

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE TvICPr DE *TRICHOMONAS VAGINALIS* Y FUNCIÓN COMO INHIBIDOR DE CISTEÍNA PROTEINASAS (CPs).

Rossana Arroyo¹, Diana B Sánchez-Rodríguez¹, Gerardo Reséndiz-Cardiel², Jaime Ortega-López². ¹Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Ciudad de México, C.P. 07360. ²Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Ciudad de México, C.P. 07360. rarroyo@cinvestav.mx

Palabras clave: *Trichomonas vaginalis*, Proteína TvICPr, Cistatinas.

Introducción. *Trichomonas vaginalis* es el protista flagelado responsable de la tricomoniasis, una de las infecciones de transmisión sexual no viral más común a nivel mundial. Alrededor de 280 millones de nuevos casos de tricomoniasis se reportan cada año (1). En la secuencia del genoma de *T. vaginalis* se reportan ~440 genes que codifican para proteasas, de los cuales la mitad corresponden a cisteína proteinasas (CPs) de diversos clanes (2). Particularmente, *T. vaginalis* codifica para 48 CPs de tipo catepsina L que pertenece a la familia C1 del clan CA y para 10 CPs de tipo legumaina que pertenece a la familia C13 del clan CD. Además, tricomonas posee tres genes que codifican para inhibidores endógenos de CPs que pertenecen a la super familia de las cistatinas (Tricocistatinas; TC1-3) cuya función es controlar la actividad proteolítica excesiva del parásito. Las cistatinas son inhibidores reversibles de CPs, de bajo peso molecular que pueden tener péptido señal, estar glicosilados e inhibir CPs de tipo catepsina-L, aunque también pueden inhibir CPs de tipo legumaina o ambos tipos de CPs (3).

El objetivo de este trabajo fue la expresión de la proteína TC recombinante a partir de DNA genómico de tricomonas como una estrategia para probar su función como inhibidor de CPs.

Metodología. El gen *tvicp* se amplificó por PCR a partir de DNA genómico e iniciadores específicos. El amplicón se clonó en el vector de transición pGEMT-Easy, se secuenció, se subclonó en el vector de expresión pCold I, se expresó en *E. coli* por inducción con IPTG y se purificó por cromatografía de afinidad a níquel. La proteína recombinante TvICPr se utilizó para la producción de anticuerpos policlonales (para ensayos de WB e IFI) y para ensayos funcionales de inhibición enzimática de CPs de tipo catepsina-L de humano y las CPs presentes en un extracto de tricomonas, utilizando sustratos sintéticos fluorogénicos. La degradación del sustrato se detectó por espectrofluorometría (4).

Resultados. El inhibidor nativo se detectó por WB en la región de 30 y 18 kDa en lugar del tamaño esperado de 12 kDa, lo que sugiere que el inhibidor nativo se podría

encontrar glicosilado, ya que se le localiza en el aparato de Golgi, en vesículas y en la membrana plasmática. Lo cual es consistente con la predicción de la presencia de un péptido señal en el extremo NH2 terminal de TvICPr. La proteína recombinante TvICPr purificada mostró actividad inhibidora contra CPs del tipo catepsina-L, al reducir la actividad proteolítica de la catepsina-L de humano y CPs de tipo catepsina-L de tricomonas de manera concentración dependiente. La inhibición de las CPs de tricomonas redujo el efecto citotóxico del parásito a monocapas de células HeLa.

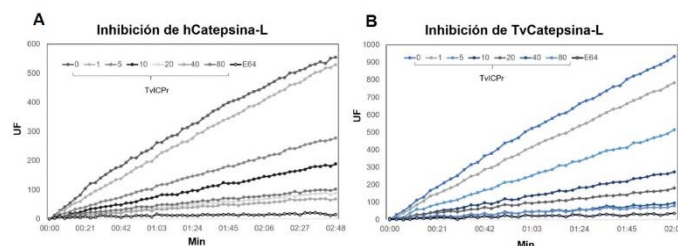


Fig. 1. Inhibición de la actividad proteolítica de catepsinas-L por el inhibidor TvICPr. (A) catepsina-L humana (B) catepsinas-L presentes en extractos de *T. vaginalis* en presencia de un sustrato fluorogénico específico para catepsinas-L y concentraciones crecientes (1-80 μ M) del inhibidor recombinante de tipo cistatina, TvICPr.

Conclusiones. Los datos muestran que TvICPr funciona como inhibidor de CPs de tipo catepsina-L de humano y de *T. vaginalis* lo que ayuda a regular la actividad proteolítica excesiva en el parásito y posiblemente afecte la del hospedero durante la infección.

Agradecimientos. Por el apoyo para la realización de este trabajo al CINVESTAV-IPN, al CONACYT donativo 162123 y 153093 (RA) donativo INFR-2016-269657 (JOL) y beca número 243457 (DBSR).

Bibliografía.

1. Poole, DN and McClelland, RS (2013) *Sex Trans Infect* **89**, 418-422.
2. Carlton J, et al., (2007) *Science*; 315(5809): 207-12
3. Turk V, et al., (2008). *Front. Biosci.* **13**, 5406-5420.
4. Sánchez-Rodríguez DB, et al., (2018). *J Biochem Cell Biol*, 102: 87-100.

