



UADY

CIENCIAS DE LA SALUD

POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS DE LA SALUD

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE
CODIFICAN TRANSPORTADORES TIPO ZIP Y CDF EN
Trichomonas vaginalis

Tesis presentada por:

QFB. Karla Guadalupe Fernández Martín

En opción al grado:

Maestra en Investigación en Salud

Directores de Tesis

Dr. Julio C. Torres Romero

M. en C. Claribel Huchin Chan

Mérida, Yucatán, Enero 2018



UADY

CIENCIAS DE LA SALUD

POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS DE LA SALUD

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE
CODIFICAN TRANSPORTADORES TIPO ZIP Y CDF EN
Trichomonas vaginalis

Tesis presentada por:

QFB. Karla Guadalupe Fernández Martín

En opción al grado:

Maestra en Investigación en Salud

Directores de Tesis

Dr. Julio C. Torres Romero

M. en C. Claribel Huchin Chan

Mérida, Yucatán, Enero 2018



"Luz, Ciencia y Verdad"

*Posgrado Institucional en
Ciencias de la Salud*

Oficio: PICSA/008/18.
Enero 16 de 2018.

La tesis, "**Análisis de la expresión de los genes que codifican transportadores tipo ZIP y CDF en *Trichomonas vaginalis***", presentada por la QFB. Karla Guadalupe Fernández Martín, 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

UADY
POSGRADO 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.pics.uady.mx>

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al comité tutorial, **Dra. Karla Acosta, Dra. Elizabeth Ortiz, Dr. Julio Lara, Dr. Alberto Vargas y Dr. Roberto Cedillo**, por su valioso tiempo y dedicación en la revisión de este trabajo, así como las observaciones para la mejora de este documento.

A mi director de tesis, el **Dr. Julio C. Torres Romero** por sus consejos, paciencia, conocimiento transmitido y apoyo incondicional. Gracias también por permitirme formar parte de su proyecto de investigación.

A mi directora de tesis, la **M. en C. Claribel Huchim Chan** por sus consejos, paciencia y apoyo para la realización de este trabajo de tesis.

A la **Dra. Norma Pérez** por su apoyo incondicional para terminar en tiempo y forma el posgrado.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular, por su amistad, su apoyo y por hacer del laboratorio un lugar agradable para trabajar.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización del posgrado.

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, como parte del proyecto de investigación “Identificación y caracterización de transportadores de iones divalentes (hierro, zinc y calcio) en el parásito protozoario *Trichomonas vaginalis*.” financiado por el CONACyT con registro CB-2014-01/237990.

ÍNDICE	
I. RESUMEN.	2
II. INTRODUCCIÓN.	4
III. ANTECEDENTES.	6
3.1. Generalidades de la tricomoniasis.	6
3.2. <i>Trichomonas vaginalis</i> .	7
3.2.1. Morfología.	7
3.2.2. Microambiente.	8
3.2.3. Adquisición de nutrientes.	9
3.3. Transportadores de iones.	10
3.3.1. Transportadores tipo ZIP.	11
3.3.2. Transportadores tipo CDF.	13
3.4. Transportadores tipo ZIP y CDF en otros microorganismos.	16
IV. OBJETIVOS.	18
V. HIPÓTESIS.	19
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.	20
6.1 Tipo de estudio.	20
6.2. Variables.	20
6.3 DIAGRAMA METODOLÓGICO (TRANSPORTADORES TIPO ZIP Y CDF).	21
6.4. Identificación de los genes TvZIP y TvCDF.	22
6.5. Análisis <i>in silico</i> de las secuencias de TvZIP y TvCDF.	22
6.6. Diseño de oligonucleótidos.	23
6.7. Identificación de los transportadores TvZIP y TvCDF en el genoma de <i>T. vaginalis</i> por PCR.	23
6.7.1. Cultivo de parásitos.	23
6.7.2. Extracción de ADN.	24
6.7.3. Amplificación de los transportadores TvZIP y TvCDF por PCR.	24
6.8. Efecto de metales traza sobre la expresión de los genes de transportadores ZIP y CDF.	27

6.9. Efecto en la expresión de los genes de transportadores ZIP y CDF bajo diferentes estímulos ambientales.....	28
6.9.1. Prueba de estrés oxidativo.....	28
6.9.2. Prueba de choque térmico.....	28
6.10. Extracción de ARN.....	29
6.11. Síntesis de ADN complementario.....	29
6.12. Amplificación de los transportadores TvZIP y TvCDF por RT-PCR. .	30
6.13. Plan de procesamiento de datos y presentación de resultados.....	31
VII. RESULTADOS.....	32
7.1. Análisis <i>in silico</i>.....	32
7.2. Identificación de los transportadores TvZIP y TvCDF por PCR.....	45
7.3. Efecto de los metales traza sobre la expresión de los genes de transportadores TvZIP y TvCDF.	49
7.4. Efecto en la expresión de los genes TvZIP y TvCDF bajo diferentes estímulos ambientales.....	54
VIII. DISCUSIÓN.....	63
IX. CONCLUSIONES.....	72
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
XI. ANEXOS	84
11.1 Análisis <i>in silico</i>.....	84
11.1.1 Transportadores tipo ZIP.....	84
11.1.2. Transportadores tipo CDF.....	86
11.1.3. Árbol filogenético de transportadores de tipo CDF.....	89
11.2. Expresión de HSP70 en parásitos tratados con H₂O₂.....	90
11.3 Artículo sobre los transportadores tipo ZIP encontrados en <i>T. vaginalis</i>.....	91
11.4. Capítulo de libro sobre los transportadores tipo CDF en <i>T. vaginalis</i>.	104

I. RESUMEN.

La tricomoniasis es un padecimiento que afecta a millones de personas alrededor del mundo y es causada por el parásito protozoario *Trichomonas vaginalis*, el cual requiere de diversos nutrientes como el zinc y el hierro para su desarrollo en el tracto genitourinario. En diversos eucariotas, se ha reportado que la adquisición de dichos iones es regulada a través de transportadores de iones tipo ZIP y tipo CDF.

Se realizó un BLAST en el genoma de *T. vaginalis* identificando *in silico* ocho secuencias tipo ZIP (TvZIP1-8) y ocho de tipo CDF (TvCDF1-8), las cuales se identificaron también de forma experimental en el genoma, además se determinó su expresión en diferentes condiciones: En altas concentraciones de zinc los transportadores TvZIP1, 3, 5 y 7, así como los TvCDF se regulan de forma negativa a excepción del TvCDF3 que muestra una regulación positiva. En concentraciones altas de hierro TvZIP2 mostró un aumento en los niveles de expresión, mientras que, TvZIP4 disminuyó su expresión en las concentraciones probadas. En la evaluación con peróxido de hidrógeno TvZIP1, 3-5, TvZIP7 y TvCDF1-8 disminuyeron los niveles de expresión después de los 60 min con el tratamiento de 400 μ M de H₂O₂. Con respecto al choque térmico a 43°C para TvZIP3, TvZIP4, ZIP6 y TvZIP7 y para los TvCDF 1, 2, 3, 6, 7 y 8 el mayor cambio en la expresión se observó a los 90 minutos de incubación.

Con base en los resultados obtenidos podemos inferir que *T. vaginalis* tiene dos de las principales familias de transportadores de iones (ZIP y CDF) que le permiten adaptarse a los constantes cambios en su microambiente como son el altas concentraciones de iones metálicos o situaciones de estrés que se presentan como parte de la respuesta inmune del huésped a la infección como el aumento de la temperatura o el estrés oxidativo y de esta forma colonizar el tracto genitourinario de hombre y mujeres.

II. INTRODUCCIÓN.

La tricomoniasis se considera como la infección de transmisión sexual (ITS), no viral, número uno en el mundo ya que la Organización Mundial de la Salud (OMS) la considera un problema de salud pública que afecta aproximadamente a 200 millones de personas al año. En México, se estima que tiene una incidencia de 104 casos por cada 100,000 habitantes, ubicándose entre las veinte causas de enfermedades transmisibles.¹⁻³

Dicha ITS es causada por el parásito *Trichomonas vaginalis*, el cual requiere de diversos nutrientes para su desarrollo en el tracto genitourinario debido a que no tiene la capacidad para producir los nutrientes necesarios para su supervivencia y desarrollo. Entre estos nutrientes se pueden mencionar los iones divalentes, entre los que destacan el hierro, calcio, zinc, entre otros.⁴⁻⁶

El zinc y el hierro son nutrientes esenciales que participa en la regulación de algunas propiedades de virulencia, tales como, la síntesis de metaloproteinasas relacionadas con la evasión del sistema inmune y la citotoxicidad. Por otro lado, dichos iones se ven relacionados con la estimulación de las adhesinas que participan en la citoadherencia del parásito así como con cisteínproteinasas que intervienen en el proceso de hemolisis.⁷

Debido a la importancia que tienen el zinc y el hierro se requiere comprender cómo el parásito adquiere estos nutrientes. En el caso de otros organismos eucariotas se ha reportado que existen dos familias de proteínas de transporte que permiten el transporte de dichos iones a través de la bicapa lipídica, estas son los transportadores del tipo ZIP y los del tipo CDF. Este tipo de transportadores se han identificado de forma experimental en diversos organismos, incluyendo parásitos, pero a la fecha no existen reportes en *T.*

vaginalis, por lo que hasta ahora, se desconoce el proceso por el cual dicho protozoo mantiene la homeostasis de estos metales traza.

Como se mencionó anteriormente, tanto el zinc como el hierro son importantes en la patogénesis de *T. vaginalis* por lo que conocer los mecanismos de regulación permitirá el desarrollo de nuevas estrategias para el control de la tricomoniasis. Es por eso que en este trabajo de tesis se propone el análisis de los genes de transportadores de tipo ZIP y CDF de *T. vaginalis*, así como la variación de su expresión en diferentes condiciones ambientales.

III. ANTECEDENTES.

3.1. Generalidades de la tricomoniasis.

La tricomoniasis es una ITS, no viral, extremadamente común en seres humanos causada por el parásito protozoario *T. vaginalis*. Según la OMS la tricomoniasis afecta cada año entre 160 y 180 millones de personas alrededor del mundo con edades entre 15 y 49 años y tiene una incidencia mundial de 276 millones de nuevos casos cada año.^{8,9}

En México, en el 2011 se notificaron 113,843 casos con una incidencia de 104 por cada 100,000 habitantes ocupando el lugar número doce entre las veinte principales causas de enfermedades transmisibles. En el reporte de enfermedades de transición sexual del año 2016 se notificaron 48,507 casos, y para este año, hasta la semana 49 se reportan 45,156 casos. Las mayores cifras hasta este momento se registran en Veracruz, Puebla y el Estado de México. La tricomoniasis afecta principalmente a mujeres entre los 25 y 44 años de edad, con 110,775 casos del total según el reporte epidemiológico de morbilidad realizado en 2011.^{3,10,11}

La tricomoniasis en las mujeres se caracteriza por vaginitis, por pequeñas lesiones hemorrágicas puntiformes en el cérvix (cérvix en forma de fresa) y una secreción espumosa verde amarillenta de olor fétido, se le relaciona con uretritis o cistitis además de que ocasiona complicaciones durante el embarazo. En los hombres, el parásito se desarrolla en la próstata, uretra o vesículas seminales, puede producir síntomas leves y se le atribuye 5 o 10% de las uretritis no gonocócicas.^{12,13}

Esta ITS también se ha asociado a inflamación pélvica atípica, infertilidad, cáncer cervical, neoplasia intraepitelial cervical, cáncer de próstata, aumenta la

susceptibilidad a la infección y transmisión del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y virus del papiloma humano (VPH). Sin embargo, a pesar de estas consecuencias y la incidencia reportada esta ITS no es de reporte obligatorio por lo tanto se desconoce el número real de personas afectadas por dicho padecimiento.^{12,14,15}

El método de diagnóstico más común es la visualización del parásito en una preparación salina del flujo vaginal, secreción prostática o flujo uretral. Así como puede identificarse en papanicolaou, pruebas inmunológicas, pruebas de sensibilidad a oligonucleótidos y por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Sin embargo, el método de oro para su detección es el cultivo del parásito.^{16,17}

En cuanto al tratamiento de la tricomoniasis se requiere que éste sea rápido y eficaz, así que se recurre a los fármacos de la familia de los nitroimidazoles entre los que destacan el metronidazol (MTZ) y el tinidazol (TNZ). Dichos medicamentos se han empleado por más de 30 años, siendo el MTZ el tratamiento de mayor elección debido a su bajo costo y su disponibilidad en los sistemas de salud pública. Por otro lado, el TNZ si bien tiene una vida media más larga y alcanza altas concentraciones sanguíneas más rápido que el MTZ es más caro.^{9,16,18}

3.2. *Trichomonas vaginalis*.

3.2.1. Morfología.

T. vaginalis es un parásito protozoario descrito en 1836 por Alfred Donné como “animalículos” que se encontraban presentes en secreciones genitales, posteriormente, se le nombro como *T. vaginalis* debido a que se demostró que la vagina es su hábitat normal.^{12,19}

Este protozoo flagelado mide entre 10 y 30 micrómetros de longitud y de 5 a 12 micrómetros de ancho, puede presentar diversos aspectos, por ejemplo, en cultivos *in vitro* se puede observar ovoide o piriforme, pero cuando dicho parásito se adhiere a las células del epitelio genital adopta una forma ameboide. Posee cinco flagelos de los cuales cuatro se encuentran en la porción anterior, el quinto flagelo se encuentra en la parte posterior y forma parte de la membrana ondulante.^{20,21}

La forma infectante del parásito es el trofozoíto, no se ha descrito la forma de quiste; sin embargo, en condiciones desfavorables este puede adoptar una configuración de pseudoquiste internalizando sus flagelos. El citoesqueleto de *T. vaginalis* se compone de tubulina y fibras de actina, el núcleo se encuentra en posición anterior, debajo de éste surge una pared sólida llamada axostilo que se encuentra de forma longitudinal en el parásito, además posee aparato de Golgi, retículo endoplásmico e hidrogenosomas.^{11,14,15}

3.2.2. Microambiente.

Durante la transmisión entre hospederos masculinos y femeninos, *T. vaginalis* está expuesta a cambios ambientales drásticos, que incluyen variaciones de pH, temperatura, la presencia de lactobacilos, cambios hormonales cíclicos, descamación del epitelio, flujo menstrual en el caso de las mujeres, nutrientes escasos y fluctuación en las concentraciones de hierro (vagina) y zinc (próstata), poliaminas, respuesta inmunitaria del huésped, entre otras. Por lo que, para poder causar una infección crónica no mortal a los humanos requiere de una gran capacidad adaptativa además de múltiples recursos como son: la adquisición de nutrientes, la evasión de la respuesta inmune, la expresión coordinada y alternada de múltiples genes, etc. Además de moléculas de defensa para neutralizar los efectos del oxígeno ya que dicho parásito es microaerófilo.^{7,22,23}

3.2.3. Adquisición de nutrientes.

El parásito protozoario *T. vaginalis* necesita para su crecimiento de un gran número de nutrientes y metabolitos preformados como carbohidratos, aminoácidos, purinas, pirimidinas, iones metálicos divalentes (hierro, calcio y zinc), ácidos grasos y esteroides, ya que carecen de citocromos y de las rutas metabólicas de los ácidos tricarboxílicos y de la fosforilación oxidativa.^{7,19}

Dichos nutrientes, en especial los metales traza, participan en su proceso de patogénesis, el cual es un proceso multifactorial que comienza con la adhesión del parásito a la célula huésped (células epiteliales y eritrocitos), seguido por la producción de un efecto citotóxico sobre la célula blanco, la hemólisis y que finaliza con la fagocitosis de la misma.^{24,25}

En el caso del particular del zinc (Zn^{2+}), se ha propuesto que participa en la regulación y síntesis de metaloproteinasas como la TvMP50 y GP63 relacionadas con la evasión del sistema inmune y la citotoxicidad. Con respecto a la adhesión, se ha reportado que cuatro de las cinco adhesinas del parásito, AP23, AP53, AP51 y AP65-1, son reguladas de forma transcripcional por Zn^{2+} .^{4,7,26}

Igualmente, como elemento traza, se ha propuesto al Zn^{2+} como posible regulador de muchas proteínas que contienen dominios de “dedos de zinc” las cuales han sido identificadas de acuerdo con su genoma y otros de manera experimental como la proteína HMP35 que presenta una secuencia de cisteínas similar al dominio de dedos de zinc RING.^{4,27} Por otro lado, existen estudios que consideran que el Zn^{2+} tiene un efecto tóxico sobre *T. vaginalis*, el cual se ha visto que es dependiente de la concentración y que dicho efecto sólo se observa en altas concentraciones, pero, en concentraciones menores a 1.6 mM (concentración mínima inhibitoria) el parásito se adapta y parece adquirir cierta tolerancia o resistencia al Zn^{2+} .²⁸

En el caso del hierro (Fe^{2+}), se ha reportado que es de suma importancia para el crecimiento y el mantenimiento de la infección por *T. vaginalis*, también estimula la citoadherencia y la resistencia al complemento pero, reduce la citotoxicidad y la inducción de la apoptosis de la célula huésped.^{6,22}

En el caso de algunas proteínas esenciales para el parásito se ha descrito que algunas se regulan de forma positiva por Fe^{2+} , como las adhesinas (AP120, AP65, AP51 AP33 y AP23) y de forma negativa como las cisteínproteinasas TVCP12, TVCP65 y TVCP39. Además, el Fe^{2+} también participa en la relocalización celular de las adhesinas, la expresión de TvGAPDH y TvLEGU-1 proteínas que participan en la citoadherencia y de TvLIP importante para el proceso de hemolisis.^{6,7,25}

La adquisición de los nutrientes necesarios para la supervivencia, desarrollo y patogénesis del parásito es a través de la fagocitosis de las células epiteliales y las secreciones vaginales, por otro lado, la membrana celular del parásito permite la incorporación de los nutrientes a través de proteínas de transporte que han no han sido descritas. Sin embargo, en otros microorganismos eucariotas se reportan, de manera particular, la presencia de diversas proteínas que participan en el transporte de nutrientes y en la absorción, secuestro y salida de iones divalentes como el Fe^{2+} y el Zn^{2+} .^{7,19,29}

3.3. Transportadores de iones.

Las proteínas de transporte son las encargadas de mantener la homeostasis del Zn^{2+} , Fe^{2+} y otros metales traza en las células eucariotas a través de procesos de absorción, secuestro y salida de dichos iones, ya que, en algunos casos la acumulación excesiva en la célula puede causar citotoxicidad.³⁰

