 3 min a temperatura ambiente. Se centrifuga 2 min a 14,000 rpm, se recupera la fase acuosa (superior), se transfiere a otro tubo Eppendorf, y se le agregan 500 μ l de la mezcla fenol:cloroformo (1:1 vol/vol), se mezcla por vortex, se vuelve a centrifugar por 2 min a 14,000 rpm recuperando nuevamente la fase acuosa. Se agregan 500 μ l de cloroformo, se extrae por 2 min, se centrifuga, se recupera la fase acuosa que contiene ácidos nucleicos, se le agregan 50 μ l de acetato de sodio 3M, y se mezcla bien. Para precipitar el DNA, se agrega 1 ml de etanol absoluto a -20 °C y se incuba por lo menos 1 hr a 4 °C. Enseguida, se centrifuga a 14,000 rpm por 30 min, el sobrenadante se desecha, y la pastilla se lava 3 veces con etanol al 70%. Una vez lavada la pastilla, se deja secar al aire, cuidando de que no se seque completamente, para facilitar su resuspensión en 50 ml de TE (Tris 10 mM pH 8.0 y EDTA 1 mM). Se prepara un gel de agarosa al 0.75% (en TAE 1X) y se carga en cada carril 5 μ l de la solución de ácidos nucleicos más 1 μ l de buffer de muestra tipo IV (6X).

El gel se tiñe con bromuro de etidio se observan las bandas con luz ultravioleta (UV) en un transiluminador y se toma fotografía para registro.

n) CRIOPRESERVACION DE LAS CLONAS MXL DEL AISLADO CNCD-14-7 de *T. vaginalis*.

Para la criopreservación de las clonas, se inocularon cajas de cultivo de 25 cm² con 30 ml de medio TYM-SC y un inóculo de aproximadamente 1.2x10⁶ parásitos, las cajas se incubaron a 37°C/24 hrs. Posteriormente, con un hisopo estéril se despejaron los parásitos de las paredes de la caja, y se cosecharon por centrifugación a 1,600 rpm/5 min. La pastilla se resuspendió a una concentración de 20x10⁶ parásitos/ml en una mezcla de medio TYM-SC y 10% de dimetilsulfoxido (DMSO) previamente esterilizado por filtración a través de 0.22 µm. De cada clona se tienen lotes de 5 tubos en criopreservación

V. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.

A. Estandarización del método de clonación de *T. vaginalis* en agar semisólido.

Para determinar el número óptimo de parásitos que permita obtener colonias aisladas en el agar, se sembraron seis cajas con diferentes inóculos preparados por diluciones dobles sucesivas. Al quinto día de incubación en anaerobiosis se observaron colonias puntiformes, de color blanco-pardo, inmersas en el agar (Fig.1). Las colonias que crecen en la superficie del agar corresponden a bacterias. Esta observación fue posible hacerla, ya que algunas de las cajas presentaron contaminación por bacterias.

Los inóculos apropiados para obtener colonias aisladas en agar semisólido fueron de 14,000 y 1,400 parásitos/0.1 ml (Tabla 1).

Fig. 1. Morfología colonial del aislado CNCD-147 de *Trichomonas vaginalis* en agar semisólido TYM-SC/agar Noble 0.6 %, con un inóculo de 1,400 parásitos/0.1 ml, incubándose a 37 °C días en anaerobiosis. Se obtuvieron diferentes tamaños de colonias, las cuales están señalados por las flechas; la punta de flecha señala colonias pequeñas, la flecha corta señala colonias medianas y la flecha larga señala colonias grandes. Para la clonación sólo se rescataron colonias pequeñas.



Tabla I. Crecimiento del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis* en agar semisólido

No. caja	Inóculo	Tipo Crecimiento
	(No. parásitos/0.1 ml)	(Colonias)
1	1.4×10^6	masivo
2	1.4×10^5	masivo
3	1.4×10^4	aislado
4	1.4×10^3	aislado
5	1.4×10^2	negativo
6	1.4×10^1	negativo

Clonación del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis*.

Una vez determinado el inóculo óptimo, presentado por las cajas 3 y 4 (Tabla I), de ahí se obtuvieron 5 colonias aisladas, se resuspendieron en 6 ml de medio TYM-SC y se rotularon de la siguiente manera:

C1; C2; C3; C4; C5

Segunda clonación.

En la segunda clonación se sembraron 1,400 parásitos de cada una de las clonas, teniendo un total de 5 cajas. Al quinto día se analizaron las cajas, y de cada una se rescataron tres colonias aisladas a excepción de la caja 1, de la cual se rescataron cinco colonias, y de las cajas 2 y 5 que se rescataron 2 (Tabla II); teniéndose un total de 15 subclonas como producto de la segunda clonación.

Tabla II. Clonas obtenidas en la segunda clonación del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis*.

Clonas	Subclonas				
	C1:1	C1:2	C1:3	C1:4	C1:5
C1	C1:1	C1:2	C1:3	C1:4	C1:5
C2	C2:1	C2:2			
C3	C3:1	C3:2	C3:3		
C4	C4:1	C4:2	C4:3		
C5	C5:1	C5:2			

Las subclonas se mantuvieron en cultivo por tres semanas, y posteriormente a cada una se le determinó el patrón de proteinasas totales (Fig. 2), con el fin de determinar la posibilidad de obtener clonas deficientes en proteinasas (mutante natural), y de seleccionar de cada grupo, dos clonas, una con una actividad proteolítica alta, y otra con actividad proteolítica baja.

El patrón de actividad proteolítica de las proteinasas totales de cada subclona (Tabla II) muestra que todas las subclonas presentaron actividad proteolítica (Fig. 2), lo cual indica que no se obtuvieron clonas deficientes en proteinasas (mutantes naturales). Sin embargo, se pudieron seleccionar subclonas con actividad proteolítica alta y baja (Tabla III) de la siguiente manera: Subclonas con alta actividad proteolítica C1:5 (carril 6), C2:2 (carril 8), C3:1 (carril 9), C4:3 (carril 14), y C5:2 (carril 16). Las subclonas seleccionadas por su actividad proteolítica baja fueron: C1:1 (carril 2), C3:2 (carril 10), C4:1 (carril 12) y C5:1 (carril 15) (Fig. 2).

Fig. 2.

Patrón de actividad de las proteinasas totales de las primeras clonas del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis*. Se utilizaron 8×10^5 parásitos de cada clona por carril. Se corrió un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE al 9%, conteniendo gelatina al 0.2% (gel de sustrato), el gel se renaturalizó 1 hr en Tritón X-100 al 2.5%, posteriormente las proteinasas se activaron 20 hrs a 37 °C en buffer de acetatos pH 4.5 con 50 μ l de β -mercaptoetanol, finalmente el gel se tiñó con azul de Coomassie. Las bandas de actividad se observan como zonas blancas en fondo obscuro. El peso molecular de los marcadores esta en kilodaltones (kDa).

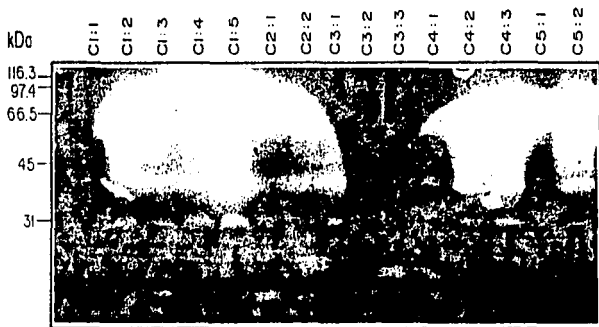


Tabla III. Subclonas del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis*, seleccionadas por su actividad proteolítica en geles de sustrato.

Clonas	Actividad proteolítica (Fig. 2).	
	Alta	Baja
C1	C1:1	C1:5
*C2	C2:2	-
C3	C3:1	C3:2
C4	C4:3	C4:1
C5	C5:2	C5:1

* El patrón de actividad de las clonas C2:1, C2:2, y no presentó diferencias, por lo cual sólo se escogió la clona C2:2.

Tercera clonación.

