



UADY

CIENCIAS DE LA SALUD

POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS DE LA SALUD

Maestría en Investigación en Salud

Evaluación de la expresión de genes que codifican proteínas de unión al hierro y la concentración de hierro durante la inducción de resistencia al metronidazol en *Trichomonas vaginalis*.

Tesis presentada por:

Q.F.B. Wendy Paola Argáez Correa

En opción al grado de:

Maestra en Investigación en Salud

Directores de Tesis:

Dr. Julio César Torres Romero

Dr. Víctor Ermilo Arana Argáez

Mérida, Yucatán, México, 2017



UADY

CIENCIAS DE LA SALUD

POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS DE LA SALUD

Maestría en Investigación en Salud

Evaluación de la expresión de genes que codifican proteínas de unión al hierro y la concentración de hierro durante la inducción de resistencia al metronidazol en *Trichomonas vaginalis*.

Tesis presentada por:

Q.F.B. Wendy Paola Argáez Correa

En opción al grado de:

Maestra en Investigación en Salud

Directores de Tesis:

Dr. Julio César Torres Romero

Dr. Víctor Ermilo Arana Argáez

Mérida, Yucatán, México, 2017



"Luz, Ciencia y Verdad"

**Posgrado Institucional en
Ciencias de la Salud**

Oficio: PICSA/148/17.
Octubre 11 de 2017.

La tesis, "Evaluación de la expresión de genes que codifican proteínas de unión al hierro y la concentración de hierro durante la inducción de resistencia al metronidazol en *Trichomonas vaginalis*", presentada por la QFB. Wendy Paola Argáez Correa, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de **Maestra en Investigación en Salud**, ha sido aprobada en su contenido científico y en cuanto al cumplimiento de lo establecido en el Plan de Estudios vigente del Posgrado Institucional en Ciencias de la Salud.

Atentamente

Dra. Norma Elena Pérez Herrera
Coordinadora del Programa Institucional
en Ciencias de la Salud



Ccp. Archivo

Av. Itzaes x 59 y 59 A. Facultad de Medicina. C.P. 97000. Mérida, Yucatán, México.
Tel. (999) 9240554, 9233297 Ext. 36163. <http://www.picsa.uady.mx>

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis Dr. Julio Torres Romero y Dr. Víctor Arana Argáez por la confianza que depositaron en mí, sus consejos, opiniones, felicitaciones y apoyarme durante la maestría.

A mis revisores de tesis, ya que gracias a sus recomendaciones pude mejorar en muchos aspectos.

A mis compañeras de maestría Karla y Tahali, por contribuir con sus experiencias e ideas en mi desarrollo experimental.

A todos los compañeros que conforman el laboratorio de Bioquímica y Genética molecular por el trabajo en equipo y los momentos de desestrés.

Al Dr. Guillermo Valencia por ayudarme en todo momento con el manejo del citómetro de flujo del laboratorio de hematología del CIR Biomédicas.

A mi abuelita que siempre creyó en mí, me apoyó y estuvo a mi lado, incluso en esos momentos difíciles que se me presentaron durante el posgrado.

A mis padres que nunca dudaron de mis capacidades y en todo momento estuvieron orgullosos de mis éxitos.

Y por último para quien se ha convertido no solo en mi compañero sino en parte importante de mi vida, por darme ánimos siempre, por darme alegría y diversión en los momentos de mayor estrés y porque siempre has creído que todo lo que me propongo lo puedo conseguir.

LUGAR DE REALIZACIÓN

El desarrollo experimental se llevó a cabo en el “Laboratorio de bioquímica y genética molecular” y en el área de inmunología del “Laboratorio de farmacología”, ambos con sede en la facultad de química de la Universidad Autónoma de Yucatán (FQUADY).

ÍNDICE

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES	5
3.1. Generalidades y mecanismo de acción del metronidazol	5
3.2. Mecanismos de resistencia al metronidazol	6
3.3. Proteínas de unión a hierro involucradas en la activación del metronidazol	8
3.4. Evidencia de la modificación de proteínas de unión al hierro involucradas en la resistencia al metronidazol en diversos microorganismos	10
3.5. Activación del metronidazol en <i>Trichomonas vaginalis</i>	10
IV. OBJETIVOS	13
4.1. Objetivo General	13
4.2. Objetivos Específicos	13
V. HIPÓTESIS	14
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	15
6.1. Tipo de estudio	15
6.2. Muestra	15
6.3 Variables	15
6.4 Estandarización de las condiciones de PCR	16
6.4.1. Verificación de secuencias reportadas en la bibliografía	16
6.4.2. Diseño de oligonucleótidos	17
6.4.3. Verificación de la integridad del ADN	18
6.4.4. Estandarización de las condiciones de PCR con ADN genómico	18
6.4.5. Estandarización de las condiciones de RT-PCR	19
6.5. Análisis de los genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo del hierro	21
6.5.1. Cultivo de parásitos	21

6.5.2. Determinación de la Concentración mínima inhibitoria del metronidazol	22
6.5.3. Cinética con metronidazol	22
6.6. Ensayos <i>in vitro</i> de resistencia al metronidazol	23
6.7. Expresión de los genes por qRT-PCR	24
6.8. Evaluación del hierro intracelular unido a proteínas por citometría de flujo	25
VII. RESULTADOS	27
7.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria 50 (CMI ₅₀) del metronidazol	27
7.2. Cinética con metronidazol y expresión de los genes por RT-PCR	28
7.3. Ensayos <i>in vitro</i> de resistencia al metronidazol	31
7.4. Expresión de los genes por qRT-PCR	31
7.5. Análisis del hierro intracelular por citometría de flujo	35
VIII. DISCUSIÓN	38
IX. CONCLUSIONES	42
X. PERSPECTIVAS	43
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

I. RESUMEN

Antecedentes. *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*), es un protozooario parásito flagelado, el cual causa la tricomoniasis; infección de transmisión sexual (ITS) que afecta a millones de personas en el mundo. Este protozooario posee un organelo llamado hidrogenosoma que está involucrado en sus procesos metabólicos y en la activación del metronidazol, fármaco de primera elección en el tratamiento de la tricomoniasis. La activación del metronidazol se lleva a cabo mediante una reducción de su grupo nitro por proteínas relacionadas con la transferencia de electrones, las cuales tienen la característica principal de incluir al hierro como cofactor. Actualmente se reconoce que existen aislados clínicos de *T. vaginalis* resistentes al fármaco en varios continentes. La resistencia al metronidazol se ha analizado *in vitro* y se ha relacionado con la modificación de proteínas involucradas en el metabolismo del hierro y se presume el hecho de que éstas juegan un papel importante en la resistencia al fármaco. El hierro es fundamental en la patogénesis y supervivencia de *T. vaginalis* además de regular muchas de sus funciones metabólicas. Aunque en otros microorganismos se ha descrito la participación de diversos genes en la activación del metronidazol, actualmente, no existen estudios reportados acerca de la participación de los genes que codifiquen para las proteínas activadoras del metronidazol, y que además se encuentren reguladas por hierro; por lo que evaluar los niveles de expresión de estos genes, contribuiría a comprender la forma en la cual éste protozooario, puede modular diferencialmente la expresión de este tipo de proteínas en presencia de metronidazol, con la finalidad de permanecer de manera crónica en el humano.

Objetivo. Evaluar la expresión diferencial de al menos 10 genes que codifican proteínas de unión al hierro y la concentración de hierro intracelular unido a proteínas durante la inducción de la resistencia al metronidazol en *T. vaginalis*.

Métodos. Se realizaron ensayos por triplicado de inducción de resistencia al metronidazol durante 130 días a partir de una cepa de referencia susceptible, hasta la obtención de las cepas resistentes a 3, 6 y 15 μM del fármaco. A continuación se evaluó la expresión relativa de cinco genes involucrados en la activación del metronidazol y que utilizan hierro como cofactor, mediante un ensayo por qRT-PCR utilizando Sybr Green y se realizó una determinación del hierro intracelular unido a proteínas por medio de citometría de flujo, utilizando la calceína como un indicador fluorescente de presencia del mismo.

Resultados. Mediante el análisis de las doble delta C_T ($\Delta\Delta C_T$) obtenidas, se realizó una cuantificación relativa del nivel de expresión de los transcritos, observándose aumento en la expresión de ferredoxina (*Fdx*) y hierro hidrogenasa (*Fe-Hyd*) y una disminución en el transportador ZIP4 (*TvZIP4*), piruvato ferredoxina oxidoreductasa (*PFO*) y hierro superóxido dismutasa (*Fe-SOD*). Además, el comportamiento del hierro intracelular en los parásitos resistentes a metronidazol se correlacionó con lo observado en el análisis por qRT-PCR.

Conclusión. Se confirmó que la inducción de resistencia al metronidazol en *T. vaginalis* tiene como resultado una expresión diferencial a nivel de ARNm en los genes *Fdx*, *PFO*, *TvZIP4*, *Fe-Hyd* y *Fe-SOD*, los cuales utilizan al hierro como cofactor y además están involucradas en la activación del metronidazol y de igual manera la concentración del hierro intracelular es cambiante conforme aumenta la resistencia del parásito.

II. INTRODUCCIÓN

T. vaginalis es un protozoo parásito flagelado, el cual causa la tricomoniasis, infección de transmisión sexual (ITS) no viral más extendida a nivel mundial, ocasionando más de 270 millones de infecciones anuales en el mundo.¹ La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cerca del 90% de las infecciones ocurren en personas con recursos limitados, con un predominio en mujeres en edad fértil entre 16 y 35 años, grupo en el cual se estima que entre el 10% y 30% están infectadas.^{1,2} De igual manera la OMS estima que más de la mitad de los casos de cada año ocurren en hombres.³

En México, para el año 2016 se reportaron 48,507 nuevos casos de tricomoniasis urogenital para la población en general de los cuales 46,808 corresponden sólo a mujeres; de igual forma para el estado de Yucatán se reportaron 338 nuevos casos para la población en general, en donde 319 pertenecían a mujeres en edades comprendidas de los 10 a los 65 años, siendo las más afectadas las mujeres de entre 20 y 50 años.⁴ Sin embargo, los datos epidemiológicos obtenidos pueden no corresponder a la realidad porque la enfermedad no es de reporte obligatorio, además de tener un curso silente o asintomático en la mayoría de hospederos.³

A partir de los primeros años de la década de 1960, varios casos de resistencia en *T. vaginalis* se han descrito mediante la comparación de aislados clínicos susceptibles con resistentes.⁵ La evidencia de la aparición de resistencia al metronidazol en diferentes microorganismos y específicamente en *T. vaginalis*, se han basado en reportes de diversos aislados resistentes al metronidazol en varios continentes aunque a veces con un número limitado de pacientes. La resistencia al metronidazol se ha probado *in vitro* y se ha relacionado con la modificación de proteínas involucradas en el metabolismo del hierro.^{5,6} Estos estudios contemplan el efecto del metronidazol en la expresión de las proteínas que activan al fármaco, pudiendo incluir, o no, al hierro. Sin embargo, se sabe

que el hierro es fundamental en la patogénesis y supervivencia de *T. vaginalis* porque regula muchas de sus funciones metabólicas y en la actualidad no hay estudios acerca de los genes que codifiquen para las proteínas activadoras del metronidazol y que además estén involucradas en el uso y transporte de hierro. Por lo tanto, el identificar los genes que codifican para las proteínas de unión a hierro en *T. vaginalis* involucradas en la activación del metronidazol, contribuirán a comprender la forma en la cual este protozooario, al estar sujeto a fluctuaciones en las concentraciones del fármaco, puede modular diferencialmente la expresión de este tipo de transportadores y/o proteínas, con la finalidad de permanecer de manera crónica en el humano. Se pretende estos hallazgos sirvan como plataforma para poder dilucidar los mecanismos moleculares por los cuales el parásito genera una resistencia al metronidazol y de esta manera desarrollar una estrategia en el tratamiento de la tricomoniasis.

