



UADY

CIENCIAS DE LA SALUD

POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS DE LA SALUD

**Identificación de un transportador de Ca^{2+} tipo TRP de
Trichomonas vaginalis, capaz de inducir una respuesta inmune
humoral específica en un modelo murino**

Tesis presentada por:

QFB. Tahali Mendoza Oliveros

En opción al grado:

Maestra en Investigación en Salud

Directores de Tesis:

Dr. Víctor E. Arana Argáez

Dr. Julio C. Torres Romero

Mérida, Yucatán, Noviembre 2017

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, Dr. Julio C. Torres Romero y Víctor E. Arana Argáez, por haber confiado en mí, por su paciencia, su valiosa dirección, por compartirme sus experiencias y conocimientos, pero sobre todo por la motivación, consejos y el apoyo recibido de su parte a lo largo de estos años.

También agradezco al Dr. Julio C. Lara Riegos, por su confianza, su apoyo, valiosas pláticas y consejos brindados durante el desarrollo de este trabajo de tesis.

Al Dr. Miguel E. Rosado Vallado, Dr. Guillermo Valencia Pacheco, Dra. Glendy Polanco Hernández y Dra. Reyna C. Collí Dulá, a todos ustedes gracias por el interés mostrado hacia este trabajo, por las recomendaciones y sugerencias brindadas.

Muchas gracias Dra. Leidi C. Álvarez Sánchez, por su apoyo, por compartirme sus experiencias y conocimientos, así como por todo el asesoramiento brindado para desarrollar distintas técnicas empleadas en este trabajo de tesis.

Además, quiero hacer extensiva mi gratitud a todos mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular, así como a mis compañeros del Área de inmunología del Laboratorio de Farmacología, por su amistad, apoyo, colaboración y todos los buenos momentos en las horas laborales y fuera de ellas. Un especial reconocimiento a Antonio, Iván y Amalia, se merecen muchas y buenas palabras, ya que con ustedes he compartido incontables horas de trabajo y buenos ratos. Gracias por todo el respaldo que me han brindado, por escucharme, apoyarme, por estar ahí en lo bueno y en lo malo.

Así como también quiero agradecer a toda persona que de alguna manera contribuyó a la realización de este trabajo de tesis.

DEDICATORIAS

A mis padres, porque todo esto nunca hubiera sido posible sin el apoyo, la confianza y el cariño que me brindan, que de forma incondicional entendieron mis ausencias y mis malos momentos. Que a pesar de la distancia siempre estuvieron a mi lado al pendiente y sosteniendo cada uno de mis pasos durante todo este proceso. Nunca tendré palabras suficientes para demostrarles todo mi amor y el agradecimiento infinito hacia ustedes.

A mi hermano Gilberto, por estar al pendiente de mí siempre, por apoyarme en cada una de mis decisiones y porque a lo largo de nuestras vidas, a pesar de la distancia siempre hemos estado ahí para compartir los buenos y malos momentos.

A Daniel, por ser mi apoyo incondicional todo este tiempo, gracias por entenderme, escucharme y darme ánimos siempre, gracias por todo el aprendizaje que has dejado en mí, a lo largo de este camino.

El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular y el Laboratorio de Farmacología, de la Facultad de Química, de la Universidad Autónoma de Yucatán, como parte del proyecto de investigación “Identificación y caracterización molecular de transportadores de iones divalentes (hierro, zinc y calcio) en el parásito protozoario *Trichomonas vaginalis*”, con No. de registro SISTPROY FQUI-2015-0002 y financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través de la convocatoria de ciencia básica 2014: No. 237990.

ÍNDICE

	Página
I. Resumen	1
II. Introducción	2
III. Antecedentes	4
3.1 Etiología y aspectos morfológicos de <i>T. vaginalis</i>	4
3.2 Epidemiología.....	5
3.3 Manifestaciones clínicas de la tricomonosis	6
3.4 Fisiopatología de la infección	7
3.4.1 Factores asociados al parásito.....	8
3.4.2 Factores asociados al hospedero	9
3.5 Regulación del Calcio (Ca^{2+}) en <i>T. vaginalis</i>	11
3.6 Transportadores tipo TRP	11
3.7 Respuesta inmune del hospedero frente a <i>T. vaginalis</i>	13
3.7.1 Respuesta inmune celular.....	14
3.7.2 Respuesta inmune humoral	15
3.8 Respuesta inmune frente a transportadores iónicos.....	16
3.8.1 Respuesta inmune frente a transportadores TRP	17
3.9 Vacunología inversa.....	17
3.9.1 Análisis <i>in silico</i> empleados en la vacunología inversa	18
3.9.2 Del antígeno candidato a la inmunogenicidad	19
3.9.3 Candidatos vacunales identificados con vacunología inversa	20
IV. Objetivo	22
4.1 General.....	22
4.2 Específicos	22
V. Hipótesis	23
VI. Material y métodos.....	24
6.1 Tipo de estudio	24
6.2 Diagrama del diseño experimental.....	24

6.3	Definición de variables y escalas de medición	25
6.4	Análisis <i>in silico</i> para la predicción de potencial antigénico	25
6.4.1	Análisis de propiedades de reconocimiento del sistema inmune.....	26
6.4.2	Análisis de propiedades moleculares y estructurales	26
6.5	Cultivo de <i>T. vaginalis</i>	27
6.6	Extracción de ARN	27
6.7	Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	28
6.8	Diseño de oligonucleótidos	28
6.9	Clonación del transportador TvTRPV en el vector pTZ57R/T	28
6.10	Expresión del transportador TvTRPV en el vector pCold II.....	29
6.11	Purificación de la proteína recombinante TvTRPV	31
6.12	Cuantificación de la proteína recombinante TvTRPV	31
6.13	Animales de experimentación	31
6.14	Grupos experimentales	32
6.15	Evaluación del efecto de la proteína recombinante TvTRPV sobre la respuesta inmune	33
6.16	Cuantificación de los niveles de IgG en respuesta a la proteína TvTRPV.....	33
6.17	Análisis estadísticos	35
6.18	Consideraciones éticas	35
VII. Resultados		
7.1	Identificación de propiedades de reconocimiento del sistema inmune.....	35
7.1.1	Predicción de la antigenicidad.....	35
7.1.2	Predicción de epítopes B	37
7.1.3	Predicción de epítopes T.....	38
7.2	Identificación de propiedades moleculares y estructurales	40
7.2.1	Predicción de la localización celular.....	40
7.2.2	Predicción de regiones transmembranales	41

7.2.3 Predicción de la función	43
7.2.4 Alineamientos múltiples y árboles filogenéticos	45
7.3 Clonación del transportador TvTRPV en el vector pTZ57R/T	49
7.3.1 Amplificación del transportador TvTRPV de <i>T. vaginalis</i>	49
7.3.2 Confirmación de la transformación PTZ57R/T-TvTRPV	50
7.3.2.1 Confirmación por PCR colony	50
7.3.2.2 Confirmación por análisis de restricción.....	51
7.4 Expresión del transportador TvTRPV en el vector pCold II.....	53
7.4.1 Confirmación de la transformación pCold II-TvTRPV	55
7.4.1.1 Confirmación por PCR colony	55
7.4.1.2 Confirmación por PCR a partir de ADNp.....	55
7.5 Inducción de la proteína recombinante TvTRPV.....	56
7.6 Purificación de la proteína recombinante TvTRPV	58
7.7 Respuesta inmune humoral inducida por la proteína recombinante TvTRPV	59
VIII. Discusiones.....	65
IX. Conclusiones	70
X. Recomendaciones	71
XI. Referencias bibliográficas	72

I. RESUMEN

La tricomonosis causada por el parásito *T. vaginalis*, es considerada una de las infecciones de transmisión sexual crónica no mortal, con mayor frecuencia a nivel mundial. Sin embargo, a pesar de este hecho, no existen vacunas disponibles que tengan un efecto protector contra esta infección. Hasta la fecha, el desarrollo de vacunas contra *T. vaginalis* se ha centrado principalmente en la detección de inmunógenos potenciales. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial inmunogénico de un transportador recombinante de Ca^{2+} tipo TRP de dicho parásito, en un modelo murino. Para ello, primero se realizó la predicción de propiedades de reconocimiento del sistema inmune, así como la predicción de las propiedades moleculares y estructurales de los transportadores TRP de *T. vaginalis* (TRPML/TRPP, TRPP y TRPV) mediante distintos análisis *in silico*. Los resultados obtenidos permitieron seleccionar al transportador TvTRPV como el de mayor potencial antigénico, el cual fue clonado y expresado como proteína recombinante. Una vez purificada la proteína recombinante TvTRPV, se evaluó su potencial inmunogénico en ratones de la cepa BALB/c, los cuales fueron inmunizados con 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de dicha proteína. Posteriormente, se detectaron los niveles de anticuerpos IgG a los 15 días posteriores de la inmunización primaria, así como 15 días después del primer y segundo refuerzo (día 15, 30 y 45, respectivamente) realizado con dicha proteína. Los resultados obtenidos demostraron que la proteína recombinante TvTRPV de *T. vaginalis* puede inducir una respuesta inmune humoral, caracterizada por niveles elevados de anticuerpos IgG. También se demostró que los niveles de IgG detectados aumentaron de manera específica después de cada refuerzo de inmunización, indicando que con cada exposición con la proteína TvTRPV, ocurrió la activación y expansión clonal de células de memoria, específicas para dicha proteína. Lo que sugiere que la proteína recombinante TvTRPV presenta potencial inmunogénico, por lo cual podría tener aplicaciones en métodos de diagnóstico o terapéuticos contra la tricomonosis.

II. INTRODUCCIÓN

La tricomonosis es la infección de transmisión sexual causada por el parásito protozooario *T. vaginalis*, el cual parasita el tracto genitourinario de hombres y mujeres. La Organización Mundial de la Salud estima que afecta aproximadamente a 248 millones de personas anualmente y la mayoría se encuentra en países en desarrollo. Esta infección puede desencadenar complicaciones graves, entre las que se encuentran trastornos de la fertilidad, así como el riesgo de contagio de otros agentes causantes de infecciones de transmisión sexual, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Por lo que una vacuna sería ideal para prevenir la infección contra dicho parásito.

El desarrollo de una vacuna comienza con la identificación en el microorganismo, de componentes o estructuras capaces de generar una respuesta inmune protectora. Con las técnicas convencionales, éste puede ser un proceso largo y complicado. Sin embargo, en los últimos años, el auge de la informática y la disponibilidad de la secuencia de los genomas han permitido la búsqueda de proteínas que son codificadas por distintos microorganismos, a fin de establecer candidatos vacunales potenciales. Este nuevo enfoque conocido como vacunología inversa, en primer lugar, realiza la selección de candidatos mediante análisis *in silico*, los cuales son clonados, expresados y finalmente se utilizan en ensayos de inmunización, para evaluar su capacidad de desencadenar respuestas inmunes protectoras.

Entre los criterios para la selección de proteínas con potencial antígeno se encuentra la identificación de aquellas relacionadas con funciones cruciales en la patogénesis o supervivencia del microorganismo de estudio, ya que los anticuerpos producidos en respuesta a estos antígenos pueden bloquear su función y neutralizar la infección. Los transportadores TRP descritos en *T. vaginalis* se encuentran relacionados con la regulación del Ca^{2+} , el cual es fundamental para la supervivencia, crecimiento y colonización del parásito en el

tracto genitourinario. Además, recientemente se ha descrito la asociación de los transportadores TRP con procesos inflamatorios y respuestas inmunológicas específicas. Por lo tanto, en el presente trabajo se realiza la identificación del transportador de Ca^{2+} tipo TRP de *T. vaginalis* con mayor potencial antigénico y se obtiene como proteína recombinante, para la evaluación de la respuesta inmune humoral inducida, caracterizada por la producción de anticuerpos IgG.

III. ANTECEDENTES

3.1 Etiología y aspectos morfológicos de *T. vaginalis*

La tricomonosis es la infección de transmisión sexual (ITS) no viral número uno a nivel mundial, causada por el parásito protozoario *T. vaginalis*, el cual parasita el tracto urogenital de hombres y mujeres. Sin embargo, la presencia de síntomas ocurre principalmente en las mujeres.^{1,2}

T. vaginalis sólo presenta la forma de trofozoíto, el cual mide entre 10 y 30 μm , (13 μm de media) con variaciones que dependen de las condiciones ambientales. En cultivos axénicos, se describe como un protozoo de vida libre de aspecto piriforme (Figura 2a), pero al adherirse a células epiteliales vaginales adopta una forma ameboide (Figura 2b).³⁻⁵

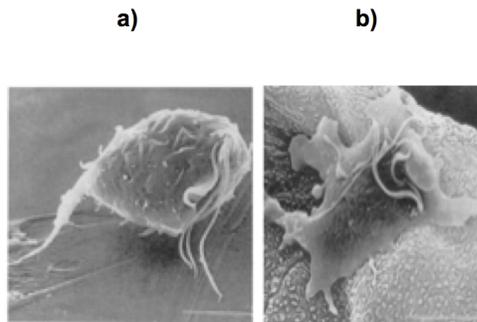


Figura 1. a) Morfología de *T. vaginalis* en cultivo y b) adherido a células epiteliales.^{4,5}

Posee cinco flagelos, cuatro de ellos anteriores y uno posterior, cuya función es conferirle sus movimientos rápidos de traslación y rotación característicos. El quinto flagelo está formado por un citoesqueleto de actina y tubulina, el cual proporciona un movimiento ondulante. Este flagelo está situado en la parte posterior formando la membrana ondulante, asociada a una estructura llamada costa, cuya función es dar resistencia a la estructura del parásito. Debajo del núcleo nace una parte sólida, llamada axostilo, dispuesta longitudinalmente y análoga a la columna vertebral, que le proporciona rigidez anatómica al

protozooario. Su citoplasma contiene el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico, los hidrogenosomas (análogos a las mitocondrias), vacuolas y gránulos de glucógeno, además del núcleo situado en el tercio anterior del parásito, que alberga seis cromosomas (Figura 2).^{6,7}

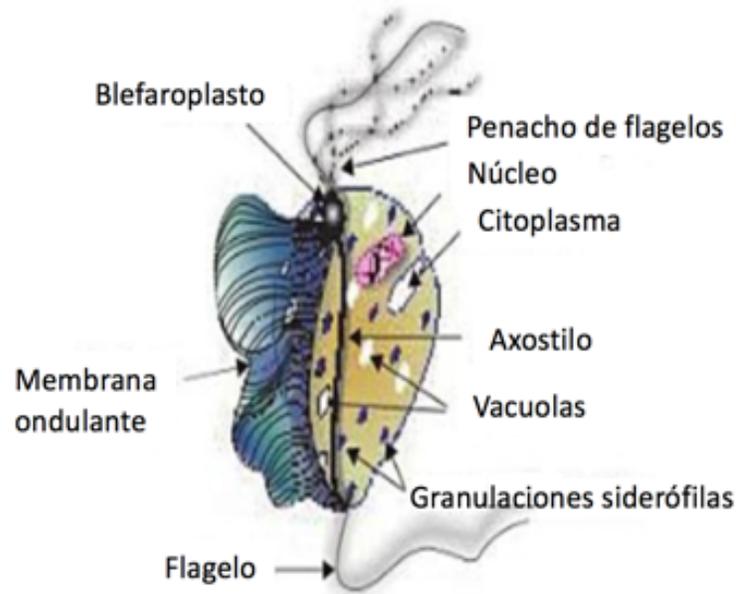


Figura 2. Representación gráfica del trofozoito de *T. vaginalis*.⁸

En la actualidad no se han descrito formas quísticas; sin embargo, en situaciones desfavorables, *T. vaginalis* puede interiorizar sus flagelos y adoptar una configuración semirredonda, la cual es denominada pseudoquiste.⁶

3.2 Epidemiología

La tricomonosis afecta aproximadamente a 248 millones de personas anualmente y la mayoría se encuentra en países en desarrollo. A continuación, se presentan los datos epidemiológicos de tricomonosis, reportados en el año 2012 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en las distintas regiones del mundo (Figura 3).⁹

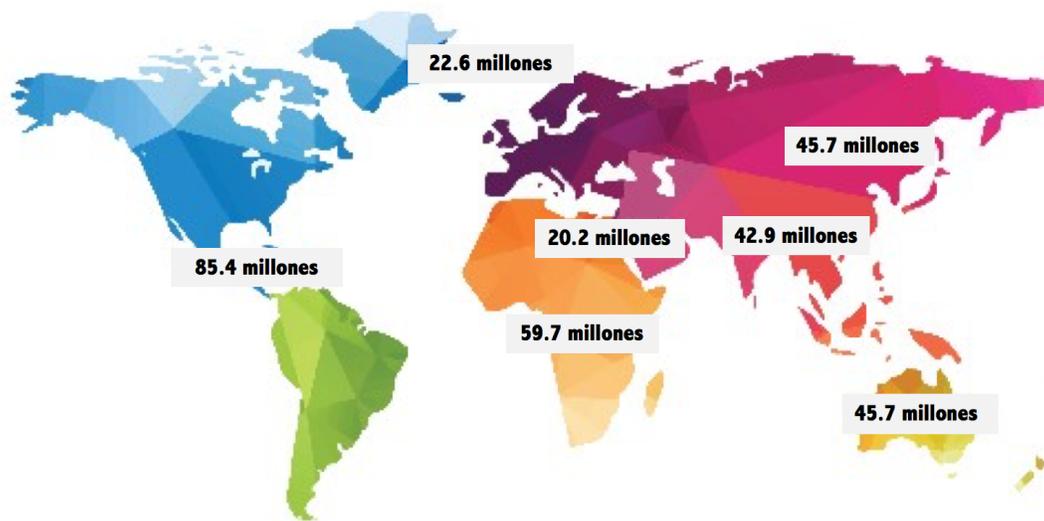


Figura 3. Prevalencia global de casos de tricomonosis.⁹

En México, de acuerdo a la información epidemiológica de morbilidad, emitida por la Secretaría de Salud y la Dirección General de Epidemiología (DGE), en el año 2016 se registraron 30,688 casos de tricomonosis, siendo los estados de Veracruz, Puebla y México los que presentaron un mayor número de personas infectadas. En cuanto al estado de Yucatán, en ese mismo año se registraron un total de 234 nuevos casos de tricomonosis y hasta la semana epidemiológica 32 (19 de agosto del 2017) se han reportado 170 nuevos casos.¹⁰

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos llevados a cabo por las organizaciones internacionales para establecer medidas de vigilancia, los datos epidemiológicos, especialmente en lo que respecta a la tricomonosis, siguen subestimando las cifras reales, debido al número elevado de casos asintomáticos y ser considerada una enfermedad de declaración no obligatoria.¹¹⁻¹³

3.3 Manifestaciones clínicas de la tricomonosis

La presencia de síntomas, como consecuencia de la infección por este parásito,

es más frecuente en el sexo femenino. Las pacientes infectadas con *T. vaginalis* pueden presentar leucorrea abundante, espumosa, fétida y de color amarillo a verdoso. Además, pueden presentar prurito, dispareunia y disuria. En la especuloscopia, se puede llegar a observar eritema vaginal y cervical que muchos autores denominan como “vagina en empedrado” y “cérvix en fresa”, debido a la dilatación de los capilares y a las hemorragias puntiformes. Sin embargo, esto sólo se llega a encontrar en menos del 2% de las pacientes infectadas, lo que dificulta el diagnóstico. Entre las complicaciones asociadas con la tricomonosis se incluyen adenitis, piosalpingitis, endometritis, trastornos de la fertilidad y en mujeres embarazadas puede inducir parto prematuro. Además, la tricomonosis aumenta el riesgo de contagio de otros agentes causantes de ITS, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).¹⁴⁻¹⁹

Los varones tienden a sufrir una infección con escasa o nula sintomatología y actúan como reservorios de *T. vaginalis*. Sin embargo, cuando la infección se hace evidente, puede manifestarse con secreción uretral serosa y purulenta, prurito, edema prepucial, erección dolorosa, eyaculación y disuria. Entre las complicaciones se encuentran uretritis, prostatitis, cistitis, epididimitis, balanopostitis e infertilidad.²⁰

3.4 Fisiopatología de la infección

La distinta sintomatología provocada por el parásito se debe a los distintos mecanismos de patogenia, los cuales hoy en día no han podido ser explicados de forma clara. En las últimas décadas se han realizado estudios que han permitido revelar de forma parcial el comportamiento y evolución de *T. vaginalis*.²¹

