



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INMUNOGÉNICO
DE TRES PÉPTIDOS DE TRANSPORTADORES TIPO
ZIP DE *Trichomonas vaginalis* SOBRE LA FUNCIÓN
DE MACRÓFAGOS PERITONEALES MURINOS

TESIS

PRESENTADA POR

EMANUEL CEBALLOS GONGORA

EN OPCIÓN AL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2019



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INMUNOGÉNICO
DE TRES PÉPTIDOS DE TRANSPORTADORES TIPO
ZIP DE *Trichomonas vaginalis* SOBRE LA FUNCIÓN
DE MACRÓFAGOS PERITONEALES MURINOS**

TESIS

PRESENTADA POR

EMANUEL CEBALLOS GONGORA

EN OPCIÓN AL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2019



Mérida, Yuc., 12 de noviembre de 2019
Oficio Num.: PICQB/237/2019

Asunto: Autorización de digitalización

La tesis "Evaluación del potencial inmunogénico de tres péptidos de transportadores tipo zip de *Trichomonas vaginalis* sobre la función de macrófagos peritoneales murinos" presentada por Emanuel Ceballos Góngora, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de Maestro en Ciencias Químicas y Bioquímicas, ha sido aprobada en cuanto a su contenido científico y en cuanto a lo establecido en el Manual de Procedimientos del Posgrado Institucional en Ciencias Químicas y Bioquímicas, por lo que se le autoriza la digitalización de los ejemplares correspondientes.

Directora de la tesis

Dr. Víctor Ermilo Arana Argáez

Dr. Julio César Torres Romero

Sinodales

Firmas

Dr. Guillermo Valencia Pacheco

Dr. Julio Lara Riegos

Dr. Geovanny Nic Can

**ATENTAMENTE
"LUZ, CIENCIA Y VERDAD"**

**DRA. MAIRA RUBI SEGURA CAMPOS
COORDINADORA DEL POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

c.c. Archivo
MRSC

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, Dr. Julio César Torres Romero y Dr. Victor Ermilo Arana Argáez, les agradezco su confianza, enseñanzas, consejos, amistad y por el tiempo que me dedicaron a pesar de toda su carga laboral durante estos años, muchas gracias.

A mis sinodales, al Dr. Guillermo Valencia Pacheco, Dr. Julio César Lara Riegos y al Dr. Geovanny Nic Can, gracias por compartir sus experiencias, los consejos y por sus enseñanzas durante los seminarios, los cuales me hicieron mejor persona y profesional.

A la coordinadora del posgrado PICQB, Dra. Maira Rubi Segura Campos, agradezco su dedicación hacia el posgrado, por los conocimientos y consejos que pude adquirir de su persona dentro y fuera de clases, y por el ejemplo de pasión que muestra al trabajar.

A todos mis compañeros del Área de inmunología del Laboratorio de Farmacología y del Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular, gracias por su amistad, apoyo, colaboración, por todas las risas y buenos momentos que pasamos; en especial a Antonio, Iván-chan, Iván- Sosa, Roberto, Tahali que estuvieron a mi lado en los momentos más difíciles de este trabajo, y que sin duda este trabajo hubiera sido muy complicado sin su ayuda, gracias por compartir y dedicarme muchas horas a su lado.

A mis compañeros de posgrado, Vicente, Josué, Christofer, Claudia, Gina y Lili, gracias por su amistad y por su apoyo en mi proyecto con sus consejos.

A mi familia (Mis padres, Ismael, Alfonso, Karla L, José Antonio, tía Derly, Maricarmen B, y por supuesto Karla B) gracias por siempre ser un ejemplo de esfuerzo y confianza, que en cada uno de ustedes puedo ver que es dar lo mejor de uno mismo.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Farmacología y en el Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular de la Facultad de Química, de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), bajo la dirección del Dr. Julio César Torres Romero y el Dr. Víctor Ermilo Arana Argáez y formó parte del Proyecto "Identificación y caracterización molecular de transportadores de iones divalentes hierro (Fe^{2+}), zinc (Zn^{2+}) y calcio (Ca^{2+}) en el parásito protozoario *Trichomonas vaginalis*" con No. de registro SISTPROY FQUI-2015-0002, financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y agradecimiento por la beca concedida con CVU-861084.

RESUMEN

La tricomoniasis causada por el parásito *Trichomonas vaginalis*, es la infección de transmisión sexual, no viral, con mayor prevalencia a nivel mundial. El diagnóstico de esta infección se puede complicar por diversas situaciones como: el alto porcentaje de pacientes asintomáticos, las manifestaciones inespecíficas de vaginitis y la limitación de las herramientas de diagnóstico, cuya sensibilidad, especificidad y valor predictivo se ha demostrado que es menor en comparación a otros métodos serológicos y moleculares. Por tanto, este trabajo presenta un análisis bioinformático para identificar tres péptidos derivados de un transportador de Zn^{2+}/Fe^{2+} (Transportador tipo ZIP) de *T. vaginalis* (TvZIP) y evaluar su potencial inmunogénico a través de su capacidad para producir anticuerpos específicos mediante un esquema de inmunización en un modelo murino (Balb/C), y en su capacidad de estimular la producción de las citocinas proinflamatorias interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral- Alpha (TNF- α , por sus siglas en inglés) y especies reactivas de oxígeno (óxido nítrico, NO) e hidrógeno (peróxido de hidrógeno, H_2O_2) en macrófagos peritoneales murinos. Mediante programas bioinformáticos se analizaron las secuencias de aminoácidos de ocho proteínas tipo ZIP de *T. vaginalis* (TvZIP-1 a TvZIP-8), se identificaron tres péptidos (TvZIP-2, TvZIP-4 y TvZIP-8) con capacidad de ser reconocidos por el complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II, por sus siglas en inglés) y con características antigénicas, los péptidos fueron sintetizados para su uso. Ratones de la cepa Balb/C fueron sometidos a un esquema de inmunización con tres diversas concentraciones de los péptidos y se obtuvieron muestras de suero sanguíneo para evaluar los niveles de anticuerpos IgG específicos, también se obtuvieron macrófagos peritoneales murinos y fueron estimulados con los péptidos a sus diversas concentraciones, para evaluar las citocinas (IL-6 y TNF- α) y las especies reactivas NO y H_2O_2 . Los resultados mostraron que los péptidos de TvZIP-2, TvZIP-4 y TvZIP-8 presentaron potencial inmunogénico al estimular la producción de las citocinas IL-6 y TNF- α y las especies reactivas NO y H_2O_2 . De igual manera, los linfocitos B mostraron la capacidad de reconocer los péptidos y estimular la producción de anticuerpos IgG péptido específicos. En conclusión, se puede indicar que los péptidos TvZIP seleccionados por programas bioinformáticos fueron inmunogénicos al producir anticuerpos IgG péptido específicos en los ratones y al estimular la producción de las citocinas y las especies reactivas en los macrófagos peritoneales murinos; por ello, los péptidos TvZIP podrían utilizarse como posibles blancos para el diagnóstico de la tricomoniasis por métodos serológicos con mayor especificidad que los métodos microscópicos actuales, así como su potencial uso en posibles métodos terapéuticos.

ABSTRACT

Trichomoniasis is most common, non-viral, sexually transmitted infection, not viral, caused by the protozoan parasite called *Trichomonas vaginalis*. The diagnosis of the infection can be complicated by diverse situation such as the percentage of asymptomatic patients, non-specific manifestations of vaginitis and the limited of the diagnostic tools like sensitivity, specificity and predictive value, the sensibility of the results could be lower in comparison to other serological and molecular methods. The aim of this work using *in silico* methods, was to analyze and identify the best peptide derived from Zn²⁺/Fe²⁺ transporters (ZIP Transporters) in *T. vaginalis*, with the purpose of evaluate the immunogenic potential of the peptide mediated by the stimulation in the production of cytokines (IL-6 and TNF- α) and reactive species (NO and H₂O₂) in murine peritoneal macrophages. Briefly, we used diverse bioinformatics programs to analyze the eight zip transporters from *T. vaginalis*, were predicted three peptides (TvZIP) with antigenic characteristic's and capable of being recognized by the complex of MHC class II. The synthetic peptides were commercially manufactured. They were administered the peptides in strain Balb/C mice at three difference doses, with the goal to evaluate the levels of the specific IgG obtained by the stimulation and recognition of three peptide by B cell's. Later, were obtained murine peritoneal macrophages and stimulated with the three doses of the peptides, this has the purpose of find the cytokines (IL-6 and TNF- α) and the reactive species like nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide (H₂O₂) in the supernatants due to stimulation with the peptides. The results indicate, the TvZIP peptides have the potential of stimulating the production of proinflammatory cytokines and the reactive species, in the same way, the peptides can be recognized by the B lymphocytes and stimulated the production of antibodies towards to the peptides. As a conclusion, we can say that TvZIP peptides identified could be use in the diagnosis of trichomoniasis by serological methods with greater specificity and as possible therapeutic methods.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES	3
2.1.	<i>Trichomonas vaginalis</i>	3
2.2.	Hábitat.....	4
2.3.	Epidemiología.....	4
2.4.	Manifestaciones clínicas de la tricomoniasis	4
2.5.	Patología de la infección	5
2.5.1.	<i>Factores asociados al hospedero</i>	5
2.5.2.	<i>Factores asociados al parásito</i>	7
2.5.3.	<i>Mecanismos independientes de contacto</i>	8
2.6.	Regulación de Zn ²⁺ y Fe ²⁺ en <i>T. vaginalis</i>	9
2.7.	Transportadores tipo ZIP.....	9
2.8.	Respuesta inmune del hospedero frente a <i>T. vaginalis</i>	12
2.9.	Mecanismos de respuesta inmune humoral	12
2.10.	Mecanismos de respuesta inmune celular	13
2.11.	Transportadores iónicos con potencial inmunogénico.....	14
2.12.	NO y H ₂ O ₂ en la eliminación de antígenos	15
2.13.	Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC)	16
2.14.	Análisis <i>in silico</i>	18
III.	HIPÓTESIS	21
IV.	JUSTIFICACIÓN	23
V.	OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES.....	25
5.1.	Objetivo general	25
5.2.	Objetivos específicos	25
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1.	Análisis <i>in silico</i>	27
6.2.	Animales de experimentación.....	27
6.3.	Grupos experimentales	28
6.4.	Esquema de inmunización y toma de muestras sanguíneas.....	29
6.5.	Obtención, cuantificación, cultivo, tratamiento y activación de macrófagos	29
6.5.1.	<i>Obtención de macrófagos peritoneales</i>	29
6.5.2.	<i>Cuantificación de macrófagos</i>	30

6.5.3.	<i>Cultivo de macrófagos peritoneales</i>	31
6.5.4.	<i>Activación de macrófagos</i>	31
6.6.	Determinación de los niveles séricos de anticuerpos IgG, y de las citocinas IL-6 y TNF-α, en los sobrenadantes de cultivo, por la técnica ELISA 31	
6.6.1.	<i>Evaluación de la respuesta humoral mediante la determinación de niveles séricos de IgG</i>	32
6.6.2.	<i>Evaluación de la respuesta celular mediante la determinación de los niveles de las citocinas IL-6 y TNF-α</i>	33
6.7.	Determinación de los niveles de las especies reactivas, NO y H₂O₂	34
6.7.1.	<i>Óxido nítrico (NO)</i>	34
6.7.2.	<i>Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)</i>	34
6.8.	Análisis estadísticos	35
6.9.	Consideraciones éticas	35
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
7.1.	Identificación y selección de péptidos de la familia de proteínas de transporte tipo ZIP de <i>T. vaginalis</i> con el mayor potencial inmunogénico por medio de análisis <i>in silico</i>	37
7.2.	Evaluación de la respuesta inmune celular inducida por los péptidos seleccionados, mediante la determinación de citocinas (IL-6 y TNF-α) en macrófagos peritoneales murinos	42
7.3.	Determinación del efecto de los péptidos sobre la producción de NO y H₂O₂ en macrófagos peritoneales murinos	45
7.4.	Evaluación de la respuesta inmune humoral inducida por los péptidos, mediante la determinación de anticuerpos séricos IgG	49
VIII.	CONCLUSIONES	53
IX.	REFERENCIAS	55

I. INTRODUCCIÓN

Trichomonas vaginalis (*T. vaginalis*) es un protozoo flagelado, monoxeno, anaerobio causante de la infección de transmisión sexual (ITS) denominada tricomoniasis. La tricomoniasis es la infección con mayor distribución a nivel mundial; en el año 2018, México presentó 42,603 casos nuevos entre hombres y mujeres, siendo las mujeres de 25 a 44 años de edad las más afectadas; sin embargo, estos datos son una estimación, ya que la infección se puede presentar de forma asintomática; por lo cual, reflejar la situación actual de la infección es complicado, lo que ocasiona un problema de salud pública. La tricomoniasis tiene mayor prevalencia en mujeres, principalmente por las características microambientales de la vagina las cuales favorecen el desarrollo del parásito. Al igual que muchos organismos protozoarios, *T. vaginalis* necesita de diferentes proteínas transportadoras para interiorizar diversas moléculas que por sí solas no son capaces de producirse, las cuales son indispensables para su metabolismo, patogenicidad, adherencia y desarrollo, entre ellas se puede mencionar a las proteínas transportadoras de iones divalentes, entre los que destacan el hierro (Fe^{2+}) y zinc (Zn^{2+}). La entrada de Zn^{2+} y Fe^{2+} en los organismos está altamente controlada para evitar un potencial de intoxicación y *T. vaginalis* no es la excepción. Se ha reportado que el Zn^{2+} funge como tricomonocida a altas concentraciones, por lo que el parásito tiene mecanismos para la regulación de estos metales, como las proteínas transportadoras. Fernández y col.¹ recientemente identificaron ocho secuencias conservadas de genes de transportadores tipo ZIP en el genoma de *T. vaginalis*, que se expresan a nivel transcrito y codifican proteínas encargadas de regular la entrada del Zn^{2+} y Fe^{2+} al parásito. Esto confirma el requerimiento Zn^{2+} y Fe^{2+} en *T. vaginalis* para realizar sus funciones metabólicas y el uso de estas proteínas tipo ZIP para su regulación, por lo cual, estos transportadores podrían ubicarse como posibles blancos antigénicos para el sistema inmune.

II. ANTECEDENTES

2.1. *Trichomonas vaginalis*

En el año 1836, el biólogo francés Alfred Donné describió el parásito *T. vaginalis*, el cual es un protozoo flagelado, anaerobio que se presenta en forma de trofozoítos, no muestra estadios de resistencia como los quistes, solo tiene como huésped al ser humano (monoxeno), se localiza en tracto genitourinario humano, y es agente etiológico de la tricomoniasis.^{2,3}

El trofozoíto mide de 7-30 μm de largo y de 5-15 μm de ancho, adoptando en medios líquidos aspectos piriformes, semilunares o esferoidales con actividad locomotriz rápida, y en medios sólidos (agar) puede adoptar formas ameboides con actividad locomotriz lenta.^{4,5} Su citoplasma contiene el aparato de Golgi, retículo endoplásmico, vacuolas, núcleo e hidrogenosomas encargados de producir energía en condiciones anaeróbicas, ya que no posee mitocondrias. El aparato locomotor presente en el parásito posee un axostilo y cinco flagelos, cuatro de ellos anteriores y uno posterior adherido a una membrana ondulante (Figura 1).^{3,4,6,7}

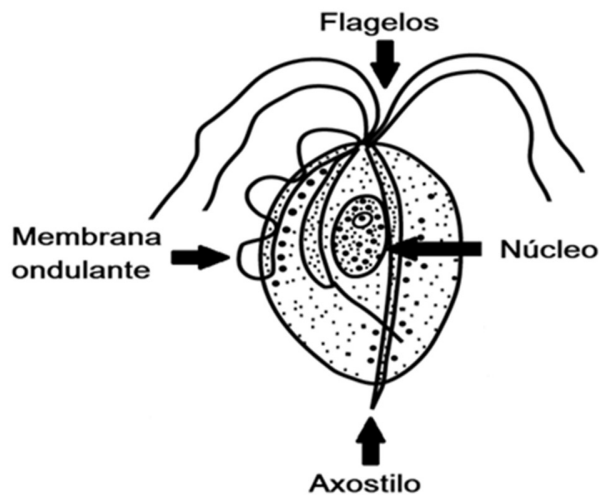


Figura 1. Morfología del trofozoíto de *T. vaginalis* modificado del CDC.⁸

2.2. Hábitat

El parásito se transporta por medio de las secreciones generadas durante el acto sexual, como el flujo vaginal, el líquido preseminal y el semen, invadiendo la mucosa genital donde se reproduce mediante fisión binaria en un periodo de incubación de entre 4 y 28 días. *T. vaginalis* tiene preferencia por las mujeres debido a las características microambientales del tracto genitourinario, localizándose en la vagina, glándulas periuretrales y glándulas de Bartolini, donde el parásito se favorece de la glucosa, del glucógeno presente en la cavidad vaginal, las sales de Fe^{2+} durante la menstruación y del pH alcalino para colonizar el epitelio vaginal. En los hombres el parásito se ubica en la uretra, próstata, vesículas seminales y en el surco balano-prepucial.^{3,4,9}

2.3. Epidemiología

La tricomoniasis urogenital es la infección de transmisión sexual (ITS), no viral, con mayor prevalencia a nivel mundial. En el año 2016 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que anualmente 357 millones de personas contraen alguna de las siguientes cuatro ITS como: clamidiasis, gonorrea, sífilis o tricomoniasis, siendo la tricomoniasis la infección más extendida en el mundo con una incidencia aproximada de 180 millones de infectados nuevos al año; sin embargo, este dato puede variar ya que la enfermedad no es de reporte obligatorio, además de ser asintomática mayormente en hombres y en menor cantidad en mujeres. México, en el año 2018 presentó 42,603 casos nuevos de tricomoniasis urogenital, siendo las mujeres de entre 25 y 44 años de edad las más afectadas.^{3,10-13}

2.4. Manifestaciones clínicas de la tricomoniasis

La tricomoniasis urogenital es una infección que puede presentar diversas manifestaciones clínicas tanto en hombres y mujeres. En las mujeres se puede presentar de manera sintomática y asintomática, se estima que el 25-50% de las mujeres infectadas permanecen asintomáticas. Las mujeres sintomáticas (50-75%) desarrollan manifestaciones clínicas a partir de los seis meses posteriores a la exposición al parásito.^{2,6,14,15}