III. ANTECEDENTES

3.1. Generalidades y mecanismo de acción del metronidazol

Los 5-nitroimidazoles constituyen un grupo bien caracterizado de agentes antimicrobianos muy utilizados en la terapéutica humana. Estos agentes inhiben el crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias y algunos protozoarios tales como *T. vaginalis*, *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) y *Giardia lamblia* (*G. lamblia*).⁷ Dentro de este grupo se encuentra el metronidazol, fármaco que ha sido utilizado en medicina clínica por más de 45 años. El metronidazol se ha indicado originalmente para el tratamiento de la infección causada por *T. vaginalis*, y ha demostrado ser eficaz contra otras infecciones por protozoarios tales como la amebiasis y giardiasis, así como en diversas infecciones causadas por bacterias anaerobias obligadas, que incluye a *Bacteroides* y *Clostridium*, así como bacterias microaerófilas como *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) y *Campylobacter sp.*⁸⁻¹⁰

El metronidazol tiene buena disponibilidad y excelente distribución en todos los tejidos, ya que penetra fácilmente en las membranas celulares por medio de difusión pasiva. Es considerado como un profármaco, ya que por sí mismo es inactivo y requiere la activación del grupo nitro por los microorganismos anaerobios y microaerófilos que poseen componentes de transporte de electrones, y que tienen suficiente potencial de óxido reducción (redox) negativo (baja tensión de oxígeno), para donar electrones al metronidazol.^{9,11,12}

En los protozoarios, el grupo nitro reactivo del metronidazol se reduce de manera monovalente generando un intermediario transitorio citotóxico; esto es debido a que el metronidazol compite con la hidrogenasa por los electrones provenientes de la ferredoxina, cuya función es como aceptor de electrones provenientes de la piruvato-ferredoxina oxidoreductasa (PFO) y algunos otros

tipos de enzimas durante el proceso (Figura 1). El compuesto generado es capaz de formar enlaces con el ácido desoxirribonucleico (ADN) y los grupos sulfhidrilo de aminoácidos y proteínas. En bacterias los radicales originados causan un rompimiento de los cromosomas y muerte celular, sin embargo, el objetivo específico en un organismo nucleado es desconocido aunque de igual manera causa citotoxicidad, con la consecuente inhibición de síntesis del ADN, daños a las proteínas y otros componentes celulares.^{11,14} En adición a los radicales tóxicos, la producción de hidrógeno molecular es desigual en la presencia de metronidazol, resultando en un incremento del peróxido de hidrogeno intracelular.¹⁵

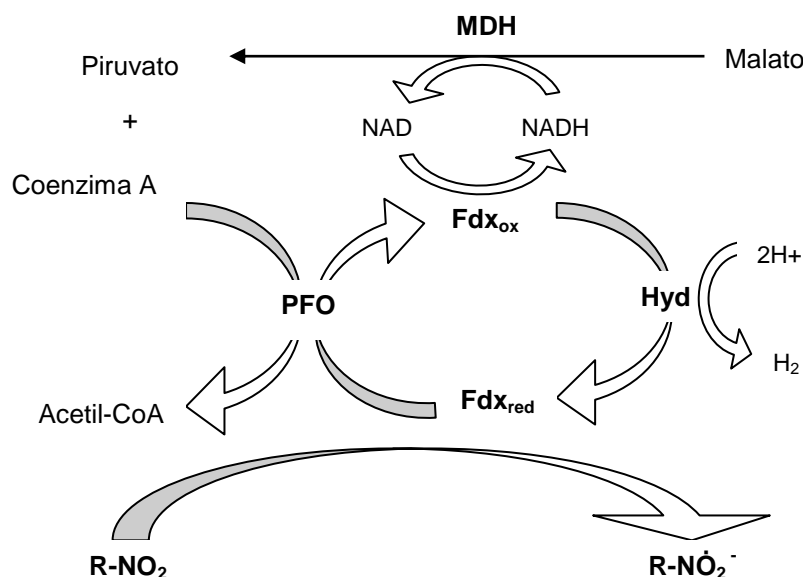


Figura 1. Activación del metronidazol en los microorganismos. PFO (piruvato-ferrooxina oxidoreductasa), Fdx (ferredoxina), Hyd (hidrogenasa) y MDH (malato deshidrogenasa).

3.2. Mecanismos de resistencia al metronidazol

La resistencia es rara en microorganismos clásicamente considerados susceptibles, sin embargo, en los últimos años se ha detectado un aumento de la resistencia a metronidazol en especies como *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*), *E. histolytica*, *H. pylori*, *G. lamblia* y *T. vaginalis*. Se han propuesto algunos

mecanismos para explicar cómo los microorganismos sobreviven al tratamiento con metronidazol. El proceso varía entre los organismos pero el principio general incluye al menos uno de los siguientes procesos: ¹⁶

- Aumento de la salida del fármaco

El diseño de eflujo (bomba) es mediado por proteínas de transporte, que confieren resistencia a los componentes tóxicos. En las bacterias es necesario un sistema de eflujo tripartita para expulsar el antimicrobiano hacia el medio externo: una proteína localizada en la membrana citoplasmática, otra en el espacio periplasmático y una tercera en la membrana externa. Los sistemas de eflujo particularmente se asocian con resistencia a múltiples antimicrobianos de importancia clínica.¹⁷

- Incremento en la actividad de enzimas reparadoras de ADN dañado.

Ocurre mediante mecanismos de detoxificación que disminuyen el daño oxidativo por las especies reactivas del oxígeno (ROS) y por reguladores de la reparación del daño al ADN; por ejemplo, enzimas que catalizan la producción de desoxirribonucleótidos requeridos para la síntesis de ADN (ribonucleótido reductasa), codificadas por genes cuya expresión es inducida en presencia de oxígeno.¹⁸

- Modificación en la actividad o expresión de las proteínas involucradas en la activación del fármaco.

Se basa en la disminución y/o inactivación de la actividad proteínica involucrada en la activación del fármaco, sobreexpresión de genes que codifican proteínas de rescate en respuesta a estrés oxidativo severo y la eliminación completa de las rutas de activación del fármaco, excluyendo así su acción contra el parásito.¹⁹

3.3. Proteínas de unión a hierro involucradas en la activación del metronidazol

- Piruvato-ferredoxina oxidoreductasa (PFO)

Enzima metabólica ausente en humanos, pero presente en los parásitos protozoarios. Es catalizadora de la descarboxilación oxidativa del piruvato en una reacción dependiente de Coenzima A para producir acetil Coenzima A y CO_2 . Su expresión es regulada de manera positiva por hierro.²⁰

- Ferredoxina (Fdx)

Proteína con un clúster hierro-azufre, cuya función primordial es la transferencia de electrones; es pequeña, soluble, con bajo potencial redox y funciona como acarreador de electrones en diversas rutas metabólicas, tanto en bacterias como en plantas, algas y animales.²¹

- Hierro-Hidrogenasa (Fe-Hyd)

Componente de la cadena de transporte de electrones, que tiene por función oxidar las coenzimas del tipo $\text{NADH} + \text{H}^+$, que se producen en algunas de las reacciones al interior de la mitocondria de células eucariotas. Otras funciones consisten en enviar los protones extraídos a las coenzimas, al espacio intermembrana de la mitocondria para la creación de un gradiente, mientras que los electrones son transportados a la etapa siguiente de la cadena.²²

- Hierro alcohol deshidrogenasa (Fe-ADH)

Cataliza la oxidación reversible de una amplia variedad de alcoholes primarios, secundarios y cíclicos de origen endógeno o xenobióticos a sus correspondientes aldehídos y cetonas. La reacción de oxidación tiene lugar con la reducción de la coenzima NAD^+ .²³

- Flavina reductasa (FLV-1)

Cataliza la reacción de oxidación del NADH o NADPH a NAD^+ o NADP^+ . Genera peróxido de hidrógeno transfiriendo electrones desde el NADPH

intracelular al oxígeno extracelular. El puente de electrones a través de la enzima contiene una molécula de FAD y probablemente dos grupos hemo. Forma parte de la defensa antioxidante en *T. vaginalis* e indirectamente reduce el oxígeno molecular a peróxido de hidrogeno por la vía de las flavinas libres.²⁴

- Malato deshidrogenasa (MDH)

La enzima málica cataliza la descarboxilación oxidativa del L-malato a piruvato en una reacción donde se pueden distinguir dos pasos. En el primer paso el L-malato se oxida a oxalacetato, compuesto que permanece unido a la enzima, y que en el segundo paso se descarboxila (carboxilato unido al grupo metileno) a piruvato.²⁵

- Hierro superóxido dismutasa (Fe-SOD).

Presente frecuentemente en organismos aeróbicos, aerotolerantes y algunos anaerobios obligados. Es esencial para su defensa contra la toxicidad producida por los metabolitos parcialmente reducidos, generados durante la reducción biológica normal del oxígeno molecular. Estas enzimas catalizan la conversión del radical superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2).²⁶

- Receptores y Transportadores de hierro.

Debido a la toxicidad de las concentraciones elevadas de hierro en el citoplasma celular y teniendo en cuenta que en ciertos microorganismos no se han descrito bombas de excreción para este elemento, la forma de control de su homeostasis intracelular es mediante receptores y transportadores de hierro. Estos sistemas de adquisición en ciertos casos están implicados en el crecimiento, sobrevivencia y virulencia de los microorganismos, mediante la restricción o no, de la biodisponibilidad del metal.²⁷

3.4. Evidencia de la modificación de proteínas de unión al hierro involucradas en la resistencia al metronidazol en diversos microorganismos

Se ha reportado que la deficiencia del transportador de hierro FeoAB en *B. fragilis* está relacionado directamente con la resistencia al metronidazol en dicha bacteria. Además, la PFO encargada de la activación del metronidazol, se ve afectada por las concentraciones de hierro; esto provee evidencia del papel clave del hierro intracelular en la susceptibilidad al metronidazol en *B. fragilis*.²⁸ Para el caso de *E. histolytica*, en aquellas cepas resistentes al metronidazol se reportó un incremento de la enzima Fe-SOD la cual utiliza al hierro como cofactor, y la ferredoxina que es un transportador de electrones, ambas participantes en la activación del metronidazol.²⁹ De igual manera, estudios realizados en *H. pylori* y *G. lamblia* indican que varias de sus proteínas involucradas en transferencia de electrones, tales como la ferredoxina, las flavodoxinas, PFO e hidrogenasa están asociadas con la reducción del metronidazol a su forma activa y son reguladas por las concentraciones de hierro intracelular.³⁰⁻³²

En el mecanismo de resistencia de estos microorganismos, se ha visto un aumento o disminución de proteínas que utilizan el hierro como cofactor o están involucradas en el metabolismo de hierro, y se presume el hecho de que éstas cumplen un papel importante en la resistencia al metronidazol.³³

3.5. Activación del metronidazol en *T. vaginalis*

T. vaginalis carece de mitocondrias y peroxisomas, pero en su lugar posee un organelo llamado hidrogenosoma que está involucrado en sus procesos metabólicos y es el lugar donde ocurre la reducción del metronidazol. El fármaco entra al parásito fácilmente por difusión pasiva, sin embargo, para llevar a cabo su función antimicrobiana necesita de una reducción metabólica y

la formación de un radical anión nitro que es citotóxico, lo cual lleva a un daño subsecuente de secciones específicas del ADN ricas en timina y adenina, lo que ocasiona la muerte celular.^{34,35} Bajo circunstancias normales *T. vaginalis* usa PFO y enzimas de unión a ferredoxina para oxidar el acetato del piruvato vía acetil Coenzima A para generar ATP. Cuando el metronidazol está presente, actúa como aceptor preferencial de electrones, y de esta manera su grupo nitro captura electrones de la ferredoxina para la generación de radicales que llevan a la muerte celular (Figura 2).³⁴⁻³⁶ Estudios *in vitro* han demostrado que la respuesta al metronidazol en *T. vaginalis* es rápida; la síntesis de ADN es inhibida luego de 30 minutos y la muerte ocurre después de 5 horas de administrado el medicamento.³⁶

Las rutas metabólicas de *T. vaginalis* comparten características con eucariotas y procariotas anaerobios. Las actividades de estas rutas son críticas para la susceptibilidad al metronidazol y el proceso en el cual el parásito desarrolla resistencia. El hierro también es importante en la regulación de actividades de *T. vaginalis* y ha sido propuesto el hecho de estar involucrado en la resistencia al metronidazol.³⁶