Estos transportadores también permiten a la célula controlar los niveles intracelulares cuando se exponen a concentraciones altas de Zn^{2+} o Fe^{2+} o

cuando los niveles extracelulares son bajos, esto al facilitar el secuestro intracelular dentro de los orgánulos o eflujo de iones a través de la membrana plasmática.^{31,32}

Entre los transportadores de iones se encuentran los transportadores ABC, los transportadores de la RND (Transportador de Resistencia, Nodulación y División) y las proteínas CorA las cuales se han reportado en bacterias, también se han encontrado ATPasas de tipo P en algunas células eucariotas. Sin embargo, las dos familias de transportadores que se encuentran comúnmente en células eucariotas para el transporte de iones metálicos son la familia de transportadores tipo ZIP y la familia transportadores tipo CDF. De forma general la familia ZIP se encarga de la absorción y el transporte de Zn^{2+} y Fe^{2+} desde fuera de la célula hasta el citoplasma, mientras que la familia CDF permite el eflujo de estos iones de la célula.^{30,33,34}

3.3.1. Transportadores tipo ZIP.

La familia de transportadores ZIP (Zinc Regulated Transporter-, Iron Regulated Transporter- like protein, por sus siglas en inglés) recibe su nombre debido a los dos primeros miembros que se identificaron, ZRT1 y ZRT2 de *Saccharomyces cerevisiae* e IRT1 de *Arabidopsis thaliana*, los primeros son transportadores de Zn^{2+} en una levadura y los segundos son transportadores de Fe^{2+} en una planta; a esta familia también se le denomina como SLC39A (Solute-Linked Carrier 39 A, por sus siglas en inglés). Su función es la de transportar iones metálicos desde fuera de la célula hasta el citoplasma.^{35,36}

En el año 2001, había 86 secuencias de proteínas ZIP registradas en la base de datos perteneciente al Centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI, por sus siglas en inglés), para este año se tiene un registro de 71,469 secuencias aminoacídicas. Gaither y Eide mencionan que el aumento en estos

registros se debe a la utilización de herramientas de análisis de bases de datos más sensibles.^{30,37}

Los transportadores ZIP se pueden agrupar en dos familias de acuerdo con las similitudes entre los aminoácidos que los conforman, la primera subfamilia (ZIP I) incluye genes de hongos, plantas y un protozoo; en la segunda subfamilia (ZIP II) se agrupan genes de mamíferos y nematodos. Sin embargo, Gaither y Eide, por medio de un análisis bioinformático identificaron a dos subfamilias más a las que denominaron *gufA* y LIV-1/LZT donde incluyen en general a proteínas de eucariontes.³⁸⁻⁴⁰ Este tipo de proteínas de transporte se han identificado en diferentes organismos, por ejemplo, en humano se reportan 14 transportadores, de los cuales ZIP1, ZIP2 y ZIP3 corresponden a la subfamilia ZIP II y ZIP5, ZIP6 y ZIP10 pertenecen a la subfamilia LIV-1. En la subfamilia *gufA* se encuentra la proteína *gufA* de *Myxococcus xanthus*, la cual se identificó y clasificó por secuencia en dicho grupo, sin embargo, su función aún no ha sido descrita de forma experimental.^{31,36,41}

La mayoría de las proteínas que conforman la familia ZIP, son homodímeros que poseen ocho dominios transmembrana y una topología similar donde los extremos amino y carboxilo terminal se encuentran fuera de la membrana, la longitud de dichas proteínas es de 309 a 476 aminoácidos, esta diferencia se debe a la región variable que se encuentra en los dominios transmembrana III y IV, y que es rica en histidina. En los dominios transmembrana IV y V se encuentra una región rica de histidina, la cual se ha predicho con forma de hélice anfipática que junto con un residuo polar adyacente forman el sitio de unión intramembranal para metales pesados como zinc, hierro, manganeso, cobre y cadmio. Por último, la región II y III que se encuentra en el exterior de la membrana, podría ser el sitio de unión del sustrato durante el proceso de transporte (Figura 1).^{36,38,39}

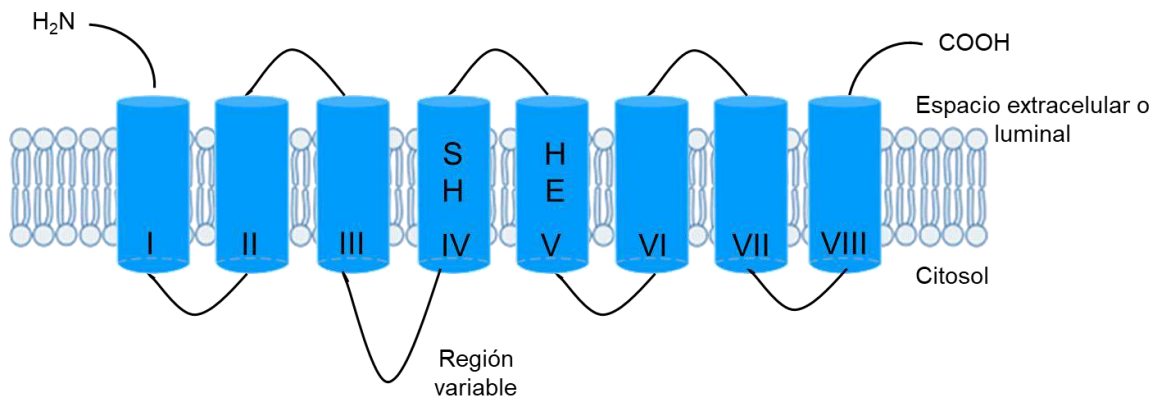


Figura 1. Representación gráfica de un transportador tipo ZIP. Se enumeran las ocho regiones transmembrana (RTM) descritas para este tipo de transportadores, se señalan los aminoácidos H-S y H-E en las RTM IV y V respectivamente que son importantes para la unión del metal, así como la región variable.^{31,36}

3.3.2. Transportadores tipo CDF.

La familia de transportadores conocida como Facilitadores de Difusión de Cationes (CDF, por sus siglas en inglés) pueden encontrarse en bacterias, arqueas y eucariotas, estas proteínas fueron descritas en la década de 1990 y el primer miembro que se caracterizó fue CzcD que desempeña un papel importante en la resistencia a metales pesados de *Cupriavidus metallidurans* (anteriormente *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia metallidurans*) A esta familia de transportadores también se le conoce como ZnT (Zinc Transporters) SLC30 (Solute-Linked Carrier 30).^{34,42,43}

Los transportadores CDF se encargan del transporte de Zn^{2+} , cadmio (Cd^{2+}), cobalto (Co^{2+}), manganeso (Mn^{2+}), níquel (Ni^{2+}) y Fe^{2+} , por lo que se divide en tres grupos según la especificidad de los iones metálicos, el primero es el conformado por Mn^{2+} -CDF, el segundo por Fe^{2+}/Zn^{2+} -CDF y el tercero por Zn^{2+} -CDF. Recientemente, se realizó un análisis filogénico de la familia de transportadores CDF encontrando que contiene 18 clados, de los cuales 13 tienen por lo menos un CDF caracterizado y 5 subtipos que contienen CDF no

caracterizado, también se identificaron 8 clados en los que se encontraba presente el Zn^{2+} lo que sugiere que los transportadores son polifiléticos.^{32,44}

Las proteínas que conforman la familia CDF tienen la función de transportar iones metálicos desde el citoplasma hacia afuera de la célula, pero diversos autores mencionan que, CDF en eucariotas tiene una función adicional como un transportador intracelular de sustratos. Por ejemplo, en *Saccharomyces cerevisiae*, la proteína MSC2 media la exportación de iones desde el núcleo hasta el citoplasma, mientras que otros dos CDF (MMt1 y MMT2) se encargan de exportar Fe^{2+} en las mitocondrias. En las plantas se ha reportado el transporte de Zn^{2+} por este tipo de transportadores mientras que, en humanos los CDF (ZnT) se encuentra en la membrana celular y funcionan como exportadores de iones Zn^{2+} , otros se encuentran en la membrana de organelos intracelulares que se encargan de secuestrar Zn^{2+} en compartimientos celulares como lisosomas, vesículas secretoras y aparato de Golgi.^{32,34}

El modelo estructural de los transportadores CDF que se describió en un principio fue CzcD de *C. metallidurans* (Figura 2) que consiste en seis dominios transmembrana de los cuales los dominios I, II, V y VI son antipáticos y se reporta que forman un canal, mientras que, los dominios III y IV se localizan en la parte lipídica del lado externo de la membrana. La región II, V y VI tienen una región conservada de aspartato que se postula como sitio de unión al zinc. Otros autores reportan que los residuos de aspartato en las regiones transmembrana V y VI se relacionen de forma importante con el transporte del Zn^{2+} . Sin embargo, en las regiones transmembrana II y V se encuentran también dos residuos de histidina que de igual forma se relacionan con el transporte del Zn^{2+} , pero, el ácido glutámico en la región transmembrana I no se ha relacionado con esta actividad de transporte. Al igual que los transportadores de tipo ZIP, los CDF cuentan con una región rica en histidinas.^{30,34,44}

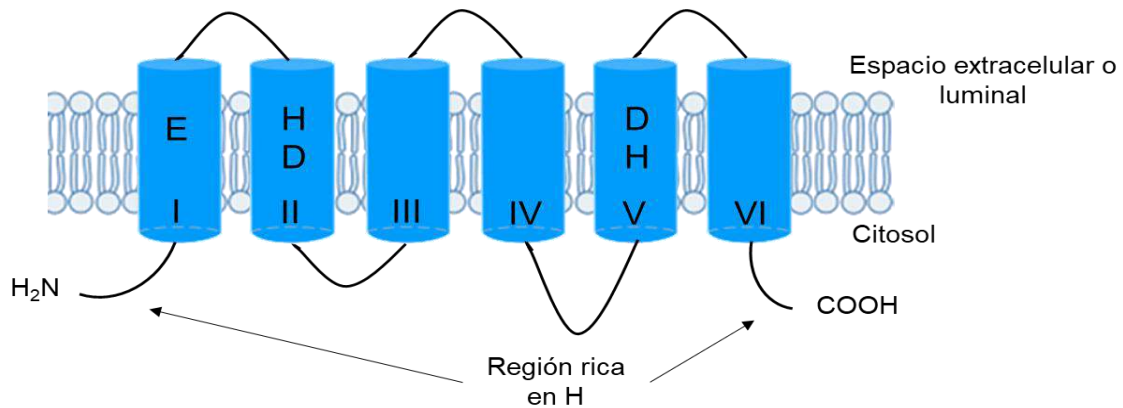


Figura 2. Representación gráfica de un transportador CDF. Se enumeran las seis regiones transmembrana para los transportadores CDF así como los aminoácidos conservados E en RTM-I, H-D en RTM-II y H-D en RTM-V importantes para la unión y transporte del metal, de igual forma se señalan las regiones ricas en H que contribuyen a la función del transportador.^{30,45}

Posteriormente, en 2007 se elucida la estructura en 3D del transportador YiiP (FieF) encontrado en *E. coli* (Figura 3). El transportador YiiP asemeja una Y con cada brazo formando un dominio transmembrana, dicho transportador es un homodímero formado por dos proteínas integrales de membrana (33 kD cada una) compuestas cada una de seis segmentos transmembrana y un dominio carboxilo terminal (C-terminal) situado en el citoplasma. Dos bandas de residuos aromáticos en la superficie de las proteínas sugieren el límite de la región de la membrana mientras que los dominios C-terminal sobresalen hacia el citoplasma y se yuxtaponen entre sí para formar el área de dimerización. La unión de los dominios carboxilo y transmembrana forman un bucle intracelular formando otra zona de dimerización. Las seis hélices transmembrana están unidas entre sí por tres bucles extracelulares denominados como EL1, EL2, EL3 y dos bucles intracelulares nombrados como IL1 e IL2. Un bucle adicional IL3 une al dominio C-terminal y el dominio transmembrana VI. Cada protómero de YiiP contiene sitios de unión al Zn²⁺ que permiten la estabilización del dímero.^{34,46,47}

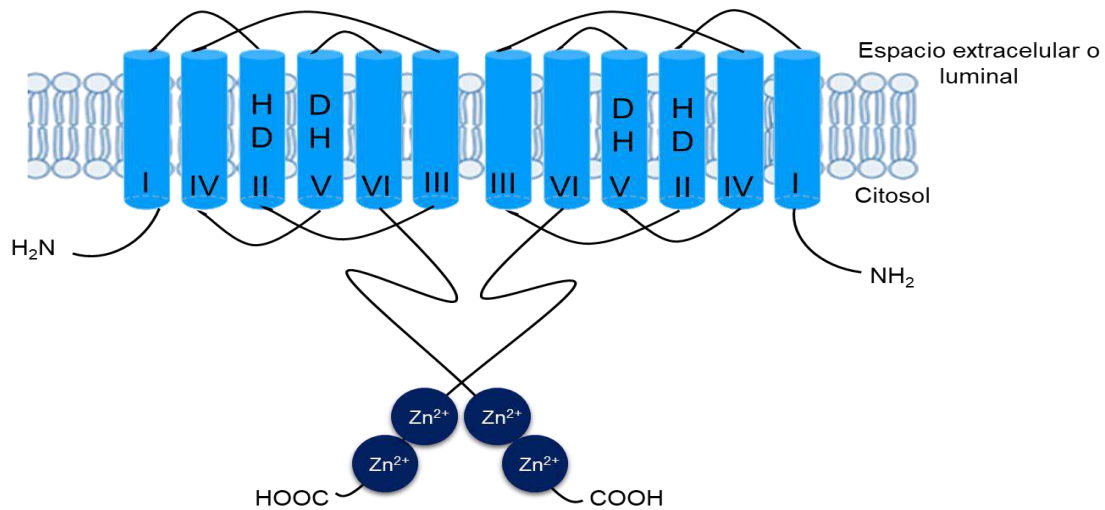


Figura 3. Representación gráfica de un transportador CDF-FieF. Homodímero formado por dos proteínas integrales de membrana compuestas cada una de seis regiones transmembrana, en las RTM II y V se señalan los aminoácidos conservados (H-D, H-D) importantes para la función, así como el área de dimerización y los sitios de unión al zinc.^{31,48}

3.4. Transportadores tipo ZIP y CDF en otros microorganismos.

Como se mencionó, los transportadores de tipo ZIP y CDF son importantes para la homeostasis de diversos iones metálicos entre los que se encuentra el Zn^{2+} y el Fe^{2+} , debido a esto algunos investigadores se han dado a la tarea de estudiar este tipo de proteínas en diversos seres vivos, encontrando que, estos transportadores tienen diferentes miembros y dependiendo del organismo y las condiciones ambientales es posible encontrar más de uno en la membrana. (Cuadro 1).

Cuadro 1. Número de transportadores ZIP y CDF encontrados en diferentes organismos.

Organismo	Transportador		Referencias
	ZIP	CDF	
<i>Homo sapiens</i>	11	14	Kambe T. <i>et al</i> 2015. ³¹
<i>Arabidopsis thaliana</i>	18	13	Grotz N. <i>et al</i> 1998 ⁴⁹ , Kobae Y. <i>et al</i> 2005. ⁵⁰
<i>Leishmania major</i>	4	4	Jacques I. <i>et al</i> 2010 ⁵¹ , Huynh C. <i>et al.</i> 2006. ⁵²
<i>Trypanosoma brucei</i>	5	7	Kramer U. <i>et al</i> 2007. ³³
<i>Caenorhabditis elegans</i>	6	8	Guerinot M. 2000 ³⁹ , Cheol H., <i>et al</i> 2013. ⁵³
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5	5	Kramer U. 2008 ³³ , Nies D. 2003. ⁵⁴
<i>Escherichia coli</i>	NI	2	Fu D. 2010 ⁵⁵ , Anton A. <i>et al</i> 2004. ⁴²
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	NI	5	Eide L. 2001. ³⁰
<i>Drosophila melanogaster</i>	5	7	Mathews F. 2005 ⁵⁶ , Pielage <i>et al</i> 2004. ⁵⁷

NI: No Identificado.

IV. OBJETIVOS.

Objetivo general.

Evaluar la expresión de los genes que codifican transportadores de zinc pertenecientes a las familias ZIP y CDF en el parásito *Trichomonas vaginalis*.

Objetivos específicos.

1. Identificar y analizar *in silico* los genes de transportadores ZIP y CDF presentes en el genoma de *Trichomonas vaginalis*.
2. Identificar en el genoma de *T. vaginalis* la secuencia de genes de transportadores tipo ZIP y CDF previamente identificados *in silico*.
3. Analizar el efecto de metales traza (zinc y hierro) sobre la expresión de los genes de transportadores tipo ZIP y CDF.
4. Analizar el efecto de diferentes estímulos ambientales (choque térmico y estrés oxidativo) sobre la expresión de los genes de transportadores tipo ZIP y CDF.

V. HIPÓTESIS.

El parásito protozoario *T. vaginalis* contiene genes que codifican proteínas tipo ZIP y CDF y su expresión es dependiente de las condiciones nutricionales y ambientales.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Tipo de estudio.