Las mujeres pueden llegar a presentar diversos síntomas y signos como vaginitis, leucorrea, prurito vulvar, uretritis, irritación genital dolorosa, y al espéculo se puede apreciar la vagina con erosión general del epitelio y enrojecimiento con petequias de fácil sangrado denominado “cérvix en fresa”, el cual se presenta solo en el 2% de las pacientes. Durante el embarazo se pueden presentar complicaciones como aborto, parto

prematureo, ruptura prematura de membranas fetales, infección del producto, endometritis post-parto, entre otras. A su vez, la infección se asocia con una mayor susceptibilidad al virus inmunodeficiencia humana VIH-1, e incrementa el riesgo de desarrollar cáncer cervical y de contraer el virus del papiloma humano (VPH).^{6,15-17}

El hombre se considera portador, ya que la infección se presenta generalmente en el 75% de los casos de forma asintomática; sin embargo, puede llegar a presentar diversos síntomas y signos como uretritis, cistitis, edema prepucial, secreción uretral y erección dolorosa. De igual manera, la infección se ha relacionado con el riesgo a padecer cáncer de próstata y esterilidad.^{2,3,15}

No obstante, los signos y síntomas que se manifiestan tanto en hombres y mujeres son inespecíficos ya que se asemejan a los provocados por otros microorganismos como *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis* y *Gardnerella vaginalis*. Debido a esto, las manifestaciones clínicas no son un parámetro para diagnosticar la infección. Por ello, la búsqueda de métodos de diagnóstico específicos contra *T. vaginalis* es un tema relevante para el tratamiento de la infección de forma específica y eficaz.^{17,18}

2.5. Patología de la infección

La distinta sintomatología provocada por *T. Vaginalis* durante la infección se debe en gran manera a sus diversos mecanismos de virulencia, los cuales son dependientes e independientes del contacto con el huésped. El parásito se ha beneficiado de estos mecanismos de virulencia permitiéndole adaptarse al huésped con el fin de colonizar y mantener la infección en un ambiente hostil como el del nicho genitourinario, donde el pH, la microflora, la respuesta inmune, los niveles de Fe^{2+} , Zn^{+2} , Ca^{2+} , y poliaminas son parte clave en el asentamiento de la infección; aunque, hasta el momento no están del todo dilucidados estos mecanismos de virulencia.^{3,4}

2.5.1. Factores asociados al hospedero

2.5.1.1. pH vaginal y biota

El parásito se desarrolla en un pH próximo a 5; sin embargo, en un pH alcalino la infección se ve favorecida. El semen al ser de carácter alcalino favorece la transmisión del parásito durante el coito, y los fluidos secretados por la mujer aumentan el pH vaginal favoreciendo de igual manera la infección. Por otra parte, la existencia de enfermedades genitourinarias previas o una alteración en la disminución de *Lactobacillus acidophilus* vaginal, favorece el asentamiento de la infección. De igual manera, *T vaginalis* durante

la infección es responsable de un ambiente ácido en la vagina, el cual se produce al fagocitar las bacterias y *Lactobacillus* presentes en nicho genitourinario.^{3,4}

2.5.1.2. *Ciclo menstrual y niveles hormonales*

La exacerbación de los síntomas en la mujer está asociado a las fluctuaciones hormonales durante el transcurso del ciclo menstrual, donde cambios en los niveles de estrógeno y progesterona, como un incremento en la disponibilidad de Fe^{2+} a través de los glóbulos rojos en el aparato genitourinario y la disminución de la población de lactobacilos durante la menstruación, se convierten en otro factor que influye en el asentamiento del parásito.⁴

2.5.1.3. *Presencia de Hierro (Fe^{2+})*

El Fe^{2+} un elemento crucial en la exacerbación de la patogénesis de *T. vaginalis*, el cual participa como inductor de diversos genes asociados al asentamiento y colonización del parásito. Es también elemento esencial para su metabolismo, multiplicación, producción de energía en el hidrogenosoma, síntesis de proteínas, duplicación del genoma, funciones críticas de limpieza y transporte de oxígeno, además de regular diferentes mecanismos y factores de virulencia relacionados con la patogenicidad.^{1,4,7,19}

Un ambiente rico en Fe^{2+} favorece al parásito al permitirle regular proteínas como las adhesinas (AP) y las cisteín-proteasas (CP), las cuales se relacionan con los mecanismos de evasión del sistema inmune, las CP son encargadas de la degradación de la cadena pesada de inmunoglobulinas y el componente C3b del complemento. A su vez, el Fe^{2+} induce modificaciones en los componentes de la matriz extracelular del huésped, favoreciendo la adhesión de los trofozoítos de *T. vaginalis*; por el contrario, en condiciones de bajo Fe^{2+} el parásito induce otras proteínas que permiten la colonización del epitelio vaginal.⁴

2.5.1.4. *Presencia de Zinc (Zn^{2+})*

El Zn^{2+} es un elemento vital en las actividades catabólicas de *T. vaginalis*, como la expresión génica, en el metabolismo celular, y como un cofactor de virulencia. El nivel normal de Zn^{2+} (~ 9 mM) presente en el fluido prostático del hombre dificulta el crecimiento del parásito, debido al carácter citotóxico del Zn^{2+} , lo que explica por qué se presenta de forma asintomática la infección en la mayoría de los hombres; sin embargo, si los niveles de Zn^{2+} disminuyen (< 1.6 mM) existe un riesgo de desarrollar prostatitis crónica; pero, altas concentraciones de Zn^{2+} (>1.6 mM) se ha descrito que tiene un efecto tricomonocida. Este elemento regula negativamente algunas CP's (CP70, CP65, CP39, CP25 y CP20), las cuales se correlacionan de manera directa con el efecto citotóxico del parásito con las células.^{1,4,12,20}

2.5.1.5. *Homeostasis*

La homeostasis de Zn^{2+} y Fe^{2+} debe ser estrictamente regulada para mantener un equilibrio controlado de captación, utilización y almacenamiento, con el fin de asegurar la disponibilidad de metales divalentes de acuerdo con sus necesidades fisiológicas, ya que niveles excesivos o escasos de Zn^{2+} y Fe^{2+} pueden ser dañinos o tóxicos para *T. vaginalis*; por ello, *T. vaginalis* posee mecanismos como las proteínas transmembrana para introducir y regular la homeostasis de estos metales; sin embargo, hasta al momento no son bien comprendido y son motivo de estudio.^{1,20} *T. vaginalis* se considera un parásito obligado, ya que carece de habilidad para sintetizar diversas macromoléculas como purinas y pirimidinas, las cuales le son necesarias para su metabolismo, por lo que el parásito requiere de otras vías para la generación de nucleótidos.^{6,14,21}

2.5.2. *Factores asociados al parásito*

2.5.2.1. *Mecanismos dependientes de contacto*

La pared vaginal se conforma por un epitelio escamoso estratificado externo sustentado por un tejido conjuntivo. El soporte y mantenimiento de las células del epitelio vaginal (CEV) se basa en la red de macromoléculas que conforman la matriz extracelular. El parásito requiere interactuar con la superficie de la célula del huésped, donde proteínas como azúcares van a ser esenciales para llevar a cabo la interacción entre ambas células, durante este contacto se generan pequeños huecos entre ambas membranas que permiten al parásito controlar distintos factores como el pH o la concentración de iones de las células del hospedero.⁴

2.5.2.2. *Factores contacto-dependientes asociados a T. vaginalis*

a) Adhesión: La adhesión del parásito al huésped es un proceso multifactorial donde el pH, la temperatura, iones, el tiempo de contacto, y proteínas del parásito como las AP (AP120, AP65, AP51, AP33 y AP23), las cuales destacan por su diversidad funcional y el mimetismo molecular que presentan, son necesarias para llevar a cabo la interacción parásito-huésped y de esta manera establecer la infección. Otras biomoléculas como el lipofosfoglicano (LPG) el cual es el polisacárido de superficie más abundante de *T. vaginalis*, destaca su papel en el desarrollo de la respuesta inmunitaria mediada por la interacción con las células del huésped a través de lectinas, como las galectinas, localizadas en la superficie de CEV, ectocervicales y endocervicales. Por otra parte, el parásito es capaz de reconocer y unirse de forma específica a componentes de la matriz extracelular y de la membrana basal como la mucina, la fibronectina (Fn), la laminina o el colágeno de la mucosa vaginal, donde estos procesos se ven regulados por la concentración de Fe^{2+} . El parásito al adherirse al epitelio vaginal sufre un cambio morfológico pasando de una forma elipsoidal a una forma ameboide, incrementando de esta manera el área de la adhesión.⁴

b) Fagocitosis: La flora endógena vaginal actúa como mecanismo de protección de la mujer frente a la colonización de patógenos; sin embargo, el parásito tiene la capacidad para fagocitar CEV, lactobacilos, leucocitos, eritrocitos y levaduras, lo que ocasiona un aumento del pH vaginal y genera un microambiente que favorece el crecimiento y la multiplicación del parásito, beneficiándose de esta manera para la obtención de nutrientes y para evadir el sistema inmune del huésped. La fagocitosis de eritrocitos son fuente de ácidos grasos y Fe^{2+} que permiten la regulación de numerosos genes y factores ligados a la patogenia del parásito.⁴

2.5.3. Mecanismos independientes de contacto

El parásito secreta diversas sustancias tóxicas que van a intervenir en numerosos procesos vitales como:

a) Cisteín-proteasas (CP): Son factores líticos esenciales en los procesos de adherencia y colonización del tracto genitourinario, aunque también intervienen en procesos relacionados con la evasión del sistema inmune y con la adquisición de nutrientes. Las CP intervienen en la degradación de componentes de la mucosa y células del tracto genitourinario, con el fin de permitir la penetración del parásito a capas más profundas. Diversas CP participan en la degradación de componentes estructurales de la superficie de las mucosas como la Fn o el colágeno, la CP39 tiene la capacidad para degradar colágeno y pudiese estar involucrada en el nacimiento prematuro de las mujeres embarazadas, la CP65 o CP30 se involucran en procesos de citotoxicidad celular, la CP2, CP3 y CP4 inducen apoptosis en CEV. Otras CP tienen la capacidad para degradar las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas IgA, IgM e IgG como mecanismo de evasión del sistema inmune, así como la lisis del factor C3b del sistema del complemento. Al igual, las CP se involucran en los procesos relacionados con la adquisición de nutrientes por medio de la degradación de la hemoglobina para la adquisición de Fe^{2+} .^{3,4,12}

b) Factor de desprendimiento celular (CDF): Es una glicoproteína secretada por el parásito, que se inactiva a un pH inferior a 5 o por efecto de la temperatura. La producción de este factor se ve regulada por la presencia de estrógeno, pudiendo estar implicada en la exacerbación de los síntomas durante la menstruación por la disminución de los niveles de esta hormona. Esta proteína inmunogénica soluble tiene como función producir el desprendimiento del epitelio genitourinario favoreciendo la penetración del parásito a capas más profundas.⁴

2.6. Regulación de Zn^{2+} y Fe^{2+} en *T. vaginalis*

Los metales trazas como el Zn^{2+} y Fe^{2+} son fundamentales en la vida de cualquier organismo debido a su amplia necesidad en diversos procesos biológicos; en *T. vaginalis* estos metales participan en diversos procesos de gran importancia, como la regulación y expresión de proteínas, procesos metabólicos, crecimiento, supervivencia, mecanismos de evasión del sistema inmune y en los factores de virulencia.^{1,11}

La regulación de estos metales es de gran relevancia en todos los organismos, debido a su toxicidad a altas concentraciones; por ello, *T. vaginalis* requiere de mecanismos para mantener el balance de estos metales durante su almacenamiento y su uso en procesos fisiológicos. En *T. vaginalis*, se ha descrito que a concentraciones >1.6 mM de Zn^{2+} tiene un efecto tricomonocida; sin embargo, altas concentraciones de Fe^{2+} favorecen al parásito beneficiando su crecimiento y los factores de virulencia. Hasta el momento, en *T. vaginalis* se conoce muy poco acerca de los mecanismos de regulación de Fe^{2+} y Zn^{2+} , y las proteínas que participan en este proceso.^{1,12}

2.7. Transportadores tipo ZIP

Actualmente, se han descrito diversos tipos de proteínas de transporte de membrana involucrados en la homeostasis de Zn^{2+} y Fe^{2+} , como la familia ATPasas de tipo P (P1B-ATPasa, por sus siglas en inglés), la familia de la proteína de macrófagos asociada a la resistencia natural (NRAMP, por sus siglas en inglés), la familia de facilitadores de difusión de catión (CDF, por sus siglas en inglés), el transportador regulador de Zn^{2+} (ZRT, por sus siglas en inglés), y el transportador regulador de Fe^{2+} (IRT, por sus siglas en inglés) y las proteínas de transporte de metales de la familia ZIP, las cuales están presentes entre el reino eucariota; en la Tabla 1 se enlistan algunos organismos entre los cuales se ha identificado la presencia de proteínas de transporte tipo ZIP.^{1,22-25}

Tabla 1. Organismos reportados con homólogos de las proteínas de transporte de la familia ZIP

Organismo	Referencia
<i>Homo sapiens</i>	Gaither y col. ²⁶
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Guerinot. ²⁴
<i>Escherichia coli</i>	Grass y col. ²⁵
<i>Mus musculus</i>	Dufner y col. ²⁷
<i>Leishmania amazonensis</i>	Huynh y col. ²⁸
<i>Zea Mays</i>	Li y col. ²⁹
<i>Cryptococcus gattii</i>	Schneider y col. ³⁰
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Do y col. ³¹
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Fernández y col. ¹

Los miembros de la familia de proteínas de transporte tipo ZIP son una nueva familia involucrada el transporte de metales, identificados por primera vez en la planta *Arabidopsis thaliana*, participan en el ingreso de diversos iones metálicos a la célula como Cd^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} ; sin embargo, su función en la efluición de metales no se ha descrito. La mayoría de las proteínas ZIP se predice que poseen ocho dominios transmembrana con similar topología, con los extremos amino y carboxilo terminal localizados en la parte externa de la membrana plasmática. Las proteínas ZIP pueden variar en el tamaño de 309 a 476 aminoácidos; esta diferencia se debe en gran parte a la “región variable” (Figura 2), la cual se localiza entre los dominios III y IV. La región variable contiene residuos de histidina lo cual le permite afinidad a metales, considerándose como el sitio de unión a metales.^{1,24}

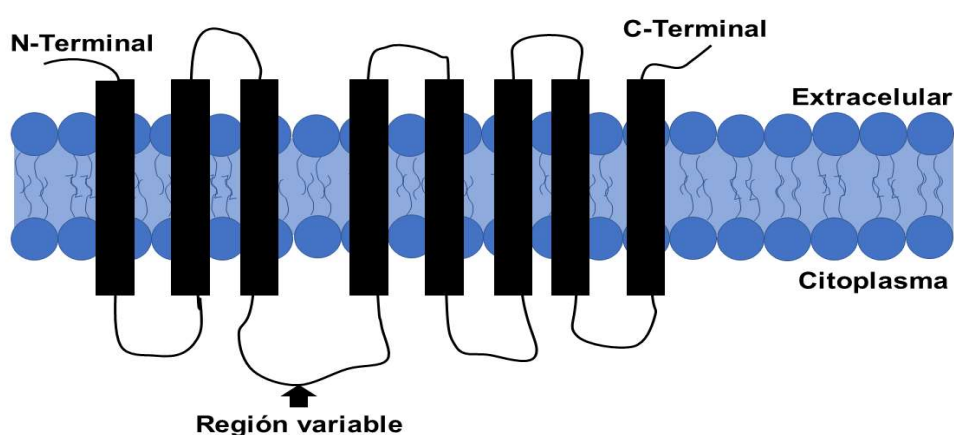


Figura 2. Topología de un miembro de la familia ZIP modificado de Guerinot.²⁴

Recientemente, Fernández y col.¹ identificaron mediante análisis *in silico* ocho genes correspondientes a transportadores tipo ZIP en el genoma de *T. vaginalis* (TvZIP), los cuales se encuentra involucrados en la homeostasis de elementos traza como Fe²⁺ y Zn²⁺. Los genes fueron identificados mediante alineamiento con *Accharomyces cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana* los cuales presentan secuencias representativas de la familia ZIP como se había descrito en la literatura. Se identificaron los tamaños aproximados de las proteínas las cuales van desde 208 (TvZIP-VII) a 299 (TvZIP-II) aminoácidos, relacionándose con el tamaño reportado en otros organismos. Las proteínas TvZIP identificadas poseen al menos un dominio ZIP y la presencia de ocho regiones transmembrana (TM) con los extremos amino y carboxilo en la superficie extracelular. Se realizaron análisis de la expresión a nivel transcrito de los genes *TvZIP* a diferentes concentraciones de Fe²⁺ y Zn²⁺ por medio de RT-PCR, donde se observó que los niveles de expresión de *TvZIP-I*, *TvZIP-III*, *TvZIP-V* y *TvZIP-VII* mostraron una regulación negativa relacionada con tratamientos a 1.5 mM de ZnSO₄, sugiriendo que estos cuatro transportadores evitan la acumulación de Zn²⁺ en *T. vaginalis*; por otro lado, los niveles de expresión de *TvZIP-II* y *TvZIP-IV* mostraron una diferencia en los niveles de expresión en diferentes concentraciones de FeSO₄ (Figura 3). Se concluyó que las proteínas TvZIP pudiesen involucrarse en la homeostasis de Fe²⁺ y Zn²⁺ en *T. vaginalis*.¹

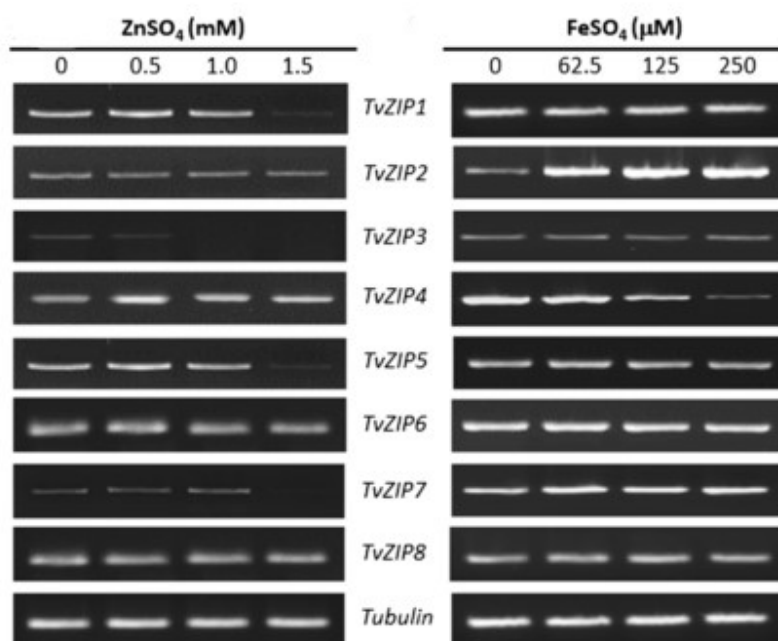


Figura 3. Perfil de expresión de los genes *TvZIP* en trofozoítos de *T. vaginalis* cultivados con diversas concentraciones de Zn²⁺ y Fe²⁺.¹

