

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN DE LA CP65 DE *Trichomonas vaginalis* INVOLUCRADA EN LA CITOTOXICIDAD DEL PARÁSITO.

Eduardo Solano González¹, *Rossana Arroyo², Jaime Ortega López¹, ¹Departamento de Biotecnología y Bioingeniería y ²Departamento de Patología Experimental. CINVESTAV IPN. Av. IPN 2508, México D.F. C.P. 07360. Tel: 57473800 ext. 4381. Fax. 57473313. esolano@mail.cinvestav.mx

Palabras clave: *Trichomonas vaginalis*, cisteín proteinasa, PCR.

Introducción. *Trichomonas vaginalis* es el protozoo flagelado, anaerobio, responsable de la trichomonosis humana, una de las enfermedades de transmisión sexual más comunes en humanos (1). Este parásito sintetiza un gran número de proteinasas que participan en propiedades de virulencia como adhesión, citotoxicidad, y evasión de la respuesta inmune (2). Se ha demostrado que una cisteín proteinasa de 65 kDa (CP65) participa en la citotoxicidad (3). Por lo que la purificación y caracterización bioquímica son de gran interés para entender su participación en esta propiedad de virulencia.

Metodología. A partir de lisados de *T. vaginalis*, se enriqueció y seleccionó la banda de la CP65, se microsecuenciaron los primeros 10 aminoácidos de su NH₂ terminal. Con base a esta secuencia y la de la región consenso 3' de CPs tipo papaína, se diseñaron oligonucleótidos y usando DNA genómico de *T. vaginalis* se amplificó un fragmento de la CP65 por PCR, este se marcó con P³² y se hicieron experimentos de "Northern" y "Southern blot" para conocer el tamaño y número de copias en el genoma de este parásito. Finalmente, se hizo un escrutinio en una minigenoteca de CPs para obtener el gen correspondiente a la CP65.

Resultados y Discusión. Los primeros 10 aminoácidos de la CP65 presentaron 68% de homología con CPs. Los oligonucleótidos diseñados con base a esta secuencia y la región conservada de las CPs tipo papaína, se amplificó por PCR un producto de 618 pb el cual se clonó en el vector PCR IV TOPO y se secuenció. La secuencia mostró entre un 76% y un 67% de homología de CPs de tipo cathepsina L de *T. vaginalis* y otros organismos (Tabla1).

Tabla 1.-Homología del fragmento de 618pb de CP65 con CPs

NOMBRE DE CP	ORIGEN	HOMOLOGÍA CP65
Precursor CP4	<i>T. vaginalis</i>	76%
Catepsina L CP8	<i>T. foetus</i>	73%
Catepsina L CP7	<i>T. foetus</i>	72%
Precursor CP2	<i>T. vaginalis</i>	72%
Precursor CP1	<i>T. vaginalis</i>	71%
Precursor CP3	<i>T. vaginalis</i>	67%

Por "Northern blot" se observó un transcrito de 2.3 Kb que correspondería a lo esperado para una proteinasa de 65 kDa (Fig 1A)

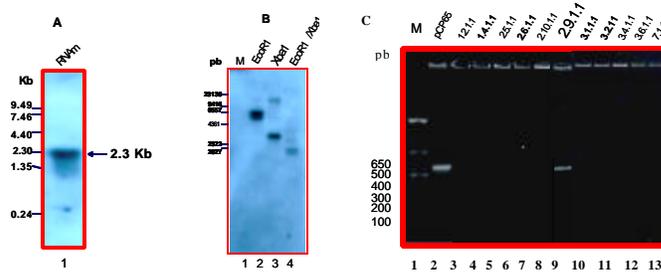


Fig. 1. Caracterización molecular del gen CP65 de *T. vaginalis* A) Northern blot RNAm de *T. vaginalis*. B) Southern blot. Digestión de DNA genómico de *T. vaginalis* con *EcoRI* (carril 2), con *XbaI* (carril 3), y con *EcoRI/XbaI* (carril 4). C) Gel de agarosa de la "PCR colony" de la minigenoteca de CPs de *T.vaginalis*. Marcadores de peso molecular (carril 1). Control positivo (carril 2). 11 clonas de CPs de *T. vaginalis* (carril 3-13).

Por "Southern blot" se observó la presencia de más de una banda en los diferentes carriles, indicando que el gen de la CP65 es multicopia (Fig 1B). Los oligonucleótidos previamente diseñados se utilizaron en ensayos de "PCR colony" para seleccionar entre las clonas de la minigenoteca a la clona 2.9.1.1 como candidato a contener el gen completo de la CP65 (Fig 1C). Secuencia en proceso.

Conclusiones. Se amplificó y clonó un fragmento de 618 pb del gen que codifica para la CP65 de *T.vaginalis*. La homología del fragmento de la CP65 con otras CPs sugiere que pertenece a la familia de cathepsinas L y el gen de la CP65 es multicopia en el genoma de *T. vaginalis*, con un tamaño de transcrito de 2.3 kb.

Agradecimiento. Este trabajo se realizó con el apoyo económico del proyecto 33044-M de CONACyT otorgado a R.A.

Bibliografía.

- Lockhart, A.B.; Thrall, P.H.; and Antonovics, J. (1996). Sexually transmitted diseases in animals: ecological and evolutionary implications. *Biol Rev* 71:415-471.
- Arroyo, R., and Alderete, J. F. (1995). Two *Trichomonas vaginalis* surface proteinases bind to host epithelial cells and are related to levels of cytoadherence and cytotoxicity. *Arch. Med. Res.* 26:279-285.
- Alvarez-Sánchez, M.E., Avila-González, L., Becerril-García, C., Fattel- Facenda, L., Ortega-López, J., and Arroyo, R. (2000). A novel cysteine proteinase (CP 65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microbiol Path* 28:193-202.