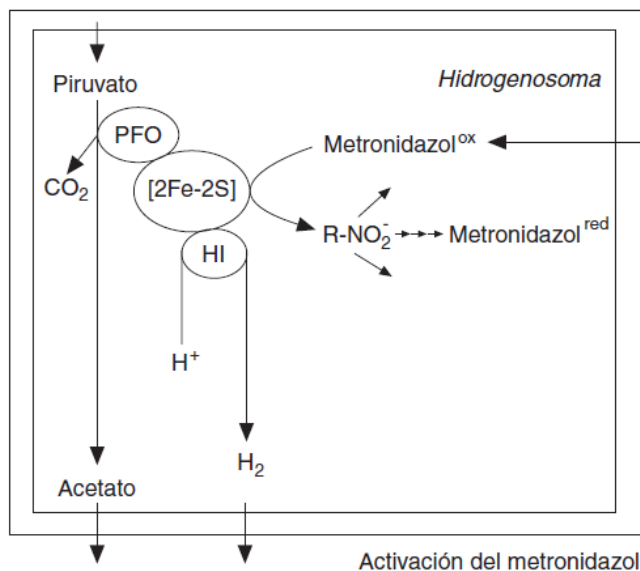


Figura 2. Activación del metronidazol en el hidrogenosoma de *T. vaginalis*. En presencia del metronidazol, los electrones generados por la PFO son transportados por la Fdx (2Fe-2S) hacia el fármaco, en lugar de su aceptor natural que es la hidrogenasa (HI).¹²

En *T. vaginalis*, las proteínas que utilizan el hierro como cofactor o están involucradas en el metabolismo del mismo, son claves para la activación del metronidazol. Esto es en gran parte debido a que el hierro es un nutriente esencial en el parásito y es requerido en altas concentraciones para regular su metabolismo y mantener su virulencia.³⁷

Entre las proteínas que participan en el metabolismo del hierro y se ha descrito que activan al metronidazol se encuentran: PFO, Fe-Hyd, Fdx, Fe-ADH, FLV-1, MDH y la Fe-SOD.³⁸⁻⁴¹ Sin embargo poco se conoce del comportamiento de este tipo de proteínas y de la concentración de hierro intracelular durante la conversión a resistencia al metronidazol. Por lo tanto, en el presente trabajo se pretende evaluar cómo se modifica la expresión de los genes que codifican para las proteínas que contienen hierro o están involucradas en el metabolismo del hierro, y la concentración de hierro intracelular, en relación a la inducción de resistencia al metronidazol en el parásito protozoario *T. vaginalis*.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar la expresión diferencial de al menos 10 genes que codifican proteínas de unión al hierro y la concentración de hierro intracelular unido a proteínas durante la inducción de la resistencia al metronidazol en *T. vaginalis*.

4.2. Objetivos específicos

1. Análisis de los transcritos de al menos 10 genes que codifican proteínas de unión al hierro (TvZIP4, receptores de lactoferrina y grupo hemo, PFO, Fdx, Fe-Hyd, Fe-ADH, FLV-1, MDH y Fe-SOD) de *T. vaginalis* en dosis subtóxicas de metronidazol.
2. Evaluar la expresión diferencial de los genes que codifican proteínas de unión al hierro de *T. vaginalis* descritos anteriormente, durante la inducción de resistencia al metronidazol.
3. Analizar la concentración de hierro intracelular unido a proteínas, durante la inducción de resistencia al metronidazol.

V. HIPÓTESIS

La inducción de resistencia al metronidazol en *Trichomonas vaginalis* modifica la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas a la entrada y utilización del hierro.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Tipo de estudio

Experimental *in vitro*.

6.2. Muestra

Aislado de referencia de *T. vaginalis* (MICH01) sensible a metronidazol.

6.3. Variables

Dependientes:

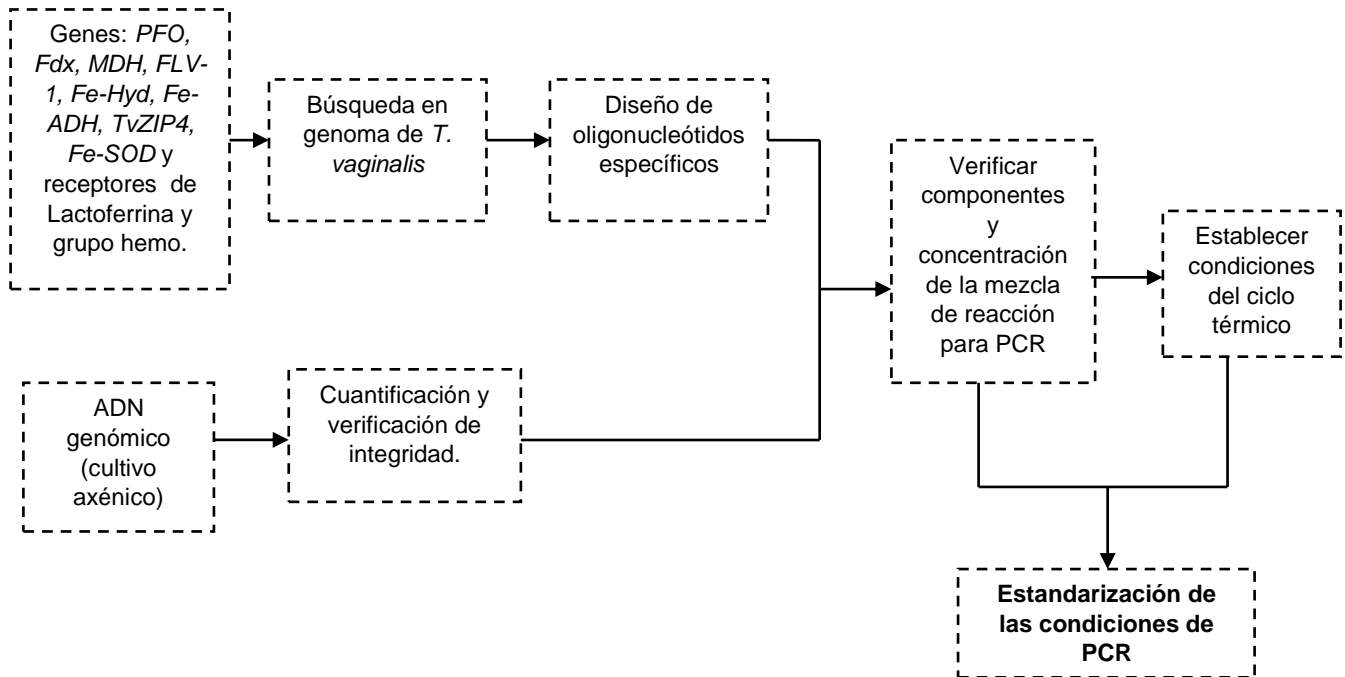
- Modificación en la expresión de genes involucrados en la activación del metronidazol.
- Variaciones en la concentración de hierro intracelular unido a proteínas.

Independientes:

- Concentraciones variables de metronidazol.

6.4. Estandarización de las condiciones de PCR

Para realizar la estandarización de las condiciones de PCR se siguieron los procesos que se señalan a continuación:



6.4.1. Verificación de secuencias reportadas en la bibliografía

Se realizó una revisión bibliográfica de los genes propuestos, para confirmar que estén relacionados con la entrada y utilización del hierro, así como en la activación del metronidazol en *T. vaginalis*. Las secuencias de los genes en estudio se corroboraron mediante los números de acceso descritos en la bibliografía consultada, pertenecientes a la base de datos de GenBank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A continuación, se realizó la verificación de la homología de cada secuencia con el genoma de *T. vaginalis*, utilizando para este fin la herramienta bioinformática BLAST de la base de datos TrichDB (<http://trichdb.org/trichdb/>). De los diez genes revisados se logró identificar

únicamente ocho secuencias ubicadas en el genoma de *T. vaginalis*: *PFO*, *Fdx*, *MDH*, *FLV-1*, *Fe-Hyd*, *Fe-ADH*, *TvZIP4* y *Fe-SOD*.

6.4.2. Diseño de oligonucleótidos

En el diseño de oligonucleótidos específicos para las secuencias de genes anteriormente verificadas, se recurrió al programa Primer-BLAST del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), empleando las siguientes características:

- Extensión del amplicón: 80-120 pb
- Diferencia de Tm: 2°C máximo
- Contenido de G:C (Guanina:Citosina): 50-60%

Los oligonucleótidos fueron reconstituidos a una concentración de 100 µM para las soluciones stock y luego se realizaron soluciones de trabajo a una concentración de 10 µM (Cuadro 1).

Cuadro 1. Oligonucleótidos específicos para genes de *T. vaginalis*

Gen	Sentido	Antisentido	Amplicón (pb)
<i>PFO</i>	AGGGCAAGAACTGGGATCAG	AATTCGATGAGTGGCTGGCG	103
<i>Fdx</i>	TGCATCTGCAAGCACGTTTC	GTGTGATAGCGCAAGCAAGG	106
<i>MDH</i>	GAACTCTCCCGCAAGGTTCT	TGAAGCGGTCACGTTCTTCT	109
<i>FLV-1</i>	TGGCCGTAAGGTTTCCATCA	AGCAGACCAAAGGAAAGCGT	97
<i>Fe-Hyd</i>	GGAACTCGCACCAATTGACC	TATGCCGTGAGCAACTGCAA	112
<i>Fe-ADH</i>	TTGCTAAGCTCCCAGAAGGC	ACAACGATATCGCCGAGCTT	115
<i>TvZIP4</i>	AAGGCCTTGCCTTGGGAATC	ACGCGAAAGCTTCAACTGGT	93
<i>Fe-SOD</i>	GGGAACATGCTTGGTACATCG	GCAGCCTTTAAGTTCTGCTCA	106
Top II	ATCGGTGTCGGTTGGTCAAG	TGGCTGTTTGACACCGTCTTT	171

6.4.3. Verificación de la integridad del ADN

En la estandarización de las condiciones de PCR, se utilizó ADN genómico obtenido a partir de un cultivo axénico de *T. vaginalis* (MICH01), proporcionado por la Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez (UAEM), el cual previamente se cuantificó en un equipo NanoDrop Lite. Posteriormente se verificó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE 0.5x, durante 45 min a 80V, empleando bromuro de etidio y luz UV como agentes reveladores.

6.4.4. Estandarización de las condiciones de PCR con ADN genómico

La preparación de la mezcla de reacción se realizó con base en un volumen final de 25 μ L (Cuadro 2).

Cuadro 2. Mezcla de reacción para estandarización de la PCR

Componente	Concentración	Volumen (μ L)	Concentración Final
Agua estéril	--	15.5	--
Búffer de polimerasa	5x	5	1x
dNTPs mix	10 mM	0.5	0.2 mM
MgCl ₂	25 mM	0.75	0.75 mM
ADN genómico	38 ng/ μ L	1	1.5 ng/ μ L
Taq polimerasa	5 U/ μ L	0.25	1.25 U/ μ L
Oligonucleótido sentido	10 μ M	1	0.4 μ M
Oligonucleótido antisentido	10 μ M	1	0.4 μ M
Volumen final por reacción	---	25 μL	---

Para establecer la temperatura de alineamiento óptima, los ciclos y los tiempos para la PCR, se realizó un gradiente de temperatura para todos los oligonucleótidos diseñados (Cuadro 3).

Cuadro 3. Ciclo térmico para PCR con ADN genómico

Etapa	Temperatura	Tiempo
Activación inicial	95 °C	2 min
Desnaturalización	94 °C	30s
Alineamiento	59.4 °C	40s
	56.9 °C	40s
Extensión	72°C	70s
Extensión final	72°C	7 min

} 35 Ciclos

Para corroborar si las condiciones utilizadas anteriormente fueron las adecuadas, se realizó una electroforesis de los productos de PCR, en gel de agarosa al 1.5% en TBE al 0.5x, durante 40 min a 80V, utilizando un marcador de 50 pb (Qiagen) el cual fue preparado según las condiciones indicadas por el fabricante.