La tercera clonación se realizó con las subclonas seleccionadas en la Tabla III de acuerdo a su patrón de proteínas (Fig. 2), como se describió previamente. Al quinto día, se rescató una colonia aislada de cada caja de las subclonas a las que se les asignó el nombre oficial MXL para su identificación en trabajos posteriores (Tabla IV) además, de cada clona se prepararon lotes de 5 tubos con 20×10^6 parásitos/ml para su criopreservación. A excepción de la clona MXL-521 que se perdió al final del desarrollo de este trabajo por lo cual la clona C5:2 se reclonó

Las nuevas clonas obtenidas de la clona C5:2 se rotularon de la siguiente manera:

MXL-5212, MXL-5213 y MXL-5214.

Las subclonas provenientes de la tercera clonación se caracterizaron en este estudio en base a las propiedades y moléculas previamente definidas.

Tabla IV: Subclonas del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis* obtenidas en la tercera clonación.

Clonas	Subclonas, tercera clonación
C1	MXL-111; MXL-151
C2	MXL-221
C3	MXL-311; MXL-321
C4	MXL-411; MXL-431
C5	MXL-511; MXL-521; MXL-5212, MXL-5213, MXI-5214

B. CARACTERIZACION.

a) PROTEINASAS TOTALES DE LAS CLONAS MXL DEL AISLADO CNCD-147 de *T. vaginalis*.

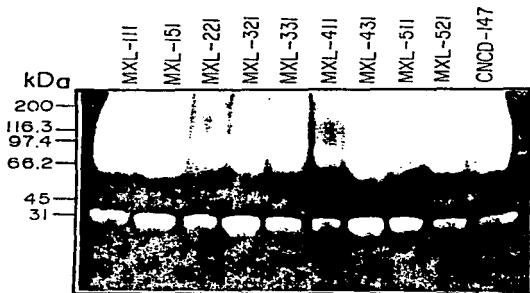
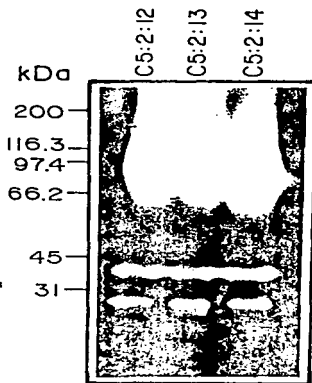
Las 12 clonas obtenidas se analizaron en base a su patrón de proteinasas totales, utilizando geles de sustrato copolimerizado con gelatina (Fig. 3). La parte A contiene las clonas MXL-151, MXL-111, MXL-221, MXL-311, MXL-321, MXL-411, MXL-431, MXL-511 y MXL-521, y la parte B a las clonas MXL-5212, MXL-5213 y MXL-5214 del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis*.

Todas las clonas presentaron actividad proteolítica, sin embargo hubo clonas que presentaron mayor actividad, clonas MXL-111 (A-1), MXL-151 (A-2) y MXL-431 (A-7); que el aislado parental CNCD-147 (A-10), clonas con menor actividad proteolítica, clonas MXL-221 (A-3) y MXL-411 (A-6). El resto de las clonas presentó actividad proteolítica semejante al aislado parental clonas MXL-311 (A-4), MXL-321 (A-5), MXL-511 (A-7), MXL-521 (A-8). En las clonas MXL-5212 (B-1), MXL-5213 (B-2) y MXL-5214 (B-3) no se observaron diferencias entre ellas (Fig. 3B), ni con respecto al aislado parental (Fig. 3A, carril 10).

Estos datos indican que los aislados de *T. vaginalis* en particular el CNCD-147, estan constituidos por poblaciones heterogéneas de parásitos que muestran patrones de proteinasas totales distintos.

Fig. 3.

Patrón de actividad proteolítica de proteinasas totales de las clonas MXL del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis*. En cada carril se cargaron 11 μ l del extracto clarificado de proteínas (equivalente a 440,000 parásitos) para cada clona. Para analizar las proteínas se corrió un gel de sustrato al 9 % como se describió en la Fig. 2. Las bandas de actividad se observan como zonas claras sobre fondo oscuro. El peso molecular de los marcadores está en kilodaltones. La parte A contiene la clona MXL-111, MXL-151, MXL-221, MXL-311, MXL-321, MXL-411, MXL-431, MXL-511, MXL-521 y al aislado parental CNCD-147. La parte B contiene a las clonas MXL-5212, MXL-5213 y 5214

A**B**

b) ANALISIS DE LAS CISTEIN-PROTEINASAS CP-65 y CP-30 QUE SE UNEN A LA SUPERFICIE DE CELULAS HeLa.

Mediante el ensayo de ligando-proteinasas, descrito en materiales y métodos, se analizó el patrón de actividad de las cistein-proteinasas que se unen a la superficie de células HeLa CP-65 y CP-30 de las clonas MXL del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis*, (Fig. 4), involucradas en citotoxicidad y adhesión, respectivamente.

En la figura 4 se muestra el patrón obtenido en este ensayo.

Todas las clonas MXL analizadas poseen cistein-proteinasas CP-65 y CP-30, aunque no todas presentaron la misma intensidad en las bandas de actividad (Fig.4).

Las clonas MXL-321 (Fig. 4A, carril 4), MXL-431 (A-7), MXL-521 (A-9), y la MXL-5214 (B-3), presentaron mayor actividad en las bandas correspondientes a la CP-65, y a la CP-30 que el aislado parental (A-10).

En las clonas MXL-331 (A-5), y MXL-411 (A-6) y MXL-511 (A-8), la actividad de las bandas correspondientes a la CP-65 y CP-30, es más baja en comparación a la actividad del aislado parental (Fig. 4A, carril 10).

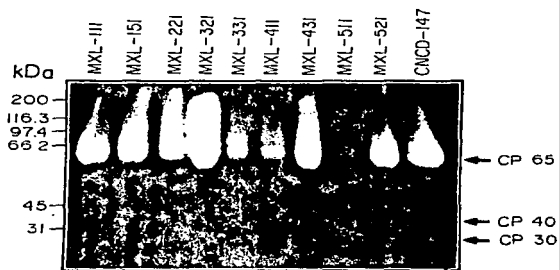
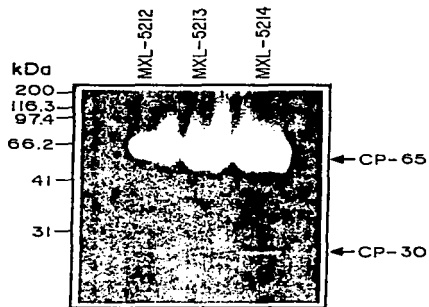
En cambio, en las clonas MXL-111 (A-1), MXL-151 (A-2), MXL-221 (A-3) MXL-5213 (B, carril 2) y MXL-5212 (B, carril 3) la actividad de

ambas cisteín-proteinasa es similar a la actividad presentada por el aislado parental (A-10).

Entre las clonas no se observaron diferencias en la actividad proteolítica de ambas cisteín-proteinasa, pero con respecto al aislado parental, la actividad presentada tanto en la CP-65 como en la CP-30 fué mayor (Fig. 4B).

Fig. 4.

Identificación de las cisteín-proteinasas CP-65 y CP-30 en las clonas MXL del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis*. En todas las clonas se empleó la misma cantidad de parásitos (20×10^6 parásitos), los cuales se lisaron y se hicieron interaccionar 24 hrs/4 °C con células HeLa fijadas (1×10^6 cels.), posteriormente, las proteínas asociadas a la superficie de las células HeLa se eluyeron con 30 μ l de buffer de muestra 1X incubándolas a 37 °C/20 min. Las proteinasas se analizaron en un gel de sustrato al 9 % como se describió en la Fig 2. En cada carril se cargaron 11 μ l de muestra. Las cisteín-proteinasas identificadas están señaladas por las flechas, los pesos moleculares de los marcadores estan en kilodaltones (kDa). El panel A incluye de la clona MXL-111 a la MXL-521 y al aislado parental CNCD-147; el panel B a las clonas MXL-5212, MXL-5213 y MXL-5214.

A**B**

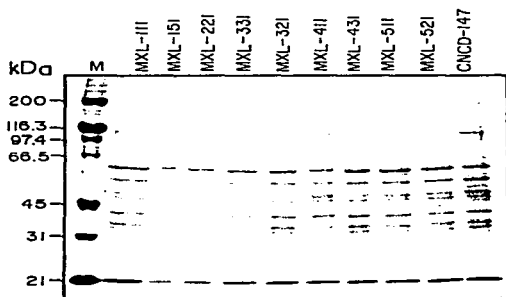
c) PROTEÍNAS TOTALES.