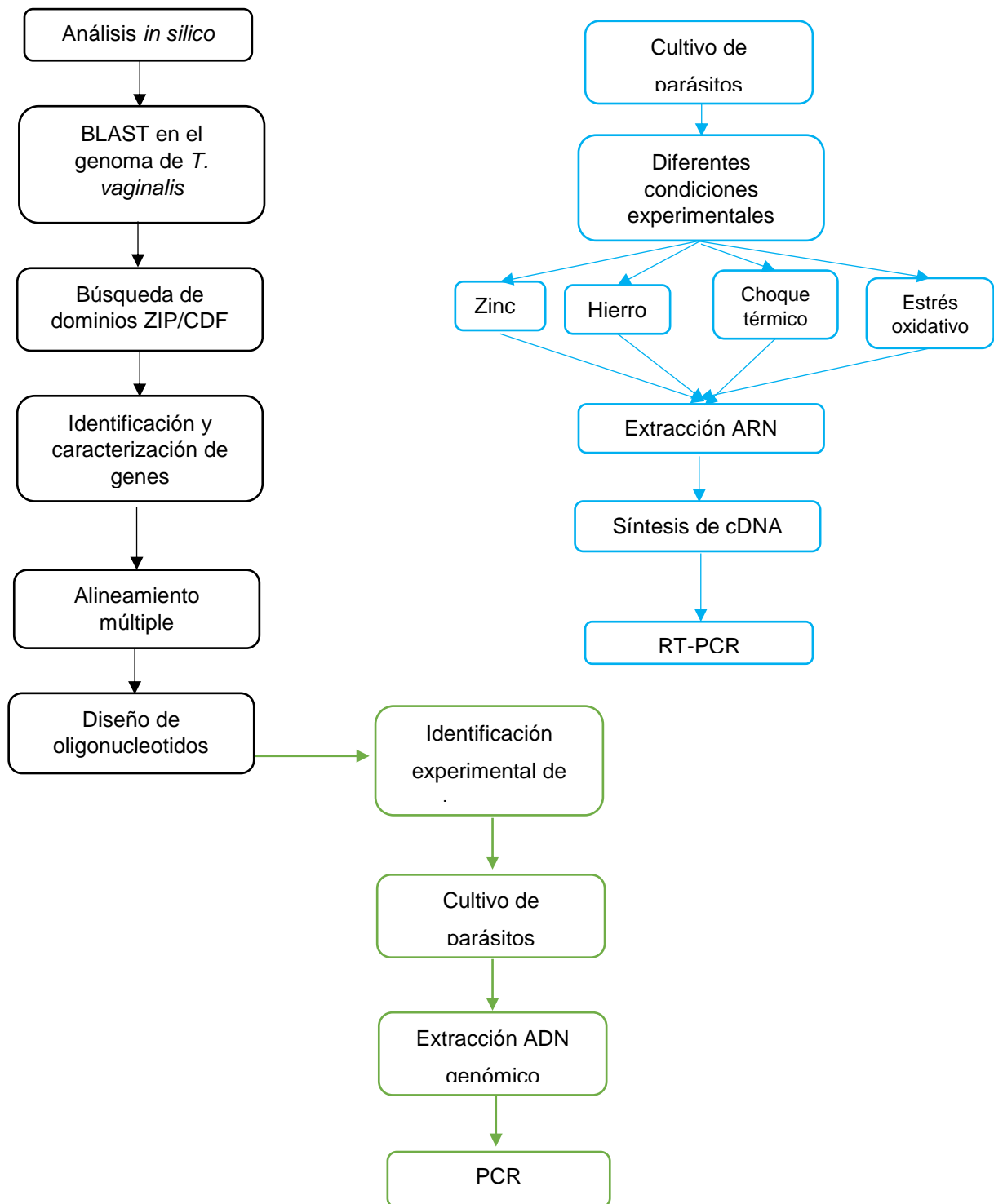
Se llevó a cabo un estudio de tipo experimental

6.2. Variables.

Cuadro 2. Variables que se analizaran en el proyecto de tesis.

Variable dependiente	Variable independiente	Definición operacional	Medición
Expresión de transportadores tipo ZIP	Concentraciones de los metales traza y la exposición a los diferentes estímulos ambientales	Semicuantitativa	RT-PCR duplex
Expresión de transportadores tipo CDF	Concentraciones de los metales traza y la exposición a los diferentes estímulos ambientales	Semicuantitativa	RT-PCR duplex

6.3 DIAGRAMA METODOLÓGICO (TRANSPORTADORES TIPO ZIP Y CDF).



6.4. Identificación de los genes TvZIP y TvCDF.

Las secuencias de transportadores tipo ZIP ya caracterizados: IRT1 de *A. thaliana* (No. GenBank: AAB01678.1), ZRT1 (No. GenBank: P32804.1) y ZRT2 (No. GenBank: NP_013231) de *S. cerevisiae* y de transportadores tipo CDF CzcD de *C. metallidurans* (No. GenBank: CAA67085), YiiP (No. GenBank: P69380.1) de *E. coli* y ZRC1 (No. GenBank: NP_013970) de *S. cerevisiae* fueron utilizadas para realizar una búsqueda tipo BLAST para encontrar genes homólogos tipo ZIP (TvZIP) y CDF (TvCDF) en el genoma de *T. vaginalis* albergado en la bases de datos TrichDB (<http://trichdb.org/trichdb/>).

6.5. Análisis *in silico* de las secuencias de TvZIP y TvCDF.

Una vez identificados los genes TvZIP y TvCDF se realizó un análisis de dominios conservados en el programa SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) con la secuencia de aminoácidos, de igual forma se realizó un alineamiento múltiple con el algoritmo MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) y se editó usando el programa BOXSHADE con una fracción de umbral de 0.3, posteriormente, la predicción de las regiones transmembrana se realizó con el programa MEMSAT-SVM (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>); la localización subcelular se predijo con el programa CELLO (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) y la función putativa de los transportadores se realizó con la herramienta PFP del servidor Kihara Bionformatics (<http://kiharalab.org/web/pfp.php>). Por otro lado, las propiedades fisicoquímicas como longitud de las secuencias, peso molecular y punto isoeléctrico se analizaron mediante el servidor ProtParam de ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Por último, para establecer la relación evolutiva entre las secuencias de los TvZIP y TvCDF encontrados se realizó un análisis filogenético con proteínas ya caracterizadas pertenecientes a las diferentes subfamilias de los transportadores tipo ZIP y CDF utilizando el método Neighbor-Joining con el modelo de sustitución

de Jones-Taylor-Thornton (JTT) con un bootstrap de 1000 repeticiones, esto en el programa MEGA 7.0 (www.megasoftware.net).

6.6. Diseño de oligonucleótidos.

Las secuencias de nucleótidos fueron analizadas mediante alineamiento múltiple en el programa MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) para identificar el porcentaje de identidad entre las secuencias de los transportadores TvZIP y TvCDF.

Tomando en cuenta los porcentajes de identidad obtenidos entre las secuencias se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada una, esto se realizó con el programa Prime-BLAST contenido en la base de datos del Centro Nacional para Información de Biotecnología (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

6.7. Identificación de los transportadores TvZIP y TvCDF en el genoma de *T. vaginalis* por PCR.

6.7.1. Cultivo de parásitos.

El cultivo de parásitos en condiciones normales se realizó con el aislado clínico caracterizado denominado *T. vaginalis* MICH01, donado por la Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, el cual se cultivó en tubos de vidrio con 5 mL de medio TYM (Tryptona-Levadura-Maltosa) a pH 6.5, suplementado con 18% de suero de caballo (SC) inactivado por calor y se incubaron a 37°C para posteriormente ser cosechados en fase logarítmica de crecimiento.

6.7.2. Extracción de ADN.

Una vez cosechados los parásitos se realizó la extracción de ADN, lo que permitió la identificación de los genes de los transportadores. Dicha extracción se realizó con el estuche comercial Wizard genomic (PROMEGA, No. catálogo A1125) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, los parásitos cultivados se lavaron tres veces con PBS, se contaron en una cámara de Neubauer para obtener la cantidad de 20×10^6 parásitos a los que se les añadieron 600 μ L de la solución de lisis, posteriormente, se añadieron 3 μ L de la solución RNAsa y se incubó 30 minutos a 37°C, luego se añadieron 200 μ L de la solución de la precipitación de proteínas, se homogenizó y se dejó en hielo durante 5 minutos para luego centrifugar a 14,000 g durante 4 minutos. El sobrenadante obtenido se traspasó a un tubo con 600 μ L de isopropanol, se homogenizó y se centrifugó a 14,000 g durante 1 minuto. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 600 μ L de etanol al 70%, se centrifugó nuevamente a 14,000 g durante 1 minuto, seguidamente se decantó el sobrenadante y la pastilla obtenida se dejó secar durante 15 minutos. Por último, se rehidrató el ADN durante 1 hora en 100 μ L de solución de rehidratación a 65°C. Posteriormente se realizó la PCR.

6.7.3. Amplificación de los transportadores TvZIP y TvCDF por PCR.

Posterior a la extracción del ADN se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en punto final para la amplificación de los transportadores TvZIP1-8 y TvCDF1-8 previamente identificados por métodos *in silico*, para lo cual en un microtubo de 0.2 mL se añadieron los reactivos a las concentraciones indicadas en el cuadro 3. Seguidamente, se colocaron los tubos en el termociclador y se programó un ciclo de desnaturalización a 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, templado a 57.7°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 7 minutos. Para la visualización de los productos de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador de rayos UV (Gel Doc XR System, Bio-Rad), obteniendo

las bandas correspondientes a los pesos de los amplicones señalados en los cuadros 4 y 5. Como control constitutivo se empleó el gen de α -tubulina (peso esperado 101 pb) reportado por Santos O. *et al*⁶⁸ y también se corrió un control negativo sin material genético en las mezclas de PCR.

Las condiciones de amplificación descritas anteriormente fueron empleadas para la identificación de los genes de los dos tipos de transportadores.

Cuadro 3. Mezcla de reacción para PCR de los transportadores TvZIP y TvCDF.

Componente	Volumen añadido (μL)	Concentración final
Agua estéril	17.50	---
Buffer de la polimerasa (10x)	2.50	1X
dNTPs (10 mM)	0.75	0.30 mM
MgCl₂ (25 mM)	1.50	1.25 mM
Primer F (10 μM)*	1.00	0.40 μ M
Primer R (10 μM)*	1.00	0.40 μ M
ADN (62.9 ng/μL)	0.50	1.25 ng/ μ L
Taq polimerasa (5 U/μL)	0.25	0.05 U
Volumen final	25	

*Primer F y Primer R específicos para cada transportador de acuerdo con los cuadros 4 y 5.

Cuadro 4. Oligonucleótidos para los transportadores ZIP de *T. vaginalis*.

Nombre	Tamaño	Secuencia	Tamaño esperado del producto
TvZIP1 F	20	GCTGGACATTATCCCGCTGA	315
TvZIP1 R	20	TCCGGCCATCCATAAAGCTC	
TvZIP2 F	20	AGGTGGCAATCGCGTTTAGA	370
TvZIP2 R	20	TGTAAAGGGCTGAAGCTGGG	
TvZIP3 F	20	TGCAGGCTTGTCATTCCCAT	166
TvZIP3 R	20	AACAGCTGGCGCTAATGGAT	
TvZIP4 F	20	CGTCTTCCTTGGTGCAGGAT	432
TvZIP4 R	20	AACGCGAAAGCTTCAACTGG	
TvZIP5 F	20	GTGAATCTCTCGCTGGTGGA	360
TvZIP5 R	20	CGAGGCCAAAGCCTTCAATG	
TvZIP6 F	20	TCACAAGCCAGTCGAAGCAT	195
TvZIP6 R	20	AAAGTTCCAGCGGAAAACGC	
TvZIP7 F	20	TGGCTTGGCTCTCGGAATTT	253
TvZIP7 R	20	GGCAGAAAATGCGCTGACAA	
TvZIP8 F	20	TCGCCCTCCGAAATCGAAAT	174
TvZIP8 R	20	TCTTGGAGTTCGTGGAAGCC	

F: Forward; R: Reverse

Cuadro 5. Oligonucleótidos para los transportadores CDF de *T. vaginalis*.

Nombre	Tamaño	Secuencia	Tamaño esperado del producto
TvCDF1 F	20	AAAAAGCCCCCGACAAAACG	428
TvCDF1 R	20	AGAACACGACCTGTACGACG	
TvCDF2 F	20	GTATCCTCGGCCTTCTCGTT	256
TvCDF2 R	20	AGTATGCTACCTGTGCGACG	
TvCDF3 F	20	CCAGCCTGCTCAATCCTCAT	162
TvCDF3 R	20	CTCGTGAAGTGAACCATGC	
TvCDF4 F	20	GACTCATCACGCTTTGACGC	430
TvCDF4 R	20	CACGACTGCTATTGAGCCGA	
TvCDF5 F	20	ACCACGCCAGCAAACAGATA	246
TvCDF5 R	20	TGGCATTTCATCTGGCGGTAA	
TvCDF6 F	20	GGTCGGTCATCAAGTCCCAG	400
TvCDF6 R	20	ACCGGCCTGGAATGCAATAA	
TvCDF7 F	20	TTTCCGCACCTCAGGAACTC	231
TvCDF7 R	20	TGCATCTACGCCCATCTTCC	
TvCDF8 F	20	TACACAAGCTCTTGCCGAGG	372
TvCDF8 R	20	AGTTGCAGGCTTTTCGCCTAT	

F: Forward; R: Reverse

6.8. Efecto de metales traza sobre la expresión de los genes de transportadores ZIP y CDF.

Se realizaron cultivos de parásitos en presencia de zinc y hierro con el fin de observar si la expresión de los transportadores varía en estas condiciones, por lo que, para los experimentos con zinc se realizó según lo descrito por Vázquez L. *et al*⁶⁹, con algunas modificaciones. Brevemente, los parásitos fueron cultivados en medio TYM complementado con 18% de SC y se añadieron las concentraciones crecientes de sulfato de zinc (ZnSO₄) de 0.25 mM, 1.0 mM y 1.6 mM y los tubos de cultivo se incubaron a 37°C por 24 horas. Los experimentos con hierro se realizaron según lo reportado por Santos O. *et al*⁶⁸ con algunas modificaciones. Brevemente se añadieron al medio TYM con parásitos las

concentraciones de 62.5, 125 y 250 μM de sulfato ferroso (FeSO_4) y después de 24 horas de incubación se realizó la extracción de ARN y la síntesis de ADN complementario. Como control constitutivo se empleó el gen de α -tubulina reportado por Santos O. *et al*⁵⁸, como control negativo se empleó ARN del cultivo de parásitos en condiciones normales y como control de expresión se empleó el gen que codifica para la adhesina AP120 para los cultivos suplementados con FeSO_4 y el gen codificante para TvMP50 en el caso de los cultivos tratados con ZnSO_4 .

6.9. Efecto en la expresión de los genes de transportadores ZIP y CDF bajo diferentes estímulos ambientales.

6.9.1. Prueba de estrés oxidativo.

Los parásitos que fueron cultivados en condiciones normales se lavaran tres veces con PBS, se les agregara medio nuevo y 400 μM de peróxido de hidrogeno (H_2O_2), los cultivos se incubaran por 0, 60, 90, 120 y 180 minutos, transcurrido el tiempo, se realizó la extracción de ARN, la síntesis de ADNc y la RT-PCR de acuerdo con lo descrito anteriormente. Como control negativo se empleará ARN del cultivo de parásitos en condiciones normales y como control positivo se empleará el gen que codifica para la proteína TvGP63.⁶⁰

6.9.2. Prueba de choque térmico.

En el caso de los cultivos que fueron sometidos a choque térmico los parásitos cultivados en condiciones normales se incubaron a 43°C por 0, 30, 60, 90 y 120 minutos, pasado el tiempo se realizó la extracción de ARN, la síntesis de ADNc y la RT-PCR de acuerdo con lo descrito anteriormente. Como control negativo se empleará ARN del cultivo de parásitos en condiciones normales y como control positivo se empleará el gen que codifica para la proteína HP70.⁶¹

6.10. Extracción de ARN.

Para determinar la variación en la expresión de los transportadores TvZIP y TvCDF en presencia de los diversos tratamientos, se realizó la extracción de ARN de los cultivos en condiciones normales y con los diversos tratamientos. La extracción de ARN de los parásitos crecidos en las diferentes condiciones de cultivo se realizó con el estuche comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen, No. catálogo 74106) de acuerdo con lo señalado por el fabricante. Brevemente, se contaron los parásitos crecidos en cada condición en una cámara de Neubauer para obtener la cantidad de 5×10^6 parásitos, estos se lavaron tres veces con PBS, se les añadió 600 μL de la solución amortiguadora RLT y se centrifugó a máxima velocidad por 3 minutos, posteriormente, se añadieron 600 μL de etanol al 70% y se transfirieron 700 μL de la mezcla a la columna "RNeasy mini spin" colocada en un tubo colector para luego centrifugar a 8,000 g durante 15 segundos. Seguidamente se añadieron 700 μL de la solución RW1, se volvió a centrifugar a 8,000 g por 15 segundos y se añadieron 500 μL de la solución RPE y se centrifugó a 8,000 g por 2 minutos, la columna se colocó en un tubo nuevo y se añadieron 50 μL de agua DEPC, se centrifugó a 8,000 g por 1 minuto para eluir el ARN. Por último, se realizó un tratamiento con DNasa.

6.11. Síntesis de ADN complementario.

Una vez realizada la extracción de ARN se procedió a la síntesis de ADN complementario (ADNc) para lo cual se empleó el estuche comercial RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, No. catálogo K1632) y de acuerdo con lo señalado por el fabricante. Brevemente, se tomaron 150 ng de RNA total y se depositaron en un tubo cónico de 0.2 μL , de igual forma se añadió 1 μL del oligonucleótido "Oligo(dt)18" y los microlitros necesarios de agua libre de nucleasas para tener un volumen final de 12 μL . Seguidamente se añadieron 4 μL de la solución de reacción 5X, 1 μL del inhibidor "RiboLock RNase", 2 μL de la mezcla de dinucleótidos y 1 μL de la transcriptasa reversa, el tubo con la mezcla se incubó a 42°C por 1 hora y posteriormente a 70°C por 5

minutos. El ADNc resultante se diluyó 5 veces con agua estéril y se conservó a -80°C hasta su uso.

6.12. Amplificación de los transportadores TvZIP y TvCDF por RT-PCR.

Posterior a la extracción del ARN y síntesis del ADNc se realizó una RT-PCR dúplex, para lo cual en un microtubo de 0.2 mL se añadieron los reactivos en los volúmenes indicados en el cuadro 6. Seguidamente, se colocaron los tubos en el termociclador y se programó un ciclo de desnaturalización a 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, templado a 57.7°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 7 minutos. Para la visualización de los productos de PCR se realizó un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio y se observaron las bandas correspondientes a los pesos de los amplicones señalados en los cuadros 4 y 5.

Las condiciones de amplificación descritas anteriormente fueron empleadas para la identificación de los genes de los dos tipos de transportadores.

Cuadro 6. Mezcla de reacción para RT-PCR dúplex de transportadores TvZIP y TvCDF.

Componente	Volumen añadido (µL)	Concentración final
Agua estéril	15.50	----
Buffer de la polimerasa (10x)	2.50	1X
dNTPs (10 mM)	0.75	0.30 mM
MgCl ₂ (25 mM)	1.50	1.25 mM
Primer F (10 µM)	1.00	0.40 µM
Primer R (10 µM)	1.00	0.40 µM
Primer F α-Tb (10 µM)	1.00	0.40 µM
Primer R α-Tb (10 µM)	1.00	0.40 µM
ADNc	1.25	
Taq polimerasa (5 U/µL)	0.50	0.1 U
Volumen final	25	

6.13. Plan de procesamiento de datos y presentación de resultados.

Los resultados de los diferentes experimentos se presentan en formato de cuadros e imágenes representativas. De igual forma con el programa ImagenJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) se determinó la densidad de pixeles de las bandas correspondientes a cada transportador de acuerdo con los diferentes experimentos y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con *post hoc* de Dunnett a los que presentaron una diferencia significativa en el programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., California, Estados Unidos de América), estos resultados se presentan en forma de gráficas de barras con la desviación estándar correspondiente.