2.8. Respuesta inmune del hospedero frente a *T. vaginalis*

El conocimiento que se tiene acerca los mecanismo de patogenicidad de *T. vaginalis* se debe en gran parte a los estudios realizados en modelos experimentales y en los lavados vaginales de mujeres infectadas; a pesar de ello, se conoce muy poco sobre los mecanismos de respuesta inmune.^{18,32,33}

La respuesta inmune innata y adaptativa participan de manera significativa durante infecciones urogenitales. La respuesta inmune innata en el tracto vaginal se conforma por barreras físicas y bioquímicas, como las células epiteliales, el revestimiento con la mucosa, el pH ácido, células del sistema inmune innato, péptidos antimicrobianos y citocinas; por otra parte, el sistema inmune adaptativo se desarrolla durante la infección, promoviendo respuestas proinflamatorias para combatir al patógeno durante la infección.³³

El parásito induce una respuesta proinflamatoria e inmunosupresora, los mecanismos de patogenicidad de *T. vaginalis* son multifactoriales donde la adherencia del parásito, los receptores tipo Toll, CP, LPG, radicales libres y la generación de citocinas, interactúan en la inducción de la respuesta inmune local y sistémica que finalmente determina el resultado de la infección. La reinfección ocurre con frecuencia entre las parejas sexualmente activas y no tratadas simultáneamente, siendo las mujeres el grupo más afectado y los hombres el reservorio del parásito. Hasta el momento, el mecanismo de respuesta inmune contra *T. Vaginalis* no está completamente descrito y sigue siendo motivo de estudio^{6,33-35}

2.9. Mecanismos de respuesta inmune humoral

Durante la infección por *T. vaginalis*, se ha identificado la presencia de anticuerpos específicos IgM, IgA e IgG en suero, secreciones locales y en lavados vaginales; sin embargo, la inmunidad mediada por los anticuerpos es transitoria, y hay poca evidencia sobre su eficacia en la eliminación del parásito. La función protectora de los anticuerpos durante la infección por *T. vaginalis* aún es tema de estudio y la búsqueda de una respuesta inmune humoral eficaz y persistente aún es un desafío.^{33,36}

Estudios previos en modelos murinos infectados con *T. vaginalis* provenientes de aislados de pacientes mujeres sintomáticas y asintomáticas, han descrito la cinética de las inmunoglobulinas producidas en respuesta al parásito. Donde se ha reportado que los títulos de IgG, IgG1 e IgM son significativamente mayores en los ratones infectados con aislados de las pacientes sintomáticas, en comparación con los ratones infectados con los aislados de las pacientes asintomáticas. Por el contrario, los ratones infectados con *T. vaginalis* aislados de pacientes asintomáticas mostraron un aumento específico en los títulos de IgA, en comparación con ratones infectados con aislados de las

pacientes sintomáticas, sugiriendo que IgA podría estar protegiendo de una infección más severa.^{18,33}

La tricomoniasis en hombres suele ser asintomática y autolimitada en comparación con las mujeres. En el hombre se ha observado, tanto en orina como en semen, una escasa cantidad de anticuerpos contra *T. vaginales*, y un número menor de parásitos en comparación con la mujer, lo cual se debe al paso constante de orina en el tracto urogenital y a los niveles de Zn²⁺ presentes.^{12,18} En muestras uretrales de pacientes hombres sintomáticos, se ha observado un incremento en los títulos de IgM, IgG1 e IgG2, en comparación con muestras de pacientes hombres asintomáticos. No obstante, los niveles de los títulos de IgA, IgG3 e IgG4 de pacientes asintomáticos se mostraron significativamente mayores, en comparación con los títulos de los pacientes sintomáticos; lo cual, se relaciona con lo reportado en los ratones infectados con *T. vaginalis* aislados de las pacientes mujeres sintomáticas y asintomáticas.^{18,33}

Aunque las inmunoglobulinas son detectadas durante la infección con *T. vaginalis*, su presencia no parece proporcionar protección durante o después de la infección; esto podría deberse, a que el parásito presenta diversos mecanismos de evasión del sistema inmune, como el mimetismo molecular y la presencia de CP como la CP30 que actúa como mecanismo de evasión del sistema inmune al degradar el sistema del complemento y la cadena pesada de IgM, IgG e IgA y con ello evadir la respuesta de los anticuerpos. Sin embargo, esclarecer el mecanismo de anticuerpos específicos contra *T. vaginalis* es un tema de estudio, debido a que tal vez los niveles de la inmunoglobulinas durante la infección natural son ineficaces, pero los niveles de inmunoglobulinas posteriormente a una vacunación podrían llegar a ser protectores, sugiriendo que el modo de presentación del antígeno podría tener un efecto diferencial sobre la protección.^{33,36-39}

2.10. Mecanismos de respuesta inmune celular

En la respuesta inmune celular frente a *T. vaginalis*, se ha visto que el parásito regula la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), y los receptores tipo Toll, TLR2, TLR4 y TLR9, que participan en el reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS, por sus siglas en inglés). La expresión de los receptores TLR2, TLR4 y TLR9 en células epiteliales desencadenan una serie de reacciones que conducen a la regulación positiva de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias, que influye en la intensidad de la respuesta inmune adaptativa. El LPG de *T. vaginalis* es el glicoconjugado más abundante en la superficie del parásito y es responsable de la adherencia del parásito a las CEV y participa en la inducción de la respuesta inflamatoria por las células del huésped a través de los receptores tipo Toll.^{18,33,34}

El parásito al entrar en contacto con las CEV induce la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 β y TNF- α , vía NF-KB; además, durante la infección se inducen quimiocinas como IL-8 que participan en el reclutamiento de neutrófilos a la zona de infección. Los neutrófilos participan en la eliminación del parásito a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN), como los aniones superóxido y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el óxido nítrico (NO) y las defensinas. De igual manera, los macrófagos generan citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α y NO el cual es citotóxico para el parásito. Por otra parte, el parásito estimula a los macrófagos y a las células dendríticas para la producción de las citocinas IL-10 y TGF- β como mecanismo de evasión del sistema inmune. Hasta el momento, se desconoce el tipo de diferenciación de las células T CD4+ vírgenes, hacia Th1, Th2, Th17, Th22 y Treg durante la infección.^{18,33,34}

En mujeres embarazadas con tricomoniasis se han encontrado niveles elevados de proteína C reactiva, indicando que la reacción proinflamatoria en respuesta al parásito no solo se limita a la mucosa del tracto reproductivo. La mayoría de los trabajos en la respuesta contra *T. vaginalis* se han centrado en el estudio y en la elaboración de anticuerpos específicos contra diversos factores de virulencia del parásito; sin embargo, aún falta por describir los mecanismos específicos de reconocimiento del parásito por el sistema inmune del huésped.^{4,18,33}

2.11. Transportadores iónicos con potencial inmunogénico

Actualmente se ha descrito la capacidad inmunogénica de proteínas de superficie como los transportadores de iones, los cuales son capaces de inducir una respuesta inmune humoral y celular; por lo cual, son objetivo de estudio para el desarrollo de métodos terapéuticos o vacunas.⁴⁰

Häse y col.⁴¹ sugieren los transportadores de Na²⁺ como posibles blancos de fármacos y vacunas, debido a la importancia de este ion en los diversos factores de virulencia de diversos patógenos, como es el caso en *Vibrio cholerae*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella entérica serovar Typhi* y *Yersinia pestis*.

Garmory y Titball.⁴² proponen la posibilidad de usar como dianas terapéuticas los transportadores dependientes de ATP o ABC (Del inglés, ATP-binding cassette) para el diseño de vacunas o terapias contra bacterias. Debido a que los transportadores ABC participan en la resistencia a fármacos y de manera directa o indirecta en la obtención de nutrientes y metales como Fe²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ que son necesarios en los mecanismos de patogenicidad de las bacterias.

Mendoza-Oliveros y col.⁴⁰ evaluaron el potencial inmunogénico de un transportador recombinante de Ca²⁺ tipo TRP de *T. vaginalis* en un modelo murino. A través de análisis *in silico* se seleccionó el transportador TRPV de *T. vaginalis* como proteína

inmunogénica, la cual fue clonada y expresada como proteína recombinante. Se evaluó su potencial inmunogénico en macrófagos en co-cultivo con LT T CD4+ estimulados con la proteína recombinante, donde se cuantificaron los niveles de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α ; de igual manera, se inmunizaron ratones con la proteína recombinante para la evaluación de IgG específicos. Como resultado se obtuvo que la proteína recombinante TRPV de *T. vaginalis* puede inducir una respuesta inmune humoral mediante IgG específicas contra la proteína recombinante tipo TRPV y una respuesta inmune celular al inducir las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Se concluyó en el estudio que la proteína recombinante TRPV de *T. vaginalis* presenta potencial inmunogénico, por lo cual podría tener aplicaciones en métodos de diagnóstico o terapéuticos contra la tricomoniasis.

Zang y col.⁴³ desarrollaron un anticuerpo policlonal anti-ZIP8 de humano, usando un péptido que contiene los primeros 100 aminoácidos de la región N-terminal de la proteína; se seleccionó esa sección debido a que el péptido mostraba un mayor número de epítopes que pudiesen ser reconocidos por linfocitos B, mostraba menos homología con otros ZIP's y presentaba características inmunogénicas. La proteína ZIP8 humano se ha descrito como un transportador de Zn²⁺, Fe²⁺ y otros metales, la cual participa en el sistema inmune promoviendo la activación de linfocitos T y la inmunidad innata.

2.12. NO y H₂O₂ en la eliminación de antígenos

La fagocitosis es uno de los mecanismos con mayor relevancia del sistema inmune; la fagocitosis es un proceso que la mayoría de las bacterias, hongos, protozoos y otras células eucarióticas utilizan para la captación de partículas, el cual consta de dos pasos principalmente; se inicia mediante la internalización del antígeno (bacteria, parásito, entre otros), posteriormente a su internalización los antígenos son atrapados en una vacuola o fagosoma que deriva de la membrana plasmática. Seguidamente el fagosoma experimenta una serie de etapas de maduración (temprana y tardía), y finalmente se forma el fagolisosoma, el cual nace cuando el fagosoma tardío se fusiona con el lisosoma. El fagolisosoma contiene componentes como hidrolasas (nucleasas, lipasas, glucosidasas, proteasas y catepsinas) y un pH ácido (4.5) que favorece la degradación de los antígenos. Las células presentadoras de antígenos (CPA), como los macrófagos y las células dendríticas son células fagocíticas del sistema inmune, encargadas de presentar los antígenos derivados de los microbios sobre la superficie celular, a través de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC).^{44,45}

Los macrófagos participan en la eliminación de patógenos y partículas extrañas mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) durante en el proceso inflamatorio. En primer lugar, se genera el anión superóxido (O₂⁻) mediante la reducción de un electrón del oxígeno (O₂) a través de catálisis mediada por el dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina (NADPH) oxidasa. El O₂⁻ experimenta una dismutación hacia

peróxido de hidrogeno (H_2O_2) mediante el superóxido dismutasa (SOD), seguidamente el Fe^{2+} reacciona con el H_2O_2 para la formación de radicales hidroxilos (OH). De igual manera, los macrófagos pueden producir especies reactivas de nitrógeno (ERN) como el óxido nítrico (NO), el cual se forma a partir de L-Arginina y O_2 mediante la actividad del óxido nítrico inducible (iNOS).⁴⁶⁻⁴⁸

Sin embargo, un fallo en los procesos homeostáticos de la generación de las especies reactivas, llegando a exceder la capacidad defensiva del organismo, ocasiona lesiones celulares y daño tisular; este efecto dañino que causan las ERO y las ERN sobre el cuerpo humano se conoce como estrés oxidativo.⁴⁹

2.13. Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC)

El MHC también llamado antígeno leucocitario humano (HLA), está conformado por un conjunto de genes cuyos productos se expresan en la superficie de las células del sistema inmune, y son responsables del reconocimiento y presentación del antígeno a los linfocitos T CD4+ y CD8+.

Los linfocitos T participan en la eliminación de patógenos presentes en células infectadas, ayudan a los linfocitos B a producir mejores y diferentes tipos de anticuerpos para proteger contra microbios extracelulares y moléculas tóxicas. A su vez, interactúan con otras células para instruir o eliminar células que albergan o han estado expuestas a amenazas de patógenos. Por el contrario, los linfocitos T no son capaces de conocer el contenido interno de las CPA, es decir, no pueden identificar que han fagocitado o que proteína viral o mutante se está sintetizando dentro de la misma; por tanto, las CPA's utilizan el sistema de presentación de antígenos conocido como MHC, los cuales muestran en la superficie de la célula la información sobre los diversos antígenos que las CPA han sintetizado o ingerido para presentárselos a los Linfocitos T.⁵⁰⁻⁵²

Existe 2 tipos de clases de MHC

a) MHC-I presenta antígenos citoplasmáticos o endógenos a los linfocitos T CD8+ (citotóxicos), permitiendo identificar y eliminar las células infectadas. Las moléculas de MHC-I se unen a péptidos (8-10 aminoácidos) de proteínas intracelulares procesadas en el citoplasma de las CPA por estructuras llamadas proteosomas; el acoplamiento del péptido ocurre en el retículo endoplásmico; una vez formado el complejo péptido-MHC-I, se transporta a la membrana celular para su presentación a los linfocitos T CD8+ (Figura 4).^{50,52}

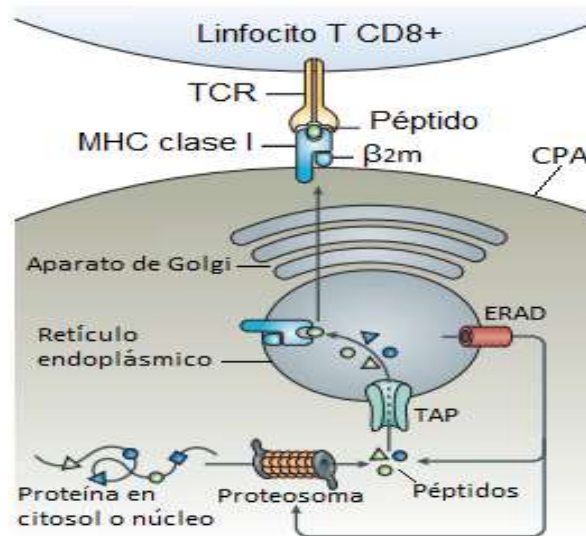


Figura 4. Presentación antigénica vía MHC clase I modificada de Neefjes y col.⁵⁰

b) MCH-II presentan antígenos ingeridos en los compartimientos endocíticos de las CPA's como macrófagos, células dendríticas, o linfocitos B. El antígeno (9-25 aminoácidos) reconocido por las CPA se presenta a los linfocitos T CD4+ (cooperadores) por medio de la molécula MHC-II formada en el retículo endoplásmico (Figura 5).^{50,52}

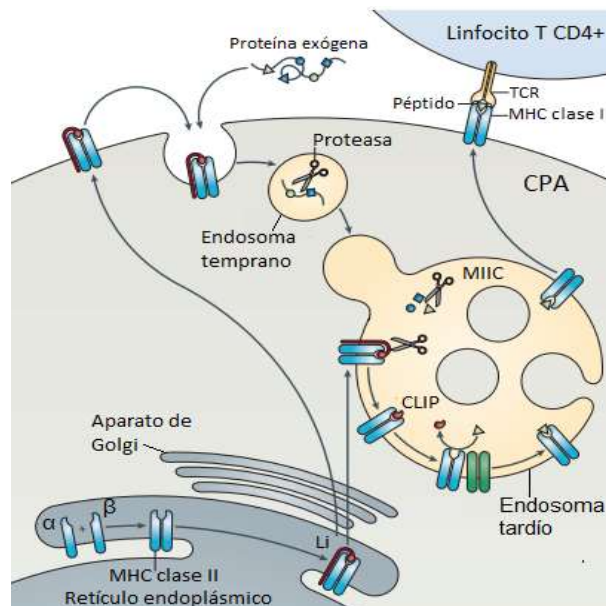


Figura 5. Presentación antigénica vía MHC clase II modificada Neefjes y col.⁵⁰

Los linfocitos T solo reconocen un antígeno cuando este se encuentra unido a una molécula del MHC, y es expuesto en la superficie celular de una CPA. *T. vaginalis* al ser un parásito extracelular inducirá la presentación de sus antígenos mediante el MHC-II. Las moléculas de MHC-II son un heterodímero conformado por una cadena alfa y beta que se sintetizan y se unen en el retículo endoplásmico; las moléculas del MHC-II llevan consigo una molécula llamada cadena invariable (Li, por sus siglas en inglés o CD74) la cual se encarga de proteger el sitio que ocupará el antígeno y de la salida del retículo endoplasmático en dirección al endosoma donde se encontrará con los péptidos antigénicos. En los endosomas, diversas catepsinas y proteasas rompen la cadena Li, liberando el sitio de unión del antígeno, permitiendo la unión del péptido antigénico al MHC-II, los residuos de Li (CLIP) (Del inglés, *residual class II-associated li peptide*) son removidos; y finalmente, el péptido antigénico unido al MHC-II emerge a la superficie celular y establece contacto con los linfocitos CD4+ con la finalidad de reconocer el péptido; si el péptido presentado por el MHC-II es reconocida como extraño por el linfocito T CD4+, este se activa y secreta diversas citocinas, las cuales participaran en diversos mecanismos del sistema inmune como en los procesos inflamatorios a través de la liberación de citocinas. Las citocinas liberadas pueden activar a las células presentadoras y linfocitos (respuesta predominante Th1), o estimular la producción de anticuerpos (respuesta de predominio Th2). Al término del estímulo antigénico producido en los linfocitos T, se detendrá la respuesta inflamatoria, y se inducirá apoptosis en las células activadas e iniciaran los procesos de reparación.^{50,52,53}

2.14. Análisis *in silico*

Las técnicas de biología molecular han logrado el secuenciar más de 1200 genomas, que junto con la bioinformática permiten el identificar proteínas que pudiesen estar codificadas por diversos microorganismos y con ello buscar antígenos potenciales. Los métodos bioinformáticos se emplean para estudios de autoinmunidad, alergias, en el campo de la endocrinología, trasplantes, desarrollo de nuevos fármacos, estudios del cáncer y en el desarrollo de vacunas, con la finalidad de identificar componentes o estructuras únicas en los microorganismos capaces de generar una respuesta inmune protectora.⁵⁴⁻⁵⁸

Los genomas de muchos microorganismos han permitido el identificar nuevos antígenos que por técnicas convencionales no se habían descubierto. Los métodos bioinformáticos no requieren cultivar el microorganismo, ya que, con la información del genoma obtenida desde una base de datos, se seleccionan los candidatos (proteínas) en los cuales se basará el análisis; sin embargo, es necesario identificar primeramente si es una proteína de membrana o es secretada; para posteriormente usar programas como redes neuronales que permitan el pronosticar las propiedades antigénicas al identificar las regiones de unión al MHC.⁵⁶

La inmunoinformática o inmunología computacional es una nueva disciplina que consiste en la aplicación de programas bioinformáticos en el estudio del sistema inmune, con el objetivo de identificar nuevos antígenos a partir del genoma del patógeno mediante análisis computacionales para el desarrollo de vacunas. La inmunoinformática permite evaluar la antigenicidad, la fisicoquímica y la presencia de residuos aminoacídicos característicos en los extremos N- y C- terminal del epítipo, que permitirán el reconocimiento y la unión del epítipo al MHC.⁵⁹⁻⁶¹

Los análisis inmunoinformáticos constan de dos principales pasos

- 1) Identificación de antígenos candidatos (epítopos inmunogénicos) mediante el uso de algoritmos matemáticos que evalúan la respuesta inmune.
- 2) Validación del antígeno predicho, para la confirmación de la inmunogenicidad (Estudios *in vitro*).^{58,62}

Herrera y col.⁶³ mediante análisis bioinformáticos evaluaron el genoma de *Leishmania major* en la búsqueda de epítopos que pudiesen ser reconocidos por los linfocitos T con la finalidad de identificar nuevos antígenos candidatos a vacunas. Se identificaron 28 antígenos probables con capacidad de unirse a las moléculas del MHC clase I; los antígenos identificados fueron validados mediante su inmunización en ratones de la cepa Balb/C; donde posteriormente se obtuvieron las células de bazo (esplenocitos) de los ratones inmunizados y fueron estimulados *in vitro* con los antígenos identificados. Se evaluó su potencial inmunogénico mediante la cuantificación de IFN- γ producido por los esplenocitos al ser re-estimulados con los antígenos; finalmente 14 de los 28 antígenos resultaron con potencial inmunogénico al estimular la producción de IFN- γ .