El análisis electroforético del patrón de proteínas totales de las clonas MXL del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis* usando la misma concentración de proteína en cada carril, no reveló diferencias entre las clonas estudiadas, como se muestra en la Fig. 5.

Estos resultados concuerdan con lo previamente establecido por Alderete en 1983. En la composición de proteínas entre cada clona no existen diferencias, aunque estas provengan de una población heterogénea, y las características morfológicas de cada una sea totalmente diferente.

Fig. 5.

Patrón de proteínas totales de las clonas MXL del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis*. El extracto de proteínas totales se obtuvo por precipitación con ácido tricloroacético (TCA) al 10 %. En cada carril se cargaron 30 µg de proteína y se analizaron por SDS-PAGE al 9 %. El gel se tiñó con azul de Coomassie. La M indica el carril de los marcadores de peso molecular expresado en kilodaltones (kDa).



d) ADHESINAS DE LAS CLONAS MXL DEL AISLADO CNCD-147 de *T. vaginalis*.

Al analizar el patrón de adhesinas de las clonas MXL se observó que todas poseen las cuatro adhesinas, aunque en cantidades diferentes (Fig. 6) a las del aislado parental (A-11). La clona MXL-111 (A-2), MXL-321(A-6) fueron las que presentaron mayor intensidad en las bandas de las cuatro adhesinas, en especial la banda correspondiente a la adhesina de 65 kDa, a diferencia de las clonas MXL-5212 (B-2) y la clona MXL-5213 (B-3), las cuales presentaron menor cantidad que el aislado parental (A-11).

La banda correspondiente a la adhesina AP-51, se observa con mayor intensidad en las clonas MXL-111 (A-2) y MXL-321 (A-6), la siguen en intensidad las clonas MXL-151 (A-3), MXL-331 (A-5), MXL-5212 (B-3) y la MXL-5214(B-4) en las que la banda de la adhesina AP-51 se observa en mayor cantidad con respecto al aislado parental (A-11). El resto de las clonas, MXL-221, MXL-411, MXL-431, MXL-511, MXL-521 y MXL-5212 (carriles A-4, A-6, A, A-10 y B2, respectivamente) no presentaron diferencias respecto al aislado parental (A11).

En la clona MXL-321 (A-6) la banda correspondiente a la adhesina AP-33, se observa en mayor cantidad en comparación con las clonas restantes y el aislado parental (A-11); le siguen en intensidad las clonas MXL-11 (A-2), MXL151 (A-3), MXL-331 (A-5), MXL-431 (A-8), MXL-521 (A-10), MXL-5214 (B-4), MXL-5213 (B-3). El resto de las clonas, MXL-221 (A-4), MXL-411 (A-7), MXL-511 (A-9) presentaron cantidades semejantes a la banda AP-33 del aislado parental (Fig. 6A-11).

Por último, en todas las clonas, la banda correspondiente a la adhesina AP-23, se detectó en una cantidad muy baja al igual que en aislado parental (Fig. 6A-11); sin embargo la clona MXL-5212 (B-2) fue la clona que presentó menor cantidad en las cuatro adhesinas identificadas en este ensayo.

En terminos generales, podemos decir que la clona que presentó mayor cantidad de adhesinas fue la clona MXL-321, y las clonas que presentaron menor cantidad de adhesinas fueron las clonas MXL-221, la MXL-521 y la clona MXL-5212.

Tabla V: Análisis comparativo de la cantidad de cada una de las adhesinas en la clonas MXL del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis*.

	AP-65	AP-51	AP-33	AP-23
CNCD-147	++	++	++	+
MXL-111	+++	+++	+++	+++
MXL-151	+++	+++	+++	+++
MXL-221	++	++	++	+++
MXL-331	+++	+++	+++	+++
MXL-321	++++	++++	++++	+++
MXL-411	++	++	++	++
MXL-431	+++	++	+++	++
MXL-511	++	++	++	++
MXL-521	+++	++	+++	++
MXL-5212	+	+	+	++
MXL-5213	++	+++	+++	++
MXL-5214	++	+++	+++	++

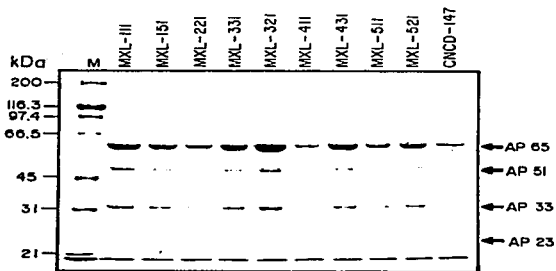
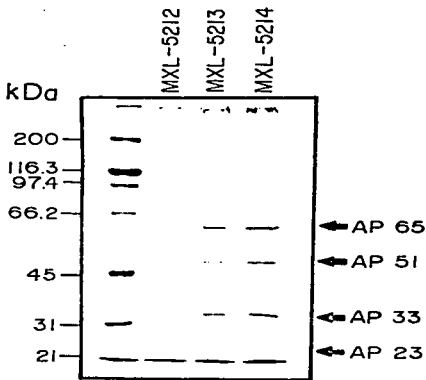
+ : Menor cantidad que el aislado parental CNCD-147.

++ : Mayor cantidad que el aislado parental CNCD-147.

++++ : Máxima cantidad detectada

Fig. 6.

Patrón de las adhesinas de las clonas MXL del aislado CNC-147 de *T. vaginalis*. En todas las clonas se usó la misma cantidad de parásitos (20×10^6), los cuales se lisaron en presencia de TLCK 1 mM y Leupeptín 0.2 mM. El lisado se hizo interaccionar 24 hrs a 4 °C con 1×10^6 células HeLa fijadas. Las adhesinas se eluyeron hirviéndolas 3 min con 30 µl de buffer de muestra 1X, y se analizaron por electroforesis en SDS-PAGE al 9 %. Peso molecular relativo de las adhesinas 65 kDa (AP-65), 51 kDa (AP-51), 33 kDa (AP-33), y 23 kDa (AP-23), las cuales están indicadas por las flechas. Los marcadores de peso molecular están en kDa. La Fig. 6 panel A, muestra el patrón de adhesinas de la clona MXL-111 a la clona MXL-521, el panel B muestra el patrón de adhesinas de las clonas MXL-5212, MXL-5213 y MXL-5214 del aislado CNC-147 de *T. vaginalis*, obtenidas por el ensayo de ligando-adhesinas descrito en materiales y métodos.

A**B**

e) ADHESION.

Para determinar los niveles de adhesión de cada una de las clonas, se realizaron tres experimentos de adhesión a monocapas de células HeLa, en los cuales, cada clona se analizó por triplicado, los datos presentados corresponden a un experimento representativo se muestran en la Fig. 7.

Estos resultados obtenidos muestran que existe una gran variabilidad en los niveles de adhesión de las 12 clonas analizadas.

Al tomar los niveles de adhesión absoluta de 40% del aislado parental CNCD-147 como el 100%, vemos que las clonas MXL-321, MXL-5212, MXL-5213 y MXL-5214 fueron las clonas más adhesivas, ya que presentaron un nivel de adhesión mayor al 100%, lo cual nos permite caracterizarlas como las clonas más adhesivas (Fig. 7).

Las clonas MXL-111, MXL-151, MXL-331 y MXL-511 presentaron una adhesión entre el 80 y 85% (Fig. 7).

Las clonas menos adhesivas presentaron niveles de adhesión menores al 80%, las cuales fueron las clonas MXL-411 con 60%, y la MXL-521 con 40.2% (Fig. 7).