VII. RESULTADOS.

7.1. Análisis *in silico*.

La identificación de las secuencias homologas se realizó a partir de las secuencias consenso para cada tipo de transportador, por un lado para los ZIP se emplearon las secuencias de los transportadores IRT1, ZRT1 y ZRT2 y para los CDF se usaron ZCR1, CzcD y YiiP, dichas secuencias se introdujeron a un motor de búsqueda (BLAST) en el genoma de *Trichomonas vaginalis* que se encuentra almacenado en la base de datos TrichDB (<http://trichdb.org/trichdb/>) y se obtuvieron para los ZIP 8 secuencias homologas a IRT1, 14 y 8 secuencias a ZRT1 y ZRT2 respectivamente. En el caso de los CDF se identificaron 20 secuencias homologas al transportador CzcD, 10 secuencias al FieF y 9 secuencias al ZRC1. Cuadros mostrados en el capítulo XI de Anexos.

Posteriormente, se realizó una búsqueda de dominios a las 31 secuencias y 39 secuencias de aminoácidos obtenidas para determinar si en estas se hallaba el dominio característico de los transportadores ZIP o CDF, encontrando que solo 8 de estas secuencias tenían el dominio ZIP (Figura 4A) y 8 el dominio CDF (Figura 4B), dicho análisis se llevó a cabo con el programa SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Dicho programa señala que de las 8 secuencias con dominios tipo ZIP, tres de estas (TvZIP1, TvZIP3 y TvZIP8) presentan dos dominios tipo ZIP. Por otro lado, de las ocho secuencias identificadas con dominios CDF, dos presentan un dominio adicional relacionado con la dimerización del transporte de zinc, estos son, TvCDF6 y TvCDF8.

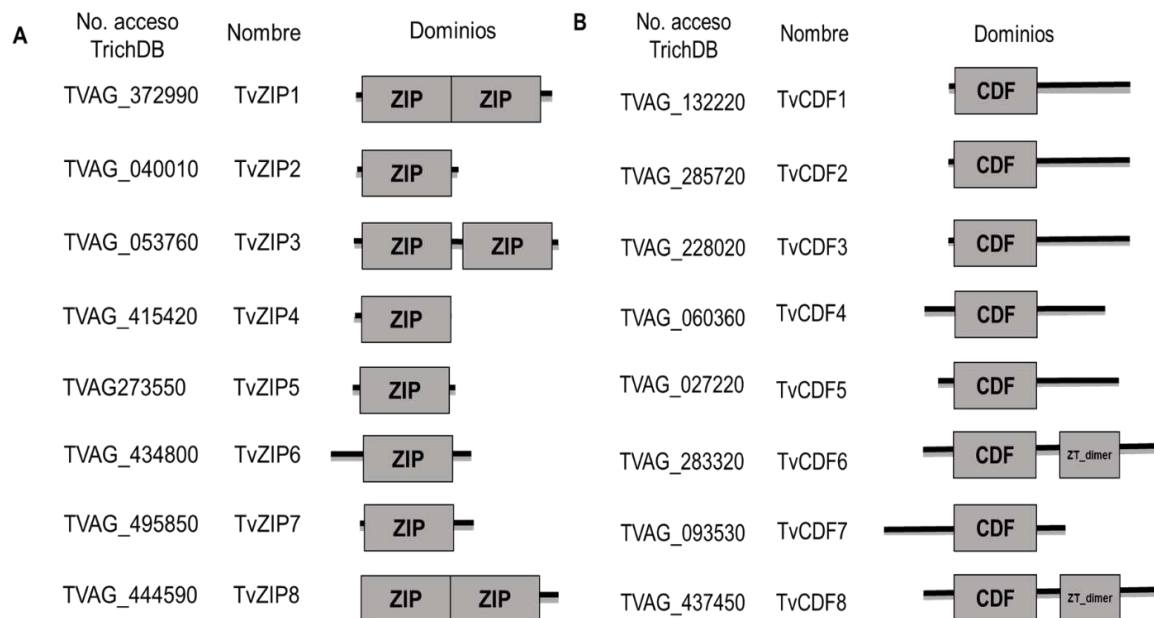


Figura 4. Dominios ZIP y CDF encontrados para las secuencias identificadas en *T. vaginalis*. **A:** Dominios correspondientes a transportadores ZIP. **B:** Dominios correspondientes a transportadores CDF. Los recuadros grises indican la posición en la que se encuentra el dominio ZIP o CDF de acuerdo con el programa SMART. ZIP:Zrt-, Irt-like protein; CDF: Facilitadores de Difusión de Cationes; ZT_dimer: dimerización del Transporte de Zinc.

Una vez identificadas las secuencias con dominio ZIP y CDF se llevaron a cabo diferentes análisis bioinformáticos, primeramente, se localizaron las secuencias en el genoma de *T. vaginalis* y así se identificaron el tamaño de los genes y las proteínas; para los transportadores TvZIP (Cuadro 7) el tamaño de los genes se encuentra entre 627 y 900 pares de bases y el tamaño de las proteínas está en el rango de 208 (TvZIP7) y 299 (TvZIP2) aminoácidos, mientras que los TvCDF (Cuadro 8) tienen un marco de lectura entre 1038 y 1488 y el tamaño de sus proteínas varía entre 346 (TvCDF5) y 496 (TvCDF6) aminoácidos.

Cuadro 7. Secuencias genómicas tipo ZIP identificadas en el genoma de *T. vaginalis*.

Nombre	No. acceso TrichDB	Localización en el genoma			ORF (pb)	No. acceso NCBI	Tamaño de la proteína (aa)
		Secuencia genómica	Inicio	Fin			
TvZIP1	TVAG_372990	DS113274	28892	28026	867	XM_001326354	288
TvZIP2	TVAG_040010	DS113461	57721	58620	900	XM_001317137	299
TvZIP3	TVAG_053760	DS113785	26445	27311	867	XM_001308790	288
TvZIP4	TVAG_415420	DS113515	69986	70980	759	XM_001315296	252
TvZIP5	TVAG_273550	DS113394	38182	39048	867	XM_001319859	288
TvZIP6	TVAG_434800	DS113240	189817	188897	825	XM_001328831	274
TvZIP7	TVAG_495850	DS113254	130207	129581	627	XM_001327754	208
TvZIP8	TVAG_444590	DS113290	143988	143137	789	XM_001325363	262

ORF: Marco abierto de lectura; pb: pares de bases; aa: aminoácidos.

Cuadro 8. Secuencias genómicas tipo CDF identificadas en el genoma de *T. vaginalis*.

Nombre	No. acceso TrichDB	Localización en el genoma			ORF (pb)	No. acceso NCBI	Tamaño de la proteína (aa)
		Secuencia genómica	Inicio	Fin			
TvCDF1	TVAG_132220	DS113908	7072	8382	1308	XM_001306434	436
TvCDF2	TVAG_228020	DS114074	14310	12994	1314	XM_001303830	438
TvCDF3	TVAG_285720	DS114481	11412	12722	1308	XM_001300194	436
TvCDF4	TVAG_060360	DS113353	61220	59982	1236	XM_001321848	412
TvCDF5	TVAG_027220	DS113573	40429	41474	1038	XM_001314062	346
TvCDF6	TVAG_093530	DS113185	108078	109568	1488	XM_001583115	496
TvCDF7	TVAG_283320	DS113192	194739	196067	1326	XM_001582098	442
TvCDF8	TVAG_437450	DS113194	264494	265792	1296	XM_001581885	432

ORF: Marco abierto de lectura; pb: pares de bases; aa: aminoácidos.

Consecutivamente, se predijeron las regiones transmembrana para cada uno de los transportadores TvZIP (Figura 5) y para cada TvCDF (Figura 6) con el programa MEMSAT-SVM (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). En el caso de los transportadores TvZIP se encontró que TvZIP1, TvZIP2, TvZIP3, TvZIP5 y TvZIP8 posiblemente poseen ocho regiones transmembrana (RTM) y el amino y carboxilo terminal se encuentran en la parte extracelular, mientras que el TvZIP4 y el TvZIP6 tendrían siete RTM y por último el TvZIP7 presentaría cinco RTM. Por otro lado, el programa señala seis RTM para TvCDF1, TvCDF2, TvCDF3, TvCDF5, TvCDF7 y TvCDF8 y el amino y carboxilo terminal se ubicaron en el citoplasma, mientras que TvCDF4 tendría nueve RTM y el amino en posición extracelular y TvCDF6 tendría diez RTM.

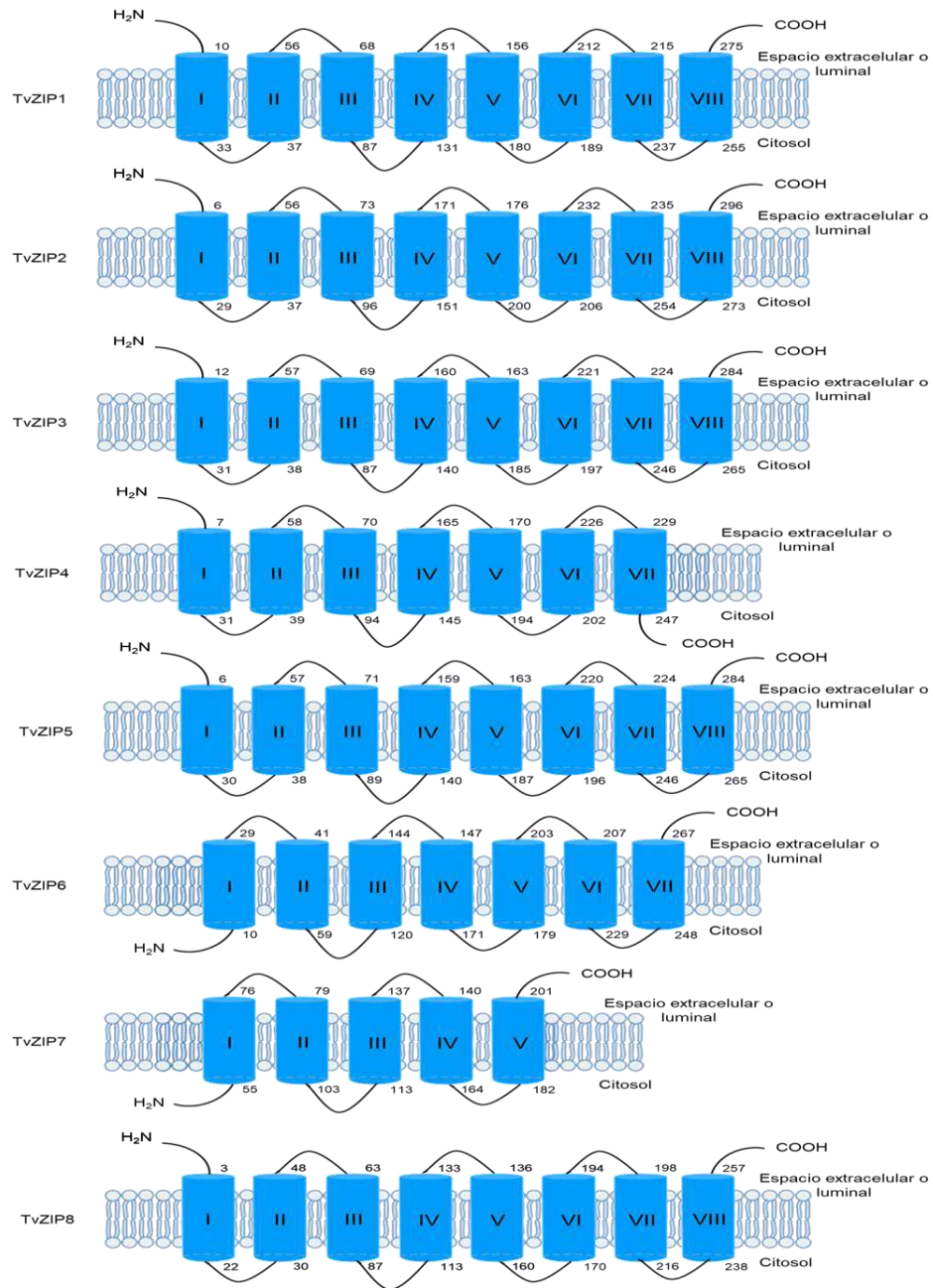


Figura 5. Regiones transmembrana identificadas para los transportadores TvZIP. En la figura se representa la membrana del parásito, los bucles intra y extracelulares (líneas negras) y las regiones transmembrana (cilindros azules con números romanos) para cada uno de los transportadores tipo ZIP identificados en el genoma de *T. vaginalis*.

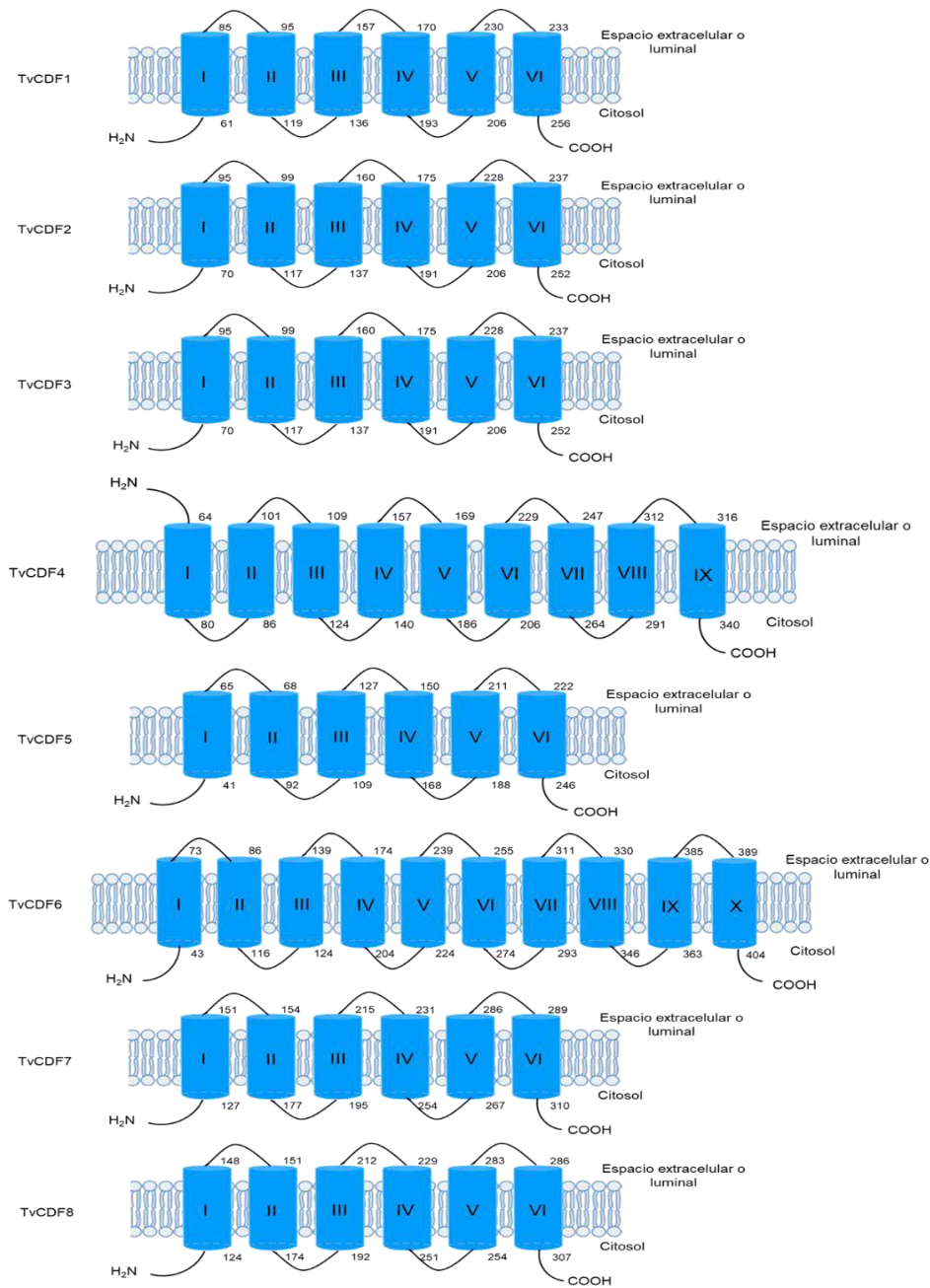


Figura 6. Regiones transmembrana identificadas para los transportadores TvCDF. En la figura se representa la membrana del parásito, los bucles intra y extracelulares (líneas negras) y las regiones transmembrana (cilindros azules con números romanos) para cada uno de los transportadores tipo CDF identificados en el genoma de *T. vaginalis*.

De igual forma se realizó un alineamiento múltiple con el algoritmo MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) para identificar las regiones conservadas entre los transportadores TvZIP (Figura 7) y TvCDF (Figura 8) y también se esquematizaron las posibles regiones transmembrana empleando la secuencia del transportador TvZIP1 y el TvCDF1 respectivamente.

El alineamiento múltiple en el caso de los transportadores TvZIP (Figura 7) mostró que a excepción del TvZIP7 los demás TvZIP tienen en la RTM II un residuo conservado de histidina (H), mientras que todas las secuencias tienen la región HS (histidina-serina) conservada en la RTM IV y en la región V los aminoácidos conservados de histidina y ácido glutámico (HXXXE) a excepción de los TvZIP3 y TvZIP5 los cuales presentan fenilalanina (F) en lugar de histidina (H), además, en la región variable que se localiza entre las RTM III y IV se identificó en el caso de TvZIP1, TvZIP2, TvZIP6 y TvZIP 7 una región rica en histidinas (HXHXH). Todas estas regiones conservadas de aminoácidos se relacionan con el transporte de Zn^{2+} y Fe^{2+} . Además, se ha reportado que el aspartato (D) en el bucle entre la RTM II y RTM III se relaciona con el transporte de Fe^{2+} .^{31,39,62}

En cuanto al alineamiento múltiple de los TvCDF (Figura 8) se observa que para TvCDF1, TvCDF2 y TvCDF3 en la RTM II hay una región conservada de histidina-aspartato (HXXXD) y en la RTM V se identificó el motivo HXXXD (histidina-aspartato), además, de regiones ricas en histidina en el amino y carboxilo terminal, dichos motivos y regiones se relacionan con el transporte de Zn^{2+} , en el caso de los TvCDF7 y TvCDF8, se identificaron los motivos aspartato-aspartato (DXXXD) en RTM II y aspartato-aspartato (DXXXD) en RTM V, estas regiones se reportan importantes para el transporte de manganeso.^{31,36,62} En el caso de los TvCDF4, TvCDF5 y TvCDF6 no se identificó alguno de los motivos mencionados.