McMurry y col.⁶⁴ a partir de diversos programas bioinformáticos, identificaron 17 proteínas con epítopos antigénicos secretadas por *Mycobacterium tuberculosis*, a las cuales posteriormente se les evaluó su potencial inmunogénico mediante la capacidad de estimular la producción de IFN- γ en linfocitos T de pacientes infectados con *M. tuberculosis*. Se obtuvieron linfocitos T de pacientes infectados con *M. tuberculosis* y mediante pruebas *in vitro*, los linfocitos fueron estimulados con las proteínas identificadas. Finalmente se evaluó la producción de IFN- γ donde debido a estimulación de los linfocitos T, se identificaron 15 de las 17 proteínas como inmunogénicas con capacidad de estimular la producción de IFN- γ .

Moise y col.⁶⁵ identificaron 150 epítopos antigénicos en el genoma de *Helicobacter pylori* mediante análisis bioinformáticos. Para la validación de los antígenos encontrados en el análisis bioinformático, se obtuvieron células de bazo (esplenocitos) de ratones infectados con *H. pylori*, y se estimularon *in vitro* con los antígenos identificados. Posteriormente, se evaluó la producción de IFN- γ por la estimulación de los esplenocitos, donde se identificaron 27 de los 150 antígenos como inmunogénicos al estimular la producción de IFN- γ . Concluyendo que los 27 antígenos pudiesen seleccionarse como candidatos a vacuna contra *H. pylori*.

Estos estudios muestran el uso frecuente de los análisis bioinformáticos hoy en día, para el diseño de nuevas estrategias para la identificación de antígenos, con el propósito de diseñar vacunas o métodos de diagnóstico más específicos.

III. HIPÓTESIS

Los péptidos seleccionados por análisis bioinformático de las proteínas de transporte tipo ZIP de *T. vaginalis* (TvZIP) son capaces de inducir una respuesta inmune humoral y celular en un modelo murino.

IV. JUSTIFICACIÓN

La tricomoniasis es la infección de transmisión sexual, no viral, más prevalente en el mundo, en nuestro país se ha observado una elevada incidencia en las mujeres de 25 a 44 años de edad, ocasionando un problema de salud pública. La identificación de la infección por medio de manifestaciones clínicas ha sido de carácter inespecífico, ya que los síntomas presentados durante la infección son similares a los causados por otras infecciones. La falta de tratamiento o un mal tratamiento de pacientes infectados con *T. vaginalis*, se vuelven un problema de salud al ser un reservorio de la infección a la población. El metronidazol es el fármaco por excelencia para el tratamiento de la tricomoniasis; sin embargo, diversos estudios han demostrado la resistencia de cepas del parásito contra dicho fármaco.^{66,67} Una alternativa para este problema, podría ser la identificación de nuevos y potentes inmunógenos en *T. vaginalis*, que sirvan para el desarrollo de herramientas de inmunodiagnóstico y/o unas vacunas contra esta ITS. Diversos estudios se han centrado en la búsqueda de antígenos en el parásito que sean capaces de inducir respuestas inmunitarias protectoras o reducir los mecanismos de patogenicidad. El presente trabajo tiene como objetivo identificar y evaluar la capacidad inmunogénica de tres péptidos derivados de las proteínas de transporte tipo ZIP de *T. vaginalis* reportadas Fernández y col.¹ en *T. Vaginalis*, y ubicarlos como posibles péptidos que en un futuro permitan reducir los niveles de patogenicidad del parásito en un modelo murino, y que con ayuda de estudios posteriores proponer su uso para el desarrollo de herramientas de inmunodiagnóstico para el tratamiento de la tricomoniasis.

V. OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES.

5.1. Objetivo general

Evaluar el potencial inmunogénico de tres péptidos de transportadores tipo ZIP de *T. vaginalis* sobre la función de macrófagos peritoneales murinos.

5.2. Objetivos específicos

- Identificar y seleccionar tres péptidos a partir de la familia de proteínas de transporte tipo ZIP de *T. vaginalis* con el mayor potencial antigénico por medio de análisis *in silico*.
- Evaluar la respuesta inmune celular inducida por los péptidos inmunogénicos seleccionados, mediante la determinación de citocinas (IL-6 y TNF- α) en macrófagos peritoneales murinos.
- Determinar el efecto de los péptidos sobre la producción de ON y H₂O₂ en macrófagos peritoneales murinos.
- Evaluar la respuesta inmune humoral inducida por los péptidos, mediante la determinación de anticuerpos séricos IgG.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Análisis *in silico*

Mediante programas bioinformáticos, se analizaron las 8 secuencias de aminoácidos de las proteínas TvZIP de *T. vaginalis* reportadas por Fernández y col.¹, con el propósito de seleccionar 3 péptidos con posible potencial inmunogénico. A través de la Base de Datos y Recursos de Análisis de Epítopes Inmunes (IEDB, por sus siglas en inglés) se evaluó la predicción de epítomos presentes en los transportadores con probabilidad de ser reconocidos por las moléculas del MHC clase II murino. Se utilizaron las redes neuronales NN-align, SMM-align y NETMHCIIpan debido a que permiten evaluar los alelos H2-IEd y H2-IAd de la cepa de ratón Balb/C (Bagg Albino). Como criterio de selección, se eligieron los péptidos que presentaron mayor afinidad a los alelos de MHC clase II, la cual fue evaluada mediante el IC50 propuesto por la base de datos; donde se determina que el valor de IC50 < 5000 nm será de baja afinidad, un IC50 < 500 nm será de afinidad intermedia y un IC50 < 50 nm será para alta afinidad.⁶⁸

Como análisis complementarios, las tres secuencias de las proteínas TvZIP donde se ubicaron los péptidos seleccionados, fueron analizadas con la base de datos AntiJen (<http://www.ddg-pharmfac.net/antijen/AntiJen/antijenhomepage.htm>) con la finalidad de identificar si una secuencia de nucleótidos o péptidos en las proteínas tiene potencial antigénico, al ser comparadas con otras secuencias antigénicas previamente reportadas. De igual manera, las 3 proteínas TvZIP se analizaron con la base de datos VaxiJen (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>), que permitió clasificar e identificar como antígenos a las proteínas considerando sus propiedades fisicoquímicas. Por último, se analizaron las posibles topologías de las regiones transmembranales de las proteínas seleccionadas, mediante la base de datos Bloomsbury Centre for Bioinformatics de UCL (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/?dompred=1>).

6.2. Animales de experimentación

Para evaluar el potencial inmunogénico de los 3 péptidos seleccionados, se realizaron ensayos *in vitro* e *in vivo* empleando ratones machos de la cepa Balb/C de entre 6 y 8 semanas. Los ratones fueron obtenidos del bioterio del centro de investigaciones regionales (CIR) "Dr. Hideyo Noguchi", UADY. Esta cepa fue empleada debido a que su genoma y sistema inmune es similar al del ser humano, además de ser ampliamente usada en las áreas de investigación de inmunología, parasitología y farmacología.⁶⁹

Los ratones fueron ubicados en el Laboratorio de Farmacología, en el Área de Manejo Experimental de Animales de la Facultad de Química, UADY. Los ratones se alojaron en cajas de acrílico con viruta estéril, se mantuvieron en condiciones estandarizadas de bioterio en un ambiente libre de patógenos y estrés, a una temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, con fotoperíodos de 12 horas luz/oscuridad. Se suministró alimento especial para roedores y agua purificada *ad libitum*; como enriquecimiento ambiental se añadieron cajas y tubos de cartón estériles con el fin de reducir el estrés provocado en los ratones durante los experimentos.⁷⁰

Los ratones se mantuvieron en observación para detectar cualquier cambio en el comportamiento, así como enfermedades, heridas o muerte. El mantenimiento y manipulación de los ratones fue de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.⁷⁰

6.3. Grupos experimentales

Se diseñaron once grupos experimentales (Figura 6), cada grupo conformado por cinco ratones, los cuales fueron inmunizados con los tres péptidos a las concentraciones 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, tomando como referencia lo propuesto por Xie y Col.³⁸ Los péptidos fueron emulsionados con el adyuvante incompleto de Freund (Sigma®) en una relación 1:1 péptido-adyuvante, siendo el volumen final administrado a cada ratón de 50 μL .

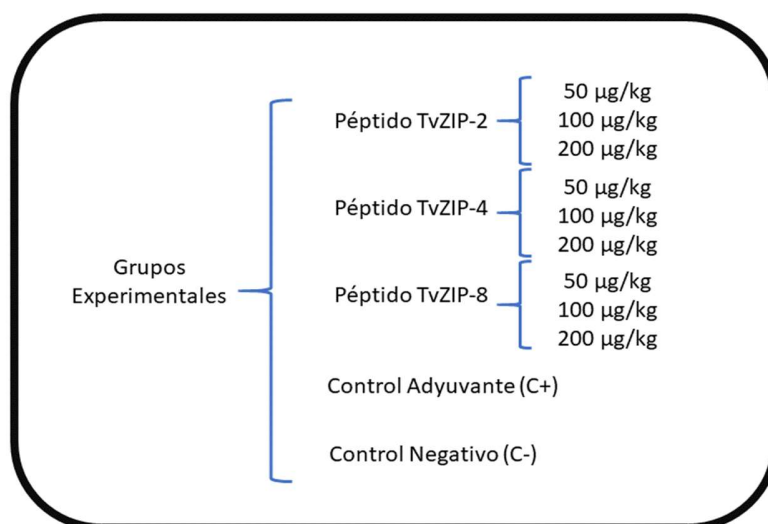


Figura 6. Esquema de tratamiento de los péptidos en los diferentes grupos experimentales

6.4. Esquema de inmunización y toma de muestras sanguíneas

Los ratones fueron inmunizados en el cojinete plantar derecho con los tres péptidos TvZIP a diferentes dosis como se describe en la Figura 6. A las dos semanas posteriores de la inmunización primaria se obtuvieron muestras sanguíneas de la vena caudal de los ratones, se dejó coagular la sangre 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó la muestra 15 minutos a 2200 rpm para la obtención del suero sanguíneo. Con el objetivo de generar una re-estimulación del sistema inmune, se aplicó un primer y segundo refuerzo en un intervalo de dos semanas entre ellos como se describe en la Figura 7. A los 15 días posteriores de ambos refuerzos se obtuvieron las correspondientes muestras sanguíneas. Los sueros obtenidos de los distintos grupos experimental se alicuotaron y almacenaron a -80°C hasta su posterior uso para la evaluación de anticuerpos IgG. Previamente a la inmunización primaria se tomó una muestra sanguínea como basal.



Figura 7. Esquema de Inmunización, re-estimulación y recolección de muestras sanguíneas

6.5. Obtención, cuantificación, cultivo, tratamiento y activación de macrófagos

6.5.1. Obtención de macrófagos peritoneales

Se aplicó eutanasia a los ratones por el método de dislocación cervical siguiendo los lineamientos bioéticos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Se empleó este método ya que no provoca dolor e induce rápidamente la inconsciencia,

además de no emplear sustancias que contaminen los tejidos e interfieran en los resultados de las pruebas.⁷⁰

Los macrófagos peritoneales murinos fueron obtenidos siguiendo la metodología propuesta por Zhang y col.⁷¹ con ligeras modificaciones. Primeramente, se prosiguió a desinfectar el abdomen de los ratones con etanol (C₂H₅OH) al 70% en una campana de flujo laminar de clase II. Posteriormente, se realizó una incisión no profunda con ayuda de material quirúrgico estéril en la parte media del abdomen sin perforar el peritoneo, se retiró la piel abdominal y se administró con ayuda de una jeringa buffer de fosfatos salinos (PBS) estéril por el método de perfusión, se administraron de 8-10 mL y se aplicaron ligeros masajes a la cavidad peritoneal para favorecer el desprendimiento de los macrófagos. Finalmente se procedió a extraer con mucho cuidado sin perforar las vísceras el mismo líquido administrado (PBS), esto con ayuda de la misma jeringa usada para la administración.

El líquido recolectado fue transferido a un tubo cónico de 15 mL, resguardándose en hielo para su conservación. Posteriormente, se centrifugó por 10 min a 3000 rpm a 4°C (Centrifuge 5810R®, Eppendorf) hasta obtener un pellet celular. Por último, se realizaron 3 lavados con PBS estéril durante 5 min a 2000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue desechado con cuidado y el botón celular resuspendido en 3 mL de medio DMEM (Medio Eagle Modificado de Dubelcco, Gibco®) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, GIBCO®) y 1% de penicilina/estreptomicina (GIBCO®).

6.5.2. Cuantificación de macrófagos

Para la cuantificación de los macrófagos obtenidos, se prosiguió a usar el método de exclusión con azul de tripano, el cual permite ver las células viables y no viables. Esto debido a que las células vivas (Viables) al poseer una membrana intacta excluye colorantes como el azul de tripano, la eosina o el yoduro de propidio (PI) permitiendo ver el citoplasma refríngete, mientras que las células muertas (No viables) permiten el paso del colorante al citoplasma observándose de color azul.^{72,73}

Se tomaron 10 µL de la suspensión celular y se diluyó 1:1 con azul de tripano (Sigma®) al 0.04%, se depositaron 10 µL de esta solución en una cámara de Neubauer, y se procedió a contar las células viables encontradas en los cuatro cuadrantes de las esquinas de la cámara, se aplicó la Fórmula 1 para tener una estimación del número total de células viables.⁷²

$$\frac{\text{No. CV}}{\text{mL}} = \frac{[(CV)(10,000)(FD)]}{\text{No. Q}}$$

Fórmula 1. Calculo del número total de macrófagos peritoneales viables por mL.

Dónde:

- CV= Número de células viables.
- 10,000= Factor cámara de Neubauer.
- FD= Factor de dilución.
- No.Q= Número de cuadrantes utilizados para el conteo.

De la estimación total de las células viables se preparó una solución madre de células (1×10^6 células/mL) en medio DMEM suplementado con SFB al 10% y penicilina/estreptomicina al 1% para las distintas pruebas.

6.5.3. *Cultivo de macrófagos peritoneales*

El cultivo, tratamiento y activación de los macrófagos se siguió de acuerdo con el protocolo propuesto por Oliveira y col.⁷² Se tomaron alícuotas de la solución madre de células (1×10^6 células/mL) y se colocó en una placa estéril de 24 pozos una concentración de 1×10^5 células/pozo, los volúmenes se ajustaron con medio DMEM suplementado con 10% SFB y 1% penicilina/estreptomicina hasta un volumen final de 500 μ L. Las placas se mantuvieron en una incubadora (Thermo Scientific®) durante 48 horas, a 37°C y 5% de dióxido de carbono (CO₂) para permitir la adherencia de los macrófagos en la placa.

6.5.4. *Activación de macrófagos*

La placa previamente con los macrófagos adheridos, se centrifugo a 2000 rpm a 4°C por 10 minutos, se extrajeron los sobrenadantes por aspiración y fueron desechados. Se añadieron a los macrófagos adheridos los tres tratamientos con los péptidos a las tres diferentes concentraciones (50, 100 y 200 μ g/mL) con la finalidad de estimularlos, y se dejó incubando nuevamente la placa con los tratamientos durante 48 horas, a 37°C y 5% CO₂. Después de transcurrir las 48h de incubación se prosiguió a recuperar el sobrenadante, alicuotarlo y resguardarlo a -80°C hasta posterior uso.

6.6. **Determinación de los niveles séricos de anticuerpos IgG, y de las citocinas IL-6 y TNF- α , en los sobrenadantes de cultivo, por la técnica ELISA**

El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) es un método analítico cuantitativo que permite la detección de anticuerpos o antígenos de interés en una muestra, mediante la adición de un anticuerpo secundario ligado a una enzima formándose un complejo (muestra de interés + Ac. Secundario ligado a enzima) que al agregarse un sustrato produce un cambio de color y el cual permite su cuantificación por fotometría.⁷⁴

6.6.1. Evaluación de la respuesta humoral mediante la determinación de niveles séricos de IgG

Mediante la técnica ELISA de tipo indirecto (Figura 8), y siguiendo el manual del fabricante (PeproTech®, Londres, Reino Unido), se determinó la concentración de IgG en los sueros de los ratones inmunizados.