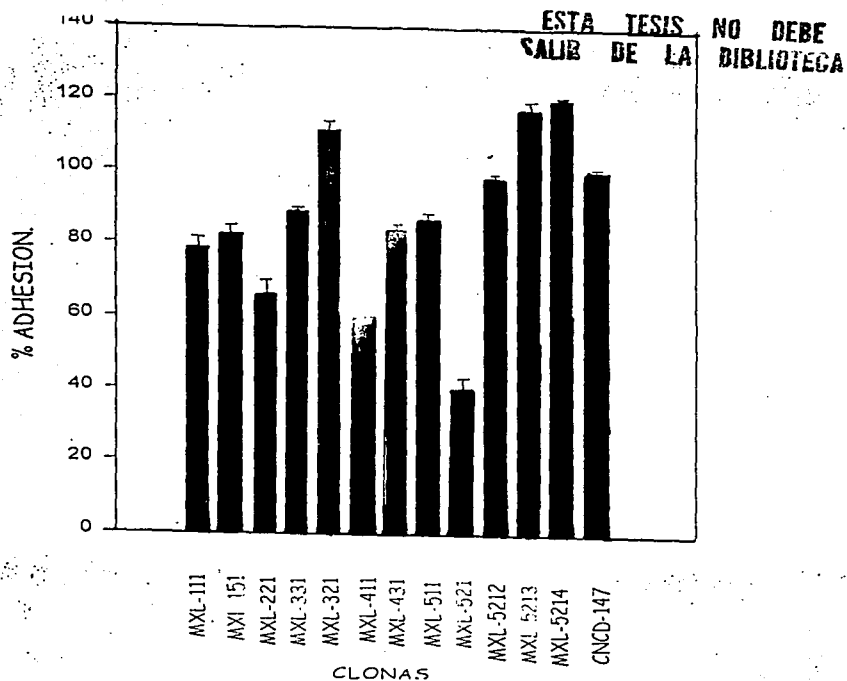


Fig. 7. Niveles de adhesión de las clonas MXL del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis*. Se utilizaron 2×10^6 parásitos marcado con $40 \mu\text{Ci}$ de ^3H .

En base a los resultados de la Fig. 7, las clonas se reagruparon en tres niveles de adhesión (Tabla VI).

Tabla VI: Niveles de adhesión de las clonas del aislado CNCD-147 de *T.vaginalis*.

Clonas	alta ^a	media ^b	baja ^c
C1		MXL-111; MXL-151	
C2			MXL-221
C3	MXL-321	MXL-331	
C4		MXL-431	MXL-411
C5		MXL-511	MXL-521
C5:2	MXL-5212		
	MXL-5213		
	MXL-5214		

^a adhesión mayor al 100%, referido al valor del aislado parental, el cual fué del 100%.

^b adhesión entre el 80 y 100% de adhesión, referido al valor del aislado parental.

^c adhesión menor al 80%.

En la Fig. 7 se puede comprueba que un aislado con un nivel de adhesión "x", en realidad está compuesto de una población heterogénea, que en forma individual puede presentar mayor ó menor grado de adhesión, lo cual puede observarse con mayor facilidad en poblaciones homogéneas, como lo podemos ver en este trabajo.

ñ) CORRELACION ENTRE LOS NIVELES DE ADHESION Y EL PATRON DE ADHESINAS.

Relacionando el por ciento de adhesión de cada clona, con el patrón de adhesinas obtenido, vemos que en algunas de las clonas, la cantidad de adhesinas es proporcional al por ciento de adhesión, ya que las clonas que presentaron mayor por ciento de adhesión y mayor cantidad de adhesinas fueron las clonas MXL-321, y la clona con menor por ciento de adhesión fué la clona MXL-221 y la clona MXL-521, las cuales, mostraron menor cantidad de adhesinas con respecto al control.

Las clonas restantes se mantuvieron sin mostrar diferencias significativas tanto en el ensayo de adhesión, como en la cantidad de adhesinas mostrada en la Fig. 6.

Arroyo y col., en 1992, reportaron que en *T.vaginalis*, las adhesinas, median la interacción de este parásitos con células epiteliales, y que el aumento en la cantidad de adhesinas, incrementaba los niveles de citoadherencia de los parásitos, lo cual apoya los resultados obtenidos anteriormente descritos.

g) CITOTOXICIDAD.

Para determinar los niveles de citotoxicidad de las diferentes clonas se realizaron tres experimentos, analizando cada clona por triplicado, los datos mostrados, corresponden a un experimento representativo (Fig. 8).

El porcentaje de citotoxicidad de cada una de las clonas esta referido al valor absoluto del aislado parental, el cual se tomó como el 100% de citotoxicidad.

Las clonas más citotóxicas fueron la MXL-221 con 99.9%, la MXL-5213 con 97.4 %, la MXL-331 y la MXL-521, ambas con un 100%.

La clona menos citotóxica con respecto al aislado parental fue la MXL-151, cuyo porcentaje de citotoxicidad fue de 68.07%.

Las clonas restantes presentaron un porcentaje de citotoxicidad del 85% en promedio.

Estos datos permitieron agrupar a las clonas MXL en la siguiente tabla

Tabla VII: Niveles de citotóxicidad de las clonas MXL del aislado

CNCD-147 de *T vaginalis*.

Clonas	alta	media	baja
MXL-111		86%	
MXL-151			61.4%
MXL-221	99%		
MXL-331	100%		
MXL-321		82.5%	
MXL-411		85%	
MXL-431		85%	
MXL-511		89%	
MXL-521	100%		
MXL-5212		84.6%	
MXL-5213	97.4%		
MXL-5214		77.2%	

El porcentaje de citotóxicidad de cada clona está referido al valor del aislado parental de 90%, el cual se tomó como 100%.

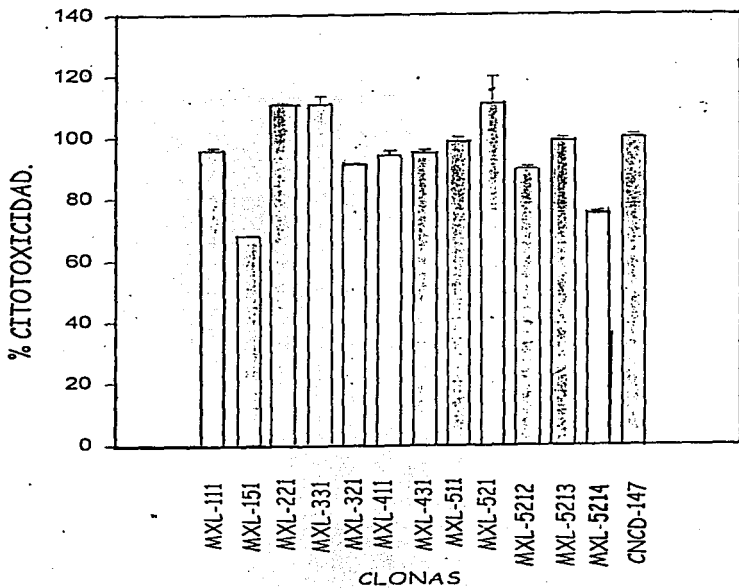


Fig. 8. Niveles de citotoxicidad de las clonas MXL del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis*. Se utilizaron 2×10^6 parásitos, se utilizaron monocapas de células HeLa a una densidad de 5.5×10^4 cél/pozo. La interacción se realizó a $37^\circ\text{C}/1$ hr.

En base a los resultados anteriormente mostrados, se realizó una comparación entre los niveles de adhesión y los niveles de citotóxicidad, los cuales se muestran en la siguiente tabla.

Tabla VIII: Comparación de los niveles de citotóxicidad y adhesión de las clonas MXL del aislado CNCN-147 de *T. vaginalis*.

Clonas	Adhesión	Citotoxicidad
MXL-111	++	++
MXL-151	++	+
MXL-221	+	+++
MXL-331	++	+++
MXL-321	+++	++
MXL-411	+	++
MXL-431	++	++
MXL-511	++	++
MXL-521	+	+++
MXL-5212	+	++
MXL-5213	++	+++
MXL-5214	+++	+

- + Baja adhesión (menos del 80%); baja citotoxicidad (menos del 80%).
- ++ adhesión intermedia (80-85%); citotoxicidad intermedia (menos del 100%, pero mayor al 80%).
- +++ adhesión alta (más del 100%); citotoxicidad alta (100%).

Los resultados muestran que las clonas MXL-111, MXL-431, y la MXL-511 obtuvieron una adhesión y una citotoxicidad intermedia.

Las clonas MXL-221, y la MXL-521, son poco adhesivas, pero muy citotóxicas.

Las clona MXL-331 y MXL-5213 son adhesivas y muy citotóxicas.

La clona MXL-321 es muy adhesiva, y medianamente citotóxica.

Las clonas MXL-411 y MXL-5212 son poco adhesivas y medianamente citotóxicas.