Este parásito se encuentra en un ambiente complejo, que sufre cambios bruscos, en el que influyen el pH, la microbiota, la respuesta inmune del hospedero, los niveles de hierro, zinc, poliaminas, calcio, etc. En este sentido, el parásito es

capaz de desarrollar mecanismos de adaptación al hospedero para colonizar y mantener la infección en este ambiente tan hostil. La interacción parásito-hospedero es un proceso multifactorial dependiente de mecanismos inherentes al hospedero y al parásito (Figura 4).²¹

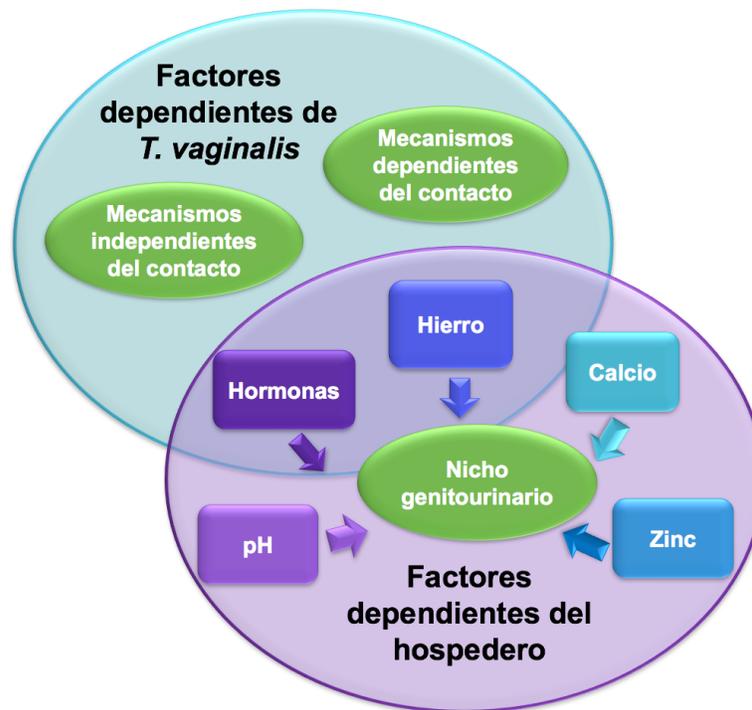


Figura 4. Esquema representativo de los principales factores que influyen en la patogenicidad y colonización por *T. vaginalis*.²¹

3.4.1 Factores asociados al parásito

Los mecanismos de patogenicidad asociados a *T. vaginalis* son de dos clases: los dependientes e independientes del contacto.

a) Mecanismos dependientes del contacto: unión entre el parásito y la célula epitelial. La adherencia del parásito a la célula está mediada por las proteínas de unión presentes en *T. vaginalis*: AP120, AP65, AP51, AP33 y AP23. Tras la adherencia, *T. vaginalis* adopta una forma ameboides que aumenta su contacto

con la célula. Para que la adherencia sea eficaz, es necesaria la presencia de cisteín-proteasas ubicadas en la superficie del parásito. El parásito finalmente se une a la laminina y la fibronectina del epitelio vaginal. Además, *T. vaginalis* está recubierta por lipofosfoglucono (LPG), molécula muy importante para su adherencia a la célula epitelial.^{22,23}

b) Mecanismos independientes del contacto: interviene el factor de desprendimiento celular (CDF, por su sigla en inglés), los desechos del parásito y la concentración de estradiol en la vagina. Cuando el CDF interactúa con la célula epitelial, induce su desprendimiento. Se ha descrito que el CDF es un marcador de virulencia, ya que al elevarse su concentración aumenta la sintomatología. Durante la menstruación el déficit de estrógenos aumenta la concentración de CDF y da lugar a una sintomatología más fuerte.^{24,25}

3.4.2 Factores asociados al hospedero

Los factores más relevantes asociados al hospedero son:

a) pH vaginal y microbiota: *T. vaginalis* crece en un pH próximo a 5.0. El pH vaginal de una mujer sana es ácido, por debajo de 4.5 y la existencia de enfermedades genitourinarias concomitantes o una alteración de la flora vaginal, están asociadas a un aumento del pH; esta circunstancia facilita el asentamiento del parásito en caso de un contacto de riesgo. Asimismo, el propio parásito a través de la fagocitosis de *Lactobacillus*, principal responsable del ambiente ácido en la vagina, reduce la población de las bacterias de la microbiota. Esta alteración de la microbiota y la secreción de determinados factores favorecen un ambiente alcalino que asegura su propio asentamiento.²⁴

b) Ciclo menstrual y niveles hormonales: el papel que cumplen estos dos elementos en la presentación clínica de la tricomonosis es de gran relevancia. La exacerbación de los síntomas en la mujer está asociada a las fluctuaciones hormonales durante el transcurso del ciclo menstrual. La presencia de receptores

específicos para estrógenos y andrógenos en la superficie de *T. vaginalis* refleja la importancia de las hormonas en el desarrollo de esta parasitosis. Existen estudios que parecen indicar que un ambiente tanto hipo como hiper-estrogénico podrían favorecer distintos mecanismos relacionados con la colonización del parásito.^{26,27}

c) Presencia de hierro: es uno de los factores que más se han estudiado en la patogenia de *T. vaginalis*. Tiene un papel como inductor de numerosos genes asociados a la adherencia del parásito al epitelio vaginal, así como a la exacerbación de su patogenia. También es esencial para el desarrollo adecuado del metabolismo del parásito y su multiplicación.^{28,29}

d) Presencia de zinc: este elemento está presente en el fluido prostático del hombre, favoreciendo un ambiente oxidativo que dificulta el crecimiento del parásito. El carácter citotóxico del Zn^{2+} explica por qué esta ITS cursa de forma asintomática en la mayoría de los varones. Este elemento también regula positivamente la expresión de dos fimbrias, esenciales junto con la actina en la modificación estructural que sufre el parásito durante el contacto con las células del tracto genitourinario, adquiriendo una forma ameboidea.²⁹⁻³¹

d) Presencia de calcio: es un requerimiento esencial para la expresión de genes diferenciales involucrados en la supervivencia, crecimiento y colonización del parásito en el ambiente vaginal. Además, se encuentra relacionado con la actividad hemolítica de *T. vaginalis*, así como también con la unión del parásito a la fibronectina durante su colonización en el hospedero. Por otro lado, también se sugiere que este ión participa como un importante cofactor, ya que se ha descrito en el parásito la presencia de moléculas relacionadas al metabolismo de calcio, como bombas de ATP-asa presentes en el retículo sarcoplásmico (SERCA, por sus siglas en inglés) y calmodulina.³²⁻³⁴

3.5 Regulación del calcio (Ca^{2+}) en *T. vaginalis*

En este parásito protozoario la importancia del calcio no ha sido estudiada de manera profunda, a pesar de ser el ión más abundante en la mayoría de los organismos y a su rol crítico como segundo mensajero en muchos tipos celulares. Tampoco se cuenta con suficiente información sobre la regulación de este catión concertada por distintos transportadores presentes en la membrana plasmática y en organelos intracelulares, siendo los transportadores de calcio un blanco importante de atención debido a su papel en el metabolismo celular y su uso potencial con orientación a nuevas terapéuticas.^{35,36}

Entre los datos publicados a la fecha respecto a la presencia de transportadores de calcio en *T. vaginalis*, se encuentra un estudio realizado por Prole y Taylor en el año 2011, en el cual se identificó por medio de análisis bioinformáticos, la presencia de canales o transportadores de Ca^{2+} únicamente de la familia de transportadores conocidos como receptores de potencial transitorio (TRP, por sus siglas en inglés), pertenecientes a la subfamilia TRPML, TRPML/TRPP y TRPV.³⁷

3.6 Transportadores tipo TRP

Los transportadores TRP (receptores de potencial transitorio) fueron inicialmente descubiertos y caracterizados en *Drosophila*, con la posterior identificación de aproximadamente 30 isoformas en vertebrados. Son canales catiónicos no selectivos situados en la membrana plasmática y algunos de ellos actúan como canales de entrada de Ca^{2+} . Después de su activación, generan una despolarización celular que puede generar la activación o inactivación de canales de iones dependientes del voltaje y modular la fuerza motriz del flujo de iones. Los transportadores TRP también pueden funcionar como canales iónicos intracelulares, principalmente como canales de liberación de Ca^{2+} , en distintos organelos celulares como lisosomas, endosomas, aparato de Golgi, retículo endoplásmico y vesículas sinápticas.³⁸

Dichos transportadores muestran diferencias en su selectividad iónica, estructura y distribución y aunque se encuentran basados en su similitud en secuencia, éstos se pueden subclasificar en distintas subfamilias: TRPC1-7 (canónicos), TRPV1-6 (vaniloideos), TRPM1-8 (melastatinas), TRPP1-3 (policistinas), TRPA1 (anquirinas) y TRPML1-3 (mucolipinas).³⁹

Todos los transportadores TRP cuentan con seis regiones transmembrana (S1-S6), tienen un bucle que forma un poro entre la quinta (S5) y sexta (S6) región transmembrana, sus regiones C y N terminales son intracelulares, y probablemente actúan principalmente como heterotetrámeros u homotetrámeros.^{40, 41}

A continuación, se describen algunas características de las subfamilias TRPML, TRPP y TRPV, las cuales han sido identificadas en *T. vaginalis* por medio de análisis *in silico*.³⁷

Subfamilia mucolipina (TRPML): cuenta con tres miembros que se expresan principalmente en vesículas intracelulares. El nombre se deriva de la mucolipina, una proteína responsable de la enfermedad neurodegenerativa mucolipidosis tipo IV (ML-IV). Las funciones de la subfamilia TRPML son difíciles de estudiar debido a su localización en los organelos celulares. Tienen un papel crucial en el tráfico y la diferenciación de endosomas tempranos a cuerpos multivesiculares, endosomas tardíos, lisosomas y endosomas de reciclaje.⁴²

Subfamilia policistina (TRPP): está conformada únicamente por tres miembros, los cuales tienen un motivo de unión a Ca^{2+} en el C terminal. Esta subfamilia parece actuar como sensores mecánicos o de protones y se conservan en vertebrados, invertebrados y levaduras.⁴³⁻⁴⁵

Subfamilia vaniloide (TRPV): Comprende seis miembros que se dividen en cuanto a su homología: TRPV1/TRPV2, TRPV3, TRPV4 y TRPV5/TRPV6. Esta subfamilia recibió el nombre de su miembro fundador, el receptor vaniloide VR1

(capsaicina). Los transportadores TRPV1, TRPV2, TRPV3 y TRPV4 son modestamente permeables a Ca^{2+} , mientras que TRPV5 y TRPV6 son los únicos canales altamente selectivos a Ca^{2+} en la familia TRP.⁴³⁻⁴⁵

Se han identificado homólogos de transportadores TRP en algunos organismos, pertenecientes a las subfamilias descritas anteriormente, las cuales han sido identificadas en *T. vaginalis* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Homólogos de transportadores TRP en diversos organismos.

Organismo	Transportador TRP reportado	Referencia
Conejo	TRPV	Martínez y cols. 2013. ⁴⁶
Ratón	TRPV, TRPML, TRPP	Feng y cols, 2014. ⁴⁷
Rana	TRPV	Saito y cols. 2011. ⁴⁸
Pez	TRPV	Majhi y cols. 2013. ⁴⁹
Alga	TRPV	Arias y cols. 2011. ⁵⁰
Mosca de la fruta	TRPV, TRPML, TRPP	Chu y cols. 2013. ⁵¹
<i>Schistosoma</i>	TRPML y TRPP	Bais y cols. 2016. ⁵²
<i>Leishmania major</i>	TRPML	Prole y Taylor.2011 ³⁷

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

En el humano, la reinfección con *T. vaginalis* ocurre con frecuencia, lo que sugiere que este parásito induce una respuesta inmune protectora pobre y en la mayoría de los casos de tricomonosis existe evidencia de una respuesta tanto celular como humoral.⁵³

La comprensión actual de la inmunidad a *T. vaginalis* se debe en gran parte a observaciones de respuestas en humanos, en modelos *in vitro* y modelos animales.⁵⁴

3.7.1 Respuesta inmune celular

En la respuesta inmune celular frente a *T. vaginalis*, a partir de aislados del parásito proveniente de pacientes sintomáticos, se ha reportado la inducción únicamente de una respuesta caracterizada por la secreción de IL-10 en las células dendríticas, mientras que un repertorio diverso de citocinas, como IL-12, IL-10 e IFN- α se producen en respuesta a bacterias infecciosas de la mucosa vaginal. La IL-10 por sí sola contribuye a la inhibición de las células Th1 y favorece una respuesta Th2.⁵⁵

Por otra parte, las citocinas relacionadas con la respuesta de tipo Th1 (IL-2 e IFN- γ) se encuentran en aumento en el suero de ratones infectados con aislados de *T. vaginalis* provenientes de pacientes asintomáticos, en comparación de aislados sintomáticos. Estos resultados coinciden con estudios de citocinas producidas por enfermedades causadas por protozoarios, que sugieren que en estos casos la respuesta mediada por células Th1 puede regular la enfermedad y prevenir otros síntomas clínicos, pero no combatir la infección, sugiriendo así que la respuesta inmune celular podría contribuir en los síntomas de la tricomonosis.⁵⁶

Por otro lado, se ha demostrado un incremento significativo de los niveles de TNF- α en el suero de pacientes infectados con *T. vaginalis*, lo que sugiere que este parásito estimula a los macrófagos para producir citocinas pro-inflamatorias, como TNF- α y óxido nítrico. Además, se ha demostrado que *T. vaginalis* induce la producción de TNF- α en macrófagos, a través de la activación dependiente de NF- κ B, la cual podría estar involucrada en el proceso inflamatorio de la tricomonosis.⁵⁷

También se ha identificado el aumento de la proteína C reactiva en el suero de mujeres infectadas con *T. vaginalis* lo que sugiere que el impacto de la reacción inmuno-inflamatoria al parásito supera los límites de la mucosa del tracto

reproductivo.⁵⁷

3.7.2 Respuesta inmune humoral

A la fecha se ha demostrado mediante distintos tipos de inmunoensayos la presencia de anticuerpos específicos en contra de *T. vaginalis* en el tracto reproductivo de pacientes y en la mayoría de los casos, anticuerpos circulantes en el suero.^{58,59}

Trabajos experimentales previos han descrito la cinética de inmunoglobulinas producidas en respuesta a la tricomonosis en un modelo murino, en los cuales los títulos de IgG, IgG1 e IgM resultan significativamente mayores en los ratones infectados con aislados del parásito provenientes de pacientes sintomáticos, en comparación con los aislados provenientes de pacientes asintomáticos. Mientras que la respuesta de IgA no muestra diferencia entre aislados de pacientes asintomáticos y sintomáticos.⁵⁶

En cuanto al papel de las inmunoglobulinas, éste permanece incierto debido a factores de virulencia de *T. vaginalis*, que son capaces de degradarlas y pueden prevenir la activación del complemento o la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos.⁶⁰

Además, aunque las inmunoglobulinas son detectadas en el ser humano durante una infección vaginal, su presencia no parece proporcionar protección durante o después de la infección. Esto debido a que tal vez los niveles de inmunoglobulinas durante la infección natural son ineficaces, pero los niveles de inmunoglobulinas logrados después de la vacunación podrían ser protectores, sugiriendo que el modo de presentación del antígeno podría tener un efecto diferencial sobre la protección.^{60,61}

3.8 Respuesta inmune frente a transportadores iónicos

Actualmente se ha descrito la capacidad de algunos transportadores iónicos de

inducir respuestas inmunológicas. Entre éstos se encuentran los transportadores de Na^{2+} que, debido a su capacidad para utilizar este ión metálico, se han descrito como posibles factores de virulencia importantes en patógenos tales como *Vibrio cholerae*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella enterica serovar Typhi* y *Yersinia pestis*, siendo adecuados como blancos de fármacos, así como de vacunas.⁶²

Además, transportadores como los denominados ABC, también presentes en bacterias, encargados de importar diversos nutrientes necesarios para la supervivencia y la exportación de sustancias tóxicas para la célula, también han sido considerados como inmunógenos. Se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra dichos transportadores, los cuales permiten eliminar las infecciones bacterianas *in vivo*, sugiriendo que estas proteínas pueden ser dianas adecuadas para el desarrollo de terapias post-infección, así como terapias protectoras. Por ejemplo, el transportador ABC de *Streptococcus pneumoniae*, encargado de la captación de hierro, es fundamental para la virulencia completa en modelos murinos de infección y mediante la inmunización de dos de sus componentes lipoproteicos (PiaA y PiuA), obtenidos de manera recombinante, se ha detectado su efecto protector frente la infección de este microorganismo, ya que inducen la producción de anticuerpos que promueven la opsonofagocitosis bacteriana.^{63,64}

Por otro lado, recientemente se ha descrito que distintos canales iónicos como los dependientes de voltaje (selectivos a Na, K y Ca) y algunos transportadores pertenecientes a la familia TRP presentan una estructura en común (bucle E-3) que debido a su longitud podría actuar como un epítoto accesible para anticuerpos, por lo que se sugiere que dicho componente de estos transportadores iónicos podría ser considerado como posible inmunógeno.⁶⁵

3.8.1 Respuesta inmune frente a transportadores TRP

A la fecha existen reportes de la posible asociación de los transportadores TRP con procesos inflamatorios y respuestas inmunológicas específicas.⁶⁶

En cultivos de queratinocitos humanos se ha descrito que el transportador TRPV1 mediado por el flujo de calcio, suprime la proliferación, promueve la apoptosis y regula la inflamación cutánea. También se ha demostrado en cultivos de queratinocitos estimulados con el transportador TRPV3, éste induce la producción de mediadores inflamatorios.^{67,68}

Por otro lado, la activación del transportador TRPV4 identificado en macrófagos alveolares se encuentra asociado a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés). En cuanto a los transportadores TRPV2 también presentes en los macrófagos alveolares, así como en otras poblaciones de macrófagos se encuentran asociados con la fagocitosis de moléculas extrañas.^{69,70}

Con respecto a estudios de la respuesta inmunológica inducida frente a transportadores TRP derivados de microorganismos, éstos son limitados. Entre los reportados, se encuentra la evaluación *in vivo* del transportador TRP2. En dicho estudio se inmunizaron ratones con distintos epítopes identificados en el transportador TRP2 de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* y se detectó una respuesta inmunológica antitumoral, desencadenando una respuesta de células T CD8+.⁷¹

3.9 Vacunología inversa

El desarrollo de una vacuna comienza con la identificación en el microorganismo, de componentes o estructuras únicas capaces de generar una respuesta inmune protectora. Con las técnicas convencionales, éste puede ser un proceso largo y complicado, ya que comúnmente se realizan pruebas de ensayo y error hasta encontrar el candidato más adecuado. Sin embargo, en los últimos años, el auge de la informática y la disponibilidad de la secuencia de los genomas han permitido la búsqueda de proteínas que pudieran ser codificadas por distintos microorganismos, a fin de establecer candidatos vacunales potenciales. Este

nuevo enfoque para el diseño de vacunas es conocido como vacunología inversa (Figura 5).⁷²

La vacunología inversa implica la clonación y expresión de las proteínas presentes en la secuencia del genoma de un organismo, que se predicen *in silico*. Posteriormente las proteínas candidatas son sometidas a procedimientos de inmunización para evaluar su capacidad de provocar anticuerpos eliminando o neutralizando al patógeno.⁷³