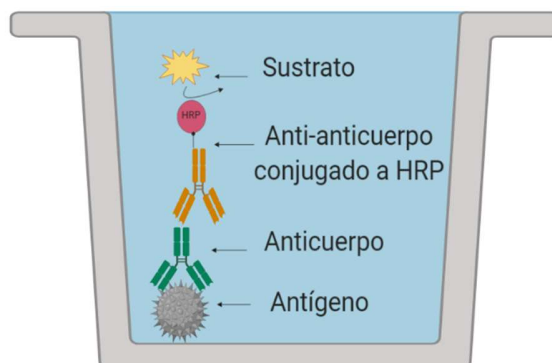


Figura 8. Estructura del complejo de una Elisa de tipo indirecto modificado de LSBio.⁷⁵

Se incubaron los antígenos de interés (tres péptidos) en una microplaca de 96 pozos a una concentración de 1 µg/mL en PBS toda la noche a 4° C; luego se lavó 3 veces la placa agregando 300 µL a los pozos con buffer de lavado (PBS/Tween 20 (0.5 %)). Se agregó buffer de bloqueo (PBS-BSA 1 %) y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente para posteriormente lavar nuevamente la placa. Los sueros obtenidos de cada grupo experimental se prepararon con diluyente 1X (PeproTech®) (0.05%Tween20, 0.1%SFB en PBS) a una dilución 1:25, las muestras de cada grupo experimental se evaluaron por triplicado. Se agregaron 100 µL por pozo de la muestra para determinar la presencia de anticuerpos IgG y se dejó incubar a 24° C durante 2 horas para posteriormente lavar nuevamente. Se agregaron 100 µL de anticuerpo secundario IgG anti-ratón marcados con peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) (Santa Cruz Technology®) a una dilución 1:2000 en diluyente 1X. Se dejó incubar la placa por 2 horas y nuevamente se procedió a lavar la placa 3 veces. Para finalizar se agregaron 100 µL de sustrato revelador ABTS (2,2'-Azinobis-3-etil-benzo-tiazolina-6-ácido sulfónico) (PeproTech®) durante 2 horas. Se procedió a leer la absorbancia a 490nm usando el lector de microplacas (iMark Microplate Reader Bio-Rad®, EE. UU). El valor obtenido de la densidad óptica (D.O.) fue directamente proporcional a los niveles de IgG totales presentes en el suero del ratón, en respuesta a los péptidos a las diferentes concentraciones.

6.6.2. Evaluación de la respuesta celular mediante la determinación de los niveles de las citocinas IL-6 y TNF- α

Mediante la técnica ELISA de tipo sándwich (Figura 9), se determinó la concentración de las citocinas IL-6 y TNF- α en los sobrenadantes recuperados de los macrófagos activados con los péptidos, siguiendo la metodología descrita por el fabricante (Murine TNF- α ELISA Development kit y Murine TNF- α ELISA development kit, PeproTech®).

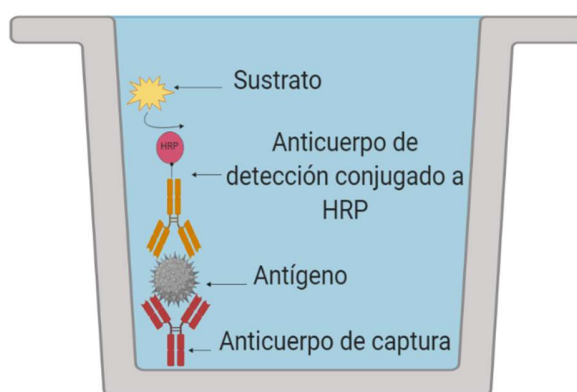


Figura 9. Estructura del complejo de una Elisa de tipo sándwich modificada de LSBio.⁷⁵

Se agregaron 100 μ L a cada pozo de anticuerpo de captura a la concentración de 1 μ g/mL para TNF- α y 2 μ g/mL para IL-6, se dejó incubar toda la noche a 4°C y se lavó la placa 3 veces con buffer de lavado. Se agregaron 300 μ L de buffer de bloqueo y se incubó durante 45 min a temperatura ambiente y se prosiguió a lavar la placa. Se realizaron diluciones seriadas de una solución estándar provista por la misma casa comercial PeproTech®, TNF- α (0-2000 pg/mL) e IL-6 (0-4000 pg/mL) en diluyente, las cuales fueron usadas para realizar las curvas estándar. Se agregaron 100 μ L a cada pozo del estándar por triplicado y las muestras de los sobrenadantes por duplicado, se dejó incubar a temperatura ambiente por 2 horas y se lavó nuevamente la placa.

Se agregaron 100 μ L a cada pozo del anticuerpo de detección anti-TNF y anti-IL-6 a una concentración de 0.25 μ g/mL para TNF- α y 0.5 μ g/mL para IL-6 en PBS/BSA y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Nuevamente se lavó la placa y se agregaron 100 μ L/pozo del conjugado Avidina-HRP (1:2000) en PBS/BSA 1% y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó la placa y se agregaron 100 μ L de la solución de sustrato-ABTS, y se dejó incubar toda la noche a temperatura ambiente en oscuridad para posteriormente leer la placa a 490nm en el lector de placas (iMark Microplate Reader Bio-Rad®, EE. UU). Los resultados de las concentraciones de las

citocinas se calcularon mediante extrapolación de las absorbancias con la curva estándar.

6.7. Determinación de los niveles de las especies reactivas, NO y H₂O₂

6.7.1. Óxido nítrico (NO)

Mediante el método de Griess de acuerdo con Ono y col.⁷⁶⁻⁷⁸ se determinó la concentración de óxido nítrico (NO) en los sobrenadantes recuperados de los macrófagos activados con los péptidos. En esta reacción, el NO es oxidado por acción del óxido de cromo (CrO₃) formando como producto secundario nitritos (NO₂⁻), que reaccionan con sulfanilamida para formar sales de diazonio, que posteriormente se acoplan a la N-(1-naftil) etilendiamina y dan como resultado compuestos azo estables que pueden ser cuantificados por fotometría.⁷⁹

Se añadió en una microplaca de 96 pozos, 50 µL/pozo de los sobrenadantes y 50 µL de reactivo de Griess (Sigma®), se dejó incubar durante 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se procedió a medir las absorbancias en el lector de microplacas a 490nm (iMark Microplate Reader Bio-Rad®, EE. UU). La concentración de NO se determinó mediante la extrapolación con una curva estándar (0-200 µM) de nitrito de sodio (NaNO₂, Sigma®).⁷⁶⁻⁷⁸

6.7.2. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

La concentración de H₂O₂ en los sobrenadantes recuperados de los macrófagos activados con los péptidos, se realizó siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (Hydrogen Peroxide Test Kit, Hanna Instruments®). En este ensayo, el H₂O₂ en la muestra reacciona con yoduro (I⁻) en una solución ácida, tornándose de color amarillo oscuro y generando yodo (I₂) como producto final, donde la cantidad de I₂ generado es equivalente a la cantidad de H₂O₂ en la muestra.⁸⁰

En una microplaca de 96 pozos se añadieron 100 µL/pozo de los sobrenadantes y 10 µL de una solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄, Hanna®) al 15%. Posteriormente, se adicionaron 10 µL de una solución de yoduro de potasio (KI, Hanna®) a cada pozo y se dejó incubar la placa a 37° C en oscuridad durante 15 minutos. Por último, se procedió a medir la absorbancia a 490nm en un lector de microplacas (iMark Microplate Reader Bio-Rad®, EE. UU.). Los resultados de las concentraciones de H₂O₂ fueron obtenidos mediante la extrapolación con una curva estándar de H₂O₂ (0-50 µM, Fermont®).⁸¹

6.8. Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos de IL-6, TNF- α , H₂O₂ y NO fueron expresados como el promedio \pm desviación estándar (D.E) de tres experimentos independientes por duplicado, los datos se analizaron usando la prueba de análisis de variancia (ANOVA) de una vía seguido de una prueba *post hoc* de Dunnett. Los resultados obtenidos de los anticuerpos IgG péptidos específicos fueron expresados como el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes por duplicado, los cuales se analizaron usando una ANOVA de dos vías seguido de una prueba *post hoc* de Tukey. Los análisis se realizaron usando el programa GraphPad Prism 7 version 7.0 (GraphPad software, La Jolla california, E.U.A). Se consideraron los valores de las pruebas con una $p < 0.05$ como estadísticamente significativas.

6.9. Consideraciones éticas

El proyecto se aprobó por el Comité de Bioética del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) (No. de identificación: CB-CCBA-M-2016-005), el manejo de los animales se realizó con base a los requisitos de bioética contemplados por dicho comité.

A los animales empleados para los experimentos se les aplico eutanasia al final del proyecto siguiendo los lineamientos descritos en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Identificación y selección de péptidos de la familia de proteínas de transporte tipo ZIP de *T. vaginalis* con el mayor potencial inmunogénico por medio de análisis *in silico*

Las ocho secuencias de aminoácidos de los transportadores TvZIP de *T. vaginalis* se utilizaron para llevar a cabo los distintos análisis bioinformáticos, con el fin de poder identificar y seleccionar los tres péptidos con posible potencial inmunogénico. Mediante las redes neuronales NN-align, SMM-Align y NETMHCIIpan disponible en la base de datos IEDB se realizó la predicción de la inmunogenicidad de los ocho transportadores TvZIP de *T. vaginalis* para identificar los péptidos que pudieran actuar como epítomos T y fuesen reconocidos por las moléculas del MHC clase II murino.

A través del algoritmo NN-Align (Del inglés, *neural network-based data alignment method*), se consideraron los péptidos o aminoácidos que flanquean el epítomo del péptido que se une al MHC-II; el epítomo es el encargado de permitir la interacción directamente con los residuos de la ranura de unión del MHC-II, donde normalmente el epítomo se compone de nueve aminoácidos. El algoritmo SMM-Align (Del inglés, *stabilization matrix alignment method*) nos proporcionó la predicción directa de la afinidad de unión de los péptidos al MHC. Por último, el algoritmo NETMHCIIpan el cual se basa en un conjunto de redes neuronales, permitió evaluar y comparar los péptidos con la afinidad de otros péptidos antigénicos descritos, basándose en la detección de patrones y la afinidad a diferentes alelos del MHC y su relación entre ellos.⁸²⁻⁸⁴

La Tabla 2 muestra los péptidos que se lograron identificar por las tres redes neuronales y con los menores valores de IC50; la columna “secuencia del péptido” señala en negritas el epítomo de cada péptido identificado; se realizó la suma de los resultados de IC50 de las tres redes neuronales y se les obtuvo el promedio, esto con la finalidad de unificar los datos y considerar las características de cada algoritmo para cada péptido.

Tabla 2. Epítopes T detectados en las secuencias correspondientes a los transportadores TvZIP de *T. vaginalis* por medio de la base de datos IEDB.

Transportador TvZIP	Localización	Secuencia del péptido	NN-Align IC50(nM)	SMM-Align IC50(nM)	NETMHCIIpan IC50(nM)	Promedio IC50
2	141-155	SSQCNALSVPASALY	328.2	1752	836.8	972.33
2	140-154	FSSQCNALSVPASAL	421.5	1896	987.11	1101.53
2	31-45	SIRWQSRLEALAGGV	494.3	1350	2007.14	1283.81
2	30-44	KSIRWQSRLEALAGG	565.9	1061	1921.35	1182.75
2	139-153	YFSSQCNALSVPASA	611	1693	1184.72	1162.90
4	69-83	NYPLASAIIVSTFVL	352.2	1713	1034.96	1033.38
4	68-82	HNYPLASAIIVSTFV	356.7	1351	879.48	862.39
4	70-84	YPLASAIIVSTFVLL	448.7	1827	1540.89	1272.19
4	231-245	NRIVMGITAAFSAGT	541.2	1174	1402.92	1039.37
6	6-20	IKWQSRLEALAGGVF	435.1	1608	2400.25	1481.11
7	65-79	IHSITAGLALGILKK	263.1	1254	1797.22	1104.77
7	64-78	CIHSITAGLALGILK	396.6	1131	924.76	817.45
7	91-105	VGHKPVEAFAISLVV	443.3	2048	1900.7	1464
8	29-43	WVSRRAESMAAGVFLG	89.8	1434	1479.78	1001.19
8	28-42	LWVSRRAESMAAGVFL	142.7	1260	868.14	756.94
8	131-145	FGFMKTNAAILAFF	260.9	302	257.32	273.40
8	132-146	GFMKTNAAILAFFFA	297.4	300	374.33	323.91
8	130-144	AFGFMKTNAAILAFF	311.3	303	233.18	282.49
8	133-147	FMKTNAAILAFFFAF	385.3	722	564.02	557.10
8	27-41	TLWVSRRAESMAAGVF	402.3	1243	755.39	800.23
8	129-143	FAFGFMKTNAAILAF	452.8	286	258.24	332.34

En la columna "secuencia del péptido" se marca en negritas el epítipo que presentan afinidad al MHC-II, el promedio de IC50 se obtuvo de la suma de los tres resultados de las redes neuronales, y mientras menor sea el valor de IC50 presentara mayor afinidad al MHC-II.

Como criterio de selección de los tres péptidos, se buscó que los tres péptidos tuviesen el menor promedio de IC50, debido a que cuanto menor sea el valor IC50 mayor será la afinidad del péptido al MHC clase II; a su vez se buscó que los tres péptidos se localizaran en diferentes proteínas. La Tabla 3 muestra los péptidos que fueron seleccionados para su síntesis como posibles péptidos inmunogénicos.

Tabla 3. Péptidos seleccionados con menor promedio de IC50, y con mayor afinidad al MHC clase II

Transportador TvZIP	Secuencia del péptido	Promedio IC50	Afinidad
2	SSQCNALSVPASALY	972.33	Baja
4	HNYPLASAIIVSTFV	862.39	Baja
8	FGFMKTNAAILAFF	273.40	Intermedia

El promedio de IC50 se obtuvo de la suma de los resultados de los tres algoritmos NN-Align, SMM-Align y NTMHCIpan para cada péptido con la finalidad seleccionar el de menor IC50.

Las tres secuencias de las proteínas (TvZIP-2, TvZIP-4 y TvZIP-8) donde se ubican los péptidos seleccionados fueron analizadas en la base de datos AntiJen, la cual predice si una secuencia de nucleótidos o péptidos tienen potencial antigénico al ser similar con secuencias antigénicas previamente reportadas. El análisis mostro que las secuencias de las proteínas TvZIP-2 y TvZIP-4 no presentan similitud con secuencias antigénicas previamente reportadas; sin embargo, el péptido TvZIP-8 mostró identidad con péptidos antigénicos conocidos de *Infectious bovine rhinotracheitis virus* (BoHV-1) y *Chlamydomphila pneumoniae* (Figura 10).

```

membrane protein 10) (Outer membrane protein 5) -
Chlamydia pneumoniae (Chlamydomphila pneumoniae).
Length = 928

Score = 29.3 bits (64), Expect = 0.32, Method: Composition-based stats.
Identities = 14/35 (40%), Positives = 21/35 (60%), Gaps = 1/35 (2%)

Query: 37 AAGVFLGAAVLHLFPESIHCFGIYSSPIPIFITVI 71
A + LGA+ H +PE +HCF Y+ I + +T I
Sbjct: 772 AFNMMLGASS-HSYPEYLHCFDTPYPIKLNLTYSI 805
(BoHV-1) (Infectious bovine rhinotracheitis virus).
Length = 842

Score = 26.2 bits (56), Expect = 2.8, Method: Composition-based stats.
Identities = 15/47 (31%), Positives = 24/47 (51%), Gaps = 2/47 (4%)

Query: 21 PLFSPETLWSRAESMAAGVFLGAAVLHLFPESIHCFGIYSSPIPIF 67
P FSP +W S ++ AG + A+ + S+ YSS +P+F
Sbjct: 798 PTFSPAYVWASVGGALVAGTTI-YAIAKMLCSSLVPLARGYSS-VPVF 842

```

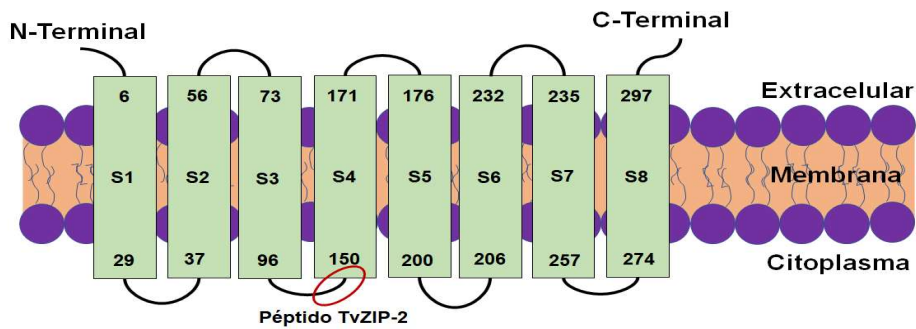
Figura 10. Resultado de identidad del péptido de TvZIP-8 con péptidos antigénicos previamente reportados a través de la base de datos AntiJen

Posteriormente, se analizaron de nuevo las tres secuencias de las proteínas (TvZIP-2, TvZIP-4 y TvZIP-8) con la base de datos VaxiJen v2.0, la cual permite la clasificación de antígenos basándose en las propiedades fisicoquímicas de las proteínas sin recurrir a la alineación de secuencias. La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos con VaxiJen v2.0; la base de datos determina que valores de predicción mayores a 0.5, indican que las secuencias aminoacídicas de las proteínas se consideran como antígenos probables. Los resultados obtenidos de VaxiJen muestran que los tres péptidos podrían considerarse como antígenos.

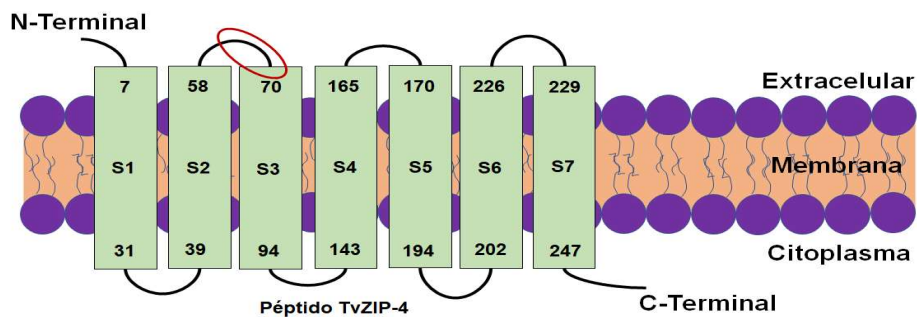
Tabla 4. Resultados del análisis de la antigenicidad de los transportadores TvZIP-2, TvZIP-4 y TvZIP-8 a través de la base de datos VaxiJen

Transportador	Valor de predicción como antígeno	Resultado
TvZIP-2	0.6301	Antígeno Probable
TvZIP-4	0.6059	Antígeno Probable
TvZIP-8	0.6277	Antígeno Probable

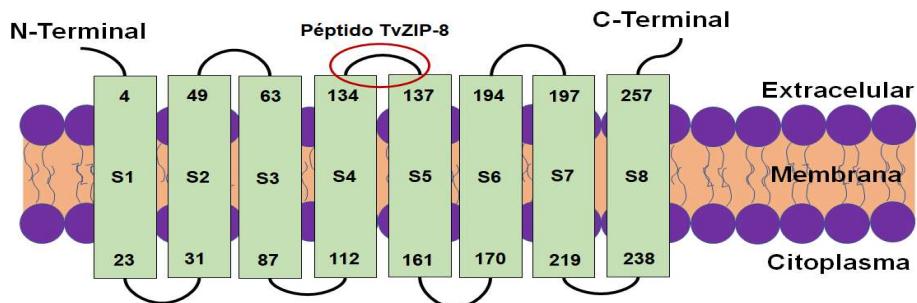
Se analizaron por medio de la página Bloombury centre of bioinformatics de UCL (PSIPRED) (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/?dompred=1>) las tres proteínas para predecir sus estructuras y ubicación de los péptidos a nivel citoplasmático, transmembranal o extracelular. Esto con la finalidad, de que el macrófago tenga un mejor reconocimiento de los péptidos en el parásito debido a su ubicación, suponiendo un contacto de manera natural. La localización de los péptidos (“Localización”, Tabla 2) se tomó de acuerdo con los resultados obtenidos de IEDB. La Figura 11 muestra los resultados de PSIPRED; donde el péptido de TvZIP-2 se ubica entre la región citoplasmática y la región transmembrana en el dominio S4, el péptido de TvZIP-4 se localiza entre la región extracelular y transmembrana en el dominio S3, por último, el péptido de TvZIP-8 se localiza en la región extracelular entre los dominios S3 y S4. Debido a su localización el péptido de TvZIP-8 podría considerarse como un mejor candidato debido a una mejor ubicación, al encontrarse a nivel extracelular facilitando su reconocimiento para las CPA.