La clona MXL-5214 es muy adhesiva y poco citotóxica.

Esto sugiere, que en la citotoxicidad hacia la célula blanco además de estar mediada por la adhesión, estan participando otros factores moleculares hasta ahora desconocidos, entre los cuales se involucran a las proteinasas CP-30 y CP-65. Por otro lado, para la citotoxicidad la adhesión es necesaria mas no suficiente.

La obtención de clonas con diferentes niveles de adhesión y citotoxicidad nos permite poder hacer una selección de alguna clona en particular dependiendo del estudio a realizar, es decir, podemos requerir una clona que sea muy adhesiva pero poco citotóxica, o bien una clona que sea

muy citotóxica y muy adhesiva, y así sucesivamente la elección de la clona dependerá de las necesidades a cubrir de cada investigador.

h) Participación de la CP-65 y CP-30 en los procesos de citotoxicidad y la adhesión de *T.vaginalis*, hacia la célula blanco.

La clona MXL-321 presentó mayor actividad proteolítica tanto en la CP-65, como la CP-30, y es esta clona la más adhesiva y citotóxica.

La clona MXL-521 presentó mayor actividad en la CP-65 que en la CP-30, y su porcentaje de citotoxicidad fué del 100%, y de adhesión el 40.25%.

La clona MXL-221 presentó mayor actividad en la CP-65, y menor actividad en la CP-30, y su porcentaje de citotoxicidad fué del 99%, y el de adhesión del 26.4%.

La actividad de la CP-30 en la clona MXL-111 no presentó diferencias significativas con respecto a la actividad observada en el aislado parental, reflejándose en sus porcentos de adhesión, ya que ambas presentaron un porcentaje de adhesión del 30%. La actividad de la CP-65 en

la clona fué ligeramente menor que la del aislado parental, por lo cual fué también menos citotóxica que el aislado parental.

Las clonas restantes en el panel A, no presentaron diferencias con respecto al aislado parental, al igual que en los ensayos de citotóxicidad y de adhesión.

En el panel B de la figura se observa que la clona MXL-5214 (carril 3) presentó mayor actividad en la CP-30 que las clonas MXL-5213 (carril 1) y MXL-5212 (carril 2), y que el aislado parental, y fue esta clona la que presentó el porcentaje de adhesión más alto ya que como se puede observar en la figura 7 fué más del 100%. La clona que presentó menor actividad en la CP-30 fué la clona MXL-5212 (carril 1), así mismo fué la menos adhesiva. La clona MXL-5213 (carril 2) no presentó diferencias significativas con respecto al aislado parental.

i) DETECCIÓN DEL VIRUS DE DOBLE CADENA DE RNA (dsT_w) de *T. vaginalis* en las clonas MXL del aislado 147.

Mediante el análisis de ácidos nucleicos en geles de agarosa de cada una de las clonas MXL (Fig. 9), y comparando los resultados con el del aislado parental CNCD-147 así como con el control positivo (CNCD-190) y

el con el control negativo (CNCD-188), en las clonas MXL-431, MXL-5121 y MXL-521, se observó una banda de aproximadamente 5.5 kb, la cual corresponde al virus de doble cadena de RNA (Koshnan y Alderete, 1994).

Estos resultados sugieren que tres clonas independientes provenientes de un aislado aparentemente negativo, están infectadas por el virus de doble cadena de RNA, no obstante que el aislado parental es un aislado virus negativo, esto puede deberse a que las clonas MXL-511 y MXL-521 provienen de la clona 5:1, y 5:2 respectivamente, las cuales fueron clonadas en presencia de dimetilsulfoxido (DMSO), y que éste, haya despertado al virus, ó bien, haya provocado alguna mutación en ellas, ó en su defecto, es posible que dentro de la población heterogénea del aislado parental existían algunos parásitos infectados por el virus, pero por estar en mucho menor cantidad, la banda correspondiente al dsTvv no podía ser observada.

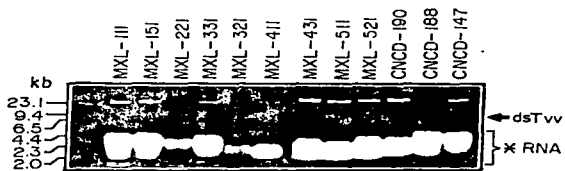
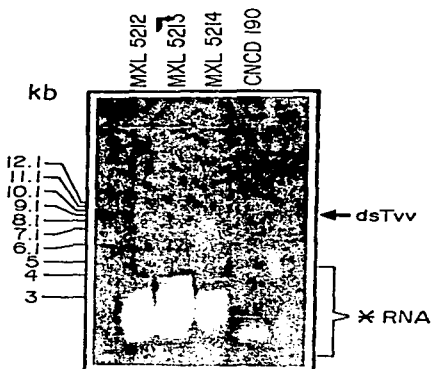
La figura 9 muestra los resultados obtenidos en este ensayo.

El panel A presenta los resultados de las clonas MXL-111 a la clona MXL-521; el panel B presenta los resultados de las clonas MXL-5212, MXL-5213 y MXL-5214.

La posición de la banda del dsTvv, está indicada por las flechas.

Fig. 9.

Detección del virus de doble cadena de RNA (dsTvv) en las clonas MXL del aislado CNCD-147 de *T. vaginalis*. La extracción de ácidos nucleicos se realizó como se describe en Materiales y Métodos, en cada carril se cargaron 5 μ l de muestra, después de correr el gel, se tiñó con bromuro de etidio al 0.5 μ g/ml, se utilizaron marcadores Lambda Hind III los cuales están expresados en kilobases (kb). El aislado CNCD-190 se utilizó como control positivo para virus, y como control negativo al aislado CNCD-188. El dsTvv de las clonas se indica por las flechas, el asterisco señala el RNA. La banda superior corresponde al DNA genómico de *T. vaginalis*. El panel A contiene de la clona MXL-111 a la clona MXL-521, el panel B contiene a las clonas MXL-5212, MXL-5213 y MXL-5214.

A**B**

VI. DISCUSION.

La mayoría de los estudios *in vitro* sobre la bioquímica y factores de virulencia de este protozooario se han realizado con aislados constituidos por poblaciones heterogeneas con diferentes genotipos. La estrategia utilizada en el presente trabajo consistió en la obtención de poblaciones homogéneas, mediante la clonación en agar semisólido, seguido por la caracterización general analizando algunos de los factores de virulencia que posee *T. vaginalis*, y las moléculas que participan en dichos procesos.

Las primeras clonas obtenidas a partir del aislado CNCD-147 de *Trichomonas vaginalis* conformado por una población heterogénea se caracterizaron en base a su patrón de actividad de proteinasas totales en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina como sustrato con el fin de determinar la existencia de clonas deficientes en proteinasas (mutante natural). Desgraciadamente no encontramos ninguna mutante natural entre las clonas analizadas, ya que como se mostró en la sección de RESULTADOS, las 15 clonas obtenidas, presentaron actividad proteolítica, sin embargo, se obtuvieron clonas con diferentes niveles de actividad

proteolítica, permitiendonos seleccionar al menos 2 clonas de cada grupo, específicamente, una clona con actividad proteolítica alta y otra baja para realizar posteriormente una tercera clonación. Al final de la clonación se obtuvieron 12 clonas, a las cuales se les asignó el nombre de clonas MXL y se caracterizaron.

En cuanto a la actividad proteolítica total, las clonas MXL-111, MXL-151, MXL-431 y la clona MXL521, presentaron mayor actividad que el aislado parental, aunque algunas de las clonas, presentaron menor actividad que el aislado parental el cual se tomó como control, siendo el caso de la clona MXL-221 y MXL-411, el resto de las clonas presentaron una actividad similar a la del aislado parental, lo cual presenta evidencias de la heterogenicidad de la población de dicho aislado.