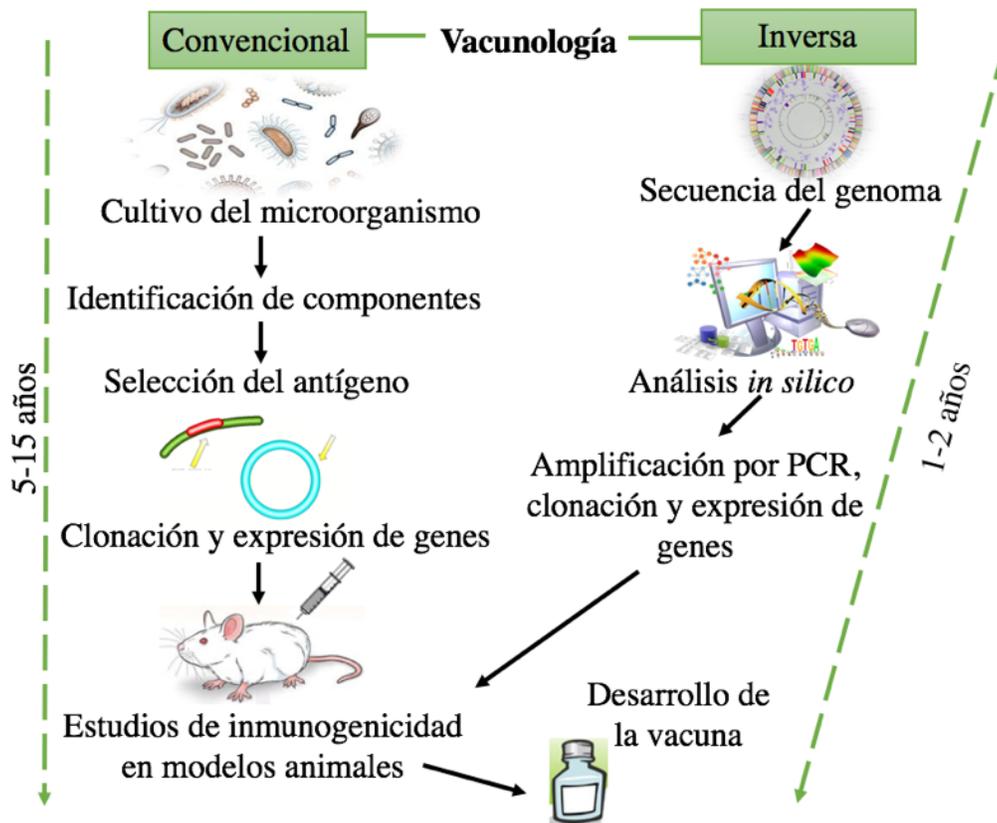


Figura 5. Comparación entre la vacunología convencional e inversa.⁷³

3.9.1 Análisis *in silico* empleados en la vacunología inversa

El proceso comienza con la información del genoma en una base de datos. En primer lugar, se realiza la selección de los candidatos vacunales, la cual se basa en el análisis que permite la identificación de proteínas de membrana,

extracelulares o secretadas, las cuales son consideradas como candidatos vacunales ideales, ya que son más accesibles a los anticuerpos que las proteínas intracelulares. Diferentes bases de datos pueden ser usadas para obtener secuencias genómicas que, con la combinación apropiada de distintos algoritmos y la evaluación crítica de la información generada, son esenciales para la selección acertada de los antígenos. Existe una gran variedad de programas para realizar la búsqueda de secuencias de ADN o proteínas en una base de datos. Los algoritmos más empleados en el contexto del análisis de secuencias incluyen los métodos de búsqueda de secuencias similares, tanto de ADN como de proteínas, así como la predicción de la localización de la proteína en la célula, a partir de una secuencia aminoacídica. También existen bases de datos con los dominios de familias de proteínas generadas de la comparación global de todas las secuencias de proteínas disponibles. La mayoría de estas herramientas se encuentran disponibles en línea.⁷⁴⁻⁷⁷

Debido a que la activación de las células T cooperadoras es esencial para iniciar la respuesta inmune protectora, también existen programas que permiten predecir regiones de unión al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) de la clase I y/o II. Así como herramientas que realizan la predicción de los ligandos MHC de las secuencias de las proteínas.^{78,79}

Finalmente, debido a la existencia de un gran número de genomas secuenciados, incluso dentro de una misma especie, se puede analizar si los genes seleccionados como candidatos se encuentran conservados. Para ello, se realizan alineamientos múltiples de secuencias de ADN o proteínas, hasta que la identidad, similitud y diferencias puedan ser observadas. La relación en cuanto a evolución puede ser vista en este programa a través de cladogramas o filogramas.⁷³

3.9.2 Del antígeno candidato a la inmunogenicidad

Una vez efectuados los distintos análisis *in silico*, la siguiente etapa de la

vacunología inversa es la evaluación de propiedades antigénicas. Mediante métodos moleculares se procede a la amplificación por PCR de las secuencias codificantes para su posterior clonación y expresión. Posteriormente, se realiza la purificación de los productos proteicos que son empleados en los procedimientos de inmunización. Para evaluar la inmunogenicidad, los sueros obtenidos procedentes de animales de experimentación, son evaluados por medio de la técnica ELISA, así como por el análisis de tipos de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés) para medir los títulos de anticuerpos y determinar la habilidad del antisuero para unirse a la superficie del microorganismo vivo.⁷⁵

La forma directa de medir la eficacia protectora de los antígenos candidatos es evaluar los sueros inmunes en un modelo animal en el que la protección sea dependiente del mismo mecanismo efector que en el humano o en el animal que se desee usar la vacuna. La falta de modelos animales fiables ha obstaculizado el desarrollo de vacunas, por lo que se han desarrollado ensayos *in vitro* alternativos (para medir actividad bactericida y opsonofagocitosis) y correlacionarlos con la eficacia de la vacuna en humanos o animales. De esta manera, la vacunología inversa ha permitido identificar exitosamente nuevos candidatos vacunales contra algunos patógenos humanos.^{73,75}

3.9.3 Candidatos vacunales identificados con vacunología inversa

El primer patógeno tratado con vacunología inversa fue *Neisseria meningitidis* serogrupo B, para el cual no existe una vacuna ampliamente protectora debido a la similitud de su polisacárido capsular con un autoantígeno y la hipervariabilidad de su antígenos proteicos de la membrana externa. La vacunología inversa condujo a la identificación de 29 nuevos antígenos productores de antibióticos bactericidas contra el patógeno *in vitro*. Después de exitosos estudios preclínicos, la vacuna derivada de esta estrategia entró en las pruebas de fase I en 2002.

En este patógeno también se han detectado respuestas inmunes protectoras, utilizando la vacunología inversa, la cual permitió identificar a la proteína de unión al factor H (fHbp) presente en dicha bacteria como un importante antígeno vacunal capaz de inducir niveles elevados de anticuerpos con actividad bactericida. Esta estrategia también se ha utilizado para identificar antígenos presentes en cepas patógenas, pero no comensales de *Escherichia coli*.⁸⁰⁻⁸⁶

Actualmente no existen reportes de la aplicación de la vacunología inversa en *T. vaginalis*. Por lo que, en este trabajo se plantea utilizar dicha estrategia para la identificación y evaluación del potencial inmunogénico de un transportador recombinante de Ca²⁺ tipo TRP de *T. vaginalis*, considerando: 1) que esta familia de transportadores son cruciales para su supervivencia, por lo cual podrían ser proteínas antigénicas, 2) así como el hecho de que, el análisis de respuestas humorales contra diferentes agentes infecciosos es crítico para el diagnóstico de enfermedades, la comprensión de los mecanismos patogénicos, así como el desarrollo y monitoreo de candidatos vacunales.^{87,88}

IV. OBJETIVO

4.1 General:

Evaluar la respuesta inmune humoral en un modelo murino, inducida por un transportador recombinante de Ca^{2+} tipo TRP de *T. vaginalis*.

4.2 Específicos:

- Identificar y seleccionar el transportador de Ca^{2+} tipo TRP de *T. vaginalis* con el mayor potencial inmunogénico, por medio de análisis *in silico*.
- Obtener el plásmido recombinante del transportador de Ca^{2+} tipo TRP seleccionado, mediante la clonación de su ADNc específico.
- Expresar de manera recombinante el transportador de Ca^{2+} tipo TRP clonado, utilizando la bacteria *E. coli*, como sistema de expresión heterólogo.
- Evaluar la respuesta inmune humoral inducida por la proteína recombinante obtenida, mediante inmunización en un modelo murino y determinación de anticuerpos IgG.

V. HIPÓTESIS

El transportador recombinante de Ca^{2+} tipo TRP de *T. vaginalis* seleccionado como el de mayor potencial inmunogénico, es capaz de inducir una respuesta inmune humoral, caracterizada por la producción de anticuerpos IgG, en un modelo murino.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Tipo de estudio

Experimental.

6.2 Diagrama del diseño experimental

A continuación, se muestra el diseño experimental de este trabajo (Figura 6) y posteriormente se explican a detalle los materiales y métodos utilizados.

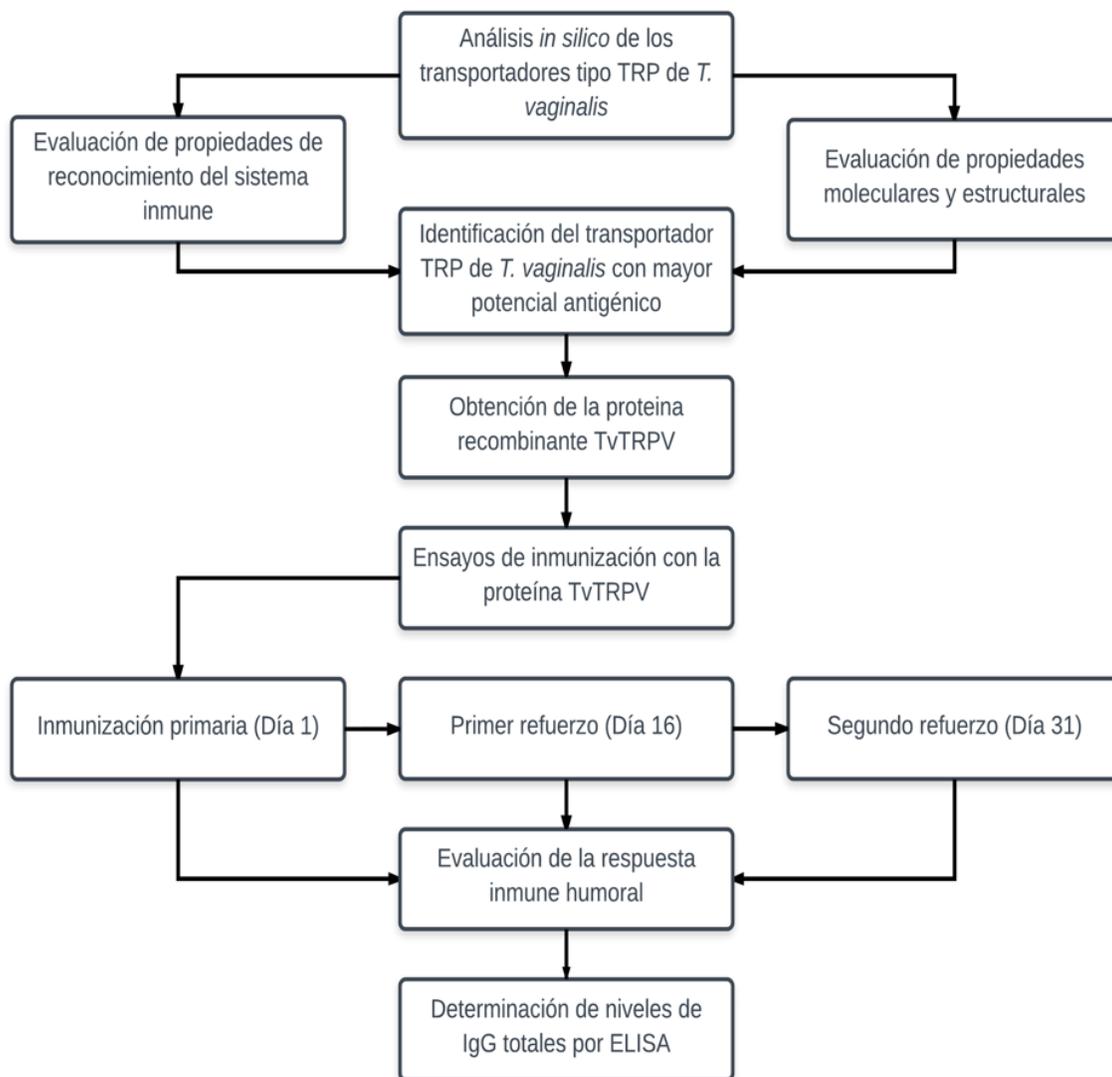


Figura 6. Diagrama del diseño experimental y métodos utilizados en este trabajo.

6.3 Definición de variables y escalas de medición

La descripción de las variables analizadas en el presente trabajo, se incluye en el cuadro 2.

Cuadro 2. Variables y escalas de medición

Variable	Definición	Tipo de variable	Naturaleza	Escala de medición	Unidad de medición
TvTRPV	Proteína recombinante TvTRPV	Dependiente	Cuantitativa	De razón, continua	mg/mL
IgG	Anticuerpo de tipo IgG en respuesta a la proteína recombinante TvTRPV	Dependiente	Cuantitativa	De razón, continua	Densidad óptica

6.4 Análisis *in silico* para la predicción de potencial antigénico

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los transportadores de Ca^{2+} tipo TRP (TRPML/TRPP, TRPML y TRPV) de *T. vaginalis* fueron obtenidas de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y de la base de datos del parásito (TrichDB) (<http://trichdb.org>). Dichas secuencias se utilizaron con el fin de identificar el transportador de Ca^{2+} tipo TRP con mayor potencial inmunogénico, mediante la predicción de propiedades de reconocimiento del sistema inmune, así como la predicción de sus propiedades moleculares y estructurales, mediante distintos análisis *in silico*. (Cuadro 3).

Cuadro 3. Análisis *in silico* realizados para la determinación del potencial inmunogénico de los transportadores TRP

Basados en el reconocimiento del sistema inmune	Basados en la identificación de propiedades moleculares y estructurales
	Localización subcelular
Predicción de secuencias con potencial antigénico	Regiones transmembranales
Predicción de epítopes B	Función
Predicción de epítopes T	Alineamientos múltiples
	Árboles filogenéticos

6.4.1 Análisis de propiedades de reconocimiento del sistema inmune

Las tres secuencias de las proteínas correspondientes a los transportadores TRP fueron analizadas en la base de datos AntiJen (<http://www.ddg-pharmfac.net/antijen/AntiJen/antijenhhomepage.htm>) y VaxiJen (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>) para la predicción de secuencias de aminoácidos con potencial antigénico.

La predicción de epítopes B presentes en los transportadores TRP se realizó mediante el servidor disponible en línea SVMTriP (<http://sysbio.unl.edu/SVMTriP/>).

En cuanto a la predicción de epítopes T, ésta se llevó a cabo utilizando el método de red neuronal artificial (NN-align, por sus siglas en inglés), disponible en línea en la base de datos y recursos de análisis de Epítopes Inmunes (IEDB, por sus siglas en inglés) (http://www.iedb.org/home_v3.php).

6.4.2 Análisis de propiedades moleculares y estructurales

La predicción de la posible localización de los transportadores TRP se realizó

mediante el servidor para eucariotas Euk-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>).

Para la predicción de la topología transmembranal de dichos transportadores presentes en el parásito, se utilizó la herramienta TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>).

En cuanto a la predicción de su función molecular, ésta se llevó a cabo utilizando el software “Protein Function Prediction” (<http://kiharalab.org/pfp.php>).

Posteriormente, se realizó la búsqueda de proteínas homólogas a cada una de las subfamilias de los transportadores TRP utilizando la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y una vez obtenidas las secuencias se realizaron alineamientos múltiples con la herramienta ClustalO (uniProt) (<http://www.uniprot.org/align/>). Los alineamientos obtenidos fueron editados con el servidor BoxShade 3.21 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) y sirvieron de punto de partida para la predicción de árboles filogenético entre las distintas subfamilias de los transportadores TRP. Dichos árboles filogenéticos se realizaron con la herramienta MEGA, utilizando el método “unión de vecinos” (Neighbor-Joining).

6.5 Cultivo de *T. vaginalis*

Se utilizó el aislado MICH01 de *T. vaginalis* cultivado axénicamente en medio TYM (Tryptona-Levadura-Maltosa) suplementado con 18% de suero de caballo, inactivado por calor, incubado a 37°C por 24 h. Los parásitos se cosecharon en fase logarítmica de crecimiento.

6.6 Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó a partir del cultivo de *T. vaginalis* mencionado previamente. 1×10^6 parásitos cultivados en condiciones normales por 24h a 37°C, fueron centrifugados a 1800 rpm por 10 min a 4°C. La pastilla celular

obtenida fue tratada utilizando el kit RNeasy (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante y el ARN obtenido fue eluído con agua libre de RNAsas. Posteriormente, la integridad del ARN extraído se analizó en un gel de agarosa al 1.5% corrido en TBE 0.5% y teñido con bromuro de etidio.

6.7 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para la síntesis del ADNc se utilizó el kit First Strand cDNA synthesis (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante. La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 20 μ L, adicionando 30 ng/ μ L de ARN tratado con DNasa, Oligo (dT) (100 μ M), agua libre de nucleasas, buffer de reacción 5X, inhibidor de RNasa RiboLock (20 U/ μ L), dNTP mix (10 mM) y transcriptasa reversa RevertAid H Minus M-MuLV (200 U/ μ L).

6.8 Diseño de oligonucleótidos

Para amplificar por RT-PCR el gen correspondiente al transportador TRPV de *T. vaginalis* (TvTRPV) a partir de su ADNc, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos: TRPV1-F (5'-CCCATGGACACTCTATTCGCACCTT-3'), y TRPV1-R (5'-CCCTTATACGGCTTCTGGTATTCTA-3'), así como los oligonucleótidos TRPV2-F conteniendo un sitio de restricción para la enzima *Bam*HI (5'-GGCGGGGATCCATGGACACTCTATTCGCACCTT-3') y TRPV2-R conteniendo un sitio de restricción para la enzima *Hind*III (5'-GGCGGAAGCTTTTATACGGCTTCTGGTATTCTA-3'). En este último par de oligonucleótidos, los codones de inicio y de paro están subrayados y las secuencias de los sitios de restricción se encuentran en cursiva.

6.9 Clonación del transportador TvTRPV en el vector pTZ57R/T

A partir del ADNc de *T. vaginalis*, se amplificó por RT-PCR el transportador TvTRPV utilizando el oligonucleótido sentido TRPV1-F y el oligonucleótido antisentido TRPV1-R.

La mezcla de reacción se preparó como se describe a continuación: buffer de polimerasa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10X), mezcla de dNTP's (10 mM), MgCl_2 (25mM), 10 μM de cada oligonucleótido (sentido y antisentido), 1 μL de ADNc, polimerasa de alta fidelidad (5 U/ μL) (Thermo Scientific Phusion Hot Start II), en un volumen final de 25 μL .

La amplificación se sometió a las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C durante 40 segundos y 72°C por 70 segundos y finalmente un ciclo de 72°C por 7 minutos. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 0.8% corrido en TBE 0.5% y teñido con bromuro de etidio.

Posteriormente, el amplicón obtenido se clonó en el vector pTZ57R/T (Thermo Fisher Scientific) según las especificaciones del fabricante. Con esta construcción se transformaron células competentes *E. coli* DH5 α , se sembraron en placas de agar LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se crecieron por 18 h a 37°C. Las clonas positivas se seleccionaron por "PCR" colony", utilizando los oligonucleótidos TRPV1-F y TRPV1-R y por restricción del ADN plasmídico (ADNp) con las enzimas *EcoRI* y *EcoRV*. Las clonas positivas se almacenaron con glicerol al 10% a -80 °C.

6.10 Expresión del transportador TvTRPV en el vector pCold II

Se realizó RT-PCR del transportador TvTRPV utilizando el oligonucleótido sentido TRPV2-F y el oligonucleótido antisentido TRPV2-R. La mezcla de reacción y las condiciones de amplificación fueron las mismas que se describieron previamente.

Después, el amplicón obtenido se clonó en el vector de expresión pCold II (Takara). La reacción de ligación se realizó en una proporción 1:4 (vector-inserto), usando 1 μL de T4 DNA Ligasa 50 U (Thermo Scientific), en 20 μL de reacción, durante 20 h a 16°C.

Posteriormente, se realizó la transformación en células competentes *E. coli* BL21(DE3) (100 μ L) con 15 μ L del producto de ligación, la mezcla se mantuvo en hielo por 15 min y se sometió a choque térmico por 90 s a 42°C. Las células se transfirieron nuevamente a hielo durante 10 min, se adicionó 260 μ L de medio Luria Bertani (LB) sin antibiótico y se incubó a 37°C durante 1 h con agitación (100 rpm). Inmediatamente después se sembró la mezcla anterior sobre placas de agar-LB con ampicilina (100 μ g/ml).

De las clonas obtenidas se realizó “PCR” colony” utilizando los oligonucleótidos TRPV2-F y TRPV2-R. Además, se obtuvo el ADNp de las clonas positivas y se realizó PCR utilizando los oligonucleótidos TRPV2-F y TRPV2-R para amplificar el transportador TvTRPV y los oligonucleótidos pCold II-F y pCold II-R para amplificar al vector. Las clonas positivas se almacenaron con glicerol al 10% a -80 °C.