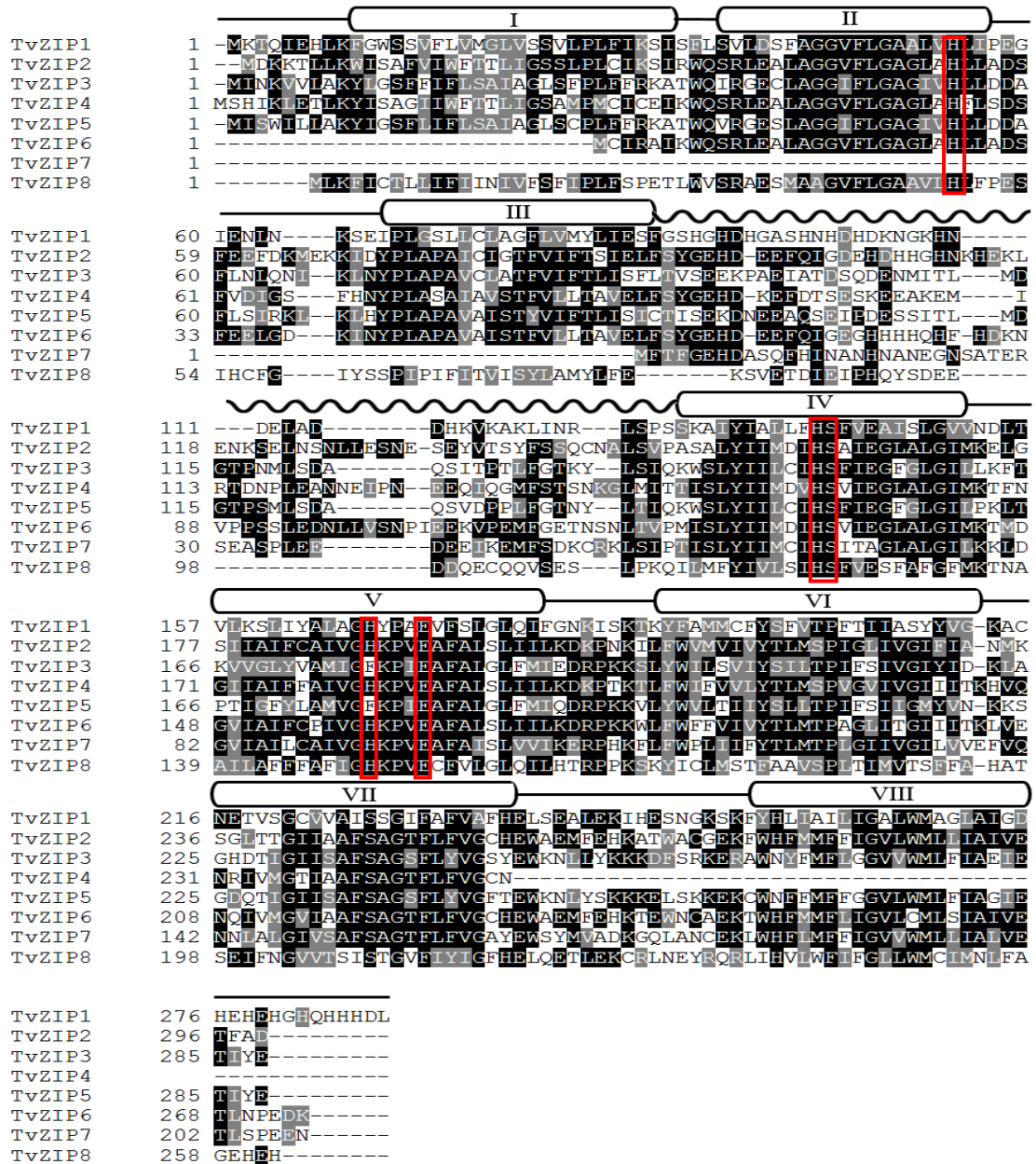


Figura 7. Alineamiento múltiple de los TvZIP. En negro se señalan los aminoácidos idénticos y en gris los similares. En los recuadros rojos se observan los aminoácidos conservados en las RTM importantes para el transporte de iones. Los recuadros con números romanos indican las RTM, las líneas representan las regiones intra- y extracelulares entre las RTM y la línea curva la región variable de las secuencias analizadas.

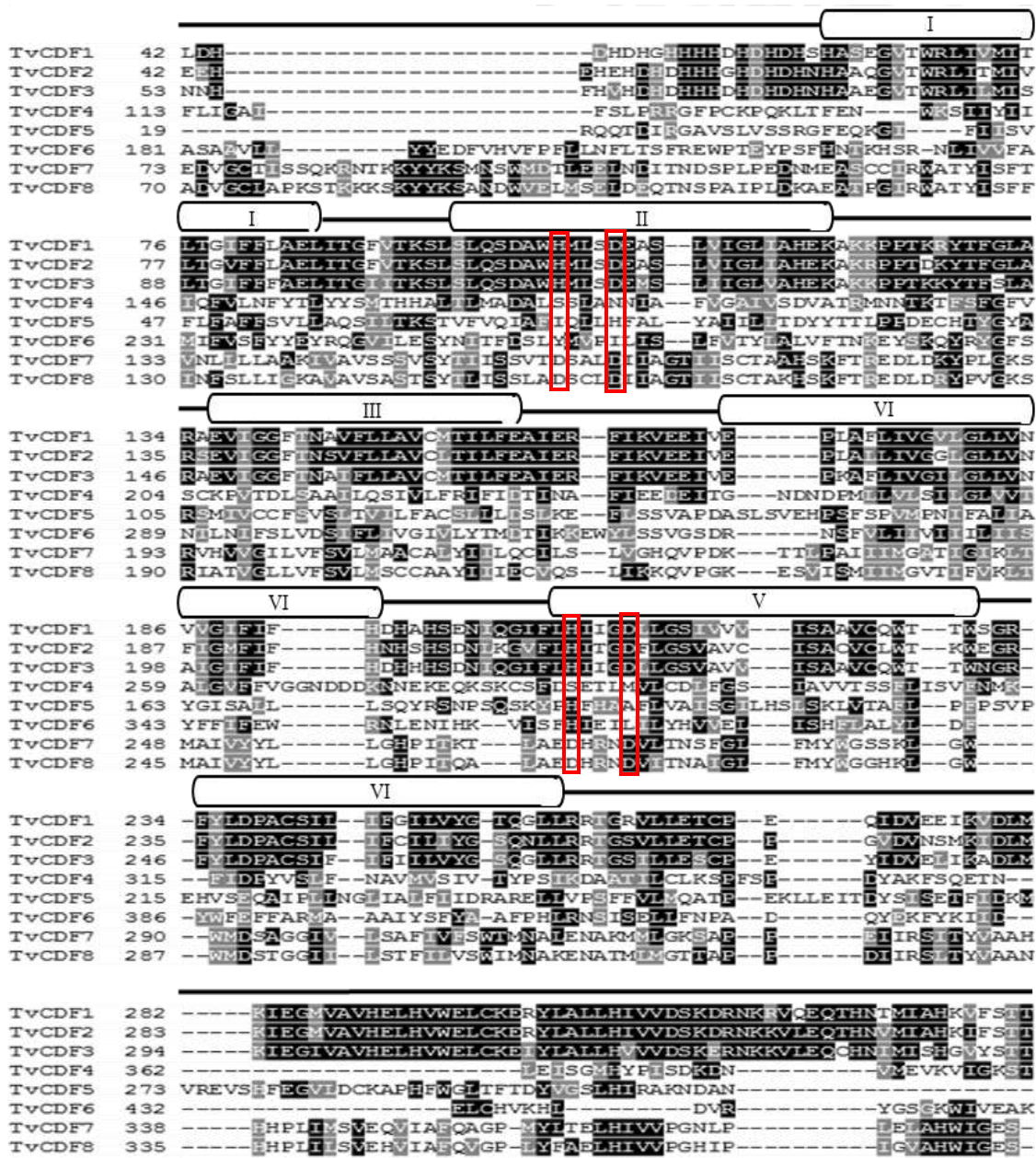


Figura 8. Alineamiento múltiple de los TvCDF. En negro se señalan los aminoácidos idénticos y en gris los similares. En los recuadros rojos se observan los aminoácidos conservados en las RTM importantes para el transporte de iones. Los recuadros con números romanos indican las RTM, las líneas representan las regiones intra- y extracelulares entre las RTM.

Para la localización subcelular, la función putativa de los transportadores y las propiedades fisicoquímicas (peso molecular y punto isoeléctrico) se emplearon los programas ya descritos en la metodología (CELLO, PFP y ProtParam respectivamente) obteniendo los siguientes resultados. Para los TvZIP (Cuadro 9) el peso molecular se encuentra entre 23,181 y 33,415 Daltons (Da) y el punto isoeléctrico se encuentra entre 5.19 y 7.61. Con respecto a la localización subcelular, todos los TvZIP posiblemente se encuentran en la membrana plasmática y su función putativa es la de un transportador transmembrana de iones metálicos. Por otro lado, para los TvCDF (Cuadro 10) el peso molecular se encontró entre 38,716 y 58,607 Da, los puntos isoeléctricos están en el rango de 5.30 y 8.08 y según los programas empleados estos transportadores se localizan en la membrana plasmática y tienen una función teórica de transportador de cationes.

Cuadro 9. Propiedades, localización y función teórica de los transportadores TvZIP.

Nombre	Propiedades teóricas		Localización subcelular	Función predicha
	Peso molecular (Da)	Punto isoeléctrico teórico		
TvZIP1	31,545	6.41	Membrana Plasmática	Transportador transmembrane de iones metálicos
TvZIP2	33,415	5.33	Membrana Plasmática	Transportador transmembrane de iones metálicos
TvZIP3	32,379	6.83	Membrana Plasmática	Transportador transmembrane de iones metálicos
TvZIP4	27,637	5.47	Membrana Plasmática	Transportador transmembrane de iones metálicos
TvZIP5	32,228	7.61	Membrana Plasmática	Transportador transmembrane de iones metálicos
TvZIP6	30,611	5.14	Membrana Plasmática	Transportador transmembrane de iones metálicos
TvZIP7	23,181	5.19	Membrana Plasmática	Transportador transmembrane de iones metálicos
TvZIP8	29,963	5.49	Membrana Plasmática	Transportador transmembrane de iones metálicos

Cuadro 10. Propiedades, localización y función teórica de los transportadores TvCDF.

Nombre	Propiedades teóricas		Localización subcelular	Función predicha
	Peso molecular (Da)	Punto isoelectrónico teórico		
TvCDF1	48,446	5.61	Membrana Plasmática	Transportador de cationes
TvCDF2	49,521	5.68	Membrana Plasmática	Transportador de cationes
TvCDF3	49,394	5.71	Membrana Plasmática	Transportador de cationes
TvCDF4	46,440	6.44	Membrana Plasmática	Transportador de cationes
TvCDF5	38,716	5.74	Membrana Plasmática	Transportador de cationes
TvCDF6	58,607	8.08	Membrana Plasmática	Transportador de cationes
TvCDF7	48,812	5.30	Membrana Plasmática	Transportador de cationes
TvCDF8	47,736	5.63	Membrana Plasmática	Transportador de cationes

Por último, se realizó un árbol filogenético para los TvZIP y otro para los TvCDF incluyendo proteínas ya caracterizadas pertenecientes a las diferentes subfamilias de los transportadores tipo ZIP y CDF utilizando el método Neighbor-Joining con corrección JTT empleando el programa MEGA 7.0 (www.megasoftware.net).

El árbol filogenético para los transportadores tipo ZIP (Figura 9) se realizó empleando 52 secuencias de transportadores tipo ZIP ya caracterizados en las diferentes subfamilias descritas anteriormente, ZIP-I, ZIP-II, LIV-1 y GufA. Dicho árbol muestra que todas las secuencias identificadas en el genoma de *T. vaginalis* (TvZIP) se agrupan en una de las ramas junto con los transportadores ZIP de una ameba de vida libre (*N. gruberi*) y los ZIP de un nematodo (*C. elegans*), dicha rama corresponde a la subfamilia ZIP-II.

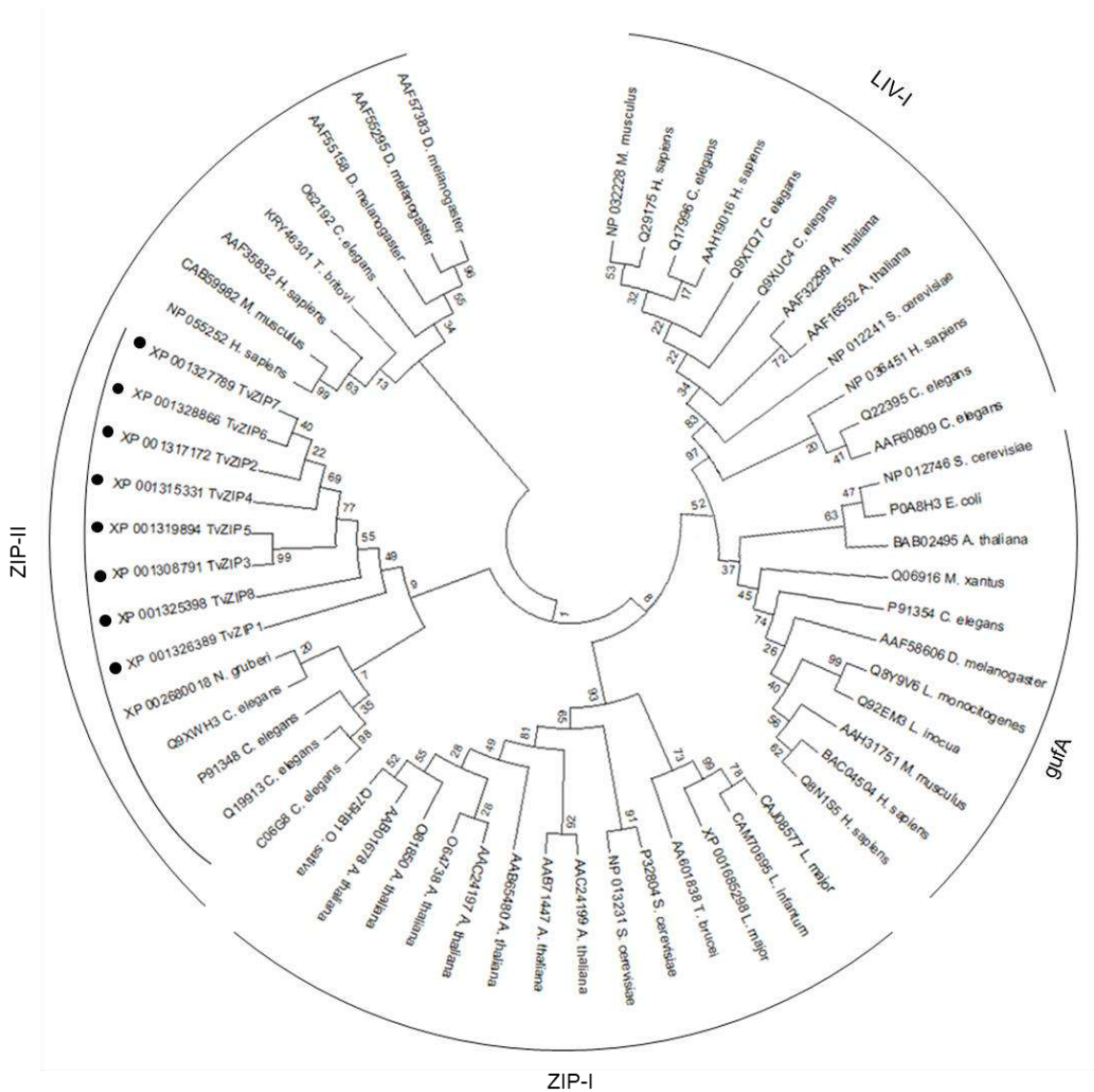


Figura 9. Árbol filogenético de los transportadores tipo ZIP. En la figura se muestra el árbol filogenético realizado por el método NJ-JTT con las secuencias de las cuatro subfamilias (LIV-I, gufA, ZIP-I y ZIP-II) de los transportadores tipo ZIP. La segunda línea en el clado de la subfamilia ZIP-II indica la rama donde se ubican las proteínas TvZIP y las secuencias de transportadores tipo ZIP de otros parásitos. • Secuencias tipo ZIP identificadas en *T. vaginalis*.

Con respecto al análisis filogenético de los TvCDF se emplearon 43 secuencias de especies diferentes que han sido descritas como transportadores de alguna de las tres familias de CDF (CDF-Zn²⁺, CDF-Zn/Fe y CDF-Mn²⁺), sin embargo, los TvCDF así como las secuencias seleccionadas se agrupaban en diferentes

ramas sin importar la subfamilia en la que se supone habían sido descritos, por lo tanto no se podía determinar a qué subfamilia pertenecían los TvCDF (Figura mostrada en el capítulo XI de Anexos), debido a esto, se realizó un árbol filogenético más pequeño (Figura 10) con secuencias ya caracterizadas de transportados CDF, encontrando que los TvCDF4, TvCDF5, TvCDF6, TvCDF7 y TvCDF8 se agrupan en la subfamilia CDF-Zn/Fe mientras que los TvCDF1, TvCDF2 y TvCDF3 se encuentran en la subfamilia CDF-Zn²⁺.