Proteína de transporte ZIP 2 de *T. vaginalis*



Proteína de transporte ZIP 4 de *T. vaginalis*



Proteína de transporte ZIP 8 de *T. vaginalis*

Figura 11. Predicción de la topología de las proteínas TvZIP-2, TvZIP-4 y TvZIP-8 de *T. vaginalis* que resumen las coordenadas lineales de las hélices e indican las regiones extra e intracelulares, los círculos en rojo indican la posible localización de los péptidos en la proteína de acuerdo con los resultados obtenidos de la base de datos IEDB.

7.2. Evaluación de la respuesta inmune celular inducida por los péptidos seleccionados, mediante la determinación de citocinas (IL-6 y TNF- α) en macrófagos peritoneales murinos

Los tres péptidos seleccionados mostraron ser reconocidos por los macrófagos y su capacidad de estimular la inducción de las citocinas proinflamatoria IL-6 y TNF- α en respuesta a los péptidos.

La Figura 12 muestra los niveles de IL-6 inducidos por los macrófagos, donde se observa un aumento en los niveles de la citocina dependiente de la dosis al estímulo con los péptidos.

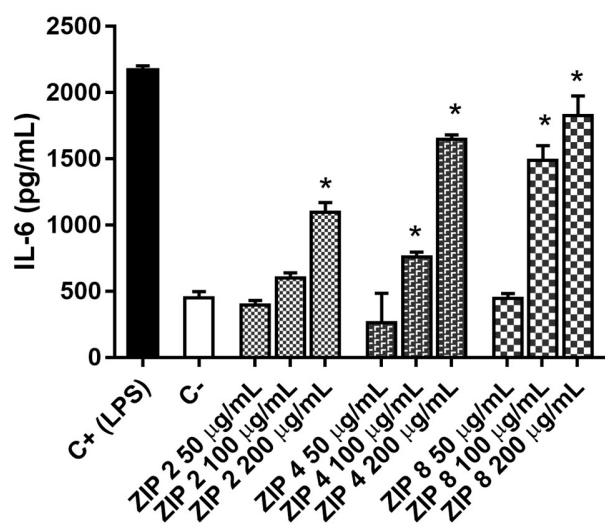


Figura 12. Evaluación de la secreción de IL-6 en macrófagos estimulados con los péptidos TvZIP-2, TvZIP-4 y TvZIP8 a las concentraciones 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados representan la media \pm D.E. Se realizó un ANOVA de una vía, seguida de un *post hoc* de Dunnett, donde $*p < 0.05$ muestra diferencia significativa con respecto al control negativo (C-).

Como se observa en la Tabla 5, los macrófagos estimulados con el péptido de TvZIP-8 a la concentración 200 $\mu\text{g/mL}$ mostraron mayor inducción de IL-6 (1828 pg/mL) y diferencia estadísticamente significativa en contraste con el grupo control negativo (C-) (454.2 pg/mL), el cual fue considerado como el menor nivel de producción de IL-6 al ser macrófagos sin estímulo. Los macrófagos estimulados con los péptidos de TvZIP-2 (200 $\mu\text{g/mL}$), TvZIP-4 (100 $\mu\text{g/mL}$) y TvZIP-8 (100 y 200 $\mu\text{g/mL}$) de igual manera mostraron diferencia estadísticamente significativa en comparación con el C-. Se obtuvieron los

valores del control positivo de LPS (2167 pg/mL) el cual fue considerado como el de máximo nivel de producción de IL-6. Los resultados se compararon contra el control negativo debido a que se buscaba el observar si los péptidos lograban estimular a los macrófagos para inducir la citocina IL-6 en comparación contra un grupo de macrófagos sin estimularlos; a su vez, se buscaba que los péptidos llegaran a tener la respuesta más cercana al control positivo de lipopolisacárido (LPS) debido a que es una glicoproteína que desempeñan una importante función en la activación del sistema inmune.⁸⁵

Tabla 5. Concentraciones de IL-6 (pg/mL) producidas por los macrófagos al estimularlos con los péptidos TvZIP-2, TvZIP-4 y TvZIP-8.

Péptido	50 µg/kg	100 µg/kg	200 µg/kg
TvZIP 2	395.8 ± 36.83	604.2 ± 36.83	1099 ± 73.66*
TvZIP 4	265.6 ± 221	760.4 ± 36.83*	1646 ± 36.83*
TvZIP 8	447.9 ± 36.83	1490 ± 110.5*	1828 ± 147.3*

Los asteriscos (*) señalan diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo C-, donde *p<0.05. Control negativo, C- (454.2 pg/mL), Control positivo de LPS, C+ (2167 pg/mL)

La Figura 13 muestra los niveles de TNF-α inducidos por los macrófagos al estimularlos con los péptidos, donde se observa un aumento TNF-α dependiente de la dosis al estímulo.

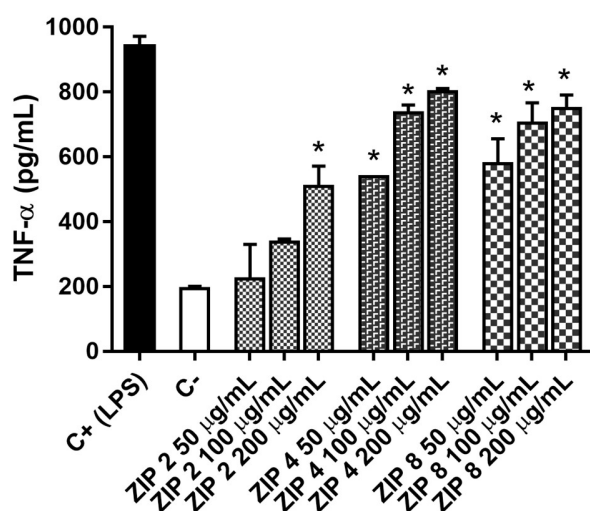


Figura 13. Evaluación de la secreción de TNF-α en macrófagos estimulados con los péptidos TvZIP-2, TvZIP-4 y TvZIP8 a las concentraciones 50, 100 y 200 µg/mL. Los

resultados representan la media \pm D.E. Se realizó un ANOVA de una vía, seguida de un *post hoc* de Dunnett, donde $*p < 0.05$ muestra diferencia significativa con respecto al control negativo (C-).

La Tabla 6 muestra los resultados de las concentraciones obtenidas de TNF- α ; como se observa los macrófagos estimulados con el péptido TvZIP-4 a la concentración 200 $\mu\text{g/mL}$ mostraron mayor inducción de TNF- α (800.9 pg/mL) y diferencia estadísticamente significativa de $*p < 0.05$ en contraste con el grupo C- (194.2 pg/mL), el cual fue considerado con el menor producción de TNF- α al ser macrófagos sin estímulo. Los macrófagos tratados con los péptidos TvZIP-2 (200 $\mu\text{g/mL}$), TvZIP-4 (50, 100 $\mu\text{g/mL}$) y TvZIP-8 (50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$) mostraron diferencia estadísticamente significativa en contraste con el grupo C-; los valores obtenidos del C+(LPS) fueron 940 pg/mL . De la misma manera, los resultados se compararon contra el control negativo debido a que se buscaba el observar si los péptidos lograban estimular a los macrófagos para inducir TNF- α comparándolos contra un grupo de macrófagos sin estimularlos; a su vez, se buscaba que los péptidos llegaran a tener la respuesta más cercana al control positivo de LPS.⁸⁵

Tabla 6. Concentraciones de TNF- α (pg/mL) producidas por los macrófagos al estimularlo con los péptidos TvZIP-2, TvZIP-4 y TvZIP-8

Péptido	50 $\mu\text{g/kg}$	100 $\mu\text{g/kg}$	200 $\mu\text{g/kg}$
TvZIP 2	224.6 \pm 105.9	336.8 \pm 10.59	509 \pm 63.51*
TvZIP 4	538.9 \pm 0*	735.9 \pm 24.56*	800.9 \pm 10.59*
TvZIP 8	578.7 \pm 77.49*	703.6 \pm 63.51*	748.5 \pm 42.34*

Los asteriscos (*) señalan diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo control negativo, C- (194.2 pg/mL), donde $*p < 0.05$. Control positivo de LPS (940 pg/mL)

TNF- α participa en la permeabilidad vascular que conduce al reclutamiento de células inflamatorias al ser un potente activador de neutrófilos, al igual que participa en mediación de la adherencia, la quimiotaxis, la desgranulación, y el estallido respiratorio, es decir en la producción de ERN y ERO.⁸⁶ Xie y col.³⁸ estudiaron α -actinina como una proteína con potencial inmunogénico como posible candidato al desarrollo de una vacuna contra *T. vaginalis*, evaluaron la función protectora de α -actinina contra *T. vaginalis* en un modelo murino, donde inmunizaron ratones con α -actinina y lograron detectar altos niveles de IgG específicos en los sueros, por otra parte, se obtuvieron esplenocitos de los ratones inmunizados y se estimularon nuevamente con los antígenos, y se pudo observar un incremento en la producción de las citocinas IFN- γ , IL-6, IL-17A e IL-10 después de la estimulación repetida *In vitro*. Dando como conclusión que los antígenos de α -actinina se podrían considerar como candidatos prometedores a

vacunas contra la tricomoniasis. Mendoza y col.⁴⁰ analizaron mediante análisis bioinformático proteínas transportadoras de iones en *T. vaginalis*, seleccionaron y estudiaron el potencial inmunogénico de la proteína recombinante del transportador de calcio Ca^{2+} de *T. Vaginalis* (TvTRPV), con la cual inmunizaron ratones de la cepa Balb/C para detectar los niveles de anticuerpos específicos en los sueros de los ratones; en macrófagos peritoneales en co-cultivo con linfocitos CD4⁺ de los ratones inmunizados fueron estimulados nuevamente *In vitro* con la proteína, y se obtuvieron los sobrenadantes donde se analizaron las citocinas IL-1 β , IL-6, and TNF- α , IL-10 e IFN- γ . Los resultados mostraron que la proteína recombinante TvTRPV es capaz de estimular la producción de las citocinas IL-1 β , IL-6, y TNF- α , las cuales participan como mediadores quimiotácticos para reclutar a los neutrófilos a los sitios de infección y combatir al parásito, así como en el proceso inflamatorio, igual se observó que la proteína es capaz de inducir anticuerpos IgG específicos; concluyendo que la proteína recombinante TvTRPV podría considerarse como candidato a vacuna.

Con lo anterior, se sugiere que los péptidos de TvZIP presentan potencial inmunogénico al poder estimular la producción de las citocinas proinflamatorias IL-6, y TNF- α en los macrófagos. Se propone hasta el momento que tanto el péptido de TvZIP-4 y TvZIP-8 a la concentración 200 μ g/mL podrían ser los más prometedores para un método terapéutico dirigido; sin embargo, faltan diversos estudios por realizar para poder esclarecer como participan los péptidos de TvZIP-4 y TvZIP-8 en la protección contra la infección.

7.3. Determinación del efecto de los péptidos sobre la producción de NO y H₂O₂ en macrófagos peritoneales murinos

La producción de H₂O₂ en los macrófagos peritoneales murinos tratados con los péptidos, mostraron un aumento dependiente de la concentración como se observa en la Figura 14.

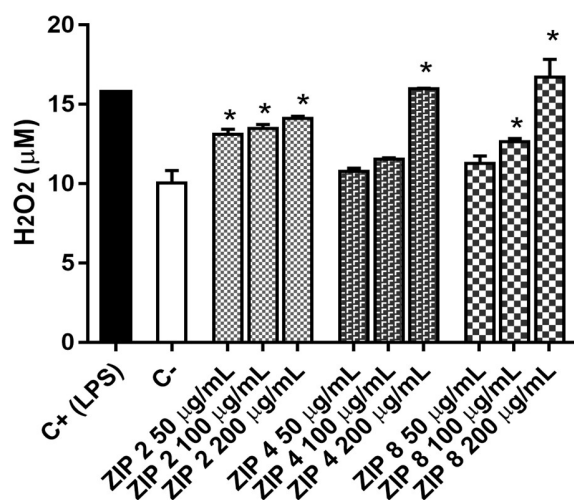


Figura 14. Evaluación de la secreción de H₂O₂ en macrófagos estimulados con los péptidos TvZIP-2, TvZIP-4 y TvZIP8 a las concentraciones 50, 100 y 200 µg/mL. Los resultados representan la media ± D.E. Se realizó un ANOVA de una vía, seguida de un *post hoc* de Dunnett, donde *p<0.05 muestra diferencia significativa con respecto al control negativo (C-).

La Tabla 7 muestra los resultados de las concentraciones obtenidas de H₂O₂, los macrófagos tratados con el péptido TvZIP-8 a la concentración 200 µg/mL mostró la mayor inducción de H₂O₂ (16.7 µM) y mostró diferencia estadísticamente significativa de *p<0.05 en comparación con el con el grupo C-(10.04 µM), el cual fueron macrófagos sin tratamiento. A su vez, el estímulo de macrófagos con el péptido de TvZIP-8 mostró una mejor concentración de H₂O₂ comparándolo con el C+ de LPS. Los macrófagos tratados con los péptidos TvZIP-2 (50,100 Y 200 µg/mL), TvZIP-4 (200 µg/mL) y TvZIP-8 (100 µg/mL) de igual manera mostraron diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo C-. Los valores obtenidos del C+(LPS) fueron 15.77 µM. Los resultados obtenidos de igual forma se compararon contra el control negativo debido a que se buscaba el observar si los péptidos lograban estimular a los macrófagos para inducir H₂O₂, comparándolos contra un grupo de macrófagos sin estimularlos; en cuanto, se buscaba que los péptidos llegaran a tener la respuesta más cercana al control positivo de LPS.⁸⁵

Tabla 7. Concentraciones de H₂O₂ μ M producidas por los macrófagos por efecto de los péptidos

Péptido	50 μ g/mL	100 μ g/mL	200 μ g/mL
TvZIP 2	13.13 \pm 0.3074*	13.47 \pm 0.2635*	14.12 \pm 0.1318*
TvZIP 4	10.77 \pm 0.2196	11.55 \pm 0.0878	15.99 \pm 0.0439*
TvZIP 8	11.27 \pm 0.4831	12.63 \pm 0.2196*	16.7 \pm 1.142*

Los asteriscos (*) señalan diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo C-, donde * p <0.05. Control negativo, C- (10.04 μ M); control positivo de LPS, C+ (15.77 μ M)

La producción de NO en los macrófagos peritoneales murinos tratados con los péptidos, mostraron un aumento dependiente de la concentración como se observa en la Figura 15.

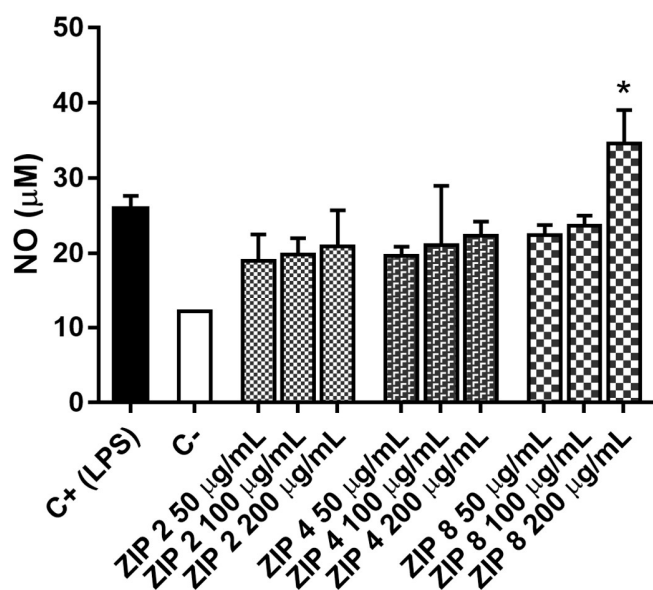


Figura 15. Evaluación de la secreción de NO en macrófagos estimulados con los péptidos TvZIP-2, TvZIP-4 y TvZIP8 a las concentraciones 50, 100 y 200 μ g/mL. Los resultados representan la media \pm D.E. Se realizó un ANOVA de una vía, seguida de un *post hoc* de Dunnett, donde * p <0.05 muestra diferencia significativa con respecto al control negativo (C-).

La Tabla 8 muestra los resultados de las concentraciones obtenidas de NO, donde se observa que el tratamiento con el péptido TvZIP-8 a la concentración 200µg/mL estimulo la mayor producción de NO (34.63 µM) y mostro diferencia estadísticamente significativa con *p<0.05 en contraste con el C-(12.13 µM). Los tratamientos con los péptidos TvZIP-2 (50, 100, 200 µg/mL), TvZIP-4 (50, 100, 200 µg/mL) y TvZIP-8 (50, 100 µg/mL) no mostraron diferencia estadística contra el C-. Se obtuvieron los niveles de C+ que fueron de 25.88 µM. Los resultados obtenidos se compararon contra el C- debido a que se buscaba observar si los péptidos lograban estimular a los macrófagos para producir NO comparándolos contra un grupo de macrófagos sin estimularlos; de igual manera, se buscaba que los péptidos llegaran a tener la respuesta más cercana al control positivo de LPS.⁸⁵ Los resultados obtenidos del estímulo de macrófagos con el péptido de TvZIP-8 mostró una mejor concentración de NO comparándolo con el C+ de LPS, este resultado al compararse con los resultados obtenidos de IL-6, TNF-α y H₂O₂ se observa que el péptido de TvZIP-8 tiene una mejor respuesta en la mayoría de los ensayos, lo cual, lo coloca como el péptido con mayor potencial inmunogénico en contraste con TvZIP-2 y TvZIP-4 que de igual manera presentan potencial inmunogénico.