Para la inducción de la proteína recombinante se tomó una de las clonas positivas, se inoculó en tubos cónicos conteniendo 15 ml de medio LB y ampicilina (100 μ g/ml) y se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm. El cultivo se llevó a una densidad óptica de 0.5 a 600 nm y se indujo con isopropil β -D tiogalacto-piranósido “IPTG” (Promega) 1 mM a 37°C durante 24 h.

El análisis de expresión de la proteína recombinante se realizó en SDS-PAGE al 15%, la pastilla de 1 ml de bacterias se resuspendió en 100 μ L de amortiguador de muestra para electroforesis 1X. Para el análisis de la solubilidad, la pastilla de bacterias del cultivo de 15 ml se resuspendió en 1.5 ml de amortiguador de lisis (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0), se rompió con lizozima (1 mg/ml), se añadió inhibidor de proteasas (1X) y se incubó en hielo por 30 min. Posteriormente, se sonicó en frío por 6 ciclos de 10 s, con pausas de 10 s. El lisado celular se centrifugó a 10, 000 x g, 30 min a 4°C para separar la fracción soluble de la insoluble. Para el análisis electroforético se tomaron 15 μ l de la fracción soluble (sobrenadante) más 15 μ l del amortiguador de muestra para

electroforesis 2X. De la misma manera se preparó una muestra de la fracción insoluble (pastilla), adicionando 30 μ L de amortiguador de muestra 1X para solubilizar la pastilla.

6.11 Purificación de la proteína recombinante TvTRPV

La proteína TvTRPV recombinante se purificó de la fracción soluble mediante el kit His Spin Protein Miniprep (ZYMO RESEARCH) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se utilizó una resina acoplada a níquel, con afinidad a histidinas, la cual se interaccionó con la fracción soluble y se dejó incubar 4 min. Posteriormente, se realizaron 2 lavados con el fin de eliminar las proteínas no acopladas y se añadió el buffer de elución para recuperar la proteína TvTRPV recombinante. Todo el procedimiento anterior se realizó en hielo y la integridad de la proteína se confirmó por SDS-PAGE al 15%. Posteriormente, la proteína TvTRPV recombinante obtenida se almacenó a -80°C hasta su posterior uso.

6.12 Cuantificación de la proteína recombinante TvTRPV

La proteína purificada se cuantificó mediante una curva estándar con albúmina de 0-2 mg/mL. Se colocaron 200 μ L del reactivo de Bradford en cada pozo de una microplaca y se agregaron 4 μ L de la dilución correspondiente a cada punto de la curva estándar con albúmina (0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2 mg/mL). El procedimiento se realizó por triplicado y la microplaca se dejó en incubación 30 min en completa oscuridad. Posteriormente, la lectura se realizó a 595 nm en el lector de placas (Bio-Rad iMark).

6.13 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad, obtenidos del Bioterio del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, UADY. Esta cepa consanguínea fue empleada debido a que su genoma y sistema inmune es similar al del ser humano. Durante el periodo

experimental los ratones permanecieron en el Laboratorio de Farmacología, en el Área de Manejo Experimental de Animales de la Facultad de Química, UADY y se alojaron en cajas de acrílico, con viruta estéril en condiciones de bioterio estandarizadas: ambiente libre de patógenos y estrés, a una temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, con foto-períodos de 12 horas luz/oscuridad. Se les suministró alimento especial para roedores y agua a libre demanda. Cada 4-5 días se realizó cambio de viruta, añadiendo en las jaulas tubos de cartón y papel estériles, como enriquecimiento ambiental, con el fin de reducir el estrés provocado por la manipulación durante el experimento. Todos los días se observaron los animales para detectar cambios de comportamiento, enfermedades, heridas o muerte.

6.14 Grupos experimentales

Los grupos experimentales y la administración de la proteína recombinante TvTRPV evaluada en este estudio, se presenta a continuación (Cuadro 4). Cada grupo experimentales fue constituido por un total de 5 ratones de la cepa BALB/c.

Cuadro 4. Esquema de tratamiento de la proteína TvTRPV en los diferentes grupos experimentales

Grupos experimentales	TvTRPV ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Adyuvante incompleto de Freund (μL)	Solución salina (μL)
Solución salina (C-)	-----	-----	50
Control adyuvante	-----	25 μL	25
TvTRPV 200	200	25 μL	*Cbp 50
TvTRPV 100	100	25 μL	*Cbp 50
TvTRPV 50	50	25 μL	*Cbp 50

*Cbp: cantidad bastante para

6.15 Evaluación del efecto de la proteína recombinante TvTRPV sobre la respuesta inmune

Los ratones BALB/c fueron inmunizados en el cojinete plantar derecho, con tres dosis de la proteína TvTRPV (50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$), tomando como referencia lo reportado por Yi y colaboradores, quienes propusieron una dosis de 100 μg de los candidatos a vacunas ACT-F y ACT-T contra *T. vaginalis*.⁶⁵

Para la evaluación de la respuesta inmune inducida por la proteína recombinante TvTRPV, ésta se emulsionó en una relación 1:1 con el adyuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich). El volumen final administrado a cada animal de experimentación fue de 50 μL .

Con el objetivo de generar una reestimulación del sistema inmune, se aplicaron dos refuerzos en intervalos de dos semanas. A continuación, se muestra el esquema de inmunización y obtención de muestras sanguíneas (Figura 7).

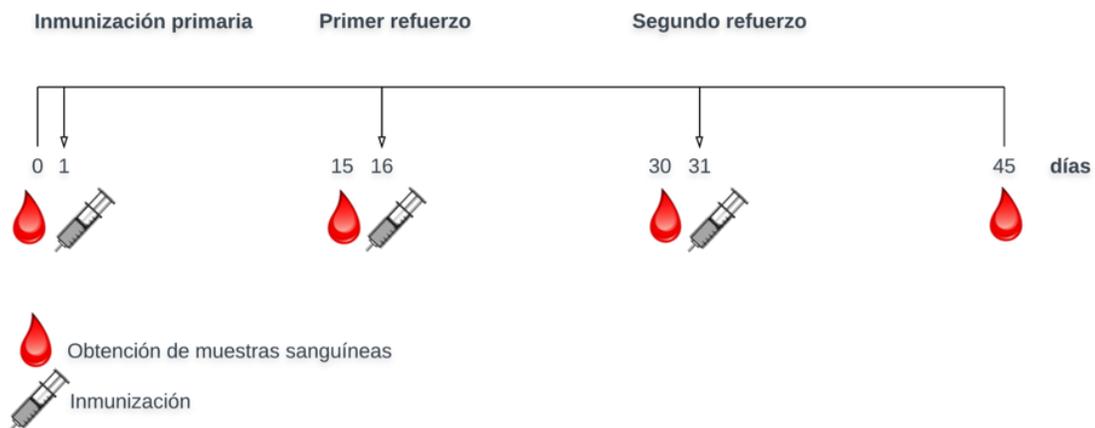


Figura 7. Esquema de inmunización y obtención de muestras sanguíneas

6.16 Cuantificación de los niveles de IgG totales en respuesta a la proteína TvTRPV

Para la evaluación de la respuesta inmune humoral inducida por la inmunización

de la proteína TvTRPV a diferentes dosis, se obtuvo aproximadamente 500 μL de sangre de la vena caudal de los ratones BALB/c. El suero se obtuvo mediante centrifugación de la sangre a 1800 x g por 15 min a 37 °C.

La cuantificación de anticuerpos se realizó mediante ensayos inmunoenzimáticos, para ello se emplearon microplacas de 96 pozos, las cuales fueron sensibilizadas con la proteína TvTRPV en amortiguador de carbonatos a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La placa fue incubada a 4 °C por 18 h. Como control de la técnica, se empleó PBS como blanco, para el cual, la sensibilización con la proteína se realizó a las mismas condiciones que las muestras evaluadas. Transcurrido el tiempo de incubación, se eliminó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con amortiguador de lavado (PBS1X pH 7 y Tween 20 al 0.05%). Posteriormente se adicionaron 300 μL de amortiguador de bloqueo (PEPROTECH), incubando la placa a 24°C por 2 horas. Después, se realizaron nuevamente tres lavados. Posteriormente los sueros de cada grupo experimental se prepararon con diluyente 1X (PEPROTECH) a una dilución 1:25 para la evaluación de IgG totales. Las muestras de cada grupo experimental fueron evaluadas por triplicado. Se adicionaron 50 μL por pozo de la muestra y se incubó a 24 °C por 2 horas. Finalizada la incubación, se realizaron tres lavados. Posteriormente, se empleó el anticuerpo de ratón IgG conjugado con peroxidasa de rábano (anti-IgG-HRP) (Santa Cruz Technology), el cual fue preparado a una dilución 1:1500 en diluyente 1X. Se añadieron 100 μL de anticuerpo conjugado por pozo y se incubó a 24 °C por 2 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados. En seguida, se agregaron 100 μL por pozo del sustrato revelador 2, 2'-Azinobis-3-etil-benzo-tiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS) (PEPROTECH) y se dejó incubar por 30 min, protegido de la luz. Finalmente, la lectura se realizó a 450 nm en el lector de placas (Bio-Rad iMark).

El valor obtenido de densidad óptica (D.O.) fue directamente proporcional a los

niveles de IgG totales presentes en el suero del ratón, en respuesta a la proteína TvTRPV.

6.17 Análisis estadísticos

La comparación de los datos obtenidos de las inmunizaciones, se realizaron mediante un análisis de varianza de 2 vías (ANOVA, por sus siglas en inglés), para analizar los factores (grupos experimentales y tiempo) e interacciones entre ellos. También se efectuó un análisis de comparaciones múltiples (*post hoc*), usando el método de Tukey.

Los análisis estadísticos y las gráficas presentadas se realizaron con el programa R⁸⁹, disponible en línea (<https://www.r-project.org>), utilizando las siguientes librerías: ggplot2⁹⁰, lattice⁹¹, plyr⁹², Rmisc⁹³, FSA⁹⁴, car⁹⁵, rcompanion⁹⁶, multcompViem⁹⁷, estimability⁹⁸ e lsmeans⁹⁹. Se consideraron como estadísticamente significativos los valores de $p < 0.05$.

6.18 Consideraciones éticas

El presente trabajo fue aprobado por el Comité de Bioética del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán (No. de identificación: CB-CCBA-M-2016-005). El manejo de los animales se realizó con base a los requisitos de bioética para la investigación y normatividad contemplados por dicho comité.

VII. Resultados

7.1 Identificación de propiedades de reconocimiento del sistema inmune

7.1.1 Predicción de antigenicidad

Los resultados de la predicción de antigenicidad utilizando la base de datos AntiJen mostraron que ninguno de los tres transportadores TRP analizados presentaron similitud con secuencias antigénicas reportadas previamente

(resultados no mostrados). Por lo que teniendo en cuenta el hecho de que de nuevos antígenos podrían no presentar similitud a antígenos de procedencia conocida, se utilizó la base de datos VaxiJen v2.0, la cual permite la clasificación de antígenos basada únicamente en las propiedades fisicoquímicas de las proteínas. Los resultados de dicho análisis se obtuvieron mediante valores de predicción, los cuales al ser mayores a 0.5 indican el potencial antigénico de las proteínas analizadas. Los resultados obtenidos mostraron que el transportador TRPV fue el que presentó un mayor valor de predicción (Cuadro 5). Sin embargo, los resultados correspondientes a los tres transportadores TRP analizados indicaron que todos ellos cuentan con un posible potencial antigénico (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de la antigenicidad de transportadores TRP de *T. vaginalis* utilizando la base de datos VaxiJen v2.0.

Transportador	Valor de predicción	Resultado
TRPML/TRPP	0.6229	Antígeno probable
TRPML	0.5924	Antígeno probable
TRPV	0.6619	Antígeno probable

La predicción de la antigenicidad como propiedad, es un parámetro importante para identificar si una molécula puede unirse específicamente a un anticuerpo o al receptor de células T (TCR).¹⁰⁰ Aunque en la actualidad existen algoritmos que utilizan la alineación de secuencias para la identificación de antígenos, su uso puede dificultarse, ya que algunas proteínas han evolucionado disminuyendo su similitud con secuencias conservadas, aunque compartan algunas estructuras y propiedades biológicas. Del mismo modo, el descubrimiento de nuevos antígenos puede dificultarse por la falta de similitud con antígenos de procedencia conocida. Por lo que, considerando lo anterior y debido a que hasta la fecha no existía registro de la antigenicidad de los transportadores TRP de *T. vaginalis*, se utilizó la base de datos VaxiJen, la cual es una herramienta confiable, consistente para

la predicción de antígenos protectores y que permitió la clasificación de dichos antígenos basada únicamente en las propiedades fisicoquímicas de la proteína analizada, independientemente de la longitud de la secuencia y la necesidad de alineación con otras secuencias.¹⁰¹

7.1.2 Predicción de epítopes B

Al analizar las secuencias correspondientes a los transportadores TRPML/TRPP, TRPML y TRPV utilizando el servidor SVMTrip, se logró identificar un total de tres, cinco y dos epítopes B presentes en dichos transportadores, respectivamente (Cuadro 6). Los resultados se obtuvieron mediante puntajes numéricos, los cuales al ser mayores a 0.5 indican ser mejores candidatos como posibles epítopes B. Los transportadores TRPML/TRPP y TRPV fueron los que mostraron puntajes más elevados (Cuadro 6). Sin embargo, los puntajes obtenidos para los tres transportadores TRP analizados indicaron que todos ellos cuentan con péptidos que podrían actuar como posibles epítopes B (Cuadro 6).

Cuadro 6. Epítopes B detectados en los transportadores de Ca²⁺ tipo TRP de *T. vaginalis*

Transportador de Ca ²⁺ tipo TRP	Posición de los aminoácidos	Secuencia del péptido	Puntaje
TRPML/TRPP	362-381	FAGYLVLGCSLFGTYCINFA	1.00
	2-21	EGNSRFHALVHYKKRYNSRY	0.807
	43-62	EISMMIIYVLIGYTNQLSIN	0.780
TRPML	455-474	FVECTIDFLIGAKWKYGRP	1.00
	234-253	IGTTMFIDALHNEVFPIAIL	0.701
	177-196	QTLNFKELLEVDYLIEEFT	0.653
	144-163	LTATLIEKGKQNSVSYFCQE	0.619
	411-430	HSDIVMDTEELVKEAAVCPD	0.587

	76-95	EFQVFYFIRRSFTKCITHAA	1.00
TRPV	175-194	LCIMDMIILASVYANVIHNY	0.803

La importancia de la identificación de epítopes B radica en que éstos pueden ser reconocidos por anticuerpos específicos secretados o receptores de células B, provocando una respuesta inmune humoral frente a patógenos invasores,¹⁰² por lo que pueden guiar el diseño de vacunas de subunidades que incluyan dichos epítopes con la finalidad de desencadenar respuestas inmunes protectoras.¹⁰³

Actualmente la identificación de epítopes B en distintos microorganismos tiene aplicaciones clínicas, por ejemplo, se han detectado antígenos que presentan epítopes protectores y que a la fecha se encuentran en fase clínica I y II como candidatos a vacuna contra malaria, y uno de ellos además es un componente importante de una vacuna contra el sarampión meningocócica B, que recientemente ha sido autorizada para su uso por la Agencia Europea de Medicamentos.^{104,105}

Con base en lo anterior, la identificación de epítopes B para el desarrollo de vacunas tiene posibilidad de éxito y más aún si se combina con estrategias para inducir respuestas inmunológicas desencadenadas por células T citotóxicas (CD8+) y/o cooperadoras (CD4+) que puedan eliminar o estimular respuestas inmunológicas en contra de distintos patógenos.¹⁰⁶

7.1.3 Predicción de epítopes T

Utilizando el método NN-align se identificaron tres, cuatro y ocho epítopes T presentes en los transportadores TRPML/TRPP, TRPML y TRPV, respectivamente (Cuadro 7). La afinidad de los epítopes predichos hacia el CMH II de tipo murino se obtuvo en base a los valores de IC50, siendo los valores <50 nM considerados como de alta afinidad, <500 nM de afinidad intermedia y <5000

nM de baja afinidad. Los resultados obtenidos mostraron que el transportador TRPV fue el que presentó los valores IC50 más bajos. Sin embargo, todos los epítopes predichos para los tres transportadores TRP obtuvieron valores <500 nM, indicando una posible afinidad intermedia de éstos al MHC II de tipo murino (Cuadro 7).

Cuadro 7. Epítopes T detectados en los transportadores de Ca²⁺ tipo TRP de *T. vaginalis*

Transportador TRP	Posición de los aminoácidos	Secuencia del péptido considerado como epítope	IC50(nM)
TRPML/PP	417-431	LFFYMSIWAFFSLTI	450.20
	416-430	VLFFYMSIWAFFSLT	471.60
	415-429	WVLFFYMSIWAFFSL	483.10
TRPML	167-181	EASEIASAAVQTLNF	380.00
	166-180	SEASEIASAAVQTL	385.50
	168-182	ASEIASAAVQTLNFK	408.70
	165-179	ASEASEIASAAVQTL	476.00
TRPV	195-209	TNWIKALGAYTSIIS	178.60
	196-210	NWIKALGAYTSIISN	180.60
	194-208	YTNWIKALGAYTSII	201.00
	193-207	NYTNWIKALGAYTSI	214.80
	19-33	IFWAWVLIPALRPLL	288.00
	20-34	FWAWVLIPALRPLLY	288.60
	18-32	CIFWAWVLIPALRPL	304.50
	17-31	SCIFWAWVLIPALRP	390.80

La unión de epítopes T al de MHC II es un evento crucial para el desarrollo de una respuesta adaptativa frente a distintos parásitos,¹⁰⁷ y la realización de este análisis *in silico* es un parámetro fundamental para el desarrollo de vacunas mediante el enfoque vacunología inversa por diversas razones: 1) los epítopes se presentan en el contexto de uno o pocos alelos del CMH;¹⁰⁸⁻¹¹³ 2) los epítopes representan la región antigénica de una proteína y por lo tanto, las regiones no antigénicas pueden eliminarse y los epítopes pueden seleccionarse para construir vacunas basadas en péptidos.¹¹⁴ En la actualidad, gracias a la identificación de epítopes T mediante análisis *in silico* se han seleccionado péptidos procedentes de distintos microorganismos. Por ejemplo, se han identificado péptidos derivados del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y restringidos a los alelos DR en humanos, los cuales se han utilizados para inducir respuestas CD4. También se han utilizado péptidos como inmunógenos específicos para VIH, entre otros microorganismos.¹¹⁵

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este análisis *in silico* realizado para los transportadores TRP de *T. vaginalis* no fue identificar específicamente epítopes como potenciales vacunales, si no utilizar métodos de predicción para proporcionar evidencia adicional de la inmunogenicidad de dichas proteínas.

7.2 Identificación de propiedades moleculares y estructurales

7.2.1 Predicción de la localización celular

Mediante el servidor Euk-mPloc se identificó que los transportadores TRPML/TRPP y TRPP posiblemente se encuentran en compartimientos intracelulares, como el retículo endoplásmico, mientras que el transportador TRPV es el único que se encuentra posiblemente expuesto en la membrana celular (Cuadro 8).

Cuadro 8. Posible localización de los transportadores TRP de *T. vaginalis*

Transportador de Ca ²⁺ tipo TRP	Localización celular
TRPML/TRPP	Retículo endoplásmico
TRPML	Retículo endoplásmico
TRPV	Membrana celular

El enfoque de vacunología inversa requiere que los determinantes antigénicos se encuentren presentes en la superficie del patógeno en cuestión, ya que distintos factores inmunológicos pueden ser incapaces de tener acceso a las proteínas citoplásmicas o de la membrana interna.^{116,117} Con base a este conocimiento, la mayoría de las vacunas se han dirigido principalmente a proteínas presentes en la membrana celular, proteínas fimbriales, antígenos anclados al glicosilfosfatidilinositol, toxinas, invasinas y porinas.¹¹⁸

En el caso de los transportadores TRP analizados, el transportador TRPV al estar expuesto en la membrana celular presenta un mayor potencial inmunogénico, ya que debido a su posible ubicación puede interactuar con moléculas como células presentadoras de antígenos, anticuerpos, entre otras, y así desencadenar una respuesta inmunológica. Por otro lado, la localización de un antígeno también es un parámetro fundamental que proporciona información sobre función en distintas vías biológicas. El transportador TRPV al encontrarse expuesto en la membrana celular nos podría indicar que posiblemente cuenta con un rol fundamental en la regulación del calcio procedente del espacio extracelular, así como también podría impactar en la regulación de este ión hacia organelos intracelulares.³⁵

7.2.2 Predicción de regiones transmembranales

Se identificaron siete posibles regiones transmembranales en el transportador

TRPML/TRPP y seis posibles regiones transmembranales tanto en el transportador TRPML y TRPV utilizando el servidor TMHMM 2.0 (Cuadro 9). Los resultados obtenidos por este servidor también indicaron la posición de los aminoácidos presentes en el dominio extracelular, en cada una de las regiones transmembranales, así como en el interior celular (Cuadro 9).