6.4.5. Estandarización de las condiciones de RT-PCR

La preparación de la mezcla de reacción se realizó con base en un volumen final de 25 µL y algunas variaciones en las cantidades de los componentes con respecto a lo estandarizado con ADN genómico (Cuadro 4). Finalmente se conservaron las mismas condiciones del ciclo térmico ya definido anteriormente, y sólo hubo modificaciones en las temperaturas de alineamiento para los 8 genes, en donde se obtuvieron temperaturas diferentes (Cuadro 5)

Cuadro 4. Mezcla de reacción para RT-PCR

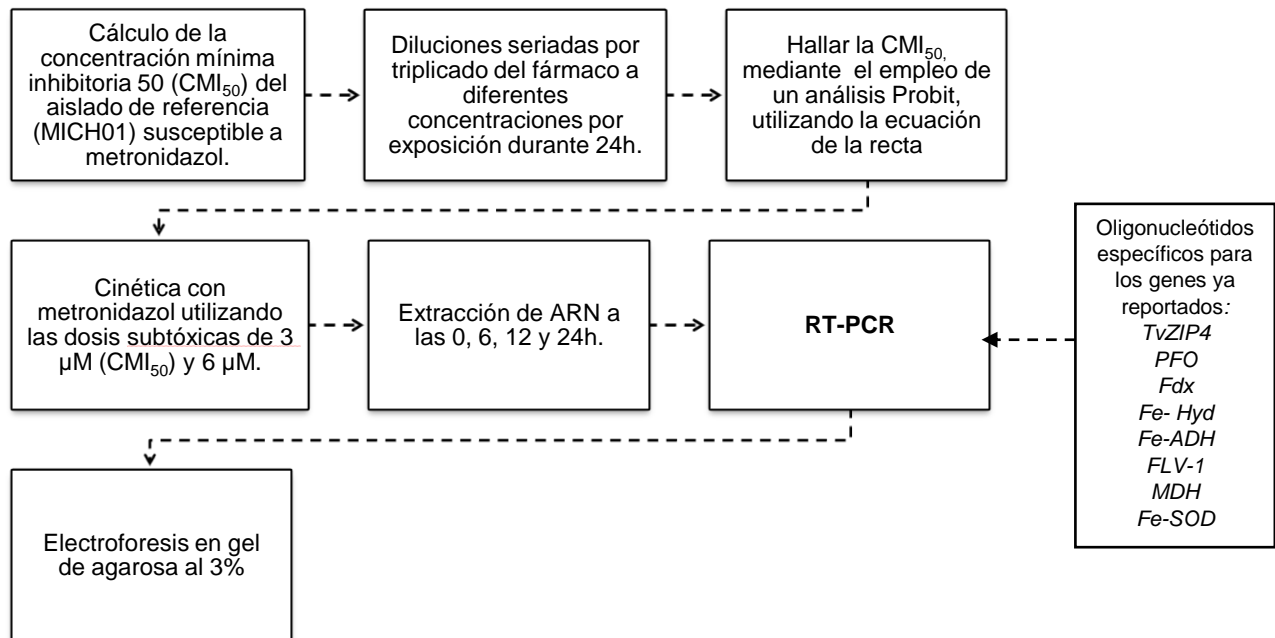
Componente	Volumen (μL)	Concentración Final
Agua estéril	16.75	--
Búffer de polimerasa (10x)	2.5	1x
dNTPs mix (10mM)	0.75	0.30 mM
MgCl ₂ (25mM)	1.5	1.50 mM
ADNc	1.25	--
Taq polimerasa (5 U/ μL)	0.25	1.25 U/ μL
Oligonucleótido sentido (10 μM)	1	0.40 μM
Oligonucleótido antisentido (10 μM)	1	0.40 μM
Volumen final por reacción	25 μL	---

Cuadro 5. Ciclo térmico para RT-PCR

Etapa	Temperatura	Tiempo	
Activación inicial	95 °C	2 min	
Desnaturalización	94 °C	30s	} 35 Ciclos
	55 °C		
Alineamiento	58 °C	40s	
	60 °C		
Extensión	72°C	70s	
Extensión final	72°C	7 min	

6.5. Análisis de los genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo del hierro

Durante el análisis semicuantitativo de los genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo del hierro bajo efectos del metronidazol a dosis subtóxicas, se realizaron los siguientes procesos:



6.5.1. Cultivo de parásitos

A partir de la cepa de referencia MICH01 se procedió a cultivar trofozoítos de *T. vaginalis* en tubos de vidrio de 10 mL de manera axénica (37°C/24 hrs) en medio TYM (Tryptona-Levadura-Maltosa) pH 6.5, suplementado con 12% de suero de caballo inactivado por calor (37°C/1 hr) sin filtrar. Durante la fase logarítmica de crecimiento se procedió a cosechar los parásitos.^{41, 42}

6.5.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del metronidazol

Para este ensayo se empleó la cepa de *T. vaginalis* MICH01 altamente susceptible al metronidazol cultivada en las condiciones mencionadas anteriormente. Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* se desarrollaron según métodos previamente descritos^{10,41,42} con algunas modificaciones en la ejecución, las cuales se describen a continuación brevemente; los parásitos fueron distribuidos en tubos cónicos de 1.5 mL a una concentración de 4×10^3 /mL. Se procedió a incubar los tubos de cultivo a 37°C por 24 hrs con concentraciones crecientes de metronidazol, de la siguiente manera: 6, 12, 18, 24, 30 μ M. Se utilizaron parásitos sin tratamiento suspendidos en medio TYM con la solución amortiguadora del metronidazol como control negativo (TvST) para la comparación de la actividad antiprotozoaria. Se tomó una alícuota de 50 μ L de parásitos de cada concentración; se tiñeron utilizando azul de tripano al 0.4% y fueron contados en una cámara de Neubauer aquellos parásitos vivos y levemente móviles, para luego realizar la relación del número de parásitos vivos/mL y calcular la CMI₅₀, la cuál es definida como la concentración más baja del fármaco a la cual se inhibe el 50% del crecimiento de los parásitos.^{40, 41, 42}

6.5.3. Cinética con metronidazol

Para el análisis semicuantitativo de la expresión génica mediante RT-PCR se llevó a cabo una cinética de 24 hrs con metronidazol utilizando las dosis subtóxicas de 3 μ M (CMI₅₀) y 6 μ M, y realizando la extracción de ARN a las 0, 6, 12 y 24 hrs. El ARN total obtenido de los trofozoítos en los diferentes tiempos fue extraído por estuche comercial RNeasy Plus Mini Kit de Qiagen de acuerdo a las instrucciones del fabricante; cuantificado en equipo Nanodrop y tratado con la enzima ADNasa presente en el estuche comercial DNase I, RNase free de ThermoFisher, para eliminar cualquier rastro de ADN genómico que pudiera estar presente. A continuación utilizando el estuche comercial RevertAid First

Strand cDNA Synthesis Kit de ThermoFisher se realizó la síntesis del ADNc y la posterior RT-PCR en el termociclador C1000 Thermal Cycler de BioRad, utilizando las condiciones estandarizadas anteriormente (Cuadros 4 y 5).⁴³⁻⁴⁵ Para observar la expresión de los transcritos, los productos de PCR se observaron en un gel de agarosa al 3%, utilizando un marcador de 50 pb y el gen constitutivo *Top II* como gen de referencia interno.

6.6. Ensayos *in vitro* de resistencia al metronidazol

La determinación de los niveles de expresión de los genes que codifican proteínas de unión al hierro en *T. vaginalis* durante la inducción de resistencia al metronidazol se efectuó de la siguiente manera:

Se realizaron ensayos por triplicado de inducción de resistencia al metronidazol a partir de una cepa de referencia sin tratamiento (MICH01). Para la inducción de resistencia los trofozoítos fueron cultivados bajo condiciones microaerófilas expuestos a concentraciones determinadas de metronidazol por 24 hrs. A continuación los parásitos fueron transferidos a un medio nuevo sin el fármaco y cultivados por 48 hrs.⁴⁶ Este procedimiento fue repetido durante 20 días, alternando 24 horas con el fármaco y 48 hrs en medio normal hasta la obtención de la primera cepa resistente a 3 μ M. A partir del primer cultivo resistente se continuó cultivando los parásitos utilizando concentraciones crecientes de metronidazol para la obtención de las siguientes cepas resistentes a 6 μ M (TvRMtz-6) y 15 μ M (TvRMtz-15), realizando el mismo procedimiento detallado con anterioridad por un tiempo total de 50 días para la obtención de TvRMtz-6 y 130 días para TvRMtz-15 (Figura 3).⁴⁶⁻⁴⁹

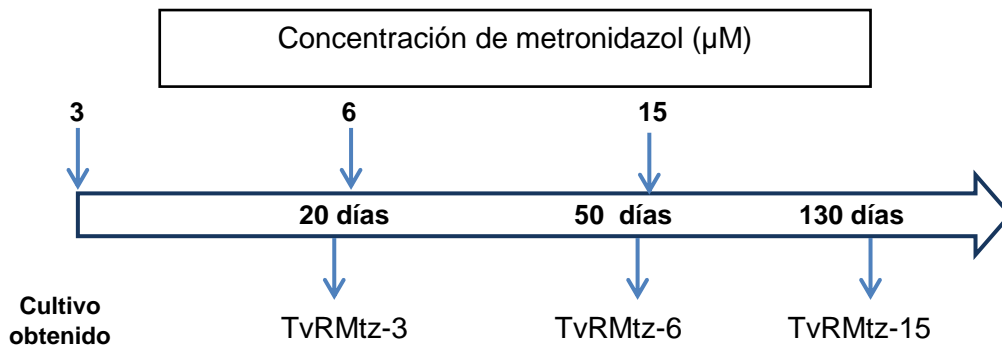


Figura 3. Inducción de resistencia al metronidazol.

6.7. Expresión de los genes por qRT-PCR

Se cuantificó la expresión de los genes involucrados en la activación del metronidazol y que evidenciaron cambios en su expresión durante los ensayos de cinética con metronidazol en tiempos cortos y bajo dosis subtóxicas. El ARN total de los trofozoítos crecidos en las diferentes concentraciones de metronidazol y en condiciones normales de cultivo, fue extraído empleando un estuche comercial RNeasy Plus Micro Kit de Qiagen, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La qRT-PCR se llevó a cabo en el termociclador StepOne de Applied Biosystems, utilizando el estuche comercial Maxima SYBR Green qPCR Master Mix de ThermoFisher para la preparación de las muestras, utilizando un volumen final de 20 µL y finalmente el ciclo térmico indicado por el fabricante manteniendo las temperaturas de alineamiento ya estandarizadas (Cuadro 6 y 7).⁵⁰ La integración de los datos así como los gráficos fueron realizados con el software Excel 2010 y las diferencias significativas fueron halladas mediante un análisis de ANOVA ($p < 0.05$) con el software GraphPad Prism 6.

Cuadro 6. Mezcla de reacción para qRT-PCR

Componente	Volumen (μL)	Concentración Final
Agua estéril	6.75	--
Maxima SYBR Green máster mix (2x)	10	1x
ADNc	1.25	--
Oligonucleótido sentido (3.3 μM)	1	165 nM
Oligonucleótido antisentido (3.3 μM)	1	165 nM
Volumen final por reacción	20 μL	---

Cuadro 7. Ciclo térmico para qRT-PCR

Etapa	Temperatura	Tiempo
Activación inicial	95 °C	10 min
Desnaturalización	95 °C	15 s
Alineamiento	55 °C	30 s
	58 °C	
Extensión	72°C	30 s

} 40 Ciclos

6.8. Evaluación del hierro intracelular unido a proteínas por citometría de flujo

Para el análisis de las cepas resistentes se utilizaron los siguientes controles de fluorescencia:

- Parásitos con bajo hierro (2,2-Dipiridilo) a una concentración de 100 μM .
- Parásitos con alto hierro (FeSO_4) a una concentración de 125 μM .
- Parásitos en condiciones normales de cultivo.

Los parásitos cosechados en fase logarítmica de crecimiento en las diferentes condiciones de cultivo, se empastillaron y lavaron 3 veces con solución PBS pH 7.0 a 1800 rpm/7 min a 4°C para eliminar el medio de cultivo y restos celulares. Luego se resuspendieron en solución PBS pH 7.0 a una temperatura de 37°C y se distribuyó 5×10^5 parásitos/mL en tubos de 1.5 mL por triplicado por cada condición de cultivo. A continuación a las muestras se les adicionó el indicador fluorescente Calceína AM (Sigma Aldrich) a una concentración de 0.25 μ M sin necesidad de permeabilización de la célula, ya que el indicador es capaz de penetrar la membrana celular. Después de 10 min de incubación a 37°C protegidos de la luz, los parásitos se lavaron y resuspendieron con PBS pH 7.0 a 37°C.⁵¹⁻⁵³ Posteriormente se analizó la fluorescencia emitida por las células en un citómetro de flujo BD FACSCalibur utilizando el filtro de fluorescencia FL-1 y una longitud de onda máxima de 530nm (rango de fluorescencia óptimo 514 - 520 nm),⁵⁴ para finalmente interpretar los histogramas correspondientes a cada muestra así como los cálculos de las intensidades de fluorescencia mediante el software CellQuest Pro en el sistema operativo iOS. Para la determinación de las desviaciones estándar de las muestras analizadas así como la realización del gráfico, fue utilizado el software GraphPad Prism 6. Los resultados se compararon con los controles utilizados durante el análisis.

VII. RESULTADOS

7.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria 50 (CMI₅₀) del metronidazol

Para el cálculo de la CMI₅₀ se realizaron tres ensayos independientes por triplicado, y luego se determinó el promedio de los parásitos contados en cada triplicado y por cada concentración; a continuación se realizó el cálculo del porcentaje de viabilidad y letalidad por cada concentración, tomando como 100% de viabilidad los parásitos sin el fármaco (Cuadro 8).