Tabla 8. Concentraciones de NO producidas por los macrófagos por efecto de los péptidos

Péptido	Concentraciones de NO (µM)		
	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL
TvZIP 2	19.00 ± 3.536	19.83 ± 2.195	20.88 ± 4.841
TvZIP 4	19.63 ± 1.25	21.08 ± 7.914	22.33 ± 1.909
TvZIP 8	22.44 ± 1.326	23.69 ± 1.326	34.63 ± 4.41*

Las especies reactivas como es el caso del H₂O₂ y NO participan como mecanismo de defensa del sistema inmune, ayudando en los procesos inflamatorios para la eliminación patógenos. Babior.⁸⁷ describe el papel del H₂O₂ y NO como agentes oxidantes microbicidas, los cuales son altamente reactivos. Los agentes oxidantes como el H₂O₂ y NO se pueden producir con el propósito de eliminar microorganismos invasores, pero también pueden llegar a causar daño en los tejidos cercanos o enfermedades; por tanto, la regulación de los agentes oxidantes como el NO y el H₂O₂ es necesaria. Se ha reportado la importancia de los macrófagos en la producción citocinas proinflamatorias, ERO y ERN en la defensa del anfitrión contra *T. vaginalis*. Durante la infección causada por *T. vaginalis* los neutrófilos son las principales células proinflamatorias que predominan en los sitios de infección.^{18,33} Estudios realizador por Han y col.⁸⁸ evaluaron en macrófagos humanos en co-cultivo con *T. vaginalis* la producción de citocinas proinflamatorias y la producción de ERN, donde dio como resultado que *T. vaginalis* es capaz de estimular a los macrófagos para la producción de las citocinas proinflamatorias

como IL-1 β , IL-6 y TNF- α y NO, vía NF- κ B. Como discusión ponen por manifiesto que los macrófagos se encuentran involucrados en los procesos inflamatorios, debido a que la producción de citocinas proinflamatorias por los macrófagos participa como mediadores para el reclutamiento de los neutrófilos al sitio de infección como la vagina durante la tricomoniasis. De igual manera, Boris y Barbés.⁸⁹ mediante estudios *In vitro* han descrito el efecto protector del H₂O₂ y NO en infecciones vaginales producidas por microorganismos como *Neisseria gonorrhoeae* y *Candida albicans*, las cuales son infecciones de transmisión sexual que suelen confundirse en los signos y síntomas causados por *T. vaginalis*.

Con lo anterior descrito, los resultados de los péptidos TvZIP-2, TvZIP-4 Y TvZIP-8 a través de la producción de las citocinas IL-6 y TNF- α , H₂O₂ y NO se puede confirmar la posibilidad de ubicar a los péptidos como inmunogénicos, donde TvZIP-4 y TvZIP-8 a la concentración de 200 μ g/mL tienen mejores resultados, lo cual podría ubicarlos como posibles métodos terapéuticos contra la infección, debido a su capacidad de producir una respuesta inmune celular al ser reconocidos por las CPA como lo son los macrófagos y su importancia al estimular las citocinas proinflamatoria en la defensa del huésped; sin embargo, estos estudios se podrían complementar evaluando el potencial de los péptidos en el bloqueo de la citotoxicidad de parásito, con el fin de conocer el potencial de protección de los péptidos contra el parásito.

7.4. Evaluación de la respuesta inmune humoral inducida por los péptidos, mediante la determinación de anticuerpos séricos IgG

Se ha reportado en pacientes infectados con *T. vaginalis* la presencia de anticuerpos IgG, IgM e IgA en los sueros y en las secreciones de los pacientes; sin embargo, se ha descrito que el parásito a través de las CPs es capaz de degradar la cadena pesada de las inmunoglobulinas como método de evasión del sistema inmune del huésped. Pese a ello, el estudiar la producción de anticuerpos contra antígenos específicos de *T. vaginalis*, así como estudiar la cinética de los anticuerpos circulantes post-tratamiento como indicador de infecciones crónicas, sigue siendo relevante para comprender el papel de los anticuerpos específicos sobre la infección y su papel protector en el huésped.^{18,33,90}

Se evaluaron las distintas dosis empleadas de los tres péptidos de TvZIP, con el fin de identificar la dosis ideal, capaz de producir una respuesta inmune humoral. Como se ha reportado en la literatura, es importante la cantidad del inmunógeno que interacciona con el individuo, debido a que dosis pequeñas o dosis muy altas inducen tolerancia o respuestas alteradas. De igual manera, la administración del inmunógeno de forma intermitente es más efectivo, permitiendo la adquisición del antígeno, sensibilizar al individuo e incrementar la memoria inmunológica al antígeno.⁹¹

La Figura 16 muestra los resultados obtenidos de los niveles séricos de IgG específicos, donde manifiestan que los grupos experimentales inmunizados con los péptidos TvZIP-2, TvZIP-4 y TvZIP-8 a las 3 dosis evaluadas (50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) presentaron niveles más elevados de anticuerpos IgG posteriores a sus refuerzos cada 15 días (15, 30 y 45 días, respectivamente).

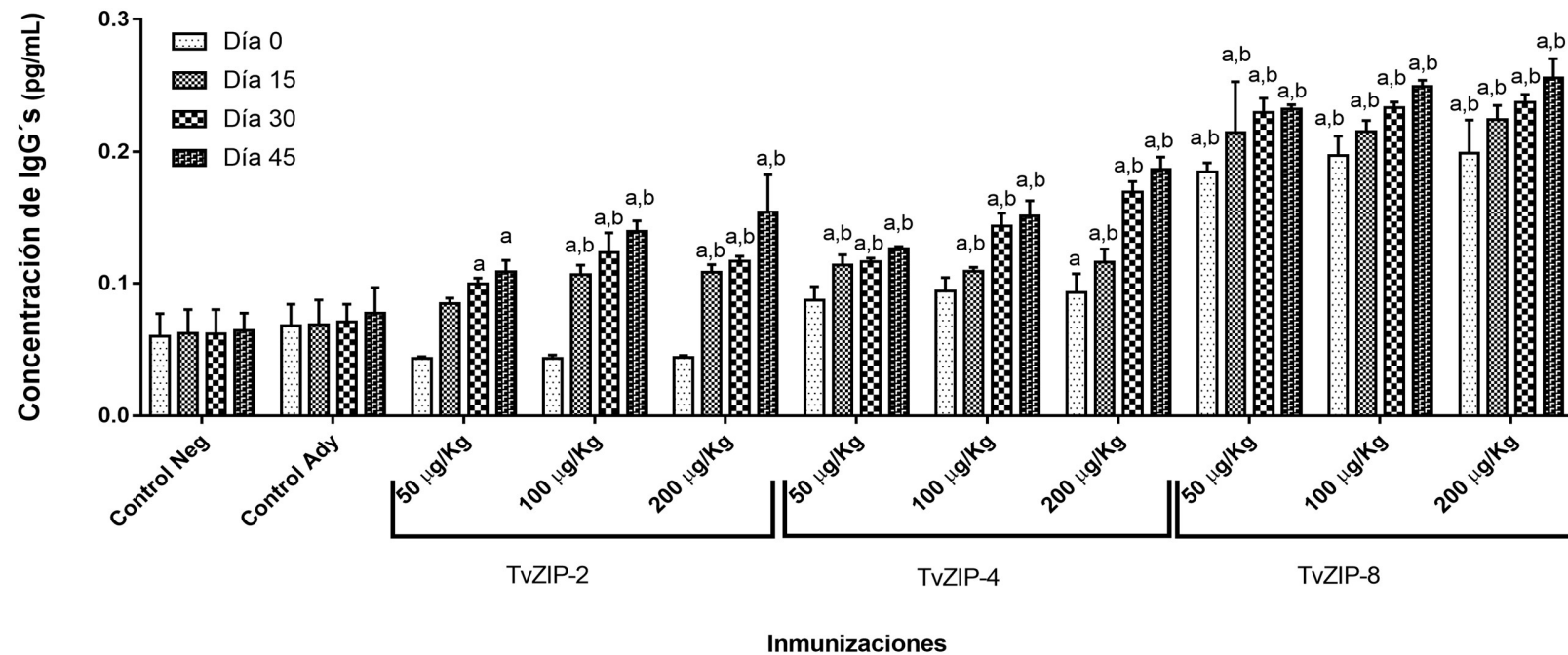


Figura 16. Niveles de inmunoglobulinas IgG totales péptido específicas detectados en ratones Balb/C en los distintos tiempos evaluados. Los resultados representan la media \pm D.E. Se realizó una ANOVA de dos vías, seguido de una prueba *post hoc* de Tukey. La letra "a" indica diferencia significativa en comparación con el control negativo del mismo día, con $p < 0.05$. La letra "b" indica diferencia significativa en comparación con el adyuvante del mismo día, con $p < 0.05$.

En la Figura 16 se puede observar que para el control negativo y el control de adyuvante no hubo un incremento en los niveles de anticuerpos IgG estadísticamente significativo con respecto al paso de tiempo, sin embargo, los grupos experimentales tratados con los péptidos TvZIP-2, TvZIP-4 y TvZIP-8 a las 3 dosis 50, 100 y 200 µg/Kg mostraron un aumento en los títulos de IgG con respecto al tiempo y el cual fue exponencial.

Los resultados de las IgG séricas manifiestan que la exposición del sistema inmunológico a los péptidos de TvZIP aumentó su capacidad de respuesta ante un nuevo contacto frente a dichos péptidos. Las respuestas secundarias frente a los péptidos resultaron más rápidas, no fueron dependientes del tiempo transcurrido y resultaron más intensas en comparación con la respuesta inmune primaria frente dichos antígenos (péptidos). La estimulación de los linfocitos “vírgenes” con los péptidos de TvZIP (*in vivo*) a sus diferentes concentraciones generó células de memoria de vida prolongada; la memoria inmunológica se debió a que, con cada exposición a los péptidos mediante las re-estimulaciones, el clon de linfocitos específicos para estos péptidos se expandió.⁹²

De acuerdo con todo lo anterior, los resultados mostraron que la respuesta inmune humoral desencadenada frente a los tres péptidos a sus tres diferentes concentraciones fue dependiente de la dosis, siendo el péptido de TvZIP-8 a la concentración de 200 µg/kg la ideal para inducir niveles elevados de anticuerpos IgG desde la primera inmunización; de igual manera, mostro que la administración del péptido de TvZIP-8 en distintos intervalos de tiempo, logra un efecto potencializado y sostenido de dicha respuesta inmunológica caracterizada por la memoria inmunológica contra el péptido de TvZIP-8.

Se ha demostrado que otros microorganismos como *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania major* son capaces de estimular en macrófagos de ratones el aumento de secreción de las citoquinas como TNF- α , IL-6, EROS, entre otros.^{93,94} En este trabajo se logró demostrar que los péptidos TvZIP-2, TvZIP-4 y TvZIP-8 de *T. Vaginalis* seleccionados con potencial inmunogénico mediante análisis bioinformático, son capaces de estimular la función efectora en los macrófagos mediante la producción IL-6, TNF- α , NO y H₂O₂, donde se encontró un aumento significativo en comparación con los macrófagos sin tratamiento. Se ha descrito que en la tricomoniasis las citocinas TNF- α e IL-6 son mediadores quimiotácticos que se encuentra implicados en los procesos inflamatorios y desempeña un papel crucial *in vivo* como mediadores en el reclutamiento de neutrófilos en los tejidos infectados en mujeres.^{88,95,96} A su vez, la producción de NO y H₂O₂ con los macrófagos estimulados los péptidos, indicaron que los péptidos podrían relacionarse con el daño oxidativo contra el parásito al estimular el daño celular. De igual manera, los péptidos fueron capaces de ser reconocidos por los linfocitos B y producir IgG péptidos-específicas, demostrando su capacidad en producir una respuesta inmune humoral. El péptido TvZIP-8 mostro mayor potencial inmunogénico y mejor afinidad al MHC-II, lo cual concuerda con los resultados obtenidos del análisis bioinformático al determinar que el péptido de TvZIP-8 mostraba mayor potencial inmunogénico en contraste con TvZIP-2 y

TvZIP-4; con base en ello, el péptido de TvZIP-8 podría ser considerado como posible candidato para un método terapéutico contra la tricomoniasis.

VIII. CONCLUSIONES

Se seleccionaron tres péptidos de los transportadores TvZIP-2, TvZIP-4 y TvZIP-8 de *Trichomonas vaginalis* con el mayor potencial antigénico identificado por los análisis bioinformáticos.

Los tres péptidos seleccionados indujeron una respuesta inmune celular determinada por la producción de las citocinas IL-6 y TNF- α en macrófagos peritoneales murinos, siendo el péptido de TvZIP-8 el de mayor inducción de las citocinas.

Los tres péptidos seleccionados indujeron la producción de especies reactivas de NO y H₂O₂ en macrófagos peritoneales murinos, siendo el péptido de TvZIP-8 el de mayor inducción.

El ensayo *in vivo* demostró que los tres péptidos indujeron una respuesta inmune humoral al producir anticuerpos IgG péptido específicos, donde el péptido de TvZIP-8 mostró una mejor estimulación al tener niveles más elevados en los títulos de IgG's.

Los tres péptidos mostraron tener potencial inmunogénico, sin embargo, el péptido de TvZIP-8 mostro mejores resultados en comparación de TvZIP-2 y TvZIP-4.

IX. REFERENCIAS.

- (1) Fernández-Martín, K. G.; Álvarez-Sánchez, M. E.; Arana-Argáez, V. E.; Álvarez-Sánchez, L. C.; Lara-Riegos, J. C.; Torres-Romero, J. C. Genome-Wide Identification, in Silico Characterization and Expression Analysis of ZIP-like Genes from *Trichomonas Vaginalis* in Response to Zinc and Iron. *BioMetals* **2017**, 1–13.
- (2) Cadena, D.; Néstor, M.; Néstor, C. Tricomoniasis Urogenital. *Tricomoniasis Urogenit.* **2006**, 3 (4), 84–89.
- (3) Santos, I. D. Tricomoniasis: Una Visión Amplia. *Iatreia* **2014**, 27 (2), 198–205.
- (4) Ibáñez-Escribano, A.; Gómez-Barrio, A. *Trichomonas Vaginalis*: The Versatility of a Tenacious Parasite. *An. la Real Acad. Nac. Farm.* **2017**, 83 (1), 10–47.
- (5) Costamagna, S. R.; Figueroa, M. P. On the Ultrastructure of *Trichomonas Vaginalis*: Cytoskeleton, Endocytosis and Hydrogenosomes. *Parasitol. al día* **2001**, 25 (3–4), 100–108.
- (6) Petrin, D.; Delgaty, K.; Bhatt, R.; Garber, G. Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas Vaginalis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **1998**, 11 (2), 300–317.
- (7) Kulda, J. Trichomonads, Hydrogenosomes and Drug Resistance. *Int. J. Parasitol.* **1999**, 29 (2), 199–212.
- (8) Centers for Disease Control and Prevention. Trichomoniasis <https://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/index.html> (accessed Nov 29, 2017).
- (9) López-Olmos, J.; Gasull, J. Infección Vaginal Por Tricomonas (e Infecciones Mixtas) y Atipias Celulares, En La Citología Cervicovaginal. *Clin. Invest. Ginecol. Obstet.* **2011**, 38 (4), 120–127.
- (10) Salud, O. M. de la. *Centro de Prensa Infecciones de Transmisión Sexual*; 2016.
- (11) Figueroa-Angulo, E. E.; Rendón-Gandarilla, F. J.; Puente-Rivera, J.; Calla-Choque, J. S.; Cárdenas-Guerra, R. E.; Ortega-López, J.; Quintas-Granados, L. I.; Álvarez-Sánchez, M. E.; Arroyo, R. The Effects of Environmental Factors on the Virulence of *Trichomonas Vaginalis*. *Microbes Infect.* **2012**, 14 (15), 1411–1427.
- (12) Quintas-Granados, L. I.; Villalpando, J. L.; Vázquez-Carrillo, L. I.; Arroyo, R.; Mendoza-Hernández, G.; Álvarez-Sánchez, M. E. TvMP50 Is an Immunogenic Metalloproteinase during Male Trichomoniasis. *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, 12 (7), 1953–1964.
- (13) Secretaria De Salud. Boletín epidemiológico del sistema nacional de vigilancia epidemiológica <http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-> (accessed Jun 13, 2019).
- (14) Sood, S., Kapil, A. An Update on *Trichomonas Vaginalis*. *Indian J. Sex. Transm.*

Dis. AIDS **2008**, 29 (1), 7.