Cuadro 9. Posición de los aminoácidos presentes en las distintas regiones identificadas de los transportadores TRP

Receptor de Ca ²⁺ tipo TRP	Regiones extracelulares	Regiones transmembrana	Regiones intracelulares
		34-56	
	1-33	224-246	57-223
	247-279	280-302	303-308
TRPML/TRPP	332-345	309-331	369-372
	396-414	346-368	438-474
		373-395	
		415-437	
		53-75	
	76-246	247-269	1-52
	319-327	296-318	270-295
TRPML	391-430	328-347	348-367
		368-390	454-477
		431-453	

		19-41	
		61-83	1-18
	42-60	104-126	84-103
TRPV	127-130	131-153	154-165
	189-202	166-188	226-263
		203-225	

Es importante el hecho de considerar el número de hélices transmembranales en una proteína, por dos razones principales. En primer lugar, si solo se expresa una región de una proteína debido a limitaciones experimentales, se debe elegir un dominio extracelular debido a su accesibilidad al sistema inmunológico. En segundo lugar, si se expresan proteínas completas, debe considerarse que se ha descrito que aquellas que contienen múltiples dominios transmembranales cuentan con una mayor dificultad para ser expresadas.¹¹⁹ Por lo tanto, si existiera la dificultad de expresar alguno de los transportadores TRP analizados, la información brindada por este análisis es fundamental, ya que nos permitiría elegir una o más regiones para su expresión y evaluación inmunológica.

7.2.3 Predicción de la función

Los resultados obtenidos de la predicción de la función mostraron que los tres transportadores TRP posiblemente actúen como canales iónicos y/o estén involucrados en el transporte de cationes como el Ca^{2+} (Cuadro 10).

Cuadro 10. Predicción de la posible función de los transportadores TRP de *T. vaginalis*

Transportador TRP	Posible función
TRPML/TRPP	Actividad de canal iónico
	Actividad de canal sustrato específica
	Transportador transmembrana pasivo
	Actividad de canal catiónico
	Canal de calcio dependiente de voltaje
	Unión del ión calcio
TRPML	Unión de nucleótidos
	Unión de ATP
	Unión de cationes
	Unión de iones
	Actividad de canal iónico
	Transporte de iones de calcio
TRPV	Actividad de canal iónico
	Actividad de canal sustrato específica
	Unión de proteínas
	Actividad de canal de calcio
	Transportador transmembrana pasivo

El conocimiento de la función de una proteína es un vínculo crucial en el desarrollo de terapéuticas contra distintos patógenos, como *T. vaginalis*. Sin embargo, muchos de los genes que podrían considerarse como esenciales y/o tener potencial antigénico se encuentran en su genoma y su función aún se desconoce, dificultando su validación experimental. Como es el caso de los

transportadores TRP que hasta la fecha se encontraban descritos únicamente como proteínas hipotéticas y que, gracias a los resultados obtenidos por la predicción de su función, se identificó que probablemente se encuentran relacionados con la regulación y el transporte del Ca^{2+} , siendo dichos transportadores un blanco importante de atención debido a su papel en el metabolismo celular y su uso potencial con orientación a nuevas terapéuticas.³⁷

7.2.4 Alineamientos múltiples y árboles filogenéticos

Los alineamientos múltiples realizados mediante la herramienta ClustalO entre distintos transportadores TRP descritos y caracterizados, mostraron las regiones que cuentan con residuos completamente conservados (mostrados en color negro), así como grupos de residuos con fuertes propiedades similares (mostrados en color gris) entre las secuencias analizadas (Figura 8, 10 y 12). Dentro de dichos alineamientos múltiples también se identificaron las regiones S5-P-S6 (región transmembrana 5, poro que permite el paso iónico y la región transmembrana 6), las cuales se muestran en rectángulos de color azul, amarillo y verde, respectivamente (Figura 9, 11, 13).

En cuanto a los resultados obtenidos de los árboles filogenéticos mediante la herramienta MEGA, éstos mostraron los posibles cambios evolutivos entre las secuencias analizadas, indicados por la longitud de sus ramas (Figura 9, 11 y 13). En conjunto, los resultados de los alineamientos múltiples y los árboles filogenéticos permitieron identificar que el transportador TRPV de *T. vaginalis* fue el que mostró una mayor divergencia en su secuencia proteica al compararlo con otros transportadores de la misma subfamilia, correspondientes a distintos organismos como roedores, mamíferos e incluso el ser humano.

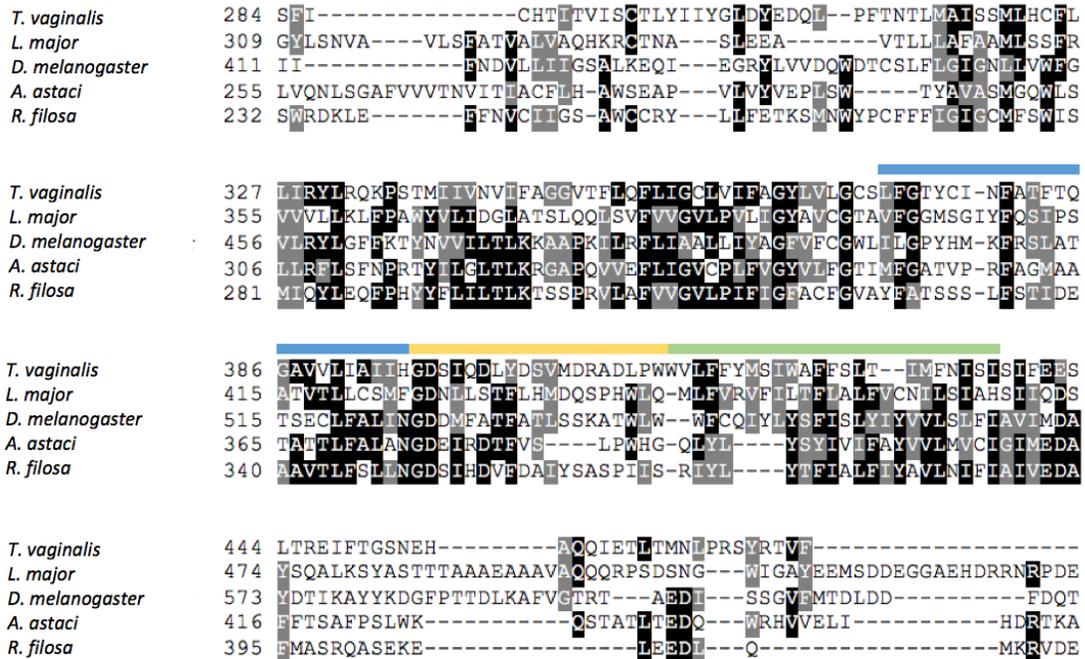


Figura 8. Alineamiento múltiple de transportadores de Ca^{2+} tipo TRPML/TRPP. Se analizaron las secuencias de transportadores TRPML/TRPP de *T. vaginalis*, *Leishmania major*, *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), *Aphanomyces astaci* (hongo) y *Reticulomyxa filosa* (protista amebode).

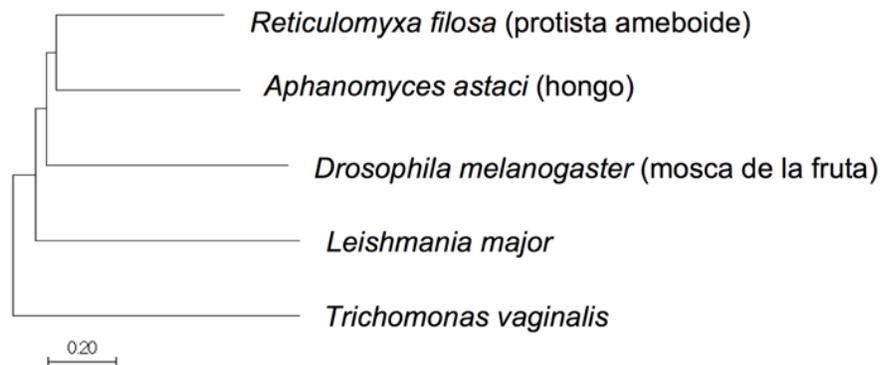


Figura 9. Filogenia de los transportadores TRPML/TRPP analizados. Se muestra la relación entre los transportadores de Ca^{2+} tipo TRPML/TRPP de *T. vaginalis*, *Leishmania major*, *Drosophila melanogaster*, *Aphanomyces astaci* y *Reticulomyxa filosa*.

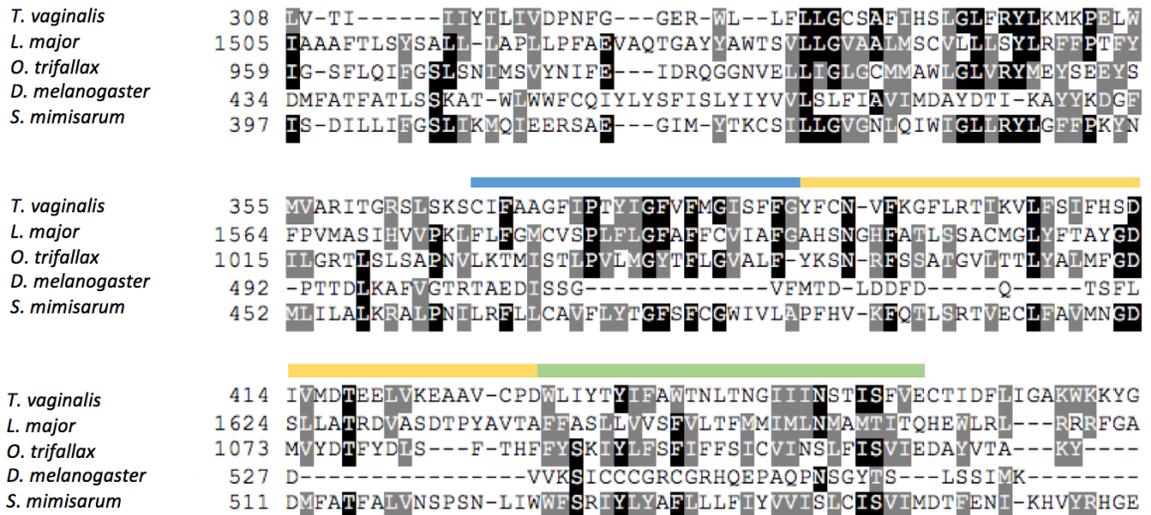


Figura 10. Alineamiento múltiple de transportadores de Ca²⁺ tipo TRPML. Se analizaron las secuencias de transportadores TRPML de *T. vaginalis*, *Leishmania major*, *Oxytricha trifallax* (protozoario), *Drosophila melanogaster* y *Stegodyphus mimosarum* (artrópodo).

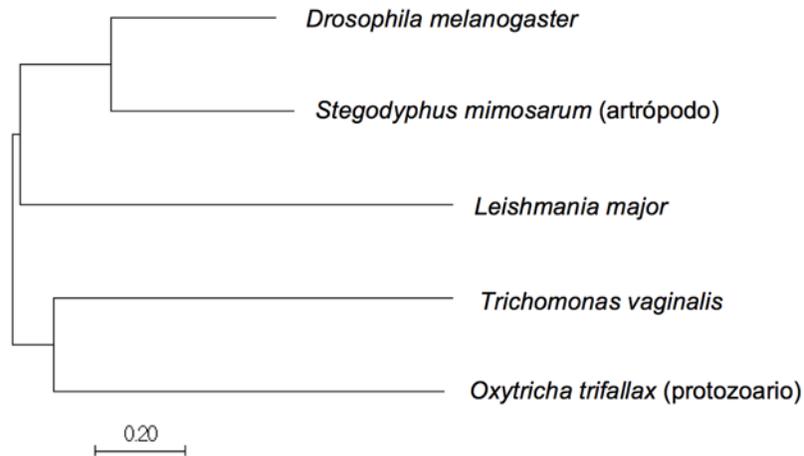


Figura 11. Filogenia de los transportadores TRPML analizados. Se muestra la relación entre los transportadores de Ca²⁺ tipo TRPML de *T. vaginalis*, *Leishmania major*, *Oxytricha trifallax*, *Drosophila melanogaster* y *Stegodyphus mimosarum*.



Figura 12. Alineamiento múltiple de transportadores de Ca^{2+} tipo TRPV. Se analizaron las secuencias de transportadores TRPV de *T. vaginalis*, *Pan paniscus* (chimpancé), *Cavia porcellus* (cobayo), *Desmodus rotundus* (murciélago), *Ovis aries* (oveja), *Cuculus canorus* (ave) y *Homo sapiens*.

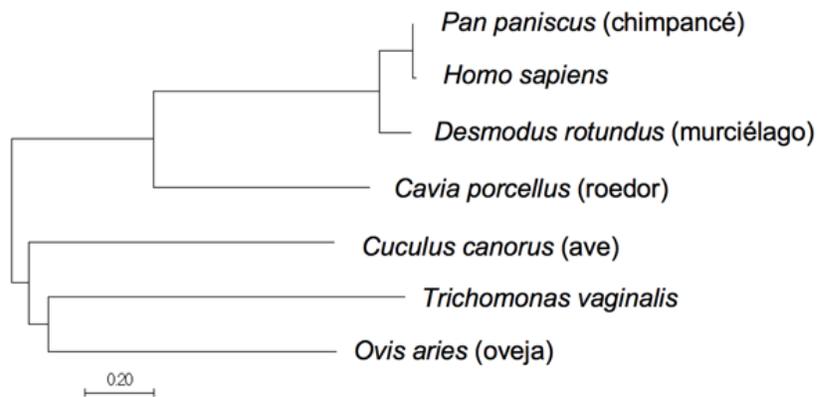


Figura 13. Filogenia de los transportadores TRPV analizados. Se muestra la relación entre los transportadores de Ca^{2+} tipo TRPV de *T. vaginalis*, *Pan paniscus*, *Cavia porcellus*, *Desmodus rotundus*, *Ovis aries*, *Cuculus canorus* y *Homo sapiens*.

Otra consideración importante para candidatos vacunales es la necesidad de mantener un equilibrio adecuado entre inmunogenicidad y reactividad. Es por ello, que la evaluación *in silico* utilizando herramientas como BLAST es fundamental para predecir la posibilidad de reactividad basada en similitud de proteínas con respecto al hospedero, en particular de vacunas de péptidos o proteínas recombinantes.¹²⁰

Los resultados de los transportadores TRPV obtenidos mediante este análisis permitieron reafirmar que el transportador TRPV de *T. vaginalis* era el ideal para la evaluación de su potencial antigénico, ya que, aunque se analizó con otros organismos eucariotas, dicho transportador presentó menor homología respecto los transportadores TRPV analizados, entre los que se encuentran los correspondientes de roedor y humano. Este hecho puede deberse a cambios evolutivos como mutaciones, flujo de genes, deriva génica al azar, interacciones, selección natural, entre otras causas.¹²¹ Este hecho favoreció la elección del transportador TRPV de *T. vaginalis* para clonarlo y expresarlo de manera recombinante, y al no presentar identidad con los transportadores TRPV analizados, se confirma que dicho transportador no presenta el potencial de inducir una respuesta autoinmune y que por lo tanto la respuesta inmune a evaluar sería específica frente a dicho transportador.

7.3 Clonación del transportador TvTRPV en el vector pTZ57R/T

7.3.1 Amplificación del transportador TvTRPV de *T. vaginalis*

Se utilizó el par de oligonucleótidos TRPV1-F y TRPV2-R para amplificar por RT-PCR al transportador TvTRPV de *T. vaginalis* a partir de su ADNc. El resultado obtenido del análisis electroforético en el gel de agarosa mostró un producto de ~711 pb, coincidiendo con el tamaño esperado, correspondiente al transportador TvTRPV (Figura 14).

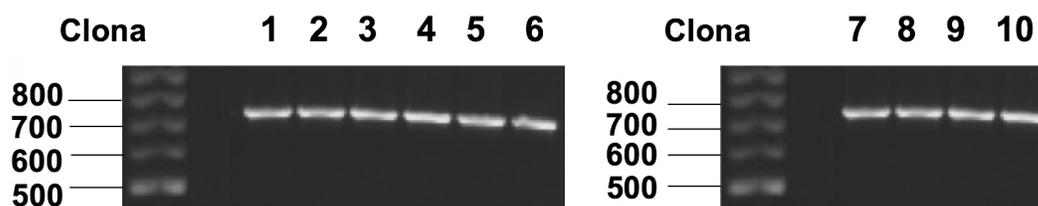


Figura 15. Análisis electroforético en gel de agarosa de la selección de clonas positivas para la construcción PTZ57R/T-TvTRPV. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, control negativo; clonas 1-10, positivas a amplicones de ~711 pb obtenidos por “PCR colony”.

7.3.2.2 Confirmación por análisis de restricción

El análisis electroforético de la restricción del control (plásmido PTZ5R/T) (Figura 16) a partir de su ADNp, utilizando las enzimas *EcoRI* y *EcoRV* mostró productos de ~2886 pb, coincidiendo con el tamaño esperado, correspondiente en ambos casos al vector pTZ57R/T únicamente. En cuanto al análisis electroforético de la restricción de una clona positiva a la construcción recombinante PTZ57R/T-TvTRPV a partir de su ADNp, éste mostró un producto de ~3597 pb utilizando *EcoRI* y el patrón de ADNp utilizando *EcoRV* (Figura 17). El primero de estos resultados coincidió con el tamaño esperado, correspondiente a la suma del tamaño del vector y el inserto. El segundo resultado obtenido también era el esperado, ya que el sitio de reconocimiento para la enzima *EcoRV* se encuentra interrumpido por la presencia del inserto.

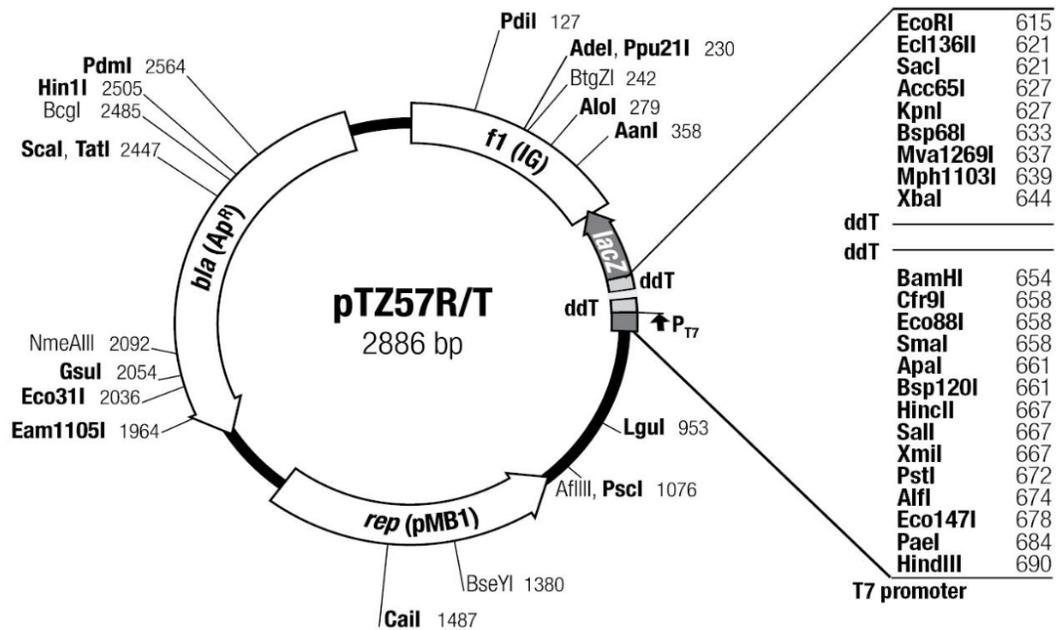


Figura 16. Mapa de restricción del vector pTZ57R/T indicando la ubicación de los sitios únicos de restricción.