Cuadro 8. Determinación de la CMI a metronidazol en la cepa MICH01 de *T. vaginalis*.

Concentración Metronidazol (μ M)	% Viabilidad	D.E	% Letalidad	Log de la concentración	Valor Probit
Sin Mtz	100.0	---	---	---	---
6	33.0	8.6	67	0.77	5.44
12	23.9	5.9	76	1.071	5.71
18	14.8	2.0	85	1.247	6.04
24	10.2	3.4	90	1.371	6.28
30	6.8	3.4	93	1.468	6.48

Utilizando un análisis Probit para analizar la relación entre la dosis de fármaco administrada a los parásitos y la viabilidad observada durante un tiempo determinado, se realizó una gráfica del logaritmo de cada concentración de metronidazol frente a su respectivo valor Probit (Figura 4).

La ecuación de la recta que se obtuvo de la gráfica se utilizó para el cálculo de la CMI_{50} , la cual fue de $3.3 \mu M$.

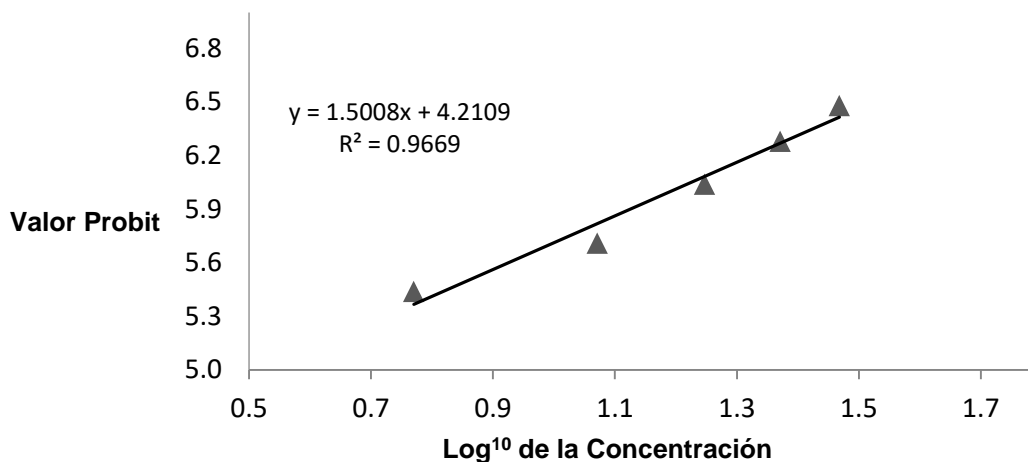


Figura 4. Curva de Inhibición por Metronidazol. Gráfica de Valores Probit (con base en el porcentaje de letalidad) frente al logaritmo de cada concentración de metronidazol.

7.2. Cinética con metronidazol y expresión de los genes por RT-PCR

A partir del cálculo de la CMI ($3.3 \mu M$), se procedió a realizar una cinética con metronidazol utilizando dosis consideradas tóxicas en los parásitos pero sin ocasionar la muerte de los mismos (subletales): $3 \mu M$ y $6 \mu M$, durante 24 hrs por triplicado para la extracción de ARN, la cual se realizó en 4 diferentes tiempos (0, 6, 12, 24 hrs), con la finalidad de analizar por RT-PCR de forma semicuantitativa la expresión de los genes de interés, utilizando un gel de agarosa al 3%. Se empleó Topoisomerasa II como gen de referencia (Figura 5). El resultado del análisis de las bandas reveló que no hubo cambios en la expresión de cuatro genes bajo efecto del metronidazol durante el período de 24 hrs. Estos corresponden a la *Fdx*, *MDH*, *FLV-1* y *Fe-ADH* (Figura 5A y 5B). Los genes que mostraron una disminución en su expresión corresponden al *TvZIP4* y *Fe-Hyd* en los cuales se aprecia la disminución a partir de las 12 hrs de administrado el fármaco (Figuras 5A y 5B). Por el contrario los genes *PFO* y *Fe-SOD* mostraron aumento en su expresión a las diferentes concentraciones

del fármaco, con algunas variaciones; por ejemplo, *PFO* tuvo un incremento en su expresión a partir de las 6 hrs de inducción con 3 μ M de metronidazol (Figura 5A), por otro lado, con 6 μ M se observó un aumento en la expresión desde el tiempo cero y se mantuvo durante las 24 hrs (Figura 5B). Para *Fe-SOD*, se observó un incremento a partir de las 12hrs con 3 μ M de metronidazol pero no fue el mismo caso con 6 μ M, en cuya concentración se observó un aumento a las 12 hrs para luego disminuir hasta su nivel basal a las 24 hrs (Figuras 5A y 5B).

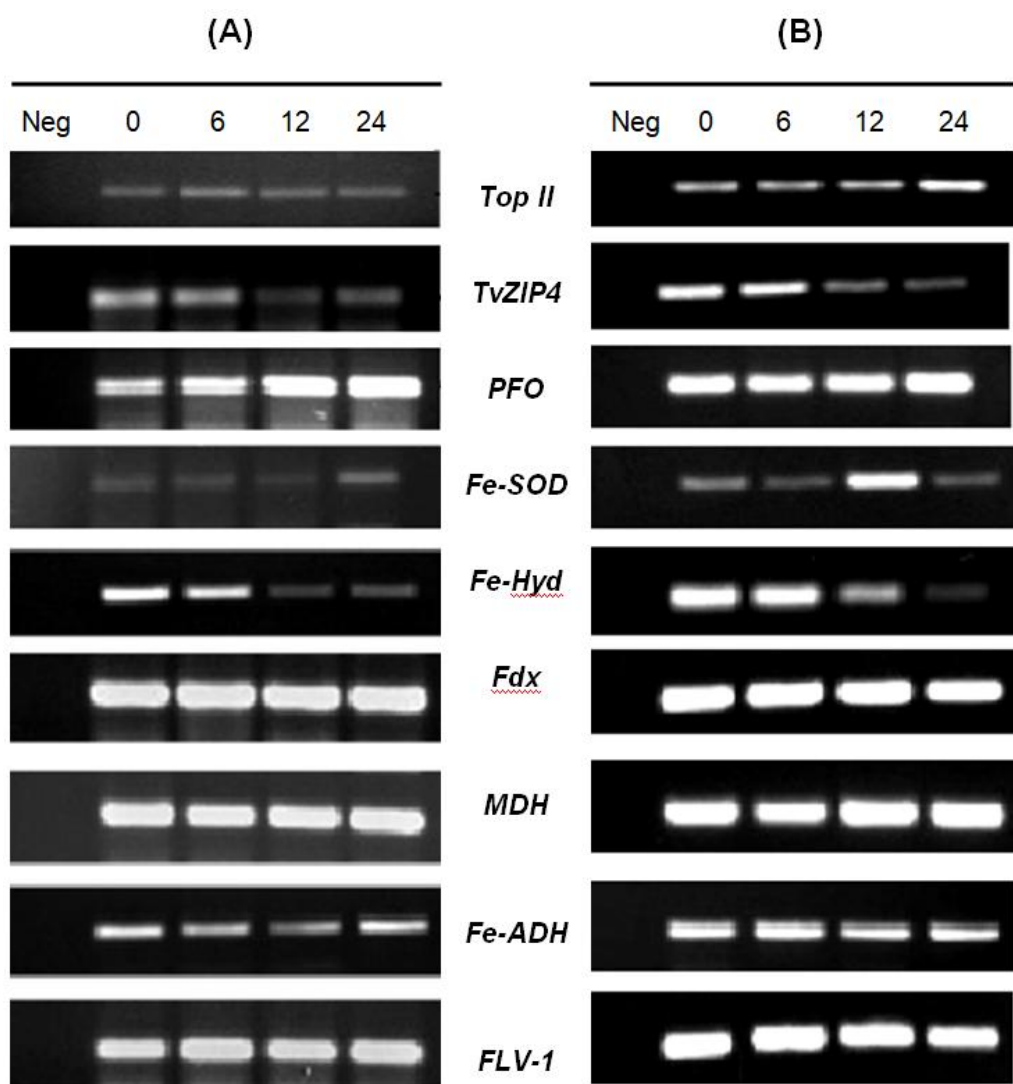


Figura 5. Análisis de la expresión de los genes de *T. vaginalis* obtenidos por RT-PCR, utilizando concentraciones de metronidazol de 3 μM que corresponde a la CMI_{50} (A) y 6 μM (B). La expresión de los genes *ZIP* (93 pb), *PFO* (103 pb), *Fe-SOD* (106 pb), *Fe-Hyd* (112 pb), *Fdx* (106 pb), *MDH* (109 pb), *Fe-ADH* (115 pb) y *FLV-1* (97 pb), se realizó en 4 diferentes tiempos (0, 6, 12 y 24 hrs) para ambas concentraciones de Mtz. Se utilizó el gen *Top II* (171 pb) como gen constitutivo en las mismas condiciones.

7.3. Ensayos *in vitro* de resistencia al metronidazol

Los trofozoítos de *T. vaginalis* fueron cultivados por duplicado en volúmenes finales de 5 mL durante 130 días para la obtención de las tres cepas resistentes TvRMtz-3, TvRMtz-6 y TvRMtz-15. Las características observadas que dieron el indicio de resistencia fueron: el aumento de tamaño observado en los parásitos en comparación de la cepa susceptible, aumento en la granularidad, leve disminución en la movilidad, alta sensibilidad al oxígeno, así como una tasa de duplicación aumentada y mayor porcentaje de células vivas/mL. Los datos obtenidos coinciden con lo reportado para cepas resistentes al metronidazol.^{14, 35, 41, 49}

7.4. Expresión de los genes por qRT-PCR

Utilizando el reactivo Sybr Green, se cuantificó la expresión de 4 genes que evidenciaron cambios en su expresión (*Fe-SOD*, *PFO*, *TvZIP4*, *Fe-Hyd*) en el aislado sensible MICH01 durante los ensayos con metronidazol bajo dosis subtóxicas; se añadió *Fdx* debido a que se han reportado cambios de expresión en parásitos resistentes a metronidazol. En el análisis se realizaron dos ensayos independientes por triplicado utilizando ADNc proveniente de parásitos sin tratamiento como control basal de expresión (TvST) y de las cepas resistentes a metronidazol (TvRMtz-3, TvRMtz-6 y TvRMtz-15 μM). Se utilizó la *Top II* como gen constitutivo.

Utilizando las C_T obtenidas con el StepOne software v2.3 a partir de los niveles de expresión de los genes, se realizaron los cálculos para la obtención de los niveles de cambio (“folding change”) y las desviaciones estándar para cada gen, utilizando el método de la $\Delta\Delta C_T$. Se observaron cambios en la expresión de los genes con respecto a los ensayos realizados bajo dosis subtóxicas. Los genes que habían manifestado una disminución en su expresión en tiempos cortos de exposición al fármaco evidenciaron comportamientos diferentes cuando el

parásito desarrolla resistencia al fármaco, resultando en lo siguiente: para el gen *TvZIP4* se observa una disminución de la expresión en los cultivos TvRMtz-3 y TvRMtz-6 que se correlaciona con lo obtenido en los tiempos cortos de inducción, sin embargo al llegar a 15 μM la expresión del gen regresa a sus niveles basales. De igual manera para *Fe-Hyd* se había observado que había una disminución en la expresión en los tiempos de 12 y 24 hrs, pero en las cepas resistentes aumentó su expresión con relación al control basal, lo que se confirma por el análisis del nivel de cambio por el método de $\Delta\Delta\text{C}_T$. Los genes que habían manifestado un aumento en sus niveles de expresión en tiempos cortos de exposición al fármaco evidenciaron comportamientos opuestos a lo que se había observado anteriormente. Con *PFO* hubo un aumento en la expresión cuando el parásito fue sometido a dosis subtóxicas de metronidazol, cuyo resultado fue igual para la cepa resistente a 3 μM , pero para las resistentes a 6 y 15 μM la expresión fue disminuyendo ligeramente; resultado que concuerda con lo ya reportado para *T. vaginalis* resistentes a metronidazol.¹⁴ El nivel de expresión del gen *Fe-SOD* se esperaba aumentara conforme los parásitos se hicieran resistentes, tal y como se ha descrito,⁴⁶ pero en los resultados obtenidos para TvRMtz-3 y TvRMtz-6 no hubo cambios significativos y se mantuvo cercano a las condiciones basales de los parásitos sin tratamiento; y para la cepa TvRMtz-15 hubo una disminución considerable. Finalmente en el gen que codifica para la ferredoxina (*Fdx*) no se habían observado cambios al exponer a los parásitos al metronidazol en dosis subtóxicas, no obstante al desarrollar resistencia se observaron cambios muy variables en la expresión de cada cepa analizada (Figuras 6 y 7).