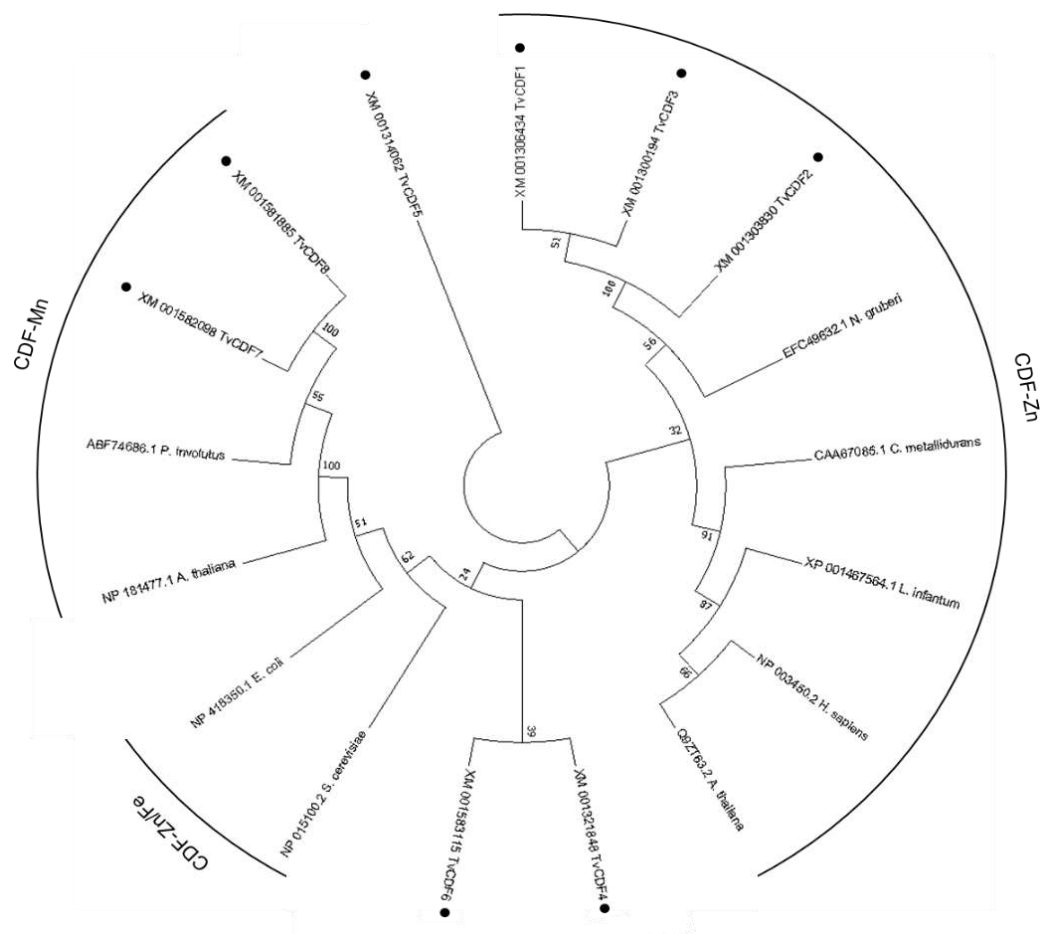


Figura 10. Árbol filogenético de los transportadores tipo CDF. En la figura se muestra el árbol filogenético realizado por el método NJ-JTT con las secuencias de las tres subfamilias (CDF-Zn²⁺, CDF-Zn/Fe y CDF-Mn²⁺) de los transportadores tipo CDF. • Secuencias tipo CDF identificadas en *T. vaginalis*.

7.2. Identificación de los transportadores TvZIP y TvCDF por PCR.

Para comprobar que los transportadores que se habían identificado por medio de programas bioinformáticos realmente se encontraban en el genoma de *T. vaginalis* y no era por los algoritmos empleados se realizó una PCR punto final con ADN genómico extraído de parásitos cultivados en condiciones normales. Para visualizar los productos obtenidos se realizó un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, dicho gel se visualizó en un fotodocumentador marca Bio-Rad y se usó el programa Quantity One (Bio-Rad) para capturar las imágenes. El marcador de peso molecular empleado fue el GeneRuler 100pb (100-1000 pb) y los pesos correspondientes a cada amplicón se señalan en la imagen correspondiente, así como los TvZIP (Figura 11) y los TvCDF (Figura 12) que fueron identificados.

En las figuras se puede observar que se obtuvieron bandas para los 8 genes de transportadores tipo ZIP y los 8 genes de transportadores tipo CDF encontrados por métodos bioinformáticos en el genoma de *T. vaginalis*.

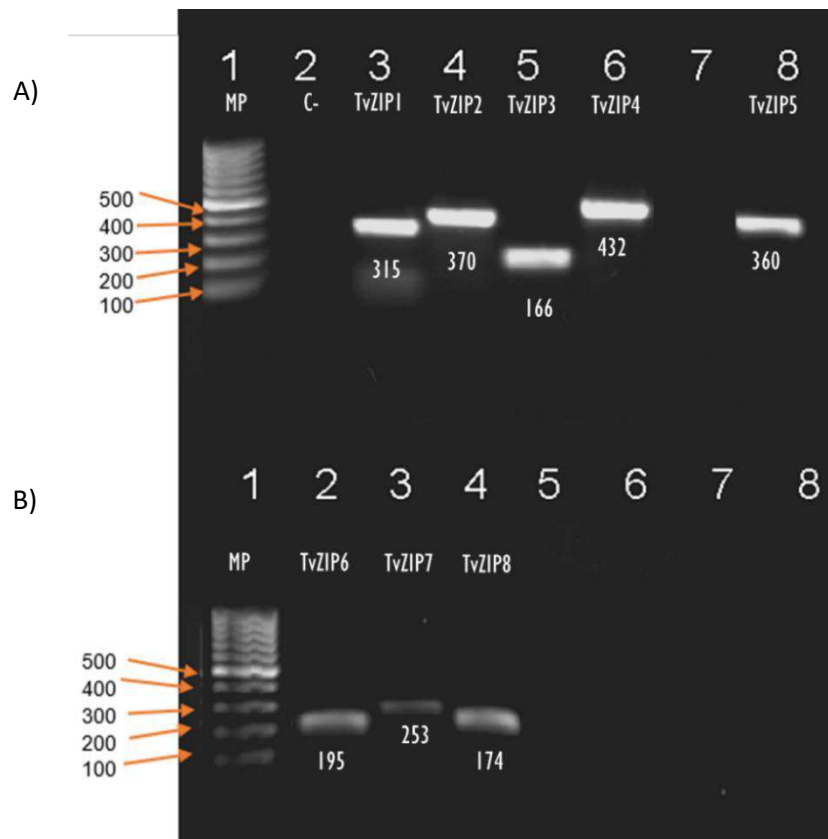


Figura 11. Amplificación por PCR de los transportadores TvZIP. A) Carril 1 MP: Marcador de peso molecular de 100 a 1000 pb; Carril 2 C-: control negativo; Carril 3 TvZIP1 (315), Carril 4 TvZIP2 (370 pb); Carril 5 TvZIP3 (166 pb); Carril 6 TvZIP4 (432 pb); Carril 8 TvZIP5 (360 pb). **B)** Carril 1 MP de 100 a 1000 pb; Carril 2 TvZIP6 (195 pb); Carril 3 TvZIP7 (253 pb); Carril 4 TvZIP8 (174 pb).

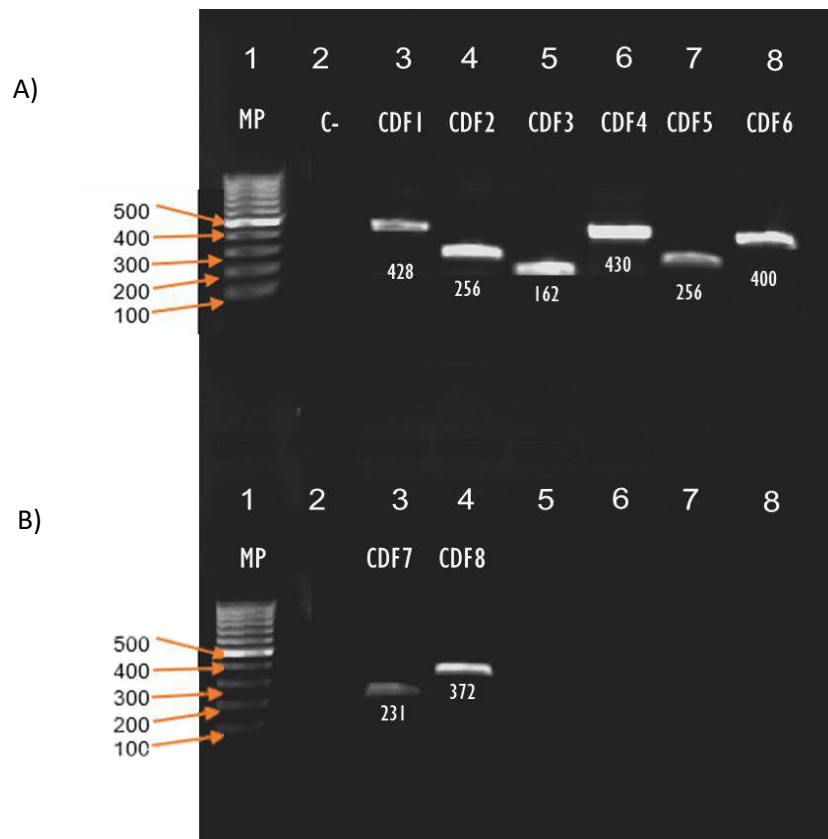


Figura 12. Amplificación por PCR de los transportadores TvCDF. A) Carril 1 MP: Marcador de peso molecular de 100 a 1000 pb; Carril 2 C-: control negativo; Carril 3 TvCDF1 (428 pb); Carril 4 TvCDF2 (256 pb); Carril 5 TvCDF3 (162 pb) Carril 6 TvCDF4 (430 pb); Carril 7 TvCDF5 (256 pb); Carril 8 TvCDF6 (400 pb). **B)** Carril 1 MP de 100 a 1000 pb; Carril 3 TvCDF7 (231 pb); Carril 4 TvCDF8 (372).

Además de la PCR, se realizó una RT-PCR dúplex en condiciones normales de crecimiento para *T. vaginalis*, medio TYM complementado con 18% de Suero de Caballo (SC) e incubando el cultivo a 37°C por 24 horas, para esto se usaron también los oligonucleótidos específicos para cada uno de los transportadores previamente identificados en el genoma y los primer para el gen constitutivo de α -Tubulina (α -Tb, peso esperado de 101 pb). Posteriormente, se realizó un corrimiento electroforético de los productos de RT-PCR (Figura 13 y 14), donde se observa que los 16 transportadores se expresan en mayor o menor medida en condiciones normales de crecimiento.

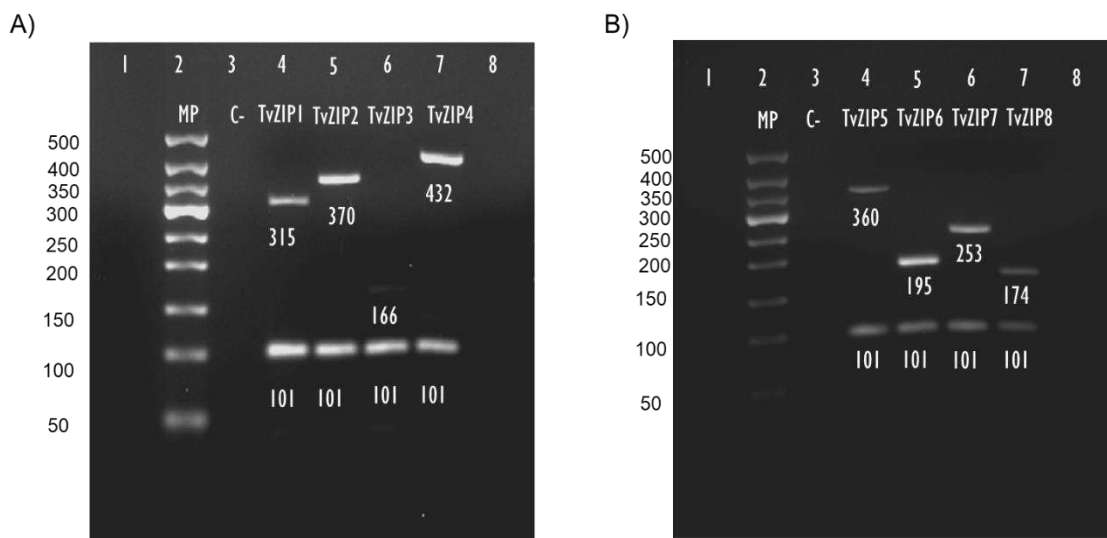


Figura 13. Amplificación por RT-PCR duplex de los transportadores TvZIP. A) Carril 2 MP: Marcador de peso molecular de 50 a 500 pb; Carril 3 C-: control negativo; Carril 4 TvZIP1 (315 pb); Carril 5 TvZIP2 (370 pb); Carril 6 TvZIP3 (166 pb); Carril 7 TvZIP4 (432 pb); la banda de 101 pb corresponde a α -Tb. **B)** Carril 2 MP de 50 a 500 pb; Carril 3 C-; Carril 4 TvZIP5 (360 pb); Carril 5 TvZIP6 (195 pb); Carril 6 TvZIP7 (253 pb); Carril 7 TvZIP8 (174 pb); la banda de 101 pb corresponde a α -Tb.

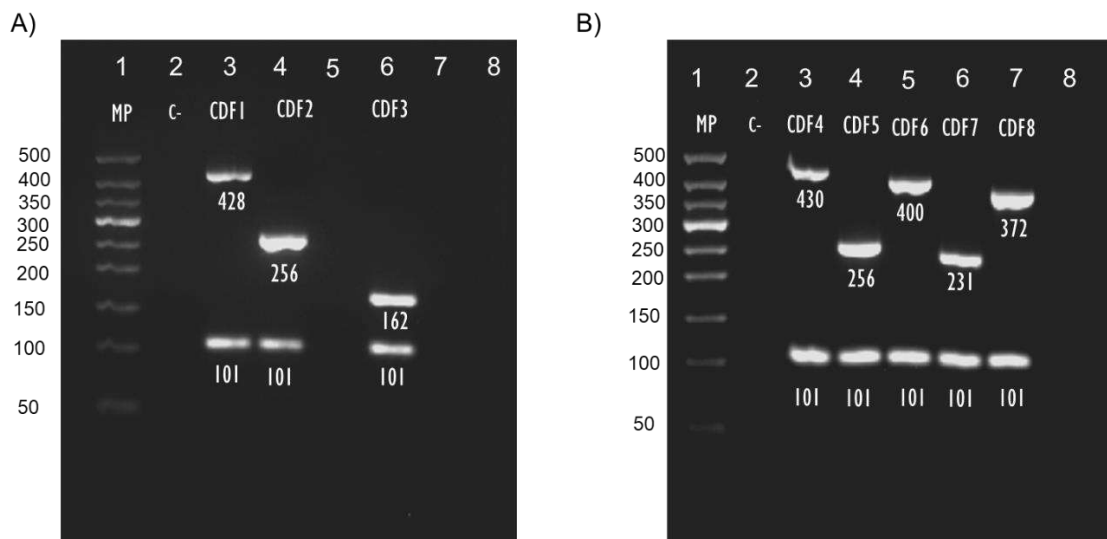


Figura 14. Amplificación por RT-PCR duplex de los transportadores TvCDF. A) Carril 1 MP: Marcador de peso molecular de 50 a 500 pb; Carril 2 C-: control negativo; Carril 3 TvCDF1 (428 pb); Carril 4 TvCDF2 (256 pb); Carril 6 TvCDF3 (162 pb); la banda de 101 pb corresponde a α -Tb. **B)** Carril 1 MP de 50 a 500 pb; Carril 2 C-; Carril 3 TvCDF4 (430 pb); Carril 4 TvCDF5 (256 pb); Carril 5 TvCDF6 (400 pb); Carril 6 TvCDF7 (231 pb); Carril 7 TvCDF8 (372); la banda de 101 pb corresponde a α -Tb.

7.3. Efecto de los metales traza sobre la expresión de los genes de transportadores TvZIP y TvCDF.

Para determinar si la expresión de los transportadores TvZIP y TvCDF cambiaba dependiendo del ion y la concentración a los que se exponga el parásito estos se cultivaron en diferentes concentraciones de sulfato de hierro (FeSO_4) y sulfato de zinc (ZnSO_4) y se realizó una RT-PCR semicuantitativa.

Para los TvZIP se obtuvieron los siguientes resultados, en las diferentes concentraciones de ZnSO_4 (Figura 15A) la expresión de TvZIP1, TvZIP5 y TvZIP7 disminuyó en la concentración más alta (1.6 mM) al igual que el control de expresión (TvMP50), para TvZIP3 se observó un cambio en la expresión a partir de la concentración de 1 mM, mientras que para TvZIP2, TvZIP4, TvZIP6 y TvZIP8 no se observaron cambios en las concentraciones probadas. En el caso de α -Tubulina no se observó ningún cambio en la expresión, lo cual ya se esperaba al ser un gen constitutivo, es decir, que no varía bajo ninguna condición.

En cuanto a la expresión de los TvZIP bajo diferentes concentraciones de FeSO_4 , se puede observar en la figura 15B, que hay un cambio en la expresión de dos de los ocho transportadores, estos son: TvZIP2 y TvZIP4. La expresión de TvZIP2 aumenta conforme aumenta la concentración de FeSO_4 y en el caso de TvZIP4 la expresión disminuye conforme aumenta la concentración de FeSO_4 . El control constitutivo no presentó cambios y el control de expresión que fue AP120 mostró un aumento de la expresión dependiente de la concentración.

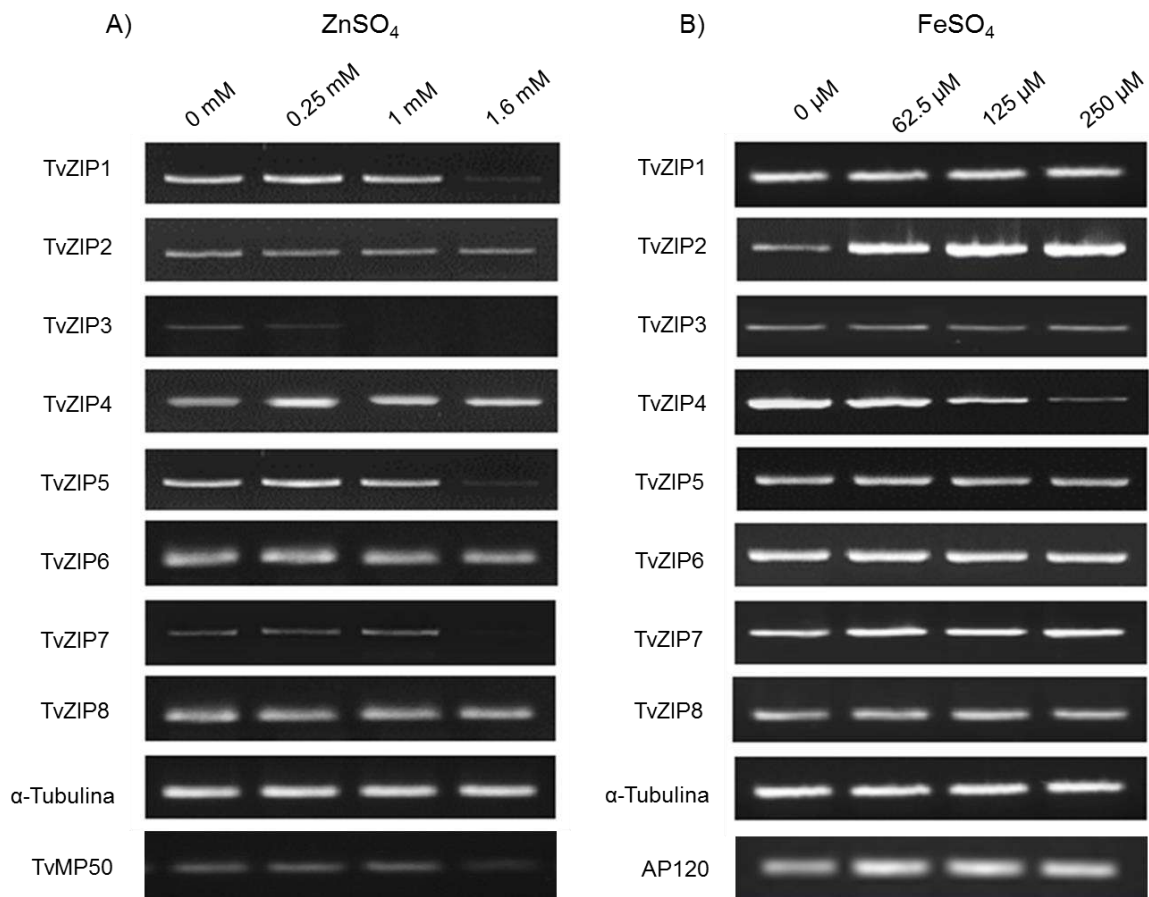


Figura 15. Expresión de los transportadores TvZIP en diferentes concentraciones de metales traza. A) Expresión de TvZIP en diferentes concentraciones de sulfato de zinc (ZnSO₄), el control constitutivo (α-Tubulina) y el control de expresión para zinc (TvMP50). **B)** Expresión de TvZIP en diferentes concentraciones de sulfato de hierro (FeSO₄), el control constitutivo (α-Tubulina) y el control de expresión para hierro (AP120).