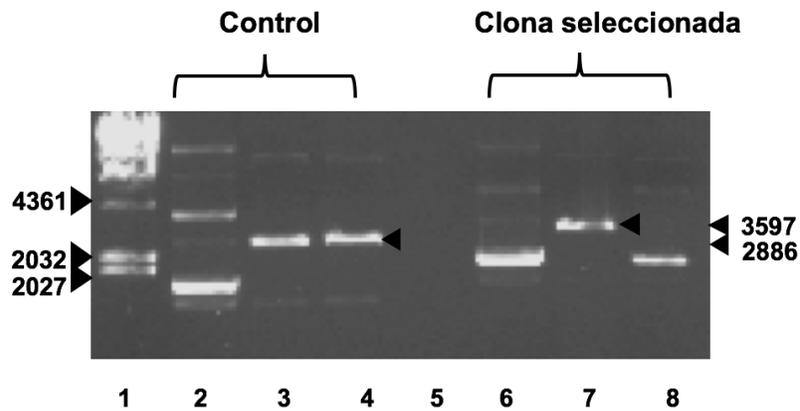


Figura 17. Análisis electroforético en gel de agarosa de los productos obtenidos por análisis de restricción. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, control sin digerir; carril 3, control linealizado con *EcoR1*; carril 4, control linealizado con *EcoRV*; carril 6, clona positiva sin digerir; carril 7, clona positiva linealizada con *EcoR1*; carril 8, restricción de la clona positiva con *EcoRV*.

Esta segunda confirmación de la adquisición de la construcción recombinante PTZ57R/T-TvTRPV en la cepa *E. coli* DH5 α aumentó la confiabilidad de los resultados obtenidos, indicando la clonación exitosa del transportador TvTRPV de *T. vaginalis*.

Hasta la fecha no se contaba con reportes previos del uso del vector de clonación PTZ57R/T en estudios realizados con *T. vaginalis*. Sin embargo, existen registros de su utilización en estudios realizados con otros parásitos, como *Toxoplasma gondii*,¹²² los cuales también confirman la clonación exitosa de genes derivados de este parásito en dicho vector de clonación, por lo que también podría utilizarse para la clonación de distintos genes provenientes de *T. vaginalis*.

Dicho vector de clonación brinda la ventaja de utilizar la actividad transferasa terminal de la Taq ADN polimerasa y otras polimerasas de ADN termoestables, las cuales añaden un único extremo 3'-A a los dos extremos del producto de PCR. La estructura de estos productos de PCR favorecen la clonación directa en el vector de clonación PTZ57R/T linearizado con proyecciones de 3'-ddT individuales. Tales extremos en el sitio de clonación del vector PTZ57R/T no solo facilitan la clonación, sino que también evitan la recircularización del vector.¹²³ Además, su utilización también permitió el almacenamiento del ADNc del transportador TvTRPV de *T. vaginalis*, para su uso posterior en la expresión de la correspondiente proteína recombinante.

7.4 Expresión del transportador TvTRPV en el vector pCold II

El producto de RT-PCR obtenido utilizando los oligonucleótidos TRPV2-F y TRPV2-R a partir de ADNp de las clonas positivas y el vector de expresión pCold II (Figura 18) se sometieron a una doble restricción con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III. El análisis electroforético mostró un producto de ~4392 pb y de ~711 pb, coincidiendo con los tamaños esperados correspondientes a la linearización del vector de expresión y el producto de PCR, respectivamente (Figura 19).

7.4.1 Confirmación de la transformación pCold II-TvTRPV

7.4.1.1 Confirmación por PCR colony

Se obtuvieron un número considerable de clonas en la placa de agar LB con ampicilina después del cultivo de 18 horas de células competentes *E. coli* BL21 con la construcción recombinante pCold II-TvTRPV. En el análisis electroforético en gel de agarosa de los productos de “PCR colony” permitió detectar que 3 de las clonas analizadas resultaron positivas a la construcción pCold-II-TRPV mostrando productos de ~711 pb, coincidiendo con el tamaño esperado, correspondiente al transportador TvTRPV (Figura 20).

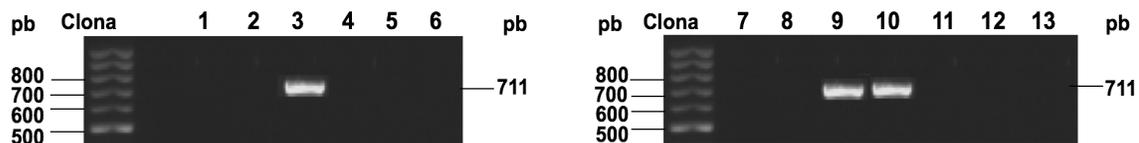


Figura 20. Análisis electroforético en gel de agarosa de la selección de clonas positivas para la construcción pCold II-TvTRPV. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, control negativo; clona 3, 9 y 10, positivas a amplicones ~711 pb obtenidos por “PCR colony”.

7.4.1.2 Confirmación por PCR a partir de ADNp

Se analizaron las clonas positivas a la construcción recombinante pCold II-TRPV, mediante PCR a partir de su ADNp utilizando los siguientes oligonucleótidos: 1) pCold II-F y pCold II -R; 2) TRPV2-F y TRPV2-R; 3) pCold II-F y TRPV2-R y 4) TRPV2-F y pCold II-R. El análisis electroforético en gel de agarosa de los productos de PCR permitió detectar fragmentos con los tamaños esperados de ~893, ~711, ~831 y ~791 pb, respectivamente (Figura 21). Este resultado indicó que la cepa *E. coli* BL21 adquirió la construcción recombinante pCold II-TvTRPV mediante un proceso de transformación exitosa.

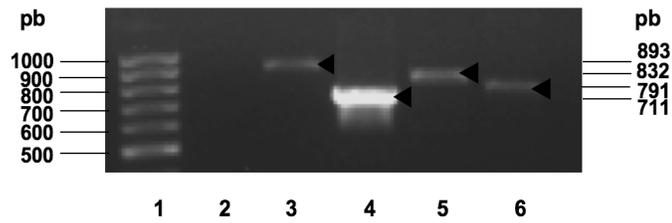


Figura 21. Confirmación de clonas positivas para la construcción de pCold II-TvTRPV por PCR a partir de ADNp. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, control negativo; carril 3, amplicón de ~893 pb; carril 4, amplicón de ~711 pb; carril 5; amplicón de ~832 pb; carril 6; amplicón de ~791 pb.

7.5 Inducción de la proteína recombinante TvTRPV

Se realizó la inducción de la construcción recombinante pCold II-TvTRPV con IPTG, tomando alícuotas antes de la inducción y 24 horas post-inducción. En éste último tiempo evaluado se observó la sobreexpresión de la proteína de ~27.4 kDa, ausente en la fracción de bacterias sin inducir (Figura 22). El fraccionamiento bacteriano después de la inducción con IPTG por 24 horas mostró que la mayor parte de la proteína inducida se encontró en la fracción soluble (Figura 22).

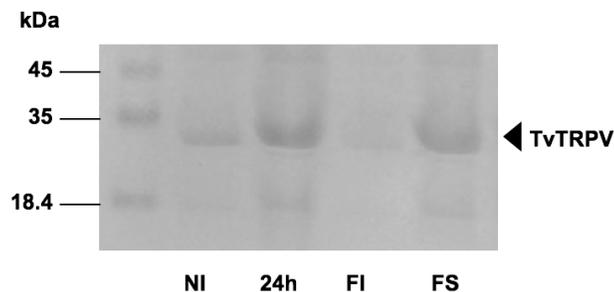


Figura 22. Inducción y fraccionamiento de bacterias transformadas con la construcción pCold II-TvTRPV. Cultivo sin inducir (NI), después de 24 de inducción (24h), fracción insoluble (FI), fracción soluble (FS).

Debido a que distintas proteínas eucariotas cuentan con dificultades para ser expresadas con éxito, el método convencional para expresarlas es mediante el

uso de vectores de expresión que cuenten con etiquetas de fusión.^{124,125} A la fecha se encuentran disponibles diversas etiquetas de fusión para facilitar la expresión y la purificación de proteínas recombinantes.^{126,127} En el caso particular para la expresión de genes provenientes de *T. vaginalis* existen reportes previos del uso de vectores de la serie pCold,¹²⁸ los cuales se encuentran fusionados a una cola de 6x His en su extremo C-terminal. De acuerdo a la información anterior, se seleccionó y utilizó el vector pCold II.

Por otro lado, debido a que el sistema pCold II emplea un promotor *cspA* derivado de *E. coli*, casi todas las cepas de dicho género bacteriano pueden utilizarse como hospederos expresión. En este trabajo se empleó la cepa *E. coli* BL21, debido a que es deficiente de proteasas OmpT y Lon, involucradas en la degradación de proteínas. Además, esta cepa de expresión contiene el ADN del bacteriófago DE3 integrado en el cromosoma. Dicho bacteriófago cuenta a su vez con el gen codificante de la T7 RNA polimerasa, regulado por el promotor *lacUV5* cuya actividad se induce por medio de la adición del inductor IPTG.¹²⁹ En este sistema, el vector de expresión pCold II utilizado para la expresión de la secuencia codificante del transportador TvTRPV, tiene incorporado una región promotora reconocida por la T7 RNA polimerasa, de manera que, tras la adición del IPTG, la T7 RNA polimerasa expresada desde el cromosoma bacteriano permitió llevar a cabo la inducción de la expresión del transportador TvTRPV de *T. vaginalis* a partir de dicho vector.¹³⁰

De acuerdo a los resultados obtenidos, se demostró que el vector de expresión pCold II resultó adecuado para la producción de la proteína recombinante TvTRPV de *T. vaginalis*, como proteína fusionada a una cola de 6 histidinas, con la finalidad de facilitar su posterior purificación.

7.6 Purificación de la proteína recombinante TvTRPV

La obtención de la mayor parte de la proteína recombinante TvTRPV en la fracción soluble, permitió su purificación mediante una columna cargada con níquel con afinidad a histidinas (Figura 23).

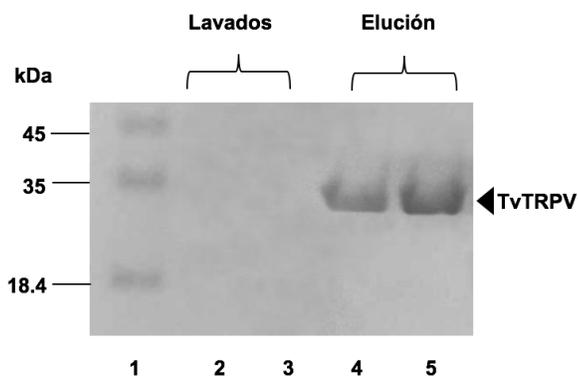


Figura 23. Purificación de la proteína recombinante TvTRPV por columna cargada con níquel. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2-3, lavados de la columna acoplada a Níquel; carril 4-5, elución de la proteína TvTRTPV.

Estudios previos han reportado la utilización de cromatografía de afinidad a Níquel mediante métodos caseros para la obtención de proteínas recombinantes derivadas de *T. vaginalis*.¹²⁸ Sin embargo, en este trabajo se utilizó un método comercial, debido a que éstos proporcionan una mayor facilidad y rapidez para la obtención de distintas proteínas recombinantes.¹³¹

La resina añadida a la columna de afinidad utilizada presenta cationes divalentes de Ni^{2+} , que permitieron la unión de la etiqueta de histidinas fusionada a la proteína recombinante TvTRPV. Las proteínas no unidas fueron eluidas mediante procedimientos de lavado y la proteína TvTRPV fue obtenida en una última elución.¹³¹

Estos resultados mostraron la eficacia de la columna cargada con níquel utilizada en este trabajo para la obtención de la proteína recombinante TvTRPV de *T.*

vaginalis, constituyendo dicha proteína una herramienta importante para evaluar su potencial inmunogénico frente a un modelo murino.

7.7 Respuesta inmune humoral inducida por la proteína recombinante TvTRPV

Los resultados obtenidos de los niveles séricos de IgG mostrados de manera descriptiva, indicaron que los grupos experimentales inmunizados con la proteína recombinante TvTRPV a las 3 dosis evaluadas (50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) presentaron niveles elevados de anticuerpos IgG a los 15 días posteriores de la inmunización primaria, así como a los 15 días posteriores del primer y segundo refuerzo realizado con dicha proteína (15,30 y 45 días, respectivamente) (Figura 24).

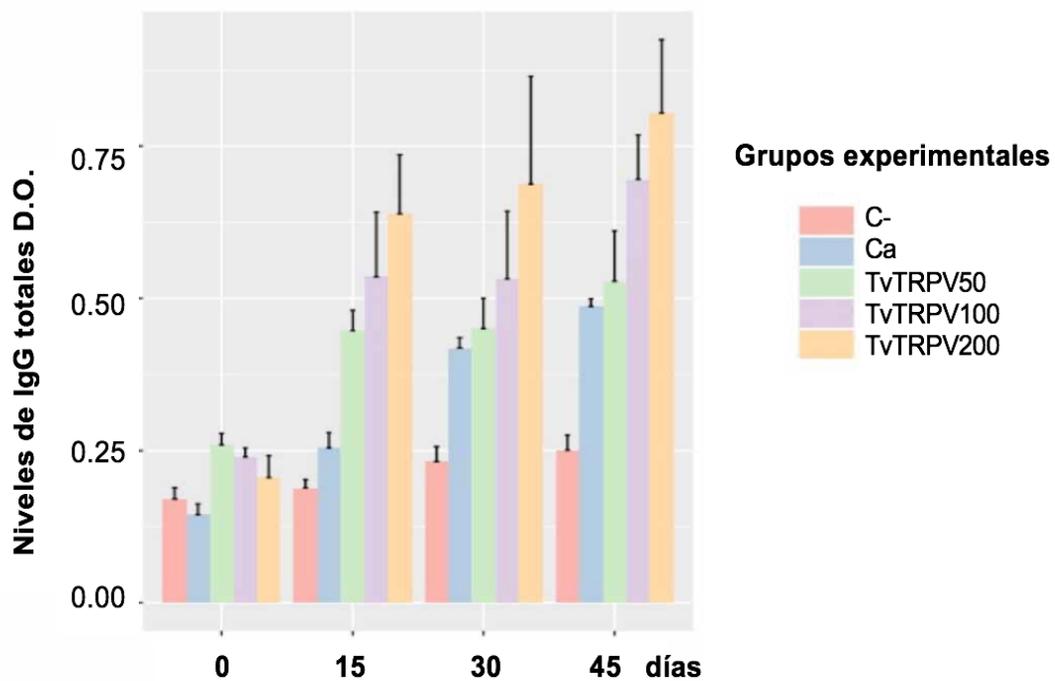


Figura 24. Niveles de anticuerpos IgG detectados en los distintos tiempos evaluados. Control negativo (C-), control adyuvante (Ca), dosis 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (TvTRPV50), dosis 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (TvTRPV100), dosis 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (TvTRV200).

Al realizar el análisis estadístico se observó que los datos analizados no presentaban igualdad de varianza, por lo que éstos fueron transformados a logaritmo. Con dichos valores se llevó a cabo el análisis de varianza de 2 vías, el cual mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los factores analizados (grupos experimentales y el tiempo), así como en las interacciones entre ellos. Por lo que se realizó un análisis de comparaciones múltiples usando el método de Tukey, el cual mostró que se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre el control negativo y el adyuvante incompleto de Freund ($p < 0.05$); el control negativo y las 3 dosis evaluadas de la proteína TvTRPV ($p < 0.05$); el adyuvante incompleto de Freund y las 3 dosis evaluadas de la proteína TvTRPV ($p < 0.05$), así como también se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los ratones inmunizados con 50 y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de la proteína TvTRPV ($p < 0.05$) (Figura 25).

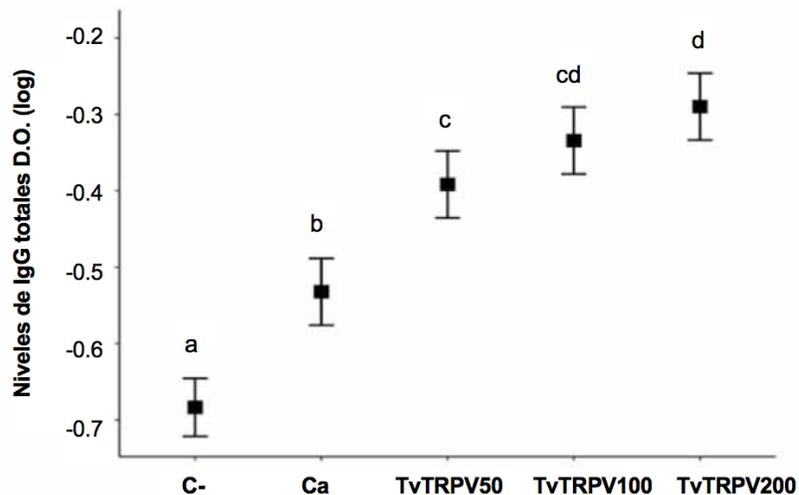


Figura 25. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG totales detectados en los distintos grupos experimentales. Los grupos experimentales que comparten la misma letra no presentan diferencia estadísticamente significativa (Tukey, $p < 0.05$).

El análisis de comparaciones múltiples usando el método de Tukey también

mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los niveles de anticuerpos IgG detectados entre todos los tiempos evaluados (Figura 26).

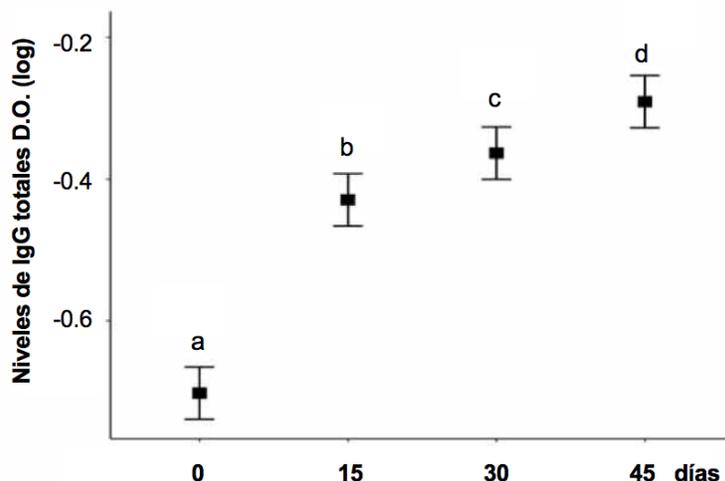


Figura 26. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG totales detectados en el tiempo. Los grupos experimentales que comparten la misma letra no presentan diferencia estadísticamente significativa (Tukey, $p < 0.05$).

En cuanto a la interacción entre los factores evaluados, el análisis de comparaciones múltiples mediante el método de Tukey mostró que los niveles de IgG detectados a los 15 días posteriores de la inmunización primaria en los grupos experimentales TvTRPV50, TvTRPV100, TvTRV200 y Ca presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto a los niveles de IgG detectados para cada grupo experimental en su estado basal (0 días). Como se puede observar, esta diferencia detectada en dichos grupos experimentales se debió tanto al efecto de la inmunización, así como al tiempo transcurrido (Figura 27).

También se puede observar que los grupos experimentales TvTRPV50, TvTRPV100, así como TvTRV200, evaluados a los 15 días posteriores de la inmunización primaria, mostraron niveles de IgG con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto al control adyuvante

(Figura 27).

En cuanto a los niveles de IgG detectados los 15 días posteriores del primer y segundo refuerzo (30 y 45 días, respectivamente) en los grupos experimentales TvTRPV50, TvTRPV100, TvTRV200, éstos mostraron un aumento gradual en la producción de anticuerpos IgG con el transcurso del tiempo. Sin embargo, dichos grupos experimentales no presentaron diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la producción de IgG entre los distintos tiempos evaluados (15, 30 y 45 d). También se puede observar que los 15 días posteriores del primer y segundo refuerzo, únicamente el grupo TvTRV200 mostró una diferencia ($p < 0.05$) en los niveles de IgG detectados, con respecto al control adyuvante en ambos tiempos evaluados. Esta diferencia detectada se debió únicamente al efecto de la inmunización (Figura 27).