En la caracterización de las proteinasas que se unen específicamente a células HeLa utilizadas como células blanco, todas las clonas presentaron las dos proteinasas de peso molecular de 65 kDa y 30 kDs (CP-65 y CP-30) previamente reportadas por Arroyo y Alderete en 1995 proteinasas de superficie que también se unen a la superficie de las células del epitelio vaginal. Sin embargo, la actividad de las dos CPs presentada por las diferentes clonas fué variable con respecto al aislado parental, ya que como

se mostró en la sección de resultados, las clonas MXL-321 y MXL-431 presentaron mayor actividad en ambas proteinasas que el aislado parental, el patrón de actividad de las clonas MXL-331, MXL-411 y MXL-511 en ambas proteinasas fue menor con respecto al aislado parental, mientras que el patrón de las clonas restantes fue similar al del aislado parental, confirmando con esto una vez más la heterogenicidad en la población que conforman los aislados de *Trichomonas vaginalis*.

El patrón de adhesinas de cada clona así como del aislado parental, muestra que todos poseen cuatro proteínas con un peso molecular relativo al de las adhesinas reportadas por Arroyo y col., en 1992, de 65, 51, 33 y 23 kDa, así mismo, al estar presentes en cada clona, se demuestra por primera vez, que cada parásito posee las cuatro adhesinas, ya que recordemos, que una clona es un grupo de células provenientes de una sola célula progenitora por lo que todas poseeran la misma información genética. Además, al comparar la cantidad de adhesinas presentadas por el aislado parental con las de las clonas, vemos, que todas las clonas presentaron mayor cantidad de adhesinas, lo cual puede deberse probablemente, a que el crecimiento en el agar semisólido estimulara la expresión de una cantidad mayor de las adhesinas, ya que ha sido reportado por Lehker y col., en 1991,

que la cantidad y expresión de las adhesinas esta influenciada por factores ambientales como el fierro, en este caso, el paso por el agar semisólido y/o por la concentración de CO₂, ya que el crecimiento de las colonias se llevó a cabo en condiciones de anaerobiosis pudieran también influir de alguna manera en la síntesis y expresión de dichas proteínas.

En el patrón de proteínas totales de cada clona, no se observaron diferencias lo cual proporciona evidencias de que existe una gran similitud en la composición de proteínas que posee tanto el aislado parental de *T. vaginalis*, de acuerdo a la migración, intensidad y número de bandas obtenidas en los geles como el de las clonas, concordando por lo descrito por Alderete en 1983, en donde al examinar 30 clonas de dicho parásito, el patrón de proteínas totales no presentó diferencias tanto por fluorometría como en el análisis electroforético, concluyéndose, que tanto aislados diferentes, como clonas, no presentan diferencias en su composición de proteínas inmunogénicas.

Con respecto a las niveles de adhesión y citotóxicidad los resultados muestran que se obtuvieron clonas que son muy adhesivas y poco citotóxicas como la clona MXL-5214, clonas muy citotóxicas pero poco adhesivas como lo son las clonas MXL-221 y la MXL-521, y clonas con una

adhesión y citotoxicidad intermedias como las clonas MXL-111, MXL-431, y MXL-511, dichos resultados nos sugieren que la relación entre la adhesión y la citotoxicidad como factores de virulencia no es directamente proporcional, y que la adhesión no es suficiente para que se presente la citotoxicidad, sugiriendo la participación de otros factores además de la adhesión, ya que como vemos una clona muy adhesiva no necesariamente es muy citotóxica, y viceversa. Por otro lado, Arroyo y Alderete en 1995, postulan que en la citoadherencia y en la citotoxicidad participan proteinasas de superficie llamadas CP-30 y CP-65, las cuales fueron distinguidas por su inhibición diferencial con leupeptín y TLCK (inhibidores de cisteín-proteinasa). En dicho trabajo, observaron que cuando se pretrata a los parásitos vivos con leupeptín la proteinasa de 30 kDa (CP-30) se inhibe y la citoadherencia se reduce dramáticamente, siendo en algunos casos completamente abolida, mientras que el pretratamiento con TLCK inhibe tanto a la CP-65 como a la CP-30, con lo cual, los niveles de citoadherencia disminuyen al 50% y la citotoxicidad es completamente nula. Esto apoya fuertemente los resultados obtenidos en este trabajo, ya que las clonas que presentaron mayor actividad proteolítica en la CP-30 fueron las más adhesivas (clonas MXI-321, MXL-5212, MXL-5213 y

MXL-5214), así mismo, las clonas que presentaron mayor actividad proteolítica en la CP-65 que en la CP-30 resultaron ser muy citotóxicas y poco adhesivas, con lo cual se pone de manifiesto que la CP-65 está involucrada en el fenómeno de citotoxicidad, y la CP-30 en la adhesión, y explica la variación observada en ambos procesos de virulencia presentes en cada una de las clonas.

Se sabe que el aislado CNCD-147 de *T. vaginalis* es virus negativo, mas sin embargo, en la detección del dsTvV en cada una de las clonas, se detectó este virus en tres clonas MXL-431, MXL-511 y MXL-521, de las cuales las dos últimas se perdieron al final del trabajo.

Estos resultados nos indican que dentro de la población del aislado CNCD-147, existen parásitos infectados por el virus, pero que al estar en un bajo número, el virus no pudo ser detectado, confirmandonos una vez más la heterogenicidad de la población.

Por otra parte, existe la posibilidad de que el DMSO haya despertado al virus ó bien, que haya actuado como un agente mutágeno, dando como resultado la expresión del dsTvV, ya que hay que recordar que las clonas

MXL-511 y MXL-521 fueron clonadas en presencia de DMSO, como se describió previamente en Materiales y Métodos.

Finalmente podemos decir, que la obtención de clonas así como la caracterización de éstas, nos permite tener un mejor control para llevar a cabo estudios sobre los factores de patogenicidad de este parásito, ya que la variabilidad genética que existe entre cada aislado de *T. vaginalis* esta influenciada en gran parte por la presencia de poblaciones heterogéneas, por lo cual, este estudio presenta una alternativa para entender mejor dicha variabilidad, al proporcionar clonas conformadas por poblaciones homogéneas.

Por último, podemos decir que en base a los objetivos planteados al inicio del trabajo, estos fueron cubiertos en su totalidad.

VII. CONCLUSIONES.

En base a los objetivos planteados y a los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

- 1.- Se obtuvieron 12 clonas con diferentes activades biológicas.
- 2.- No se obtuvieron clonas deficientes en proteinasas, correspondientes a mutantes naturales.
- 3.- Se confirmó que la adhesión esta influenciada por la cantidad de adhesinas que posee cada clona.
- 4.- Se demostró que cada parásito posee las cuatro adhesinas previamente reportadas, basandose esto, en que la clonación nos permite obtener a partir de una célula poblaciones con las mismas características de la célula ancestral.

5.- La clonación permite obtener poblaciones homogéneas, con lo cual se pueden realizar estudios de biología molecular con resultados menos variables.

6.- Los factores de virulencia del aislado parental, no se pierden al obtenerse clonas, pero estos pueden variar.

7.- Se obtuvieron clonas muy adhesivas y poco citotóxicas, y clonas muy citotóxicas y poco adhesivas, lo cual nos permite seleccionar alguna, de acuerdo a las necesidades requeridas en estudios posteriores.

8.- La obtención de clonas no varió el patrón de proteínas totales del aislado parental.

9.- A partir de un aislado reportado como virus dsTvv negativo, se obtuvieron tres clonas virus dsTvv positivo.

VIII. PERSPECTIVAS.

Teniendo en cuenta la relevancia que tiene el poder contar con nuevas herramientas que nos permitan conocer y entender un poco mas acerca de los mecanismos y moléculas que de alguna manera intervienen en la patología de la tricomonosis causada por el parásito protozoario *Trichomonas vaginalis*, las perspectivas de este trabajo para continuar con estudios posteriores son las siguientes:

- a) Realizar analisis a nivel molecular de las moléculas que participan en la virulencia de *Trichomonas vaginalis*, responsables de algún proceso patológico en el hospedero como adhesinas, proteasas, receptores, etc..
- b) Realizar estudios controlados de variabilidad para determinar el tipo, adaptación fisiológica, mutaciones, y tasa de cambio.

IX. APENDICE.

I. MEDIO TYM pH 6.2, 500 ml.

Tripticasa (BBL)	10 g.
Extracto de levadura	5 g.
Maltosa	2.5 g.
Cisteína	0.5 g.
Acido ascórbico	0.1 g.
K_2HPO_4	0.4 g.
$KHPO_4$	0.4 g.

Ajustar pH, y aforar.

Se autoclavea 20 min/120 lb de presión.