También se efectuó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía de acuerdo con el análisis de la densidad de bandas realizado y a los que presentaron una diferencia significativa se les aplicó el *post hoc* de Dunnett. En el caso de los tratamientos con ZnSO₄ se observa en la figura 16 que en TvZIP1, TvZIP5, TvZIP7 y TvMP50 la concentración 1.6 mM de ZnSO₄ presentó una diferencia significativa con respecto a la concentración de 0 mM (parásitos sin tratamiento) mientras que para TvZIP3 las concentraciones de 1 y 1.6 mM de ZnSO₄ presentaron diferencia significativa en comparación con 0 mM de ZnSO₄.

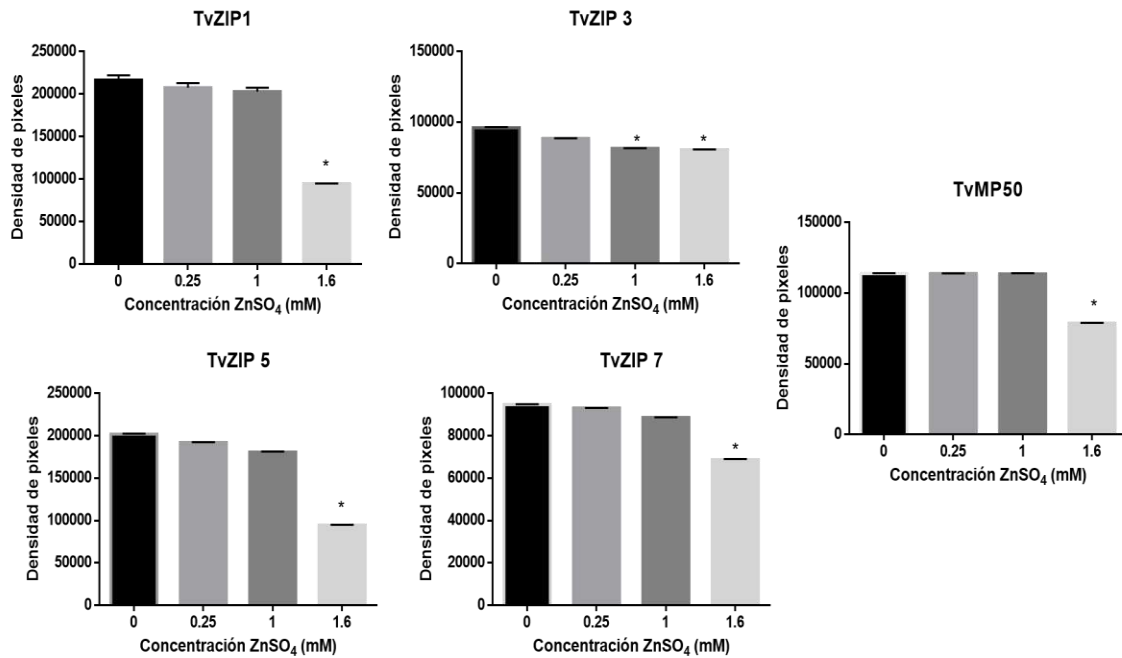


Figura 16. Evaluación de la densidad de bandas de TvZIP y TvMP50 en diferentes concentraciones de ZnSO₄. Los resultados representan la media \pm DE. Se realizó ANOVA de una vía, seguido por una prueba *post hoc* de Dunnett, donde * $p < 0.05$ respecto a la concentración de 0 mM (parásitos sin tratamiento).

Para los tratamientos con FeSO₄ (Figura 17), todas las concentraciones probadas de FeSO₄ para TvZIP2, TvZIP4 y el control de expresión AP120 fueron estadísticamente significativas con respecto a los parásitos sin tratamiento (0 mM de FeSO₄).

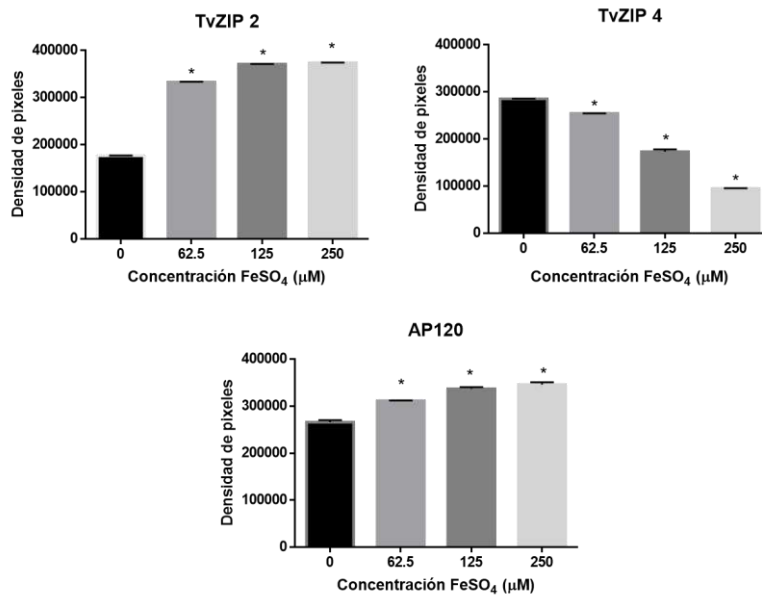


Figura 17. Evaluación de la densidad de bandas de TvZIP y AP120 en diferentes concentraciones de FeSO₄. Los resultados representan la media ± DE. Se realizó ANOVA de una vía, seguido por una prueba *post hoc* de Dunnett, donde * $p < 0.05$ respecto a la concentración de 0 mM (parásitos sin tratamiento).

Por otro lado, también se evaluó la expresión de los TvCDF bajo diferentes concentraciones de ZnSO₄ (Figura 18A) y FeSO₄ (Figura 18B), en este experimento se observó que la expresión de TvCDF1, TvCDF2, TvCDF4, TvCDF5, TvCDF7 y TvCDF8 disminuye en la concentración de ZnSO₄ de 1.6 mM, mientras que TvCDF3 aumenta su expresión a concentraciones superiores a 0.25 mM de ZnSO₄ y TvCDF6 se observa un aumento en la expresión en la concentración de 1 mM. Por otro lado, la expresión de estos mismos transportadores en diferentes concentraciones de FeSO₄ no se vio modificada.

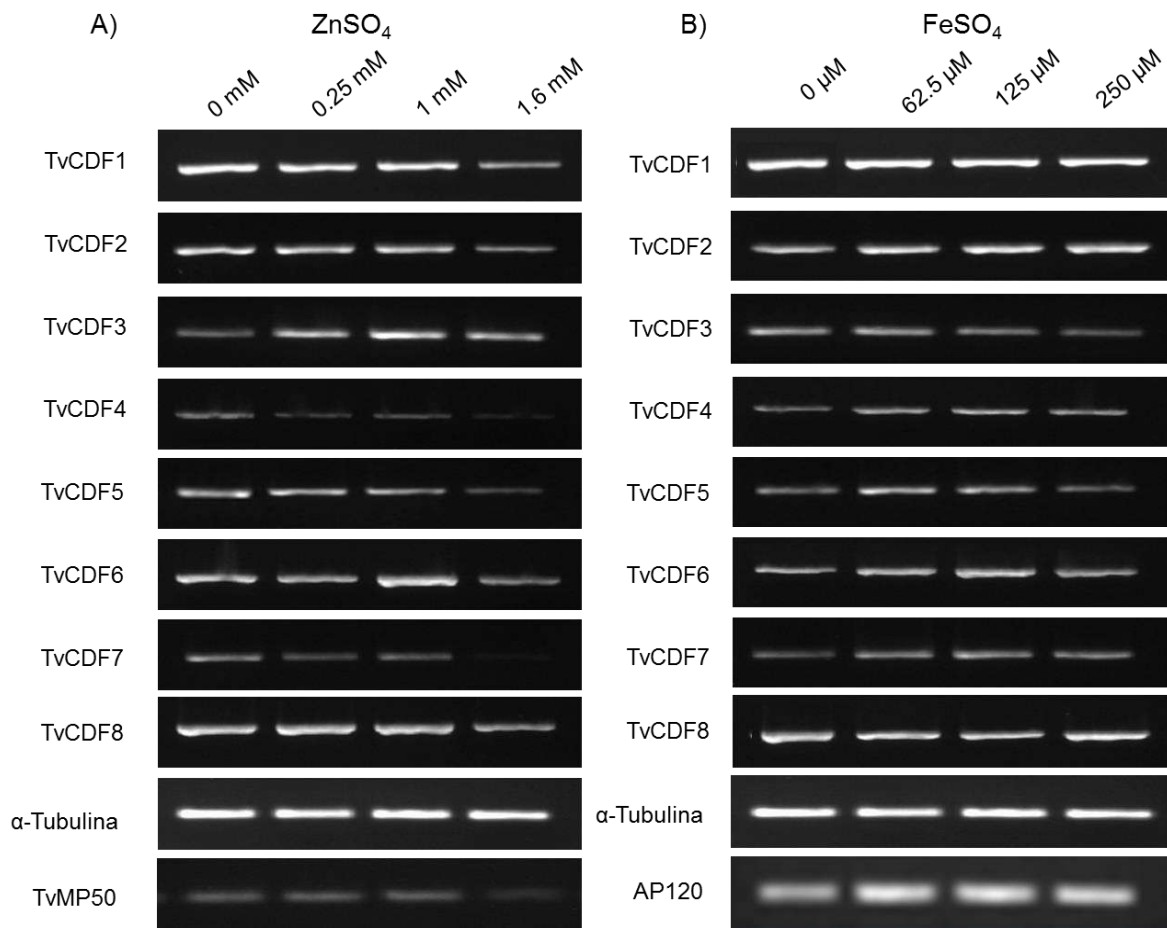


Figura 18. Expresión de los transportadores TvCDF en diferentes concentraciones de metales traza. A) Expresión de TvCDF en diferentes concentraciones de sulfato de zinc (ZnSO₄), el control constitutivo (α-Tubulina) y el control de expresión para zinc (TvMP50). **B)** Expresión de TvCDF en diferentes concentraciones de sulfato de hierro (FeSO₄), el control constitutivo (α-Tubulina) y el control de expresión para hierro (AP120).

El análisis estadístico que se realizó para los tratamientos con ZnSO₄ (Figura 19) indica que todas las concentraciones probadas de ZnSO₄ fueron estadísticamente significativas con respecto a 0 mM de ZnSO₄ para TvCDF1, TvCDF3, TvCDF4, TvCDF5 y TvCDF7, mientras que las concentraciones de 1 y 1.6 mM fueron significativas para TvCDF2 con respecto al 0 mM, para TvCDF6 se obtuvo una diferencia significativa en la concentración de 1 mM y la concentración de 1.6 tuvo una diferencia significativa con respecto a los parásitos sin tratamiento para TvCDF8 y TvMP50. Mientras que para los tratamientos con

FeSO₄ ninguno de estos mostros diferencia estadísticamente significativa con respecto a 0 mM de FeSO₄.

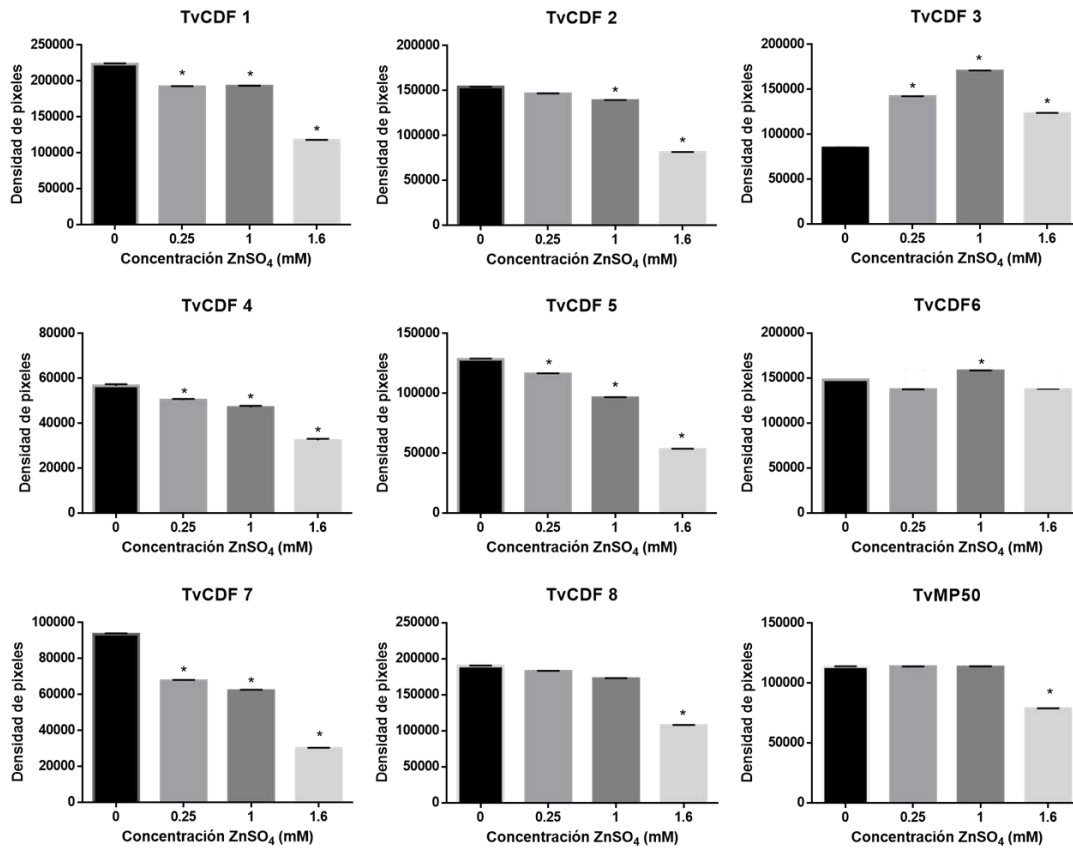


Figura 19. Evaluación de la densidad de bandas de TvCDF y TvMPP50 en diferentes concentraciones de ZnSO₄. Los resultados representan la media ± DE. Se realizó ANOVA de una vía, seguido por una prueba *post hoc* de Dunnett, donde * $p < 0.05$ respecto a la concentración de 0 mM (parásitos sin tratamiento).

7.4. Efecto en la expresión de los genes TvZIP y TvCDF bajo diferentes estímulos ambientales.

La evaluación de la expresión de los TvZIP y TvCDF se realizó también bajo diferentes estímulos ambientales o tipos de estrés a los que estaría sujeto *T. vaginalis* en su microambiente, entre estos se encuentran la exposición de los parásitos a peróxido de hidrogeno (H₂O₂) en diferentes tiempos (0, 60, 90, 120,

180 min) y también la exposición de *T. vaginalis* a una temperatura de 43 °C en periodos cortos de tiempo (0, 30, 60, 90 y 120 min).

Como resultado de los experimentos anteriores se tiene que la expresión de TvZIP bajo el estímulo de los parásitos con H₂O₂ (Figura 20A) fue diferente para cada uno de los transportadores, observando que TvZIP1 no se expresa en los tiempos de 60, 90 y 180 min pero se aprecia una banda tenue a los 120 min, para TvZIP2 no se observa expresión a los 180 min pero si a los otros tiempos probados, los TvZIP3 y TvZIP7 no se expresaron luego de 60 min con el estímulo de peróxido, TvZIP4 disminuye su expresión luego de 60 min y se mantiene hasta los 180 min, TvZIP5 no se expresa en 60, 90 y 120 min pero en 180 se observa una banda tenue y por último TvZIP6 y TvZIP8 no mostraron cambio en la expresión, todos estos cambios con respecto al control sin tratamiento. Para TvGP63 se observa que la expresión disminuye con respecto al tiempo de exposición al H₂O₂.