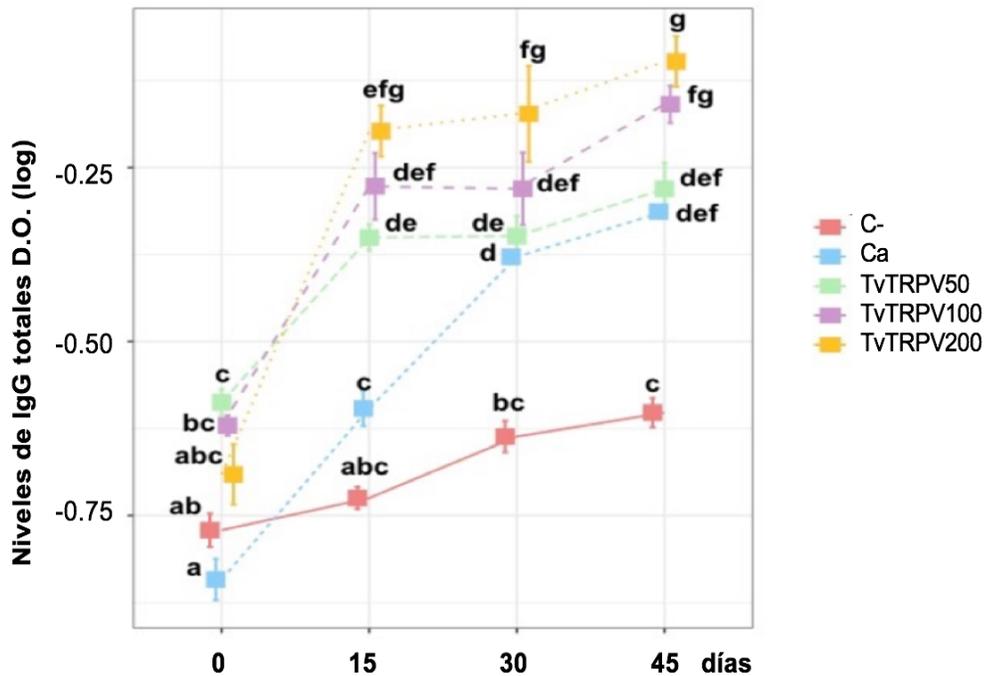


Figura 27. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG detectados en los distintos grupos experimentales, a los diferentes tiempos evaluados.

Los resultados obtenidos permitieron identificar que los niveles de anticuerpos IgG detectados fueron específicos para la proteína recombinante TvTRPV, ya que, aunque se administró en conjunto con el adyuvante incompleto de Freund, dicho grupo experimental mostró niveles inferiores de esta inmunoglobulina, confirmando que la respuesta inmune desencadenada fue resultado de la exposición a la proteína TvTRPV. Esta especificidad se debe a que cada linfocito expresa receptores de membrana que son capaces de distinguir estructuras mínimas entre los distintos antígenos.¹³²

También se demostró que la exposición del sistema inmunológico a la proteína TvTRPV aumentó su capacidad de respuesta ante un nuevo contacto frente a dicha proteína. Las respuestas secundarias resultaron más rápidas, ya que como se mostró en los resultados obtenidos, éstas no fueron dependientes del tiempo transcurrido y resultaron más intensas en comparación con la respuesta inmune primaria a dicho antígeno. Esta memoria inmunológica se debió a que con cada exposición a la proteína TvTRPV, el clon de linfocitos específicos para esta proteína se expandió.¹³² Además, la estimulación de los linfocitos “vírgenes” por este la proteína TvTRPV generó células de memoria de vida prolongada.

Por otro lado, entre las características de vital importancia involucradas para la evaluación de la inmunogenicidad se encuentran la cantidad del inmunógeno que interacciona con el organismo y la frecuencia de exposición.¹⁰⁰ En este trabajo, se evaluaron las distintas dosis empleadas de la proteína TvTRPV, para identificar la dosis ideal de esta proteína capaz de inducir una respuesta humoral, ya que muchas veces dosis pequeñas o muy elevadas pueden inducir respuestas alteradas o presentar tolerancia inmunológica, es decir incapacidad del sistema inmune para reaccionar frente a un antígeno específico.¹³² En cuanto a la frecuencia de exposición, se ha reportado que existe mayor efectividad en la administración de un inmunógeno a diferentes intervalos de tiempo,¹⁰⁰ hecho que también se demostró en este trabajo, ya que las distintas exposiciones frente a la proteína TvTRPV mostraron la adquisición y el incremento posterior de la

memoria inmunológica, como se describió previamente. Sin embargo, es importante considerar que un mayor número de inmunizaciones no necesariamente se traduce en un aumento en la producción de anticuerpos, ya que una de las características de la respuesta inmune adaptativa es la autolimitación.^{100,132}

De acuerdo a todo lo anterior descrito, se logró identificar que la respuesta inmune humoral desencadenada frente a la proteína TvTRPV fue dependiente de la dosis, siendo la de 200 µg/kg la ideal para inducir niveles elevados de anticuerpos IgG, así como también fue necesaria la administración de dicha proteína a distintos intervalos de tiempo, para lograr un efecto potencializado y sostenido de dicha respuesta inmunológica.

VIII. DISCUSIONES

Uno de los aspectos más importantes de la tricomonosis es el hecho de que se ha demostrado que tanto en humanos como en modelos de animales de experimentación no existe una protección en contra de la reinfección. Siendo las infecciones repetidas o las no tratadas causantes de complicaciones graves en mujeres y hombres.¹³³ Por lo que una vacuna sería ideal para prevenirla, sin embargo, hasta la fecha el trabajo sobre el desarrollo de vacunas contra *T. vaginalis* se ha centrado principalmente en la detección de inmunógenos potenciales, capaces de estimular el sistema inmune produciendo una respuesta protectora frente a un encuentro posterior.⁶¹

En los últimos años la vacunología inversa ha mejorado considerablemente la identificación de candidatos a vacunas, mediante el remplazo de algunas tareas experimentales usando métodos de predicción *in silico*, como la identificación de posibles epítopes T y B, predicción de la antigenicidad, de la localización subcelular, identificación de hélices transmembrana, predicción de su función, realización de alineamientos múltiples, entre otros. Además, es una herramienta de fácil acceso, eficiente en tiempo y costos.⁷³ Debido a las ventajas que ofrece la vacunología inversa, se decidió utilizar dicha estrategia en este trabajo, además de que hasta la fecha no existen reportes de su aplicación para la identificación proteínas con potencial antigénico presentes en el genoma de *T. vaginalis*.

Tomando en consideración que un antígeno no tiene que ser exclusivamente un factor de virulencia,⁸⁷ en este trabajo nos centramos en proteínas cruciales para la supervivencia de *T. vaginalis*, entre la que se encuentran los transportadores de Ca^{2+} tipo TRP. El ion Ca^{2+} está relacionado en la supervivencia, crecimiento y colonización del parásito, además se ha descrito que distintos transportadores son considerados como inmunógenos. Este hecho convierte a los transportadores de Ca^{2+} tipo TRP como un blanco importante de atención debido

a su papel en el metabolismo celular y su uso potencial con orientación a nuevas terapéuticas.^{37,57,58,62, 65}

En este sentido, mediante los distintos análisis *in silico* realizados en este trabajo se identificó al transportador TvTRPV como el de mayor potencial inmunogénico. Continuando con los procedimientos realizados por la vacunología inversa, dicho transportador fue clonado exitosamente y en la orientación correcta. En cuanto a su sobreexpresión en el sistema heterólogo *E. coli*, ésta resultó en la correspondiente proteína recombinante TvTRPV de ~27.4 kDa, siendo fundamental la obtención de proteínas recombinantes para la realización de estudios funcionales, estructurales e inmunológicos. En este trabajo, la obtención de dicha proteína recombinante nos permitió dirigir la respuesta inmunológica contra la misma, con el objetivo de evaluar la respuesta inmune humoral desencadenada. La importancia del análisis de la respuesta humoral mediante la detección de títulos de anticuerpos frente a proteínas específicas radica en que éstas pueden correlacionarse fuertemente con el grado de protección.⁸⁸

Otro parámetro utilizado para la evaluación protectora de proteínas con potencial inmunogénico es la tasa de supervivencia de animales inmunizados con la proteína en cuestión, después de ser infectados con el patógeno. Sin embargo, en este trabajo no se realizó la infección con *T. vaginalis*, únicamente nos limitamos a la evaluación de la producción de anticuerpos IgG totales e inducidos frente a la proteína recombinante TvTRPV, ya que si bien, previamente se ha reportado la utilización de la cavidad vagina y la peritoneal de modelos murinos, como sitios para llevar a cabo la infección de *T. vaginalis*, éstos no son ideales para reproducir la infección, como ocurre en condiciones naturales en los humanos.^{61,133,134}

Entre las respuestas inmunológicas frente a *T. vaginalis*, se ha reportado la presencia de inmunoglobulinas durante la infección y gracias a estudios experimentales realizados en ratones infectados con aislados de *T. vaginalis*,

obtenidos de pacientes sintomáticos y asintomáticos, se ha demostrado la presencia de anticuerpos IgG, IgM e IgA en suero y secreciones vaginales. También se han detectado niveles mayores de IgG1 e IgM en el suero y secreciones vaginales, en respuesta a la infección provocada por aislados del parásito provenientes de pacientes sintomáticos.^{135,136}

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que, a los 15 días posteriores a la inmunización primaria, los grupos inmunizados con la proteína TvTRPV presentaron niveles de IgG significativamente más elevados al compararlos contra sus correspondientes niveles de IgG en los sueros preinmunes. Por lo que podemos observar que la proteína TvTRPV a distintas dosis indujo la activación de linfocitos B vírgenes y la expansión clonal de linfocitos específicos.¹³²

Además, con esta inmunización primaria también se esperaba la generación de células plasmáticas (células B efectoras) y células de memoria, por lo que se evaluaron los sueros de los distintos grupos experimentales a los 15 días posteriores al primer y segundo refuerzo, comprobando que con cada exposición con la proteína TvTRPV, el clon de linfocitos específico para esta proteína se expandió, reflejándose como niveles más elevados de anticuerpos, que pasaron de ser mediados prioritariamente por IgM a ser de la clase IgG.¹³²

Por otro lado, también se detectó que los niveles de IgG significativamente más elevados se encontraron en el suero de ratones inmunizados con 200 µg/kg de la proteína TvTRPV, en todos los tiempos evaluados. De manera relativa, las dosis baja e intermedia (50 y 100 µg/kg, respectivamente) también estimularon la producción de anticuerpos IgG, incluso en niveles más elevados que los grupos negativo y el control adyuvante, hecho que concuerda con estudios previos, como el realizado por Abraham y cols, así como Jeffrey y cols, quienes utilizaron células completas de *T. vaginalis* emulsionadas con distintos adyuvantes (como posibles candidatos a vacuna) y evaluaron la respuesta inmunológica antes y después de la infección con el parásito. En primera instancia, Abraham y cols. al igual que en

este trabajo, también demostraron niveles de anticuerpos IgG más elevados en los ratones inmunizados con altas dosis de células completas de *T. vaginalis*, en comparación de los inmunizados con bajas dosis. Por su parte, Jeffrey y cols. también reportaron niveles de IgG e IgG1 significativamente más elevados ($p < 0.05$), comparados con los ratones sin inmunizar y los inmunizados únicamente con adyuvante.^{137,138}

De acuerdo a lo anterior, se puede observar que existe una posible relación entre dosis y niveles de anticuerpos IgG producidos, que si bien, en humanos la protección mediada por estas inmunoglobulinas no se ha detectado, debido a la presencia de infecciones recurrentes, esta respuesta humoral alcanzada y detectada después de una inmunización/vacunación podría ser eficaz en la protección, debido a una posible diferencia en la forma de la presentación del antígeno. Por ejemplo, a diferencia de la infección causada por el parásito en condiciones naturales, una inmunización activa artificial (como la realizada en este trabajo), permite que el antígeno, en este caso la proteína TRPV, sea captada por un mayor número de células dendríticas y macrófagos, debido a su localización persistente en la epidermis y en tejidos circundantes. Además, de otro factor importante, es el hecho de que en la inmunización activa artificial, los linfocitos B de memoria sintetizan anticuerpos que se unen al antígeno con una afinidad mayor, que la de las células B que no han sido previamente estimuladas, y los linfocitos T de memoria presentan una mayor capacidad para llegar a los focos de infección que las células T vírgenes.^{139,140}

También es importante mencionar que este tipo de inmunización favorece el sostenimiento expandido de anticuerpos séricos, debido al uso de un adyuvante. En este caso, gracias al adyuvante incompleto de Freund, la proteína TvTRPV se mantuvo de manera continua en la zona de entrada, liberándose de manera retardada, favoreciendo así su constante reconocimiento por parte de las células dendríticas, de modo que la estimulación antigénica perduró más allá del momento de la inmunización.¹⁴¹

Todo lo anterior, nos sugiere que existe la posibilidad de encontrar próximas terapéuticas en contra de *T. vaginalis*, ya que, aunque la proteína recombinante TvTRPV hasta el momento mostró resultados prometedores demostrando un posible potencial inmunogénico, es importante también tomar en cuenta que además de la respuesta humoral observada en este trabajo, la respuesta inmune celular es también un parámetro importante para evaluar el potencial inmunogénico de una molécula, por lo que se necesitan realizar más investigaciones para comprender el posible rol de la proteína TvTRPV, la cual podría tener aplicaciones en métodos de diagnóstico o terapéuticos contra la tricomonosis.

IX. CONCLUSIONES

- La estrategia de vacunología inversa permitió la selección de un transportador de Ca^{2+} tipo TRP presente en *T. vaginalis* y la evaluación de su potencial inmunogénico.
- El transportador recombinante de Ca^{2+} TvTRPV de *T. vaginalis* induce una respuesta inmune humoral específica, aumentando su capacidad de respuesta ante un nuevo contacto, a partir de la activación de células de memoria.

X. RECOMENDACIONES

Determinar los isotipos de anticuerpos IgG (IgG1 e IgG2) presentes en sueros de ratones inmunizados con la proteína recombinante TvTRPV de *T. vaginalis*, para caracterizar la respuesta inmune humoral inducida, por medio de la técnica de ELISA.

Determinar las subpoblaciones de linfocitos T productores de IFN y los niveles de citocinas (que participan en la respuesta inmune frente a *T. vaginalis*) inducidos por la proteína recombinante TvTRPV, por medio de citometría de flujo y la técnica de ELISA, respectivamente.

Evaluación del efecto protector de la proteína recombinante TvTRPV como candidato a vacuna en contra de la infección causada por *T. vaginalis*, mediante una inmunización primaria y aplicación de refuerzos con dicha proteína, seguido de la infección con trofozoítos de *T. vaginalis*.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Santos I. Tricomoniasis: una visión amplia. IATREIA. 2013 Jul; 27(2): 198-205.
2. Adegbaju, A & Morenikeji OA. Cytoadherence and pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. Sci Res Essay. (2008); 3(4):132–138.
3. Honigberg BM, Volkmann D, Entzeroth R, Scholtyseck. A freeze-fracture electron microscope study of *Trichomonas vaginalis* Donne and *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller). J Protozool 1984; 31:116-31.
4. Arroyo R, González-Robles A, Martínez-Palomo A, Alderete JF. Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. Mol Microbiol. 1993 Jan; 7(2):299-309.
5. Heath JP. Behaviour and pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* in epithelial cell cultures: a study by light and scanning electron microscopy. Br J Vener Dis. 1981 Apr; 57(2):106-17.
6. Bourg R. Studies on the morphology of *Trichomonas vaginalis* Donne. Bull Acad R Med Belg. 1957 Jan; 22(6-7): 346–60.
7. Costamagna SR, Prado Figueroa M. On the ultrastructure of *Trichomonas vaginalis*: cytoskeleton, endocytosis and hydrogenosomes. Parasitol. 2002 Jul; 25(3-4): 100–108.
8. Montoya HH. Microbiología básica para el área de la salud y afines. Antioquia (Colombia): Universidad de Antioquia; 2008.
9. World Health Organization. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections: 2008. Geneva: WHO; 2012.
10. Información Epidemiológica de Morbilidad. Dirección General de Epidemiología. [En línea] 2017. [Consultado 10 Septiembre 2017]. Disponible en

URL:<http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/infoepid/publicaciones2012.html>.

11. Van Der Pol, B. *Trichomonas vaginalis* infection: The most prevalent nonviral sexually transmitted infection receives the least public health attention. *Clin Infect Dis*. 2007 Jan; 44(1) :23-5.

12. Miller WC, Swygard H, Hobbs MM, Ford CA, Handcock MS, Morris M, et al. The prevalence of trichomoniasis in young adults in the United States. *Sex Transm Dis*. 2005 Oct; 32(10):593-8.

13. Soper, D. Trichomoniasis: Under control or undercontrolled? *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Jan; 190(1): 281-90.

14. Dragsted D, Farholt S, Lind I. Occurrence of trichomoniasis in women. *Sex Trans Dis*. 2001; 28: 326-9.

15. Cadena V. D, Miranda N, Calderón N. Tricomoniasis urogenital. *Rev Pacea Med Fam*. 2006; 3(4): 84–9.

16. Schwebke JR & Burgess D. Trichomoniasis. *Clin Microbiol Rev*. 2004 Oct; 17(4): 794–803.

17. Coleman JS, Gaydos CA, Witter F. *Trichomonas vaginalis* vaginitis in obstetrics and gynecology practice: new concepts and controversies. *Obstet Gynecol Surv*. 2013 Jan; 68(1): 43–50.

18. Trintis J, Epie N, Boss R, Riedel S. Neonatal *Trichomonas vaginalis* infection: a case report and review of literature. *Int J STD AIDS*. 2010 Aug; 21(8): 606–7.

19. Mavedzenge SN, Pol BV, Cheng H, Montgomery ET, Blanchard K, de Bruyn G, et al. Epidemiological synergy of *Trichomonas vaginalis* and HIV in Zimbabwean and South African women. *Sex Transm Dis*. 2010 Jul; 37(7): 460–6.

20. Ozdemir E, Kelestemur N, Kaplan M. *Trichomonas vaginalis* as a rare cause of male factor infertility at a hospital in East Anatolia. *Andrología*. 2011 Aug; 43(4):283–5.
21. Ibáñez A, Gómez A. *Trichomonas vaginalis*: The versatility of a tenacious parasite. *An Real Acad Farm*. 2017; 83 (1): 10-47.
22. Lee HY, Hyung S, Lee JW, Kim J, Shin MH, Ryu JS, et al. Identification of antigenic proteins in *Trichomonas vaginalis*. *Korean J Parasitol*. 2011 Mar; 49(1): 79–83.
23. Arroyo R, Hernández R, Ramón L, Rendón FJ, Cárdenas RE, Ortega J, et al. Tricomoniasis: de la biología a la patogenia molecular. *Av y Perspect*. 2011;3(2).
24. Fiori PL, Rappelli P, Addis MF, Sechi A, Cappuccinelli P. *Trichomonas vaginalis* haemolysis: pH regulates a contact-independent mechanism based on pore-forming proteins. *Microb Pathog*. 1996 Feb; 20(2):109–18.
25. Hernández-Álvarez HM. Evaluación de la inmunogenicidad y la capacidad protectora de la proteinasa 62 kDa de *Trichomona vaginalis* en la trichomoniasis experimental en ratones. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias de la Salud. Departamento de Parasitología. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. Ciudad de la Habana. Cuba. 2008.
26. Ford LC, Hammill HA, DeLange RJ, Bruckner DA, Suzuki-Chavez F, Mickus KL, et al. Determination of estrogen and androgen receptors in *Trichomonas vaginalis* and the effects of antihormones. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156 (5): 1119- 21.
27. Eschenbach DA, Thwin SS, Patton DL, Hooton TM, Stapleton AE, Agnew K, et al. Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 901-7.