CUANTIFICACIÓN RELATIVA DEL NIVEL DE EXPRESIÓN

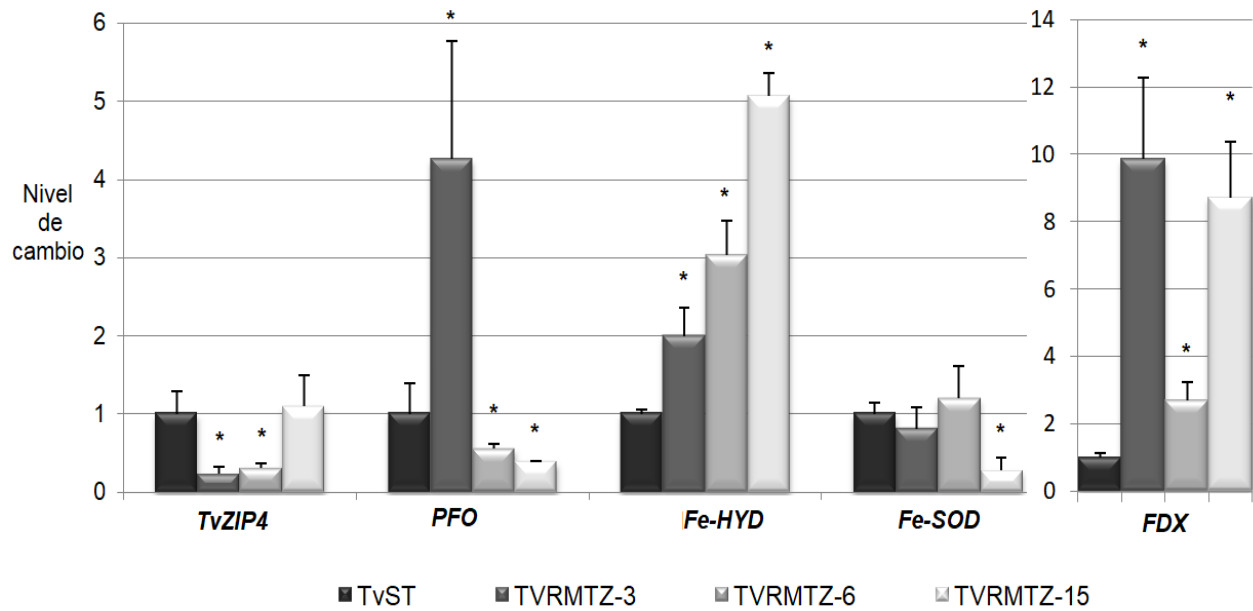


Figura 6. Niveles de expresión obtenidos por qRT-PCR para los cinco genes analizados. Se graficaron los niveles de cambio para cada tipo de cultivo, siguiendo el método de $\Delta\Delta C_T$. Se utilizó *Top II* como gen constitutivo en las mismas condiciones. Las diferencias significativas entre los niveles de cambio de cada gen con respecto a la cepa susceptible fueron señaladas mediante asteriscos.

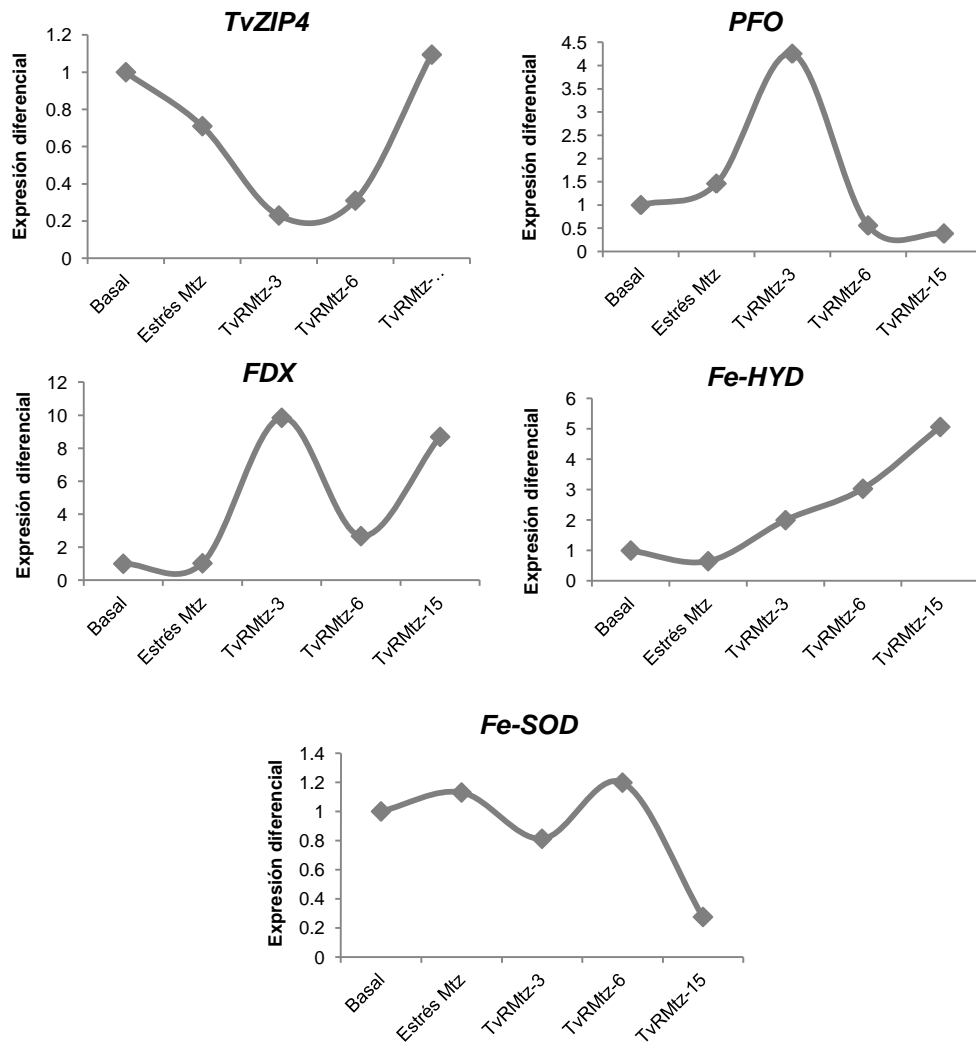


Figura 7. Comportamiento en los genes de *T. vaginalis* de acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis por qRT-PCR (fold change). Se incluyó el observado cuando se le aplica al parásito un estrés con metronidazol utilizando la CMI₅₀.

7.5. Análisis del hierro intracelular por citometría de flujo

El análisis del hierro intracelular ligado al marcador fluorescente Calceína AM se realizó mediante citometría de flujo, en donde se realizaron corridas de 20,000 eventos para cada muestra, realizando tres ensayos independientes por triplicado. Los datos obtenidos, se examinaron y graficaron según lo descrito en la sección de métodos y técnicas. Los histogramas presentados a continuación corresponden a los resultados finales de la concentración de hierro intracelular por cada condición de cultivo (Figura 8). A partir de éstos se procedió a realizar el cálculo de la intensidad media de fluorescencia, cuyos valores son representados en formato de gráfica de barras (Figura 9).

En los histogramas la interpretación se realizó observando el desplazamiento de la señal de fluorescencia, ya que a mayor concentración de hierro intracelular la señal se desplaza hacia la derecha, indicando una mayor fluorescencia y viceversa.

Es destacable el comportamiento del hierro intracelular en los parásitos resistentes a metronidazol, ya que en la cepa TvRMtz-3 se observa un incremento del hierro intracelular muy cercano al observado en el control de alto hierro, para luego disminuir en TvRMtz-6 hasta un nivel basal cercano al de la cepa susceptible, e incrementar de nuevo en TvRMtz-15. Estos resultados se correlacionan con lo observado en el análisis por qRT-PCR para algunos genes, principalmente los que se ha descrito son regulados por hierro.

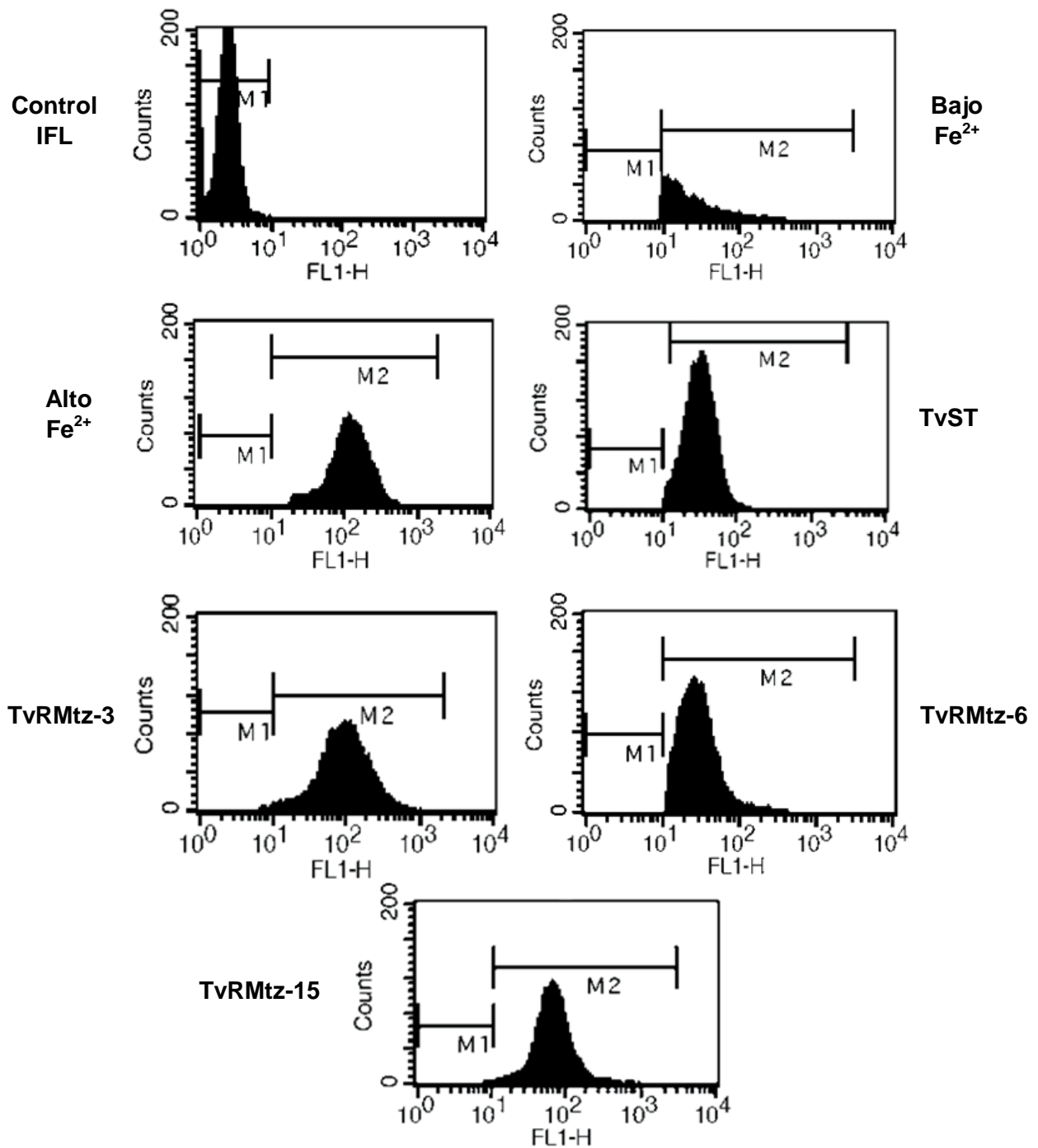


Figura 8. Histogramas representativos del análisis de fluorescencia del hierro intracelular por citometría de flujo. El eje X representa la Intensidad de fluorescencia (FL1-H), y el eje Y la concentración de parásitos en la muestra. Rango sin fluorescencia (M1), fluorescencia emitida por el indicador Calceína AM (M2), *T. vaginalis* sin tratamiento (TvST).