- (15) Stark, J. R.; Judson, G.; Alderete, J. F.; Mundodi, V.; Kucknoor, A. S.; Giovannucci, E. L.; Platz, E. A.; Sutcliffe, S.; Fall, K.; Kurth, T.; et al. Prospective Study of *Trichomonas Vaginalis* Infection and Prostate Cancer Incidence and Mortality: Physicians' Health Study. *J. Natl. Cancer Inst.* **2009**, 101 (20), 1406–1411.
- (16) Harp, D. F.; Chowdhury, I. Trichomoniasis: Evaluation to Execution Djana. *Eur J Obs. Gynecol Reprod Biol* **2016**, 34 (5), 352–359.
- (17) Alvarez, H. M. H.; Ramos, I. S.; Pérez, J. S. Infección Humana Por *Trichomonas Vaginalis* y Su Relación Con Otros Agentes Patógenos. *Rev. Cuba. Obstet. y Ginecol.* **2009**, 35 (4), 108–117.
- (18) Malla, N.; Goyal, K.; Dhanda, R. S.; Yadav, M. Immunity in Urogenital Protozoa. *Parasite Immunol.* **2014**, 36 (9), 400–408.
- (19) Horváthová, L.; Šafaříková, L.; Basler, M.; Hrdý, I.; Campo, N. B.; Shin, J. W.; Huang, K. Y.; Huang, P. J.; Lin, R.; Tang, P.; et al. Transcriptomic Identification of Iron-Regulated and Iron-Independent Gene Copies within the Heavily Duplicated *Trichomonas Vaginalis* Genome. *Genome Biol. Evol.* **2012**, 4 (10), 1017–1029.
- (20) Porcheron, G.; Garénaux, A.; Proulx, J.; Sabri, M.; Dozois, C. M. Iron, Copper, Zinc, and Manganese Transport and Regulation in Pathogenic Enterobacteria: Correlations between Strains, Site of Infection and the Relative Importance of the Different Metal Transport Systems for Virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2013**, 3 (December), 1–24.
- (21) Dean, P.; Major, P.; Nakjang, S.; Hirt, R. P.; Embley, T. M. Transport Proteins of Parasitic Protists and Their Role in Nutrient Salvage. *Front. Plant Sci.* **2014**, 5 (April), 153.
- (22) Kambe, T.; Hashimoto, A.; Fujimoto, S. Current Understanding of ZIP and ZnT Zinc Transporters in Human Health and Diseases. **2014**, 3281–3295.
- (23) Kambe, T.; Yamaguchi-Iwai, Y.; Sasaki, R.; Nagao, M. Overview of Mammalian Zinc Transporters. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, 61 (1), 49–68.
- (24) Guerinot, M. Lou. The ZIP Family of Metal Transporters. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2000**, 1465 (1–2), 190–198.
- (25) Grass, G.; Wong, M. D.; Rosen, B. P.; Smith, R. L.; Rensing, C. ZupT Is a Zn (II) Uptake System in Escherichia Coli. *J. Bacteriol.* **2002**, 184 (3), 864–866.
- (26) Gaither, L. A.; Eide, D. J. Functional Expression of the Human HZIP2 Zinc Transporter. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275 (8), 5560–5564.
- (27) Dufner-Beattie, J.; Langmade, S. J.; Wang, F.; Eide, D.; Andrews, G. K. Structure, Function, and Regulation of a Subfamily of Mouse Zinc Transporter Genes. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (50), 50142–50150.
- (28) Huynh, C.; Sacks, D. L.; Andrews, N. W. A *Leishmania Amazonensis* ZIP Family

- Iron Transporter Is Essential for Parasite Replication within Macrophage Phagolysosomes. *J. Exp. Med.* **2006**, *203* (10), 2363–2375.
- (29) Li, S.; Zhou, X.; Huang, Y.; Zhu, L.; Zhang, S.; Zhao, Y.; Guo, J.; Chen, J.; Chen, R. Identification and Characterization of the Zinc-Regulated Transporters, Iron-Regulated Transporter-like Protein (ZIP) Gene Family in Maize. *BMC Plant Biol.* **2013**, *13* (1), 114.
- (30) Schneider, R. D. O.; Diehl, C.; dos Santos, F. M.; Piffer, A. C.; Garcia, A. W. A.; Kulmann, M. I. R.; Schrank, A.; Kmetzsch, L.; Vainstein, M. H.; Staats, C. C. Effects of Zinc Transporters on *Cryptococcus Gattii* Virulence. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10104.
- (31) Do, E.; Hu, G.; Caza, M.; Kronstad, J.; Jung, W. H. The ZIP Family Zinc Transporters Support the Virulence of *Cryptococcus Neoformans*. *Med. Mycol.* **2016**, *54* (6), 605–615.
- (32) Hickey, D. K.; Patel, M. V.; Fahey, J. V.; Wira, C. R. Innate and Adaptive Immunity at Mucosal Surfaces of the Female Reproductive Tract: Stratification and Integration of Immune Protection against the Transmission of Sexually Transmitted Infections. *J. Reprod. Immunol.* **2011**, *88* (2), 185–194.
- (33) Nemati, M.; Malla, N.; Yadav, M.; Khorramdelazad, H.; Jafarzadeh, A. Humoral and T Cell-Mediated Immune Response against Trichomoniasis. *Parasite Immunol.* **2017**, No. November 2017, 1–11.
- (34) Fichorova, R. N. Impact of *T. Vaginalis* Infection on Innate Immune Responses and Reproductive Outcome. *J Reprod Immunol* **2010**, *83*, 185–189.
- (35) Vázquez, F.; José García, M.; Pérez, F.; Palacio, V. *Trichomonas Vaginalis*: Tratamiento y Resistencia a Nitroimidazoles. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2001**, *19*, 114–124.
- (36) Alderete, J. F.; Garza, G. E. Specific Nature of *Trichomonas Vaginalis* Parasitism of Host Cell Surfaces. *Infect. Immun.* **1985**, *50* (3), 701–708.
- (37) Provenzano, D.; Alderete, J. F. Analysis of Human Immunoglobulin-Degrading Cysteine Proteinases of *Trichomonas Vaginalis*. *Infect. Immun.* **1995**, *63* (9), 3388–3395.
- (38) Xie, Y.-T.; Gao, J.-M.; Wu, Y.-P.; Tang, P.; Hide, G.; Lai, D.-H.; Lun, Z.-R. Recombinant α -Actinin Subunit Antigens of *Trichomonas Vaginalis* as Potential Vaccine Candidates in Protecting against Trichomoniasis. *Parasites and Vectors* **2017**, *10* (1), 1–12.
- (39) Smith, J. D.; Garber, G. E. *Trichomonas Vaginalis* Infection Induces Vaginal CD4 + T-Cell Infiltration in a Mouse Model: A Vaccine Strategy to Reduce Vaginal Infection and HIV Transmission. **2015**, *212*, 285–293.
- (40) Mendoza-Oliveros, T.; Arana-Argáez, V.; Alvaréz-Sánchez, L. C.; Lara-Riegos, J.; Alvaréz-Sánchez, M. E.; Torres-Romero, J. C. Immune Response of BALB/c Mice toward Putative Calcium Transporter Recombinant Protein of *Trichomonas Vaginalis*. *Korean J. Parasitol.* **2019**, *57* (1), 33–38.

- (41) Häse, C. C.; Fedorova, N. D.; Galperin, M. Y.; Dibrov, P. A.; Fedorova, N. D.; Galperin, M. Y. Sodium Ion Cycle in Bacterial Pathogens : Evidence from Cross-Genome Comparisons Sodium Ion Cycle in Bacterial Pathogens : Evidence from Cross-Genome Comparisons. **2001**, *65* (3), 353–370.
- (42) Garmory, H. S.; Titball, R. W. ATP-Binding Cassette Transporters Are Targets for the Development of Antibacterial Vaccines and Therapies MINIREVIEW ATP-Binding Cassette Transporters Are Targets for the Development of Antibacterial Vaccines and Therapies. *Society* **2004**, *72* (12), 6757–6763.
- (43) Zang, Z.; Xu, Y.; Lau, A. T. Y. Preparation of Highly Specific Polyclonal Antibody for Human Zinc Transporter ZIP8. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **2015**, *47* (11), 946–949.
- (44) Smith, L. M.; May, R. C. Mechanisms of Microbial Escape from Phagocyte Killing. *Biochem. Soc. Trans.* **2013**, *41* (2), 475–490.
- (45) Flannagan, R. S.; Cosío, G.; Grinstein, S. Antimicrobial Mechanisms of Phagocytes and Bacterial Evasion Strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7* (5), 355–366.
- (46) Manish Mittal,1 Mohammad Rizwan Siddiqui,1 Khiem Tran,1 Sekhar P. Reddy, 2 and Asrar B. Malik1. Neuropathology of HIV/AIDS with an Overview of the Indian Scene. *Indian J. Med. Res.* **2005**, *121* (4), 468–488.
- (47) Aktan, F. INOS-Mediated Nitric Oxide Production and Its Regulation. *Life Sci.* **2004**, *75* (6), 639–653.
- (48) Lugrin, J.; Rosenblatt-Velin, N.; Parapanov, R.; Liaudet, L. The Role of Oxidative Stress during Inflammatory Processes. *Biol. Chem.* **2014**, *395* (2), 203–230.
- (49) Rahal, A.; Kumar, A.; Singh, V.; Yadav, B.; Tiwari, R.; Chakraborty, S.; Dhama, K. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*.
- (50) Neeffjes, J.; Jongsma, M. L. M.; Paul, P.; Bakke, O. Towards a Systems Understanding of MHC Class I and MHC Class II Antigen Presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11* (12), 823–836.
- (51) Civelek, M.; Lusic, A. J.; Genetics, M.; Angeles, L. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules Kenneth. **2014**, *15* (1), 34–48.
- (52) Vega, G. Complejo Mayor de Histocompatibilidad. *Artemisa medigraphic* **2009**, *52* (2), 86–89.
- (53) López-Martínez, A.; Chávez-Muñoz, C.; Granados, J. Función Biológica Del Complejo Principal de Histocompatibilidad. *Rev. Investig. Clin.* **2005**, *57* (2), 132–141.
- (54) Rappuoli, R. Reverse Vaccinology, a Genome-Based Approach to Vaccine Development. *Vaccine* **2001**, *19* (17–19), 2688–2691.
- (55) Rappuoli, R. Reverse Vaccinology and Genomics. *Science (80-.)*. **2003**, *302* (5645), 602–602.

- (56) Ferreira, J.; Porco, A. VACUNAS DERIVADAS DEL ANÁLISIS DE LOS GENOMAS : VACUNOLOGÍA INVERSA. *Interciencia* **2008**, 33, Num 5., 353–358.
- (57) Vivona, S.; Gardy, J. L.; Ramachandran, S.; Brinkman, F. S. L.; Raghava, G. P. S.; Flower, D. R.; Filippini, F. Computer-Aided Biotechnology: From Immunoinformatics to Reverse Vaccinology. *Trends Biotechnol.* **2008**, 26 (4), 190–200.
- (58) Groot, A. S. De. Immunomics: Discovering New Targets for Vaccines and Therapeutics. *Ddt* **2006**, 11 (5/6), 181–190.
- (59) Davies, M. N.; Flower, D. R. Harnessing Bioinformatics to Discover New Vaccines. *Drug Discov. Today* **2007**, 12 (9–10), 389–395.
- (60) Vázquez-Chagoyán, J. C.; Gupta, S.; Garg, N. J. Vaccine Development Against Trypanosoma Cruzi and Chagas Disease. *Adv. Parasitol.* **2011**, 75, 121–146.
- (61) Flower, D. R. Immunoinformatics and the Prediction of Immunogenicity. *Appl. Bioinformatics* **2002**, 4, 167–176.
- (62) De Groot, A. S.; Sbai, H.; Aubin, C. Saint; McMurry, J.; Martin, W. Immunoinformatics: Mining Genomes for Vaccine Components. *Immunol. Cell Biol.* **2002**, 80 (3), 255–269.
- (63) Herrera-Najera, C.; Piña-Aguilar, R.; Xacur-García, F.; Ramirez-Sierra, M. J.; Dumonteil, E. Mining the Leishmania Genome for Novel Antigens and Vaccine Candidates. *Proteomics* **2009**, 9 (5), 1293–1301.
- (64) McMurry, J.; Sbai, H.; Gennaro, M. L.; Carter, E. J.; Martin, W.; De Groot, A. S. Analyzing Mycobacterium Tuberculosis Proteomes for Candidate Vaccine Epitopes. *Tuberculosis* **2005**, 85 (1–2 SPEC.ISS.), 95–105.
- (65) Moise, L.; McMurry, J. A.; Pappo, J.; Lee, D. S.; Moss, S. F.; Martin, W. D.; De Groot, A. S. Identification of Genome-Derived Vaccine Candidates Conserved between Human and Mouse-Adapted Strains of H. Pylori. *Hum. Vaccin.* **2008**, 4 (3), 219–223.
- (66) Rasoloson, D.; Vaňáčková, Š. ě; Tomková, E.; Rázga, J.; Hrdý, I.; Tachezy, J.; Kulda, J. Mechanisms of in Vitro Development of Resistance to Metronidazole in *Trichomonas Vaginalis*. *Microbiology* **2002**, 148 (8), 2467–2477.
- (67) Paulish-Miller, T. E.; Augustini, P.; Schuyler, J. A.; Smith, W. L.; Mordechai, E.; Adelson, M. E.; Gyax, S. E.; Secor, W. E.; Hilberta, D. W. *Trichomonas Vaginalis* Metronidazole Resistance Is Associated with Single Nucleotide Polymorphisms in the Nitroreductase Genes Ntr4<inf>Tv</Inf> and Ntr6<inf>Tv</Inf>. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, 58 (5), 2938–2943.
- (68) Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB). MHC-II Help <http://tools.iedb.org/mhcii/help/> (accessed Jun 14, 2019).
- (69) Xiao-, L. I.; Xiang-, Y. Balb / C Bagg's Albino Origin. *Envigo* **2015**, 4–8.
- (70) Ochoa, L. Norma Oficial Mexicana, Especificaciones Técnicas Para La Producción, Cuidado y Uso de Los Animales de Laboratorio. *Nom-062-Zoo*

- 1999**, 1–58.
- (71) Zhang, X.; Goncalves, R.; Mosser, D. M. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. *Curr. Protoc. Immunol.* / Ed. by John E. Coligan ...[et al.] **2008**, CHAPTER (November), Unit-14.
- (72) Oliveira, B. J. N. A. de; Souza, L. A. de; Eurides, D.; Silva, L. A. F. da; Baungarten, L. B.; Busnardo, C. A. Aislamiento, Viabilidad y Rendimiento de Células Mononucleares de Médula Ósea de Conejos. *Acta bioquímica clínica Latinoam.* **2011**, 45 (1), 113–118.
- (73) Alberto, C. C. Autoinmunidad y Autoinflamación. *Acta Médica Colomb.* **2011**, 36 (1), 78–84.
- (74) Aydin, S. A Short History, Principles, and Types of ELISA, and Our Laboratory Experience with Peptide/Protein Analyses Using ELISA. *Peptides* **2015**, 72, 4–15.
- (75) LSBio: The Immunohistochemistry Antibody Company. Human CDH11 / Cadherin 11 ELISA Kit (Sandwich ELISA) - LS-F4464
<https://www.lsbio.com/elisakits/human-cdh11-cadherin-11-elisa-kit-sandwich-elisa-ls-f4464/4464> (accessed Nov 29, 2017).
- (76) Ono, K.; Takahashi, T.; Kamei, M.; Mato, T.; Hashizume, S.; Kamiya, S.; Tsutsumi, H. Effects of an Aqueous Extract of Cocoa on Nitric Oxide Production of Macrophages Activated by Lipopolysaccharide and Interferon- γ . *Nutrition* **2003**, 19 (7–8), 681–685.
- (77) Green, L. C.; Ruiz de Luzuriaga, K.; Wagner, D. A.; Rand, W.; Istfan, N.; Young, V. R.; Tannenbaum, S. R. Nitrate Biosynthesis in Man. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1981**, 78 (12), 7764–7768.
- (78) Green, L. C.; Wagner, D. A.; Glogowski, J.; Skipper, P. L.; Wishnok, J. S.; Tannenbaum, S. R. Analysis of Nitrate, Nitrite, and [^{15}N]Nitrate in Biological Fluids. *Anal. Biochem.* **1982**, 126 (1), 131–138.
- (79) Mur, L. A. J.; Mandon, J.; Cristescu, S. M.; Harren, F. J. M.; Prats, E. Methods of Nitric Oxide Detection in Plants: A Commentary. *Plant Sci.* **2011**, 181 (5), 509–519.
- (80) Instruments, H. HI 3844 Hydrogen Peroxide Test Kit
https://hannainst.com/downloads/dl/file/id/1403/manhi_3844.pdf (accessed Jun 14, 2019).
- (81) Pick, E.; Mizel, D. Rapid Microassays for the Measurement of Superoxide and Hydrogen Peroxide Production by Macrophages in Culture Using an Automatic Enzyme Immunoassay Reader. *J. Immunol. Methods* **1981**, 46 (2), 211–226.
- (82) Nielsen, M.; Lundegaard, C.; Lund, O. Prediction of MHC Class II Binding Affinity Using SMM-Align, a Novel Stabilization Matrix Alignment Method. *BMC Bioinformatics* **2007**, 8, 1–12.
- (83) Nielsen, M.; Lund, O. NN-Align. An Artificial Neural Network-Based Alignment

- Algorithm for MHC Class II Peptide Binding Prediction. *BMC Bioinformatics* **2009**, *10*, 296.
- (84) Wang, P.; Sidney, J.; Kim, Y.; Sette, A.; Lund, O.; Nielsen, M.; Peters, B. Peptide Binding Predictions for HLA DR, DP and DQ Molecules. *BMC Bioinformatics* **2010**, *11*.
- (85) Iregui, C. A.; Romero, S. El Lipopolisacárido. *Rev. Med. Vet. (Bogota)*. **2010**, No. 19, 37–45.
- (86) Kaplansky, G.; Bongrand, P. Cytokines and Chemokines. *Cell. Mol. Biol.* **2001**, *47* (4), 569–574.
- (87) Babior, B. M. Phagocytes and Oxidative Stress. *Am. J. Med.* **2000**, *109* (1), 33–44.
- (88) Han, I. H.; Goo, S. Y.; Park, S. J.; Hwang, S. J.; Kim, Y. S.; Yang, M. S.; Ahn, M. H.; Ryu, J. S. Proinflammatory Cytokine and Nitric Oxide Production by Human Macrophages Stimulated with *Trichomonas Vaginalis*. *Korean J. Parasitol.* **2009**, *47* (3), 205–212.
- (89) Boris, S.; Barbés, C. Role Played by Lactobacilli in Controlling The. *Microbes Infect.* **2000**, *2*, 543–546.
- (90) Nu, P. A. T.; Rappelli, P.; Dessì, D.; Nguyen, V. Q. H.; Fiori, P. L. Kinetics of Circulating Antibody Response to *Trichomonas Vaginalis*: Clinical and Diagnostic Implications. *Sex. Transm. Infect.* **2015**, *91* (8), 561–563.
- (91) Vega-Robledo, G. B. Antígenos e Inmunógenos Gloria. *Rev Fac Med UNAM* **2009**, *52* (1), 41–42.
- (92) Abbas, Abdul K.; Lichtman, Andrew H.; Shiv, P. Inmunología Celular y Molecular 7ma Edición. 359–360.
- (93) Filardy, A. A.; Costa-Da-Silva, A. C.; Koeller, C. M.; Guimarães-Pinto, K.; Ribeiro-Gomes, F. L.; Lopes, M. F.; Heise, N.; Freire-De-Lima, C. G.; Nunes, M. P.; DosReis, G. A. Infection with *Leishmania Major* Induces a Cellular Stress Response in Macrophages. *PLoS One* **2014**, *9* (1).
- (94) Koo, S.; Chowdhury, I. H.; Szczesny, B.; Wan, X.; Garg, N. J. Generation in Response to *Trypanosoma Cruzi*. *Infect. Immun.* **2016**, *84* (12), 3527–3541.
- (95) Nishimoto, N.; Kishimoto, T. Inhibition of IL-6 for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2004**, *4* (4), 386–391.
- (96) Schröder, J. M. Chemoattractants as Mediators of Neutrophilic Tissue Recruitment. *Clin. Dermatol.* **1991**, *18* (3), 245–263.