28. Crouch ML, Benchimol M, Alderete JF. Binding of fibronectin by *Trichomonas vaginalis* is influenced by iron and calcium. *Microb Pathogenesis* 2001; 31: 131-44.
29. Figueroa EE, Rendón FJ, Puente J, Calla JS, Cárdenas RE, Ortega J, et al. The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect* 2012; 14(15): 1411-27.
30. Zaichick VY, Sviridova TV, Zaichick SV. Zinc in the human prostate gland: normal, hyperplastic and cancerous. *J Urol Nephrol* 1997; 29: 565-74.
31. Krieger JN & Rein MF. Zinc sensitivity of *Trichomonas vaginalis* : *In vitro* studies and clinical implications. *J Infect Dis* 1982; 146: 341-5.
32. Harp DF & Chowdhury I. Trichomoniasis: evaluation to execution. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011 Jul;157(1):3-9.
33. Crouch ML, Benchimol M, Alderete JF. Binding of fibronectin by *Trichomonas vaginalis* influenced by iron and calcium. *Microb Pathog.* 2001 Sep; 31(3): 131.
34. Lin Z, Fernández JA, Cellier M, Vasta GR. Metals and membrane metal transporters in biological systems: the role (s) of Nramp in host-parasite interactions. *J Argent Chem Soc.* 2009; 87(1): 210-225.
35. Moreno S & Docampo R. Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr opin microbiol.* 2003; 6: 359-364.
36. Nilius B & Szallasi A. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol Rev.* 2014 Jul; 66(3):676-814.
37. Prole DL & Taylor CW. Identification of intracellular and plasma membrane calcium channel homologues in pathogenic parasites. *PLoSone.* 2011 Oct; 6(10): 1-16.

38. Gees M, Colsool B, Nilius B. The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Oct; 2(10): 1-31.
39. Wang Y. *Transient Receptor Potential Canonical Channels and Brain Diseases.* Netherlands: Springer; 2017.
40. Gaudet R. TRP channels entering the structural era. *J Physiol.* 2008 Aug; 2(10): 3565–3575.
41. Wu LJ, Sweet TB, and Clapham DE. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol Rev.* 2010 Sep; 62(3): 381-404.
42. Dong XP, Wang X, and Xu H. TRP channels of intracellular membranes. *J. Neurochem.* 2010 Jan; 113: 313–328.
43. Szallasi A & Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev.* 1999 Jun; 51(2):159-212.
44. Nilius B & Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol.* 2011 Mar; 12(3): 218.
44. Chung MK, Güler AD, Caterina MJ. TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. *Nat Neurosci.* 2008 May; 11(5):555-64.
46. Martínez MC, Martínez T, Pañeda C, Gallego P, Jimenez AL. Differential expression and localization of transient receptor potential vanilloid in rabbit and human eyes. *Histol Histopathol.* 2013 Nov; 28 (11): 1507-1516.
47. Feng X, Xiong J, Lu Y, Xia X, Zhu MX. Differential mechanisms of action of the mucolipin synthetic agonist, ML-SA1, on insect TRPML and mammalian TRPML1. *Cell Calcium.* 2014 Dec; 56(6): 446-56.
48. Saito S, Fukuta N, Shingai R, Makoto T. Evolution of vertebrate transient

receptor potential vanilloid 3 channels: Opposite Temperature Sensitivity between Mammals and Western Clawed Frogs. PLoS Genet. 2011 Apr; 7(4): e100204.

49. Majhi RK, Kumar A, Yadav M, Swain N, Kumari S, Saha A, et al. Thermosensitive ion channel TRPV1 is endogenously expressed in the sperm of a fresh water teleost fish (*Labeorohita*) and regulates sperm motility. Channels. 2013 Dec; 7(6):483-92.

50. Arias-Darraz. Canales iónicos TRP en el alga unicellular *Chlamydomonas reinhardtii*. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 2011.

51. Chu B, Postma M, Hardie RC. Fractional Ca(2+) currents through TRP and TRPL channels in Drosophila photoreceptors. Biophys J. 2013 May; 104(9):1905-16.

52. Bais A, Greenberg RM. TRP channels in schistosomes. Int J Parasitol Drug Resist. 2016 Dec; 6 (3): 335-342.

53. Ackers J.P. Immunologic Aspects of Human Trichomoniasis. In: Honigberg B.M. Trichomonads Parasitic in Humans. New York (NY): Springer; 1990. P36-52.

54. Niccolai LM, Kopicko JJ, Kassie A, Petros H, Clark RA, Kissinger P. Incidence and predictors of reinfection with *Trichomonas vaginalis* in HIV-infected women. Sex Transm Dis. 2000 May; 27(5): 284-8.

55. Scott K, Manunta M, Germain C, Smith P, Jones M, Mitchell P, et al. Immunology. 2005 Oct; 116(2): 245-54.

56. Malla N & Yadav M, Gupta I. Kinetics of serum and local cytokine profile in experimental intravaginal trichomoniasis induced with *Trichomonas vaginalis* isolates from symptomatic and asymptomatic women. Parasite Immunol. 2007

Feb; 29 (2): 101-5.

57. Shaker MJ & Hussein RA. Immunological study of women infected with *Trichomonas vaginalis* parasite in Baghdad city. IJSR.2012 Sep; 3(9): 1145-1148.

58. Burgess DE. Trichomonads and intestinal flagellates. New York (NY): University Press; 1998.

59. Honigberg B & Burgess DE. Trichomonads of importance in human medicine including *Dientamoeba fragilis*. New York (NY): Academic Press; 1994.

60. Smith JD & Garber GE. *Trichomonas vaginalis* infection induces vaginal CD4+ T-cell infiltration in a mouse model: a vaccine strategy to reduce vaginal infection and HIV transmission. J Infect Dis. 2015 Jul; 212(2): 285-93.

61. Yi X, Jiang G, Ya W, Petrus T, Geoff H, De L, et al. Recombinant α -actinin subunit antigens of *Trichomonas vaginalis* as potential vaccine candidates in protecting against trichomoniasis. Parasit Vectors. 2017 Feb; 10: 83.

62. Häse CC, Fedorova ND, Galperin MY, Dibrov PA. Sodium ion cycle in bacterial pathogens: evidence from cross-genome comparisons. Microbiol Mol Biol Rev. 2001 Sep; 65(3): 353–370.

63. Garmory HS, Titball RW. ATP-binding cassette transporters are targets for the development of antibacterial vaccines and therapies. Infect Immun. 2004 Dec; 72(12): 6757-63.

64. Jomaa M, Yuste J, Paton JC, Jones C, Dougan G, Brown JS. Antibodies to the iron uptake ABC transporter lipoproteins PiaA and PiuA promote opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 2005 Oct; 73(10): 6852-9.

65. Wilkinson T.C.I, Gardener M, Williams WA. Discovery of functional antibodies targeting ion channels. J Biomol Screen. 2015 Apr; 20(4):454-67.

66. Han H & Yi F. New insights into TRP channels. *Channels*. 2014 Jan; 8(1):13-19.
67. Bodó E, Biró T, Telek A, Czifra G, Griger Z, Tóth BI, et al. A hot new twist to hair biology: involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control. *Am J Pathol*. 2005; 166(4): 985-998.
68. Tóth BI, Dobrosi N, Dajnoki A, Czifra G, Oláh A, Szöllosi AG, et al. Endocannabinoids modulate human epidermal keratinocyte proliferation and survival via the sequential engagement of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential Vanilloid-1. *J Invest Dermatol*. 2011 May; 131(5): 1095–1104.
69. Moran MM, McAlexander MA, Biró T, Szallasi A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 Aug; 10(8): 601-20.
70. Hamanaka K, Jian MY, Townsley MI, King JA, Liedtke W, Weber DS, et al. TRPV4 channels augment macrophage activation and ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010 Sep; 299(3): L353–L362.
71. Madiha Derouazi, Yan Wang, Raphaël Marlu, Olivier Epaulard, Jean-François Mayol, Nicolas Pasqual, et al. Optimal epitope composition after antigen screening using a live bacterial delivery vector Application to TRP-2. *Bioeng Bugs*. 2010 Jan-Feb; 1(1): 51-60.
72. Rappuoli R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine*. 2001 Mar; 19(17-19): 2688-91.
73. Ferreira J & Porco A. Vacunas derivadas del análisis de los genomas: vacunología inversa. *INTERCIENCIA*. 2008 May; 33 (5): 353-358.
74. Chakravarti DN, Fiske MJ, Fletcher LD, Zagursky RJ. Application of genomics and proteomics for identification of bacterial gene products as potential vaccine candidates. *Vaccine*. 2000 Nov; 19(6): 601-612.

75. Mora M, Veggi D, Santini L, Pizza M, Rappuoli R. Reverse vaccinology. *Drug Disc Today*. 2003 May; 8(10): 459- 464.
76. Brusic V & Flower D. Bioinformatics tools for identifying T-cell epitopes. *Drug Disc. Biosilico*. 2004 Jan; 2(1): 18-23.
77. Mora M, Donati C, Medini D, Covacci A, Rappuoli R. Microbial genomes and vaccine design: refinements to the classical reverse vaccinology approach. *Curr. Opin. Microbiol*. 2006; 9: 532-536.
78. De Groot AS, Jesdale B, Martin W, Saint Aubin C, Sbai H, Bosma A, et al. Mapping cross-clade HIV-1 vaccine epitopes using a bioinformatics approach. *Vaccine*. 2003 Oct; 21(27-30): 4486- 4504.
79. Capo S, Nuti S, Scarselli M, Tavarini S, Montigiani S, Mori E. *Chlamydia pneumoniae* genome sequence analysis and identification of HLA-A2-restricted CD8+ T cell epitopes recognized by infection primed T cells. *Vaccine*. 2007 Apr; 25(17): 3516.
80. Pizza M, Scarlato V, Masignani V, Giuliani MM, Aricò B, Comanducci M, et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*. 2000 Mar; 287(5459): 1816–1820.
81. Giuliani MM¹, Adu-Bobie J, Comanducci M, Aricò B, Savino S, Santini L, et al. A universal vaccine for serogroup B meningococcus. *Proc Natl Acad Sci*. 2006 Jul; 103(29):10834-9.
82. Capecchi B, Adu-Bobie J, Di Marcello F, Ciocchi L, Masignani V, Taddei A, et al. *Neisseria meningitidis* NadA is a new invasin which promotes bacterial adhesion to and penetration into human epithelial cells. 2005 Feb; 55(3): 687-98.
83. Madico G, Welsch JA, Lewis LA, McNaughton A, Perlman DH, Costello CE, et al. The meningococcal vaccine candidate GNA1870 binds the complement

regulatory protein factor H and enhances serum resistance. *J Immunol.* 2006 Jul; 177(1): 501–510.

84. Schneider MC, Exley RM, Chan H, Feavers I, Kang YH, Sim RB, et al. Functional significance of factor H binding to *Neisseria meningitidis*. *J Immunol.* 2006 Jun; 176(12): 7566-75.

85. Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GS, Mongodin EF, Fricke WF, Gajer P, et al. The pangenome structure of *Escherichia coli*: Comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. 2008 Jul; 190(20): 6881 – 6893.

86. Moriel DG, Bertoldi I, Spagnuolo A, Marchi S, Rosini R, Nesta B, et al. Identification of protective and broadly conserved vaccine antigens from the genome of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci.* 2010 May; 107(20): 9072 – 9077.

87. Delany I, Rappuoli R, Seib KL. Vaccines, Reverse Vaccinology, and Bacterial Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 May; 3(5): a012476.

88. Burbelo PD, Ching KH, Bush ER, Han BL, Iadarola MJ. Antibody-profiling technologies for studying humoral responses to infectious agents. *Expert Rev Vaccines.* 2010 Jun; 9(6): 567-78.

89. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2016. Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>.

90. H. Wickham. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York, 2009.

91. Sarkar, Deepayan. *Lattice: Multivariate Data Visualization with R*. Springer, New York. 2008. ISBN 978-0-387-75968-5.

92. The Split-Apply-Combine Strategy for Data Analysis. *Journal of Statistical*

Software [En línea] 2011 [Consultado 5 Septiembre 2017]. Disponible en URL: <http://www.jstatsoft.org/v40/i01/>.

93. Rmisc: Ryan Miscellaneous. R package version 1.5. [En línea] 2013 [Consultado 5 Septiembre 2017]. Disponible en URL: <https://CRAN.R-project.org/package=Rmisc>.

94. FSA: Fisheries Stock Analysis. R package version 0.8.14. [En línea] 2017 [Consultado 5 Septiembre 2017]. Disponible en URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/FSA/index.html>.

95. John Fox and Sanford Weisberg. An {R} Companion to Applied Regression, Second Edition. Thousand Oaks CA: Sage. 2011.

96. Rcompanion: Functions to Support Extension Education Program Evaluation. R package version 1.5.6. [En línea] 2017 [Consultado 5 Septiembre 2017]. Disponible en URL: <ftp://centos.ustc.edu.cn/CRAN/web/packages/rcompanion/index.html>.

97. MultcompView: Visualizations of Paired Comparisons. R package version 0.1-7. [En línea] 2015 [Consultado 5 Septiembre 2017]. Disponible en URL: <https://CRAN.R-project.org/package=multcompView>.

98. Estimability: Tools for Assessing Estimability of Linear Predictions. R package version 1.2. [En línea] 2016 [Consultado 5 Septiembre 2017]. Disponible en URL: <https://CRAN.R-project.org/package=estimability>.

99. Lenth. Least-Squares Means: The R Package lsmeans. [En línea] 2016 [Consultado 5 Septiembre 2017]. Disponible en URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/lsmeans/index.html>.

100. Vega GB. Antígenos e inmunógenos. Rev Fac Med UNAM. 2009 Feb; 52(1): 41-42.

101. Doytchinova IA, Flores DR. VaxiJen: un servidor para la predicción de protección de los antígenos, antígenos tumorales y vacunas de subunidades. *BMC Bioinformatics*, 2007; 8: 4-4.
102. Getzoff ED, Tainer JA, Lerner RA, Geysen HM. The chemistry and mechanism of antibody binding to protein antigens. *Adv in Immunology*. 1998; 43: 1-98.
103. Haynes BF¹, Fleming J, St Clair EW, Katinger H, Stiegler G, Kunert R, et al. Cardiophilin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science* 2005 Jun; 308:1906–8.
104. Mugenyi CK, Elliott SR, McCallum FJ, Anders RF, Marsh K, Beeson JG. Antibodies to polymorphic invasion-inhibitory and non-inhibitory epitopes of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 in human malaria. *PLoS ONE*. 2013 Jul; 8(7): e68304
105. Frosi G, Biolchi A, Sapio ML, Rigat F, Gilchrist S, Lucidarme J, et al. Bactericidal antibody against a representative epidemiological meningococcal serogroup B panel confirms that MATS underestimates 4CMenB vaccine strain coverage. *Vaccine*. 2013 Oct; 31(43):4968–74.
106. Sharon J, Rynkiewicz MJ, Lu Z, Yang CY. Discovery of protective B-cell epitopes for development of antimicrobial vaccines and antibody therapeutics. *Immunology*. 2014 May; 142(1): 1-23.
107. Kumar M, Gromiha MM, Raghava GP. Identification of DNA-binding proteins using support vector machines and evolutionary profiles. *BMC Bioinformatics*. 2007 Nov; 8:463.
108. Sette A & Peters B. Immune epitope mapping in the post-genomic era: lessons for vaccine development. *Curr Opin Immunol*. 2007; 19(1): 106–110.

109. Salit RB, Kast WM, Velders MP. Ins and outs of clinical trials with peptide-based vaccines. *Front Biosci.* 2002; 7: 204–213, 2002.
110. Jensen PE. Recent advances in antigen processing and presentation. *Nature Immunology.* 2007; 8(10): 1041–1048.
111. Trombetta ES & Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annual Review of Immunology.* 2005; 23: 975–1028.
112. Watts C & Powis S. Pathways of antigen processing and presentation. *Reviews in Immunogenetics.* 1999; 1(1): 60-74.
113. Van der Merwe PA & Davis SJ. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annual Review of Immunology.* 2003; 21: 659-684.
114. Bui HH, Sidney J, Dinh K, Southwood S, Newman MJ, Sette A. Predicting population coverage of T-cell epitope-based diagnostics and vaccines, *BMC Bioinformatics.* 2006 Mar; 7:153.
115. Pira GL, Ivaldi F, Moretti P, Manca F. High Throughput T Epitope Mapping and Vaccine Development. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2010; 1:12.
116. Rappuoli, R. Reverse vaccinology. *Curr. Opin. Microbiol.* 2000; 3: 445-450.
117. Bowman BN, McAdam PR, Vivona S, Zhang JX, Luong T, Belew RK, et al. Improving reverse vaccinology with a machine learning approach. *Vaccine.* 2011 Oct; 29 (45): 8156–8164.
118. Vivona S, Gardy JL, Ramachandran S, Brinkman FS, Raghava GP, Flower DR. Computer-aided biotechnology: from immunoinformatics to reverse vaccinology. *Trends Biotechnol.* 2008 Apr; 26(4): 190-200.
119. Matthias G. Introduction to molecular vaccinology. Heidelberg (Germany):

Springer; 2016.

120. Plitnick L, Herzyk D. Nonclinical Development of Novel Biologics, Biosimilars, Vaccines and Specialty Biologics. United States of America: Academic Press; 2013.

121. Lynch M, Ackerman MS, Gout JF, Long H, Sung W, Thomas WK. Genetic drift, selection and the evolution of the mutation rate. *Nat Rev Genet.* 2016 Oct; 17(11): 704-714.

122. Arab Z, Seyyed SJ, Mirahmadi H. Cloning of Dense Granular 7 (GRA7) Gene of *Toxoplasma gondii* into pTZ57RT Vectors. *Novel Biomed.* 2014;2(4):114-9.

123. Clark JM, Joyce CM, Beardsley GP. Novel blunt-end addition reactions catalyzed by DNA polymerase I of *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 1987 Nov;198(1): 123-7.

124. Dahiya N, Tewari R, Hoondal GS. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006; 171: 773-782.

125. Felse PA, Panda T. Regulation and cloning of microbial chitinase genes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1999; 51: 141–151.

126. Hamid R, Khan MA, Ahmad M, Ahmad MM, Abdin MZ, Musarrat J, et al. Chitinases: an update. *J Pharm Bioallied Sci.* 2013; 5:21–29.

127. Holmström C, James S, Neilan BA, White D, Kjelleberg S. *Pseudoalteromonas tunicata* sp. nov., a bacterium that produces antifouling agents. *Int J Syst Bacteriol.* 1998; 48: 1205-1212.

128. Torres JC. Análisis de las estructuras IRE y caracterización de una de las proteínas tipo IRP de *Trichomonas vaginalis*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Infectómica y Patogénesis Molecular. Departamento de

Infectómica y Patogénesis Molecular. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México. Agosto 2010.

129. Haeyoung J, Hyun JK, Sang JL. Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* Strain BL21. *Genome Announc.* 2015 Mar-Apr; 3(2): e00134-15.

130. Guoliang Q, Li-Chung M, Ahmad K, Tapas KM, Masanori M, Bing X, et al. Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. 2004; 22: 877-882.

131. Bornhorst JA & Falke JJ. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods Enzymol.* 2000; 326: 245-254.

132. Abbas A.K, Lichtman AH, Pober J.S. 5^o Ed. *Inmunología celular y molecular.* Sanunders-Elsevier; 2004.

133. Abraham MC, Desjardins M, Filion LG, Garber GE. Inducible immunity to *Trichomonas vaginalis* in a mouse model of vaginal infection. *Infect Immun.* 1996 Sept; 64(9): 3571–3575.

134. Riese P, Trittel S, Schulze K, Guzmána CA. Rodents as pre-clinical models for predicting vaccine performance in humans. *Expert Rev Vaccines.* 2015; 14: 1213–25.

135. Kaur S, Khurana S, Bagga R, Wanchu A, Malla N. Antitrichomonas IgG, IgM, IgA, and IgG subclass responses in human intravaginal trichomoniasis. *Parasitol Res.* 2008 Jul; 103(2):305-12.

136. Yadav M, Gupta I, Malla N. Kinetics of immunoglobulin G, M, A and IgG subclass responses in experimental intravaginal trichomoniasis: prominence of IgG1 response. *Parasite Immunol.* 2005 Dec; 27(12): 461-7.

137. Abraham MC, Desjardins M, Filion LG, Garber GE. Inducible immunity to *Trichomonas vaginalis* in a mouse model of vaginal infection. *Infect Immun.* 1996

Sept; 64(9): 3571–3575.

138. Jeffrey D. Smith, Gary E. Garber. *Trichomonas vaginalis* Infection Induces Vaginal CD4+ T-Cell Infiltration in a Mouse Model: A Vaccine Strategy to Reduce Vaginal Infection and HIV Transmission. *J Infect Dis.* 2015 Jul; 212(2): 285–293.

139. Delves PJ, Roitt IM. The immune system: first of two parts. *N Eng J Med* 2000; 343: 37- 49.

140. Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD. *Immunobiology: The immune system in health and disease.* Nueva York (NY): Garland Publishing; 1999.

141. López M, Fernández G, López H. de Francisco ALM. Antigenicidad de las proteínas recombinantes. *Gac Med Bilbao* 2004; 101: 17-21.