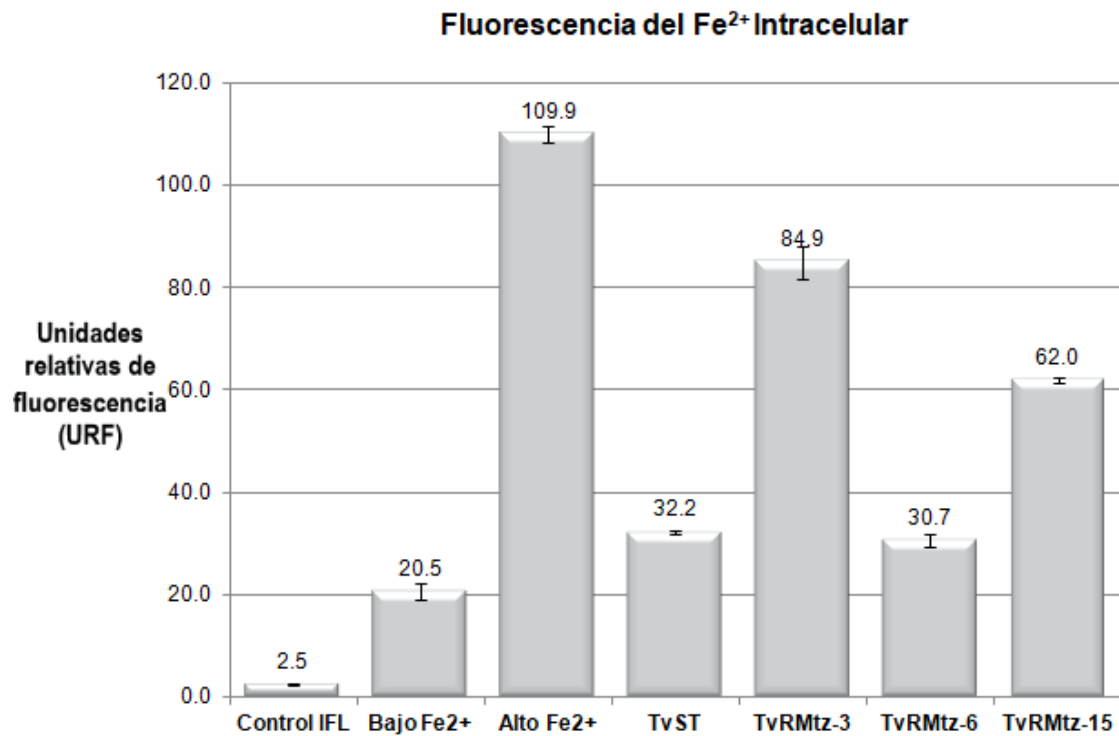


Figura 9. Representación cuantitativa de las URF del hierro intracelular para cada condición de cultivo. Las intensidades se obtuvieron a partir del área bajo la curva de los histogramas presentados previamente.

VIII. DISCUSIÓN

Los antibióticos pueden inducir la muerte celular a través de varios mecanismos de acción, incluyendo la inhibición de la transcripción, función ribosomal y biosíntesis de la pared celular.⁵⁵ Por otra parte la resistencia farmacológica en células eucariotas es un proceso complejo que usualmente involucra la activación/inactivación del fármaco y el eflujo o captación del mismo.²⁹ La evolución de la resistencia farmacológica en los microorganismos es frecuentemente adquirido por la adquisición de mutaciones espontáneas durante la terapia farmacológica.⁵⁶

Se ha demostrado que la disponibilidad del hierro es importante para la acción de los antibióticos⁵⁵ y en la resistencia al metronidazol, *T. vaginalis* optimiza aquellas rutas dependientes de hierro, ya que éste induce cambios en el transcriptoma y proteoma del parásito; por lo que se le considera de gran importancia en el desarrollo de la resistencia farmacológica.⁵⁷

Durante el estímulo con metronidazol aplicado a la cepa MICH01 altamente sensible, durante tiempos cortos (máximo 24 hrs) se observó la modificación en la expresión de algunos genes que codifican para proteínas involucradas en la cadena de transporte de electrones que participan directamente en la activación del fármaco, y se piensa que otros participan de manera indirecta ya sea en la eliminación del fármaco o en la detoxificación de la célula; por lo tanto, durante la inducción de resistencia al metronidazol y el análisis de los genes de las cepas obtenidas se esperaba obtener resultados similares. Las modificaciones observadas en la expresión de los genes no fueron constantes en la mayoría de ellos a diferencia de lo ya reportado para cepas resistentes. Los cambios que se observan en la expresión génica durante el estrés con metronidazol y en la primera cepa resistente a 3 μM son congruentes con lo ya reportado para otros protozoarios en tiempos cortos de exposición y para cepas altamente resistentes (>40 μM) que no fueron sometidas a un proceso de inducción de

resistencia⁵⁸ y se piensa que son principalmente debido a que el metronidazol genera estrés oxidativo en la célula por la generación de radicales libres, lo que influye en el aumento del nivel de expresión del gen que codifica para la Fe-SOD, ya que esta proteína tiene la función de proteger a la célula frente a los agentes oxidantes. Aun así, fue interesante observar el cambio cuando la cepa incrementa su nivel de resistencia, ya que a diferencia de lo mencionado anteriormente, el nivel de expresión del gen *Fe-SOD* disminuyó en comparación con los niveles basales de la cepa susceptible, resultado que fue congruente con lo reportado en cepas de *E. histolytica* en etapas tempranas de inducción de resistencia,⁴⁶ lo que podría implicar que la célula se adapta rápidamente a la exposición constante al fármaco en condiciones microaerófilas y que el efecto citotóxico del metronidazol se ve inactivado gracias a que el oxígeno y peróxido de hidrógeno productos finales generados por esta enzima, logran que el radical nitro pase de la forma reducida tóxica a su forma oxidada inactiva, y en combinación con las enzimas peroxiredoxina y flavina reductasa se logra amortiguar el daño oxidativo causado por los productos finales del metabolismo de la superóxido dismutasa. En este sistema antioxidante la tioredoxina reductasa igual participa donando electrones a la peroxiredoxina para que esta enzima pueda llevar a cabo su función. Entonces, al ir inactivando el fármaco que difunde hacia la célula, va disminuyendo la entrada del profármaco al interior del hidrogenosoma y éste deja de ser la causa principal de daño citotóxico, por lo que aumenta el nivel de resistencia del parásito y se genera la disminución de la expresión del gen *Fe-SOD* así como la activación de mecanismos que involucran otros genes o modificaciones post transcripcionales.

El aumento de la expresión de *PFO* observado al utilizar dosis subtóxicas de metronidazol y en la primera cepa resistente (TvRMtz-3), puede ser influenciado por la disminución en la transcripción del gen *Fe-Hyd*, que codifica para la Fe-hidrogenasa, enzima encargada de la producción de hidrógeno molecular, situada al final del mecanismo de transporte de electrones y la cual compite con

el fármaco por los electrones provenientes de PFO. Por lo tanto, de acuerdo al mecanismo antes mencionado se piensa que su disminución ocasionada por la activación del metronidazol, estimula un aumento en la expresión del gen que codifica para la PFO al haber un daño en el mecanismo que le confiere energía a la célula. El panorama cambia cuando el parásito adquiere resistencia al fármaco puesto que el nivel de expresión de *PFO* disminuye moderadamente en comparación con la célula sensible, cuyos datos concuerdan con lo reportado para *E. histolytica*, *T. vaginalis* y otros microorganismos.^{28, 35, 58, 59}

Esta situación puede ser ocasionada por el aumento gradual de la expresión de *Fe-Hyd* que resulta en un aumento de la concentración de la enzima, la cual mediante un mecanismo alterno desconocido puede obtener electrones para llevar a cabo su función, sin necesidad de emplear los electrones provenientes de *PFO* en cuyo caso ya no sería prioridad la transferencia de electrones hacia la hidrogenasa y de esta manera evitar la activación del fármaco con el consiguiente daño celular.^{58,59}

Durante el análisis del gen que codifica para la ferredoxina no se observaron cambios empleando dosis subtóxicas del fármaco, mientras que en las cepas resistentes se observó un incremento en el nivel de expresión; este hallazgo fue contrario a lo que se esperaba según lo reportado para cepas resistentes, en donde el nivel de transcripción del gen se reduce considerablemente en comparación con la cepa sensible y una disminución de la expresión del transcrito es consistente con una disminución de la habilidad del parásito de donar electrones al metronidazol.^{59,60,61} En este caso lo que se observa es un aumento en la expresión del gen *Fdx* contrario a lo reportado, y que además se correlaciona con la concentración de hierro intracelular de cada cepa. A pesar de lo obtenido no se podría decir que el parásito no desarrolla resistencia, ya que lo reportado en otros estudios se realiza en cepas altamente resistentes y en ambiente anaeróbico controlado, a diferencia de este ensayo que fue realizado en condiciones microaerófilas y donde se alcanzó apenas una resistencia a 15 μ M.

Además existen reportes de que en exposiciones cortas al metronidazol, el gen *Fdx* aumenta su expresión⁶² y que el silenciamiento de este gen no afecta en el desarrollo de la resistencia al metronidazol⁶³ lo que indicaría la fluctuación de los niveles de la expresión, en un intento de la célula de generar más energía debido a la disminución en la expresión del gen *PFO*, y el hierro intracelular, el cual es utilizado como cofactor para esta función.

Recientemente se ha reportado que el transportador TvZIP4 es una proteína que podría estar participando en la entrada de hierro a los trofozoitos de *T. vaginalis*⁶⁴ por lo que la disminución en la expresión del gen que codifica para éste durante el estrés con metronidazol se infiere que puede estar ligado a las fallas en el metabolismo del parásito ya que el fármaco utiliza el principal mecanismo de generación de energía del parásito para su activación; las proteínas que desarrollan esta función se regulan principalmente por el hierro intracelular, por lo que en situación de estrés la célula disminuye considerablemente la expresión del gen *TvZIP4* para evitar la entrada de hierro, ya sea para evitar 2 situaciones: la activación del metronidazol y la toxicidad debido al aumento de la concentración del hierro intracelular, situación que puede ser debido al daño en el metabolismo de utilización del hierro ocasionado por el fármaco; datos que pueden ser observados en el análisis del hierro intracelular. Este comportamiento es obtenido incluso en la cepa resistente TvRMtz-3; sin embargo cuando el parásito va adquiriendo más resistencia se obtuvo un aumento gradual del nivel de expresión hasta llegar al nivel basal, lo que lleva a pensar que el parásito ha logrado modificar su maquinaria celular y se encuentra adaptado a la exposición constante al fármaco.

Finalmente se podría decir que de acuerdo a lo obtenido en este estudio, es posible que existan diferentes rutas alternas aún no identificadas de obtención de energía, en donde se evite la activación del fármaco y el daño celular, así como la existencia de genes parálogos que den lugar a otras proteínas involucradas en la activación del metronidazol. También es importante mencionar la colaboración de otras proteínas y/o enzimas en el proceso de

inactivación del fármaco y la detoxificación de la célula, eventos que pueden suceder en conjunto y de forma gradual conforme aumenta la resistencia al fármaco, por lo que los datos presentados en este estudio se pretende generen las bases para poder dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en etapas tempranas de resistencia al metronidazol.

IX. CONCLUSIONES

El estrés de exposición a dosis subtóxicas de metronidazol en *T. vaginalis* induce una expresión diferencial a nivel de ARNm en los genes *PFO*, *TvZIP4*, *Fe-Hyd*, *Fe-SOD* los cuales codifican para la piruvato ferredoxina oxidoreductasa, transportador ZIP4, hierro hidrogenasa y hierro superóxido dismutasa respectivamente, las cuales utilizan al hierro como cofactor y además están involucradas en la activación del metronidazol.

La concentración del hierro intracelular cambió de manera gradual conforme aumentaba la resistencia del parásito, lo que se correlaciona con la expresión de algunos genes regulados por el mismo y se vislumbra como un elemento importante en la generación de resistencia al metronidazol en etapas tempranas de inducción de resistencia.