Para los transportadores TvCDF bajo el estímulo de peróxido de hidrógeno (Figura 20B), los TvCDF1 y TvCDF8 no se expresan luego de 120 minutos, pero a los 180 se observa el amplicón en baja intensidad mientras que TvCDF2, TvCDF3, TvCDF4, TvCDF5, TvCDF6 y TvCDF7 pierden su expresión a los 60 minutos y en los tiempos posteriores. En el caso del control de expresión (TvGP63) se observó que su expresión disminuye con respecto al tiempo,

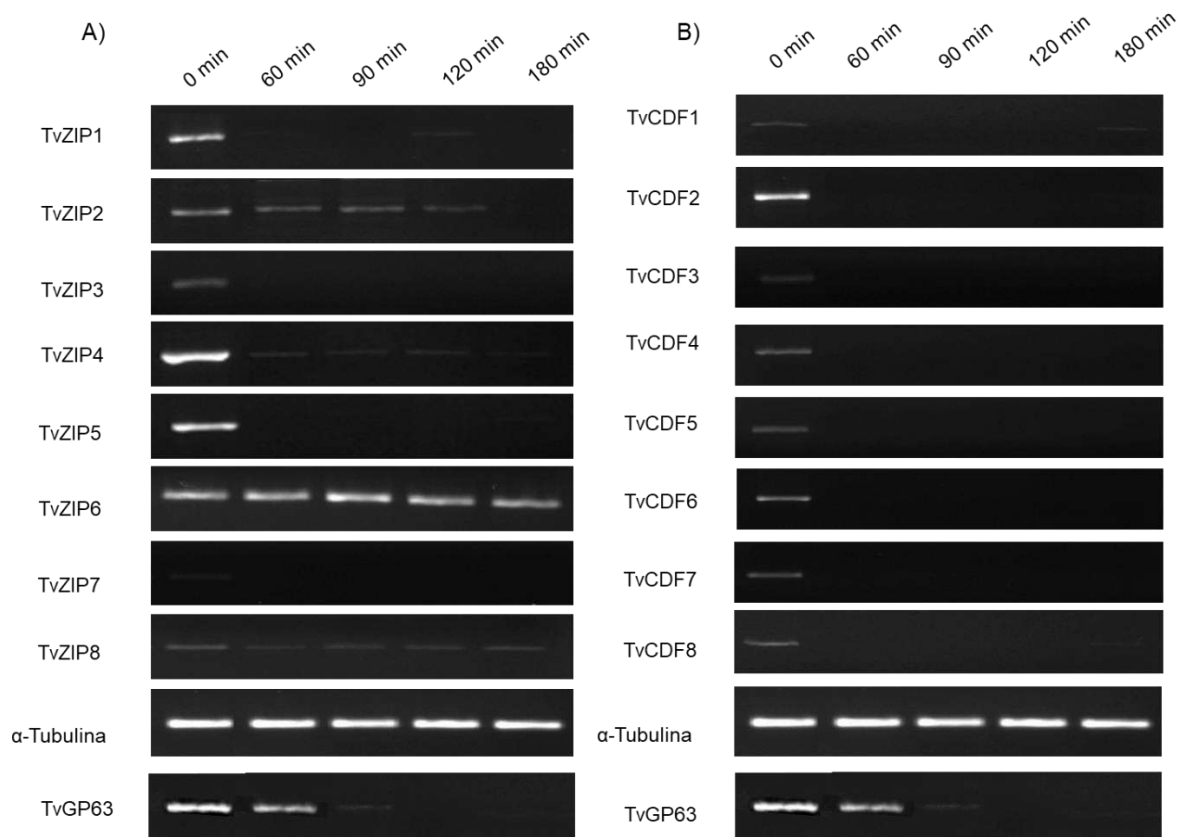


Figura 20. Expresión de los transportadores de iones metálicos bajo estrés oxidativo. A) Expresión de los TvZIP y TvGP63 bajo el estímulo con H_2O_2 (400 μM) en diferentes tiempos (0, 60, 90, 120 y 180 minutos). **B)** Expresión de los TvCDF y TvGP63 bajo el estímulo con H_2O_2 (400 μM) en diferentes tiempos (0, 60, 90, 120 y 180 minutos).

Con respecto al análisis estadístico de los TvZIP tratados con H_2O_2 en diferentes tiempos (Figura 21), este indicó que las densidades de las bandas en todos los tiempos tienen una diferencia significativa con respecto a al tiempo 0 minutos para TvZIP1, TvZIP2, TvZIP3, TvZIP4, TvZIP5 y TvZIP7, mientras que para TvZIP6 y TvZIP8 no se encontró diferencia significativa en los diferentes tiempos de incubación. Por el contrario, para todos los TvCDF (Figura 22) si se encontró diferencia significativa entre los tiempos de incubación con H_2O_2 y el tiempo 0 minutos.

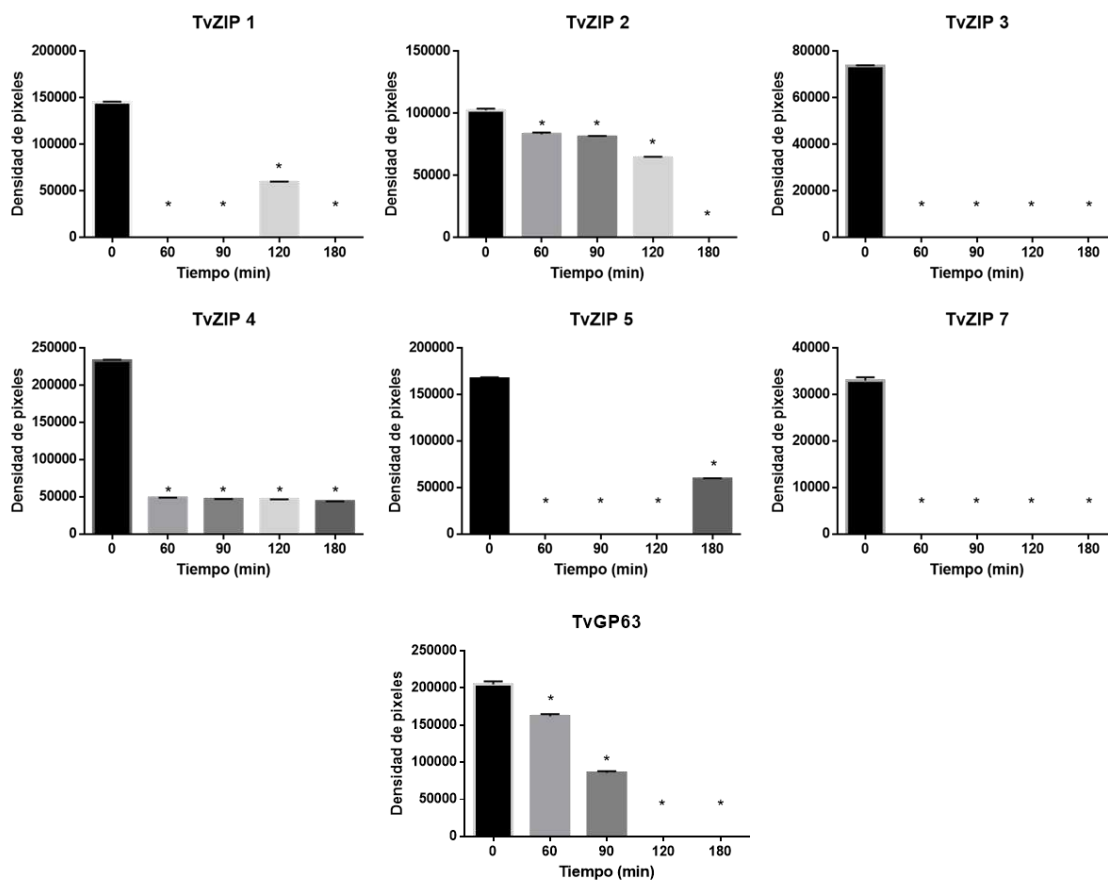


Figura 21. Evaluación de la densidad de bandas de TvZIP y TvGP63 en diferentes tiempos de exposición a H₂O₂. Los resultados representan la media ± DE. Se realizó ANOVA de una vía, seguido por una prueba *post hoc* de Dunnett, donde **p* < 0.05 respecto al tiempo de 0 minutos.

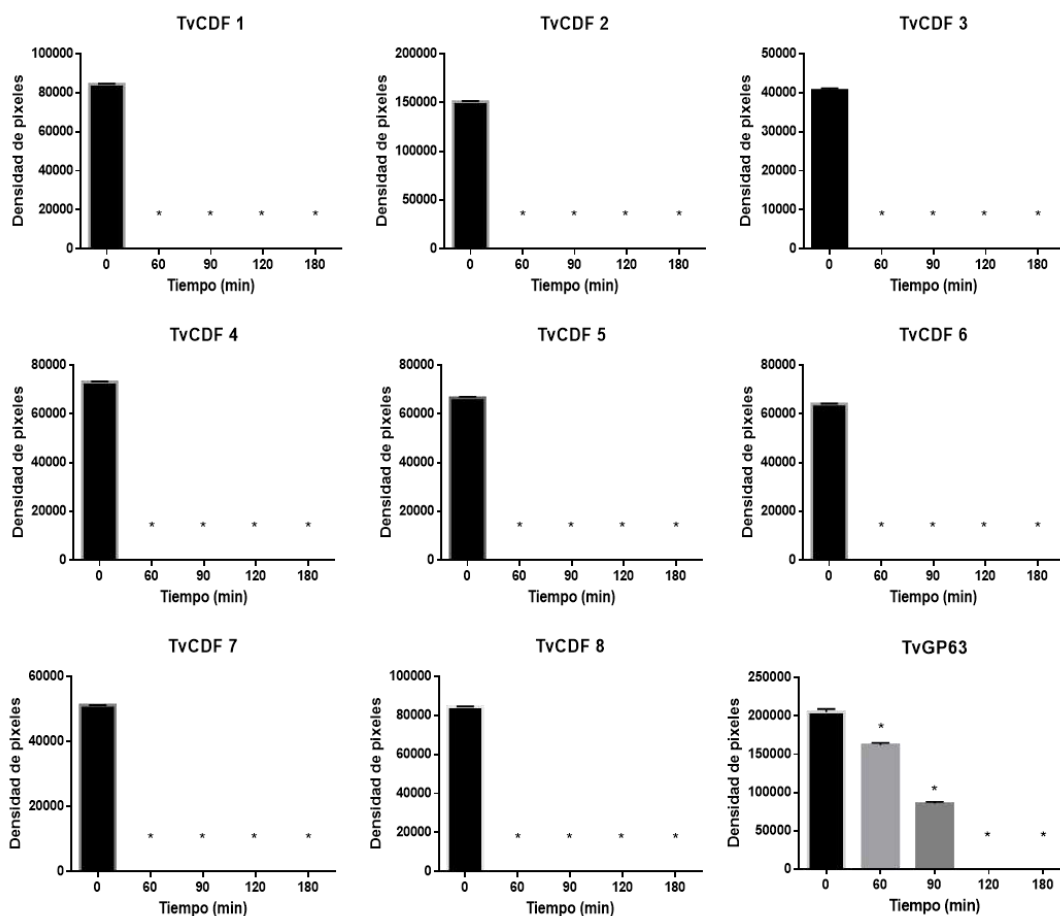


Figura 22. Evaluación de la densidad de bandas de TvCDF y TvGP63 en diferentes tiempos de exposición a H_2O_2 . Los resultados representan la media \pm DE. Se realizó ANOVA de una vía, seguido por una prueba *post hoc* de Dunnett, donde * $p < 0.05$ respecto al tiempo de 0 minutos.

Continuando con los estímulos ambientales, los parásitos se sometieron a una temperatura constante de 43°C por un rango de tiempo de 0 a 120 minutos y se pudo observar que la expresión para los TvZIP (Figura 23A) es variada dependiendo del transportador y el tiempo de incubación. Para TvZIP1 no se observa amplicón en el segundo tiempo (30 minutos), TvZIP2 no se ve afectado en el nivel de expresión en ninguno de los tiempos de incubación que se probaron al igual que TvZIP5 y TvZIP8, para TvZIP3 no se observan los amplicones correspondientes a este transportador en el tiempo de 60 minutos, en el caso de TvZIP4 se observa una disminución de la expresión únicamente en el tiempo de 90 minutos, para TvZIP6 se observa un aumento de la expresión a los 60 minutos,

parece disminuir a los 90 minutos y aumenta su expresión nuevamente a los 120 minutos, por último el amplicón correspondiente a la expresión de TvZIP7 no se observa a los 90 minutos de incubación.

Para los TvCDF (Figura 23B) se observó que la expresión de TvCDF1 disminuye en el tiempo de 60 min y a los 90 y 120 minutos no se observa amplicón, para TvCDF2 a los 30 minutos se observa un aumento en la expresión, a los 60 minutos esta disminuye, a los 90 min aumenta ligeramente y disminuye a los 120 minutos. En el caso de TvCDF3 disminuye la expresión a los 60, 90 y 120 minutos, TvCDF4 no se expresa a los 120 minutos, para TvCDF5 no se observó un cambio en la expresión en ninguno de los tiempos de incubación, TvCDF6 disminuye su expresión a los 60 minutos, a los 90 no se expresa y a los 120 se observa una banda tenue, TvCDF7 aumenta su expresión a los 90 minutos y por último TvCDF8 aumenta su expresión a los 30 minutos, disminuye a los 60, aumenta a los 90 y disminuye nuevamente a los 120 minutos.

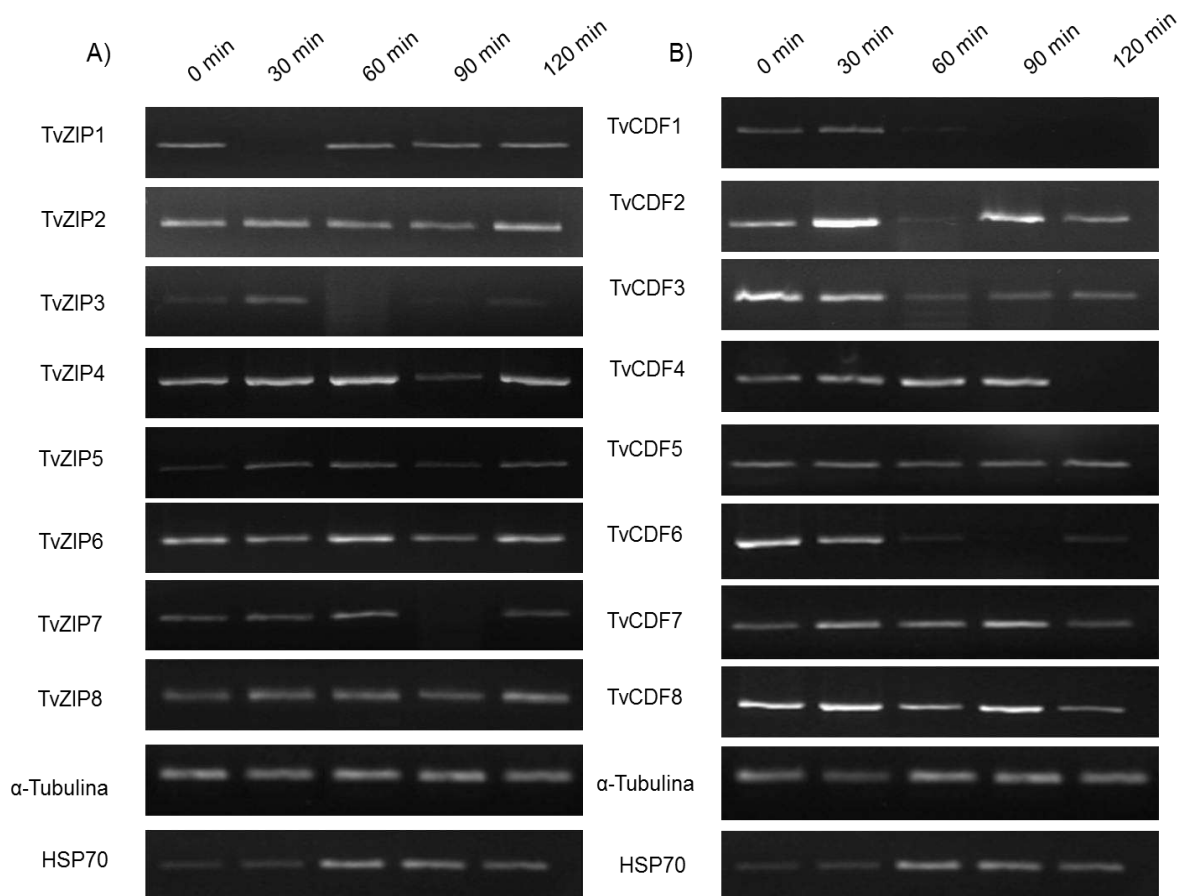


Figura 23. Expresión de los transportadores de iones metálicos bajo estrés por choque térmico. A) Expresión de los TvZIP a 43°C en intervalos de tiempo de 30 minutos (0-120 min). **B)** Expresión de los TvCDF a 43°C en intervalos de tiempo de 30 minutos (0-120 min).

Se realizaron también los análisis estadísticos correspondientes, encontrando que, para los TvZIP incubados a 43°C en diferentes tiempo (Figura 24), TvZIP1 presentó diferencia significativa a los 30 minutos, TvZIP3 y el control de expresión HSP70 presentaron diferencia significativa en 3 tiempos diferentes, 30, 60 y 90 minutos y 60, 90 y 120 minutos respectivamente en el caso de TvZIP4 y TvZIP7 mostraron diferencia significativa a los 90 min, TvZIP6 la mostró a 60 y 90 minutos, dichas diferencias fueron con respecto al tiempo 0 minutos.

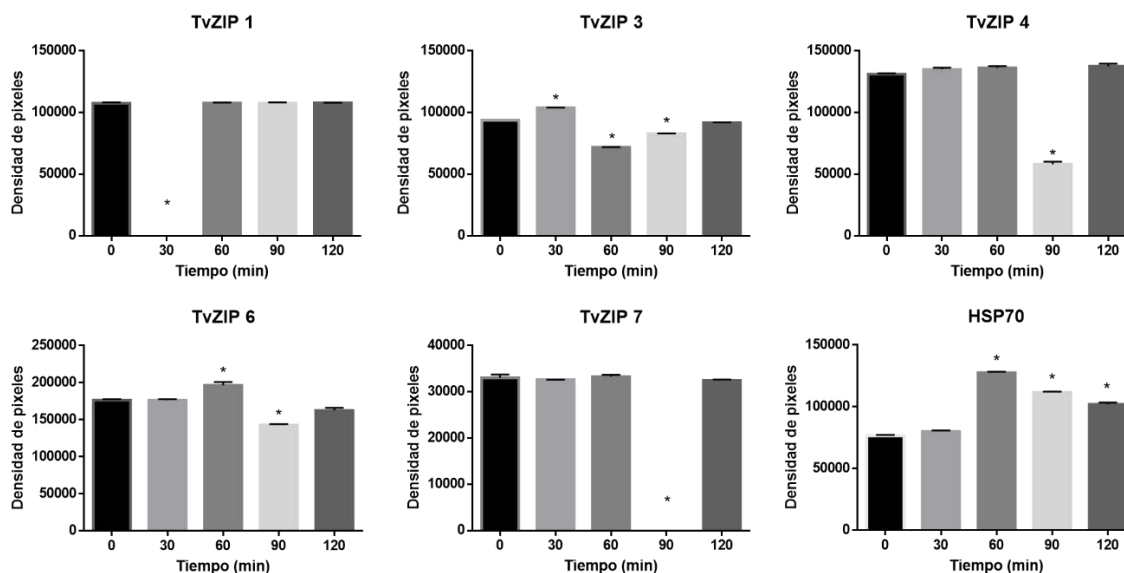


Figura 24. Evaluación de la densidad de bandas de TvZIP en diferentes tiempos de exposición a una temperatura de 43°C. Los resultados representan la media \pm DE. Se realizó ANOVA de una vía, seguido por una prueba *post hoc* de Dunnett, donde * $p < 0.05$ respecto al tiempo de 0 minutos.

El análisis estadístico para TvCDF1, TvCDF3, TvCDF6 y HSP70 (Figura 25) mostró que a los 60, 90 y 120 minutos tienen una diferencia significativa con respecto al tiempo de 0 minutos, TvCDF2 y TvCDF7 la tienen a los 30, 60 y 90 minutos, TvCDF4 presentó diferencia significativa a los 120 minutos y TvCDF8 a los 30, 60 y 120 minutos.