II. REACTIVOS Y SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS.

a. SOLUCION DE ACRILAMIDA:

Acrilamida (30%)	29.2 g
Bisacrilamida (0.8%)	0.8 g
Agua cbp	100 ml

Agregar aproximadamente la mitad del volumen final de agua a la acrilamida. Agregar la bisacrilamida y mezclar hasta disolver. Filtrar por 0.45 μ m.

b) TRIS-Cl/SDS 4X pH 8.8.
(Tris-Cl 1.5M, 0.4% SDS)

Tris base. 91 g

SDS. 2 g

Ajustar pH a 8.8 con HCl 1N.

Aforar a 500 ml.

c) TRIS-Cl/SDS 4X pH 6.8.
(Tris-Cl 0.5M, SDS 0.4%).

Tris base. 6.05 g

SDS. 0.4 g

Ajustar pH a 6.8 con HCl 1 N.

Aforar a 100 ml.

d) PERSULFATO DE AMONIO AL 10%.

Preparar solución fresca, guardar a 4 °C protegido de la luz no más de 1 semana

II:	Gel separador al 9 %	Gel concentrador.
Acri/bis 30:0.8	4.50 ml	0.65 ml
Tris-Cl (pH 8.8)	3.75 ml	(pH 6.8) 1.25 ml
Agua	6.75 ml	3.05 ml
Persulfato de amonio al 10 %	0.05 ml	0.025 ml
TEMED	0.01 ml	0.005 ml

e) BUFFER DE MUESTRA 2X

Tris base. 1.52 g

glicerol. 20 ml

SDS. 2.0 g

f) BUFFER DE MUESTRA 1X.

buffer de muestra 2X. 500 µl

β-mercaptoetanol. 50 µl

Azul de bromofeno 150 µl

azul de bromofenol 1 mg. agua. 400 μ l
40 ml agua.
Ajustar pH a 6.8 con HCl 1 N.
Aforar a 100 ml.

g) STOCK AZUL DE BROMOFENOL AL 1%.

h) AZUL DE COOMASSIE AL 0.025%

Metanol. 50 %
Azul de Coomassie R-brillante 0.05 %.
Acido acético 10 %.
Agua. 40 %
Aforar a 1 lt.

i) SOLUCION DE STEINER.

Acido acético 5 %.
metanol 16.5 %.
Agua. 78.5 %
Aforar a 1 lt.

j) BUFFER DE ACETATOS 100 mM pH 4.5

13.6 g Acetato de sodio.
900 ml Agua desionizada.
Ajustar pH con ácido acético.
Antes de usar, adicionar 0.1% de β -mercaptoetanol.

k) TRITON X-100 AL 2.5%

25 ml de Tritón X-100.
Aforar a 1 litro.

IV. REACTIVOS Y SOLUCIONES PARA EL ENSAYO DE CITOTOXICIDAD.

a) PBS pH 7.0 1000 ml.

b) FORMALDEHIDO al 2% /PBS pH 7.0.

NaCl	8 g.	Formaldehído	5.4 ml.
KCl.	0.2 g		
Na ₂ HPO ₄	0.65 g		

c) CRISTAL VIOLETA AL 0.13 %.

Formaldehído	14.28 ml.
Etanol	35.71 ml.
Cristal violeta	0.13 g.

d) SDS/ETANOL

etanol.	25 ml
agua	25 ml.
SDS	0.5 g

V: REACTIVOS Y SOLUCIONES PARA ADHESINAS.

a) BUFFER NET pH 7.4.

NaCl	0.15 M.
EDTA	0.005 M.
Tris-Cl	0.05 M.
Ajustar pH con NaOH ó HCl	0.1 N.

b) TDSET.

Tris-Cl 1M pH 7.8	5 ml.
DOC al 10 %	10 ml.
SDS 20 %	2.5 ml.
EDTA 0.5 M, pH 8.0	10 ml.
Tritón X-100 100%	5 ml.

c) LEUPEPTIN 100 µg/ml.

d) TLCK 1 mM.

Ambas soluciones deben ser preparadas en fresco y en la cantidad necesaria.

e) SACAROSA al 10 % con rojo de fenol.

f) PBS/EDTA 0.2%.

PBS pH 7.0	500 ml.
EDTA	1 g.

VI: SOLUCIONES PARA EXTRACCION DE ACIDOS NUCLEICOS.

a) BUFFER TAE 50X, pH 8.5.

Tris-base 122.5 g.

Acido acético glacial 28.5 ml

Na₂EDTA·2H₂O 18.6 g.

Ajustar pH, y aforar a 1 litro.

b) BUFFER TE pH 7.4, 7.5 ú 8.

10 mM Tris-Cl, pH 7.4, 7.5

1 mM EDTA, pH 8.0.

c) BUFFER DE ACETATOS 3M pH 5.2 500 ml.

Acetato de sodio trihidratado 204 g.

Ajustar pH a 5.2 con ácido acético 3M.

Aforar.

d) FENOL EQUILIBRADO pH 7.8.

e) FENOL/CLOROFORMO 1:1.

f) GELES DE AGAROSA AL 0.75% EN TAE 1X.

BIBLIOGRAFIA.

1. - Alderete, J. F. 1983. Antigen analysis of several pathogenic strains of *Trichomonas vaginalis*. Infect. Immun. 39:1041-1047.
2. - Alderete, J.F., and Pearlman, E. 1984. Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers. Brit. J. Vener. Dis. 60:99.
3. - Alderete, J. F., and Garza, E.G. 1985. Specific nature of *Trichomonas vaginalis* parasitism of host cell surfaces. Infect. Immun. 50:701-708.
4. - Alderete, J. F., Garza, G.E 1988. Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence. Infect. Immun. 56:28-33.
5. - Alderete, J. F., Provenzano, D., Lecker, M. W. 1995. Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. Microbial Pathogenesis. 19:93-103.
6. Alderete, J. F. 1983. Identification of immunogenic and antibody-binding proteins on the membrane of pathogenic *Trichomonas vaginalis*. Infect. Immun. 40:284-291.
7. Alderete, J. F., J. Smith, and M. Spence. 1985. Heterogeneity of *Trichomonas vaginalis* and discrimination among trichomonal isolates and subpopulations by sera of patients and experimentally infected mice. Infect. Immun. 40:463-468.
8. Alderete, J. F., Garza, G. E., Smith, J., and Spence, M. 1986. *Trichomonas vaginalis*: Electrophoretic analysis reveals heterogeneity among isolates due to high molecular weight trichomonas proteins. Exp. Parasitol. 61:244-251.

9. Alderete, J. F., L. Suprun-Brown, and L. Kasmala. 1986. Monoclonal antibody to a major surface immunogen differentiates isolates, and subpopulations of *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.* 52:70-75.
10. Alderete, J. F., P. Demeš, A. Gombošova, M. Valent, A. Yánoška, H. Fabušova, L. Kasmala, G. E. Garza, and E. C. Metcalfe. 1987. Phenotype and protein-epitope phenotypic variation among fresh isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.* 55:1037-1041.
11. Alderete, J. F., Arroyo, R., Dailey, D. C., Engbring, J., Khoshnan, A., Lehker, M. W., and McKay, J., Molecular analysis of *Trichomonas vaginalis* surface protein repertoires. In *Molecular and cell biology of sexually transmitted diseases* (Wright D. and Archard L., Eds). *Molecular and cell biology of human diseases vol. 1*, pp 173-202, 1992. Chapman & Hall, Cambridge.
12. Alvarez, E. y Arroyo R., 1997 (manuscrito en proceso).
13. Arroyo, R., Gonzalez, Robles, A., Martínez-Palomo, A. and J. F. Alderete. 1993. Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. *Molec. Microbiol.* 7(2):299-309.
14. -Arroyo, R., and J. F. Alderete. 1989. *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infect. Immun.* 57:2991-2997.
15. - Arroyo, R., Engbring, J., and Alderete J. F. 1992. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Molec. Microbiol.* 6:853-862.