X. PERSPECTIVAS

De acuerdo a lo resultados obtenidos en el presente trabajo, se considera importante observar la expresión diferencial de los genes estudiados en etapas avanzadas de resistencia. De igual manera debido a que el hierro parece tener un papel fundamental en la resistencia a metronidazol, se plantea el hecho de que las CMI de las cepas resistentes pudieran manifestar cambios dependientes de las concentraciones de hierro; este hallazgo dejaría abierto el panorama para la búsqueda de dianas terapéuticas en el tratamiento de la tricomoniasis.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. El-Taweel H. Understanding drug resistance in human intestinal protozoa. *Parasitology Research*. 2015; 114(5): 1647–1659.
2. Sariego I, Rojas L. *et al.* Estudio de la susceptibilidad al metronidazol en aislamientos cubanos de *Trichomonas vaginalis*. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 2011; 37(2): 271-276.
3. Santos I. Tricomonirosis: una visión amplia. *IATREIA*. 2014; 27(2): 198-205.
4. Anuario 1984-2016 [Internet]. Dirección General de Epidemiología. 2017 [Consultado 7 de septiembre de 2017]. Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>
5. Poole D, McClelland R. Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. *Sexually Transmitted Infections*. 2013; 89(6): 418–422.
6. Ton Nu P, Nguyen V, Cao N. *et al.* Prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection in symptomatic and asymptomatic women in Central Vietnam. *Journal of Infection in Developing Countries*. 2015; 9(6): 655-660.
7. López M, Carballo M. Los nitroimidazoles como modelo de mutagénesis química y muerte celular. *Theoria*. 2008; 17(2): 47-62.
8. Löfmark S, Edlund C, Nord C. Metronidazole Is Still the Drug of Choice for Treatment of Anaerobic Infections. *Clinical Infection Diseases*. 2010; 50:16-23.
9. Hilal-Dandan R, Brunton L. Goodman and Gilman: Manual de farmacología y terapéutica. 2ª ed. México, D.F: Mc Graw Hill; 2015.
10. Meri T, Sakari T. *et al.* Resistance of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole: report of the first three cases from Finland and optimization of *in vitro* susceptibility testing under various oxygen concentrations. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; 38(2): 763–767.
11. Olivos A, Saavedra E, Nequiz M. *et al.* Amibiasis: mecanismos moleculares de *Entamoeba histolytica*. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. 2011; 54(2).

12. Vázquez F, García M, Pérez F. *et al.* *Trichomonas vaginalis*: tratamiento y resistencia a nitroimidazoles. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2001; 19(3): 114-124.
13. Apt WL. *Parasitología Humana*. 1ª ed. México, D.F: Mc Graw Hill; 2013.
14. Wassmann C, Hellberg A, Tannich E. *et al.* Metronidazole Resistance in the Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica* Is Associated with Increased Expression of Iron-containing Superoxide Dismutase and Peroxiredoxin and Decreased Expression of Ferredoxin 1 and Flavin Reductase. *Journal of Biological Chemistry*. 1999; 274(37): 26051-26056.
15. Dunne R, Dunn L, Upcroft P. *et al.* Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Research*. 2003; 13(4): 239-249.
16. Mayers D, *et al.* Mechanisms of Resistance in Metronidazole. *Antimicrobial Drug Resistance*. Springer International Publishing. 2017; 1 (19): 281-284.
17. Cabrera C. *et al.* La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica* 2007; 38(2).
18. Quesada C. Daño y respuesta al estrés oxidativo en bacterias del género *Bacteroides*: resistencia a los antimicrobianos y mecanismos de virulencia. *Revista Biomédica*. 2008; 19: 162-168.
19. Leitsch D. Drug Resistance in the Microaerophilic Parasite *Giardia lamblia*. *Current Tropical Medicine Reports*. 2015; 2(3): 128–135.
20. Meza-Cervantez P, González-Robles A, Cárdenas-Guerra R. Ortega-López J. *et al.* Pyruvate : ferredoxin oxidoreductase (PFO) is a surface-associated cell-binding protein in *Trichomonas vaginalis* and is involved in trichomonal adherence to host cells. *Microbiology*. 2011; 157(12): 3469–3482.
21. Franco D, Castillo S. Ferredoxinas. *Educación Química*. 2013; 24(4): 426-430.
22. Rocha, H. Cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa [Internet]. 2015 [consultado 9 de diciembre de 2015]. Disponible en: http://www.med.ufro.cl/clases_apuntes/cs_basica/bioquimica_dr_rocha/M-CAPITULO_12-vinc-segunda-edicion.pdf

23. Martínez S. Distribución de alcohol deshidrogenasas ADH1 y ADH4 en tejidos de rata: relevancia en el metabolismo de etanol y retinoides [Internet]. 2015 [consultado 9 de diciembre de 2015]. Disponible en: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3482/semr02de15.pdf;jsessionid=58308FFDFFF30E14B2C39ED5DC35CE59.tdx1?sequence=2>
24. Leitsch D, Janssen B, Kolarich D. *et al.* *Trichomonas vaginalis* flavin reductase 1 and its role in metronidazole resistance. *Molecular Microbiology*. 2014; 91(1): 198–208.
25. Ciclo de Krebs, área central metabólica [Internet]. 2015 [consultado el 9 de diciembre de 2015]. Disponible en: <http://www.bioquimicaqui11601.ucv.cl/unidades/krebs/metcddek5fid.html>
26. García B, et al. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: Superóxido dismutasas. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. 1995; 14(1)
27. Drago M. Sistemas de adquisición de hierro en *Salmonella* entérica. *Revista Biomédica*. 2009; 20(1): 41-54.
28. Veeranagouda Y, Husain F, Boente R. *et al.* Deficiency of the ferrous iron transporter FeoAB is linked with metronidazole resistance in *Bacteroides fragilis*. *Journal Antimicrobiology Chemotherapy*. 2014; 69: 2634–2643.
29. Penuliar G, Nakada-Tsukui K, Nozaki T. Phenotypic and transcriptional profiling in *Entamoeba histolytica* reveal costs to fitness and adaptive responses associated with metronidazole resistance. *Frontiers in Microbiology*. 2015; 6: 354.
30. Chong P, Lynch T, McCorrister S, *et al.* Proteomic Analysis of a NAP1 *Clostridium difficile* Clinical Isolate Resistant to Metronidazole. *PLoS ONE*. 2014; 9(1): e82622.
31. Leitsch D. Drug Resistance in the Microaerophilic Parasite *Giardia lamblia*. *Current Tropical Medicine Reports*. 2015; 2(3): 128–135.

32. Francesco V. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal. *World Journal Gastrointestinal Pathophysiology*. 2011; 2(3): 35-41.
33. Falagas M, Gorbach S. Clindamicina y metronidazol: Tratamiento antimicrobiano. *Clinical Medicine NA*. 1995; 4: 823-844.
34. Kulda J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *International Journal of Parasitology*. 1999; 29: 199-212.
35. Ontiveros L. Actividad biológica de factores difusibles de probióticos (FDP) sobre *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis* bajo condiciones axénicas *in vitro*. [Licenciatura]. UANL. Facultad de ciencias biológicas; 2011.
36. Cudmore S, Delgaty K. *et al.* Treatment of infections caused by metronidazole - resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clinical microbiology reviews*. 2004; 17(4): 783–793.
37. Sehgal R. *et al.* Trichomoniasis and Lactoferrin: Future Prospects. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 2012.
38. Leistch D, Frinic M, Kolarich D. Down-regulation of flavin reductase and alcohol dehydrogenase-1 (ADH1) in metronidazole-resistant isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2012; 183: 177– 183.
39. Leishct D, Janssen B, Kolarich D. *et al.* *Trichomonas vaginalis* flavin reductase 1 and its role in metronidazole resistance. *Molecular Microbiology*. 2014; 91(1): 198–208.
40. Rasoloson D, Tomkova E, Cammack R. *et al.* Metronidazole - resistant strains of *Trichomonas vaginalis* display increased susceptibility to oxygen. *Parasitology*. 2001; 123: 45-56.
41. Upcroft, J, Upcroft P. Drug susceptibility testing of anaerobic protozoa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001; 45(6): 1810–1814.
42. Upcroft J, Campbell R, *et al.* Efficacy of New 5-Nitroimidazoles against Metronidazole-Susceptible and Resistant *Giardia*, *Trichomonas*, and *Entamoeba* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999; 43(1): 73-76.

43. RNeasy Plus Mini Handbook – QIAGEN [Internet]. Qiagen.com. 2016. [Consultado 7 de octubre de 2016]. Disponible en: <https://www.qiagen.com/at/resources/resourcedetail?id=c8cdc6bf-5bbf-4e3b-a0f4-476da9215012&lang=en>
44. DNase I, RNase free – ThermoFisher Scientific [Internet]. Thermofisher.com. 2016 [Consultado 13 de octubre de 2016]. Disponible en: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012000_DNase_I_RNasefree_1UuL_UG.pdf
45. RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit – ThermoFisher Scientific [Internet]. Thermofisher.com. 2016 [Consultado 4 de noviembre de 2016]. Disponible en: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012715_RevertAid_FirstStrand_cDNA_Syn_K1621_UG.pdf
46. Lakshmi Rani Iyer *et al.* Differential Expression and Immunolocalization of Antioxidant Enzymes in *Entamoeba histolytica* Isolates during Metronidazole Stress. *BioMed Research International*. 2014; 1-11.
47. Upcroft J, Dunne L, Wrigth J. 5-Nitroimidazole Drugs Effective against Metronidazole - Resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006; 50(1): 344–347.
48. Dunne R, Dunn L, Upcroft P. *et al.* Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Research*. 2003; 13(4): 239-249.
49. Rasoloson D, Vanáčová S, Tomková E. *et al.* Mechanism of *in vitro* development of resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. *Microbiology*. 2002; 148: 2467–2477.
50. Máxima SYBR Green qPCR Master Mix – ThermoFisher Scientific [Internet]. Thermofisher.com. 2017 [Consultado el 2 de mayo de 2017]. Disponible en: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012924_Maxima_SYBR_GreenROX_qPCR_MasterMix_k0221_UG.pdf
51. Konjin A, Glickstein H, Vaisman B. *et al.* The cellular labile iron pool and intracellular ferritin in k562 cells. *Blood Journal*. 1999; 94 (6): 2128-2134.

52. Tenopoulou M, Kurz T, Doulias P. et al. Does the calcein-AM method assay the total cellular 'labile iron pool' or only a fraction of it? *Biochemical Society*. 2007; 403: 261–266.
53. Chang J, Ryang Y, Kim S. et al. *Trichomonas vaginalis*-induced apoptosis in RAW264.7 cells is regulated through Bcl-xL, but not Bcl-2. *Parasite Immunology*. 2004; 26: 141–150.
54. Calcein AM solution – Sigma Aldrich [Internet]. Sigmaaldrich.com. 2017 [Consultado el 16 de mayo de 2017]. Disponible en: http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/C1/C1359/C1359-100UL-PW___SIAL____.pdf
55. Yeom J, Imlay J, Park W. Iron Homeostasis Affects Antibiotic-mediated Cell Death in *Pseudomonas* Species. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285(29): 22689–22695.
56. Méhi O, Bogos B, Csörgo B. et al. Perturbation of iron homeostasis promotes the evolution of antibiotic resistance. *Molecular Biology Evolution*. 2014; 31(10): 2793-2804.
57. Bradic M, Warring S, Tooley G. et al. Genetic indicators of drug resistance in the highly repetitive genome of *Trichomonas vaginalis*. *Genome Biology Evolution*. 2017; 9(6): 1658-1672.
58. Samarawickrema N, Brown D, Upcroft J, et al. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1997; 40: 833–840.
59. Land K, Clemens D, Johnson P. Loss of multiple hydrogenosomal proteins associated with organelle metabolism and high-level drug resistance in trichomonads. *Experimental Parasitology*. 2001; 97: 102–110.
60. Quon D, D'Oliveira C, Jonnson P. Reduced transcription of the ferredoxin gene in metronidazole resistant *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings of National Academy of Sciences*. 1992; 89: 4402-4406.

61. Heidari S, Bandehpour M, Seyyed-Tabaei S. *et al.* Ferredoxin Gene Mutation in Iranian *Trichomonas vaginalis* isolates. Iranian Journal of Parasitology. 2013; 8(3): 402-407.
62. Tazreiter M, Leischt D, Hatzenbichler E. *et al.* *Entamoeba histolytica*: Response of the parasite to metronidazole challenge on the levels of mRNA and protein expression. Experimental Parasitology. 2008; 120: 403-410.
63. Land K, Delgadillo-Correa M, Tachezy J, *et al.* Targeted gene replacement of a ferredoxin gene in *Trichomonas vaginalis* does not lead to metronidazole resistance. Molecular Microbiology. 2004; 51(1): 115-122.
64. Fernández K, Álvarez M, Arana V. *et al.* Genome-wide identification, in silico characterization and expression analysis of ZIP-like genes from *Trichomonas vaginalis* in response to Zinc and Iron. Biometals. 2017; 1-13.