16. - Arroyo, R. and J. F. Alderete. 1995. Two *Trichomonas vaginalis* surface proteinases bind to host epithelial cells and are related to levels of cytoadherence and cytotoxicity. Arch. Med Res. 26:279-285.
17. Brasseur, P., and J. Savel. 1982. Evaluation de la virulence des souches de *Trichomonas vaginalis* par l'étude de l'effet cytopathogène sur culture de cellules. C. R. Soc. Biol. 176:849-860.
18. Cohen, B. L. 1973. Regulation of intracellular and extracellular neutral and alkaline proteases in *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. 79:311-320.
19. - Cohen, B. L. 1979. The neutral and alkaline proteases of *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. 77:521-528.
20. - Coombs, G. H., and M. J. North. 1983. An analysis of the proteinases of *Trichomonas vaginalis* by polyacrylamide gel electrophoresis. Parasitol. 86:1-6.
21. - Dailey, D. C., Chang, T., and Alderete, J. F. 1990. Characterization of a hemolysin of *Trichomonas vaginalis*. Parasitol. 101:171.
22. - Dailey, D. C., and J. F. Alderete. 1991. The phenotypically variable surface protein of *Trichomonas vaginalis* has a single tandemly repeated immunodominant epitope. Infect. Immun. 59:2083-2088.
23. - Garber, G. E., Bowie, W. R. 1990. The effect of *Trichomonas vaginalis* and the role of pH on the cell culture monolayers viability. Clin. Invest. Med. 13:71-76.
24. Gentry, G. A., Lawrence, N. and Lushbaugh, W. 1985. Isolation and differentiation of Herpes simplex virus and *Trichomonas vaginalis* in cell cultures. J. Clin. Microbiol. 22:199-204.

25. Gorrell, T. E. 1985. Effect of culture medium iron content on the biochemical composition and metabolism of *Trichomonas vaginalis*. *J. Bacteriol.* 161:1228-1230.
26. González-Garza, M. T., J. Arellano-Blanco, and H. Gómez-Estrada. 1977. Marcaje citoquímico de las enzimas proteolíticas de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med.* 8:139-144.
27. Heath, J.P. 1981. Behaviour and pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* in epithelial cell cultures. *Br. J. Vener. Dis.* 57:106-117.
28. - Hollander, D. H. 1976. Colonial morphology of *Trichomonas vaginalis* in agar. *J. Parasitol.* 62(5): 826-828.
29. - Honigberg, B. M. 1978. Trichomonads of importance in human medicine. In parasitic Protozoa, vol. 2. Keir, J.P. (ed). New York: Academic Press, Inc., p.276-454.
30. - Honigberg, B. M. (ed). 1990. Trichomonads parasitic in Humans, Springer-Verlag, New York.
31. - Khoshnan Ali, and Alderete, J.F. 1993. Multiple double-stranded RNA segments are associated with virus particles infecting *Trichomonas vaginalis*. *J. Virol.* 67:6950-6955.
32. - Khoshnan, A., Provenzano, D., and J.F. Alderete. 1994. Unique double-stranded RNAs associated with the *Trichomonas vaginalis* virus are synthesized by viral RNA-dependent RNA-polymerase. 68:270-274.

33. Khoshnan, A., and J. F. Alderete. 1994. *Trichomonas vaginalis* with a double-stranded RNA virus has upregulated levels of phenotypically variable immunogen mRNA. *J. Virol.* 68:4035-4038.
34. - Kotcher, E., and Hoogasian, A.C. 1957. Cultivation of *Trichomonas vaginalis*, Donné 1837, in association with tissue cultures. *J. Parasitol.* 43(supp):39-43.
35. - Krieger, J.N., Poisson, M.A., and M.F. Rein. 1983. Beta-hemolytic activity or *Trichomonas vaginalis* correlates with virulence. *Infect. Immun.* 41:1291-1295.
36. - Krieger, J.N., Ravdin, J.J., Rein, M.F. 1985. Contact-dependent cytopathogenic mechanisms of *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.* 50:778-786.
37. - Kusunose, M., T. Nakanishi, N., Minamiura, and T. Yamamoto. 1980. Yeast cell wall bound proteolytic enzymes. *Agric. Biol. Chem.* 44:2779-2784.
38. - Lahti, J. C., and Johnson P. 1992. Beta-succinyl-coenzyme A synthetase from *Trichomonas vaginalis* is a soluble hydrogenosomal protein with a amino-terminal sequence that resembles mitochondrial presequences. *J. Bacteriol.* 174:6822-6830.
39. - Lehker, M. W., Chang, T. H., and J. F. Alderete. 1990. Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for *Trichomonas vaginalis*. 171:2165-2170.
40. - Lehker, M. W., R. Arroyo and J. F. Alderete. 1991. The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoa *Trichomonas vaginalis*. *J. Exp. Med.* 174:1.

41. - Lockwood, B. C., M.J. North., K.I. Scott., A.F. Bremer, and G.H. Coombs. 1987. The use of a highly sensitive electrophoretic method to compare the proteinases of *Trichomonas*. *Mol. and Biochem. Parasitol.* 24:89-95.
42. - Lockwood, B. C., North, M. J. and Coombs, G. H. 1984. *Trichomonas vaginalis*, *Tritrichomonas foetus* and *Trichomitus batrachorum*: comparative proteolytic activity. *Exp. Parasitol.* 58:245-253.
43. - McKerrow, J. H., and M. J. Doenhoff. 1988. *Schistosoma* proteases. *Parasitology Today.* 4(12):334-339.
44. - McLaughlin, J., and M. Muller. 1979. Purification and characterization of a low molecular weight thiol proteinases from the flagellate protozoon *Tritrichomonas foetus*. *J. Biol. Chem.* 254:1526-1533.
45. - Neale, K.A., and J.F. Alderete. 1990. Analysis of the proteinases of representative *Trichomonas vaginalis*. 58:157-162.
46. - North, M. J., and G. H. Coombs. 1981. Proteinases of *Leishmania mexicana* amastigotes and promastigotes: Analysis by gel electrophoresis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3:293-300.
47. - North, M. J., Mottram, J. C., and G. H. Coombs. 1990. Cysteine-proteinases of parasitic protozoa. *Parasitology Today.* 6(8);270-274.
48. - North, M. J., C.D. R., and G.H. Coombs. 1990. The specificity of trichomonad cysteine proteinases analysed using fluorogenic substrates and specific inhibitors. *Mol. and Biochem. Parasitol.* 39:183-194.

49. - Pindak, F. F., Gardner, A. W., Mora de Pindak, M. 1986. Grow and cytopathogenicity of *Trichomonas vaginalis* in tissue cultures. J. Clin. Microbiol. 23:672-678.
50. - Pindak, F. F., Mora de Pindak, M., Gardner, W. A. Jr. 1993. Contact- indepent cytotoxicity of *Trichomonas vaginalis*. Genitourin. Med. 69(1):35-40.
51. - Provenzano, D., and J. F. Alderete. 1995. Analysis of human Immunoglobulin-degrading cysteine-proteinases of *Trichomonas vaginalis*. Infect. Immun. 63:3388-3395.
52. - Rangel, H. A., P.M.F. Araujo., I. J. B. Camargo. M. Bonfilto., D. Repka, J. B. Sakyrada, and A. M. Atta. 1981. Detection of a proteinase common to epimastigote, trypomastigote and amastigote of different strains of *Trypanosoma cruzi*. Tropmed. Parasitol. 32:87-92.
53. - Rasmussen, S.E., Nielsen, M.H., Lind, I., and Rhodes. J.M. 1986. Morphological studies of the cytotoxicity of *Trichomonas vaginalis* to normal human vaginal epithelial cell in vitro. Genitourin. Med. 62:240-246.
54. - Suprynowicz, F. A., and N. M. Allewell. 1979. Regulation of neutral protease activity through the life cycle of *Tetrahymena pyriformis*. Biochem. Biophys. Acta. 585:488-498.
55. - Ter Kuile, B.M. and Müller, M. 1994. Maltose utilization by extracellular hydrolysis follow by glucose transport in *Trichomonas vaginalis*. Parasitol. 110:37-34.
56. Yañez, C. y Arroyo, R. 1997. Manuscrito en proceso.

57. Wang, A., and C. C. Wang. 1986. The double-stranded RNA in *Trichomonas vaginalis* may originate from virus-like particles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7956-7960.
58. Wang, A., C. C. Wang., and J. F. Alderete. 1987. *Trichomonas vaginalis* phenotypic variation occurs only among trichomonads infected with the double-stranded RNA virus. J. Exp. Med. 166:142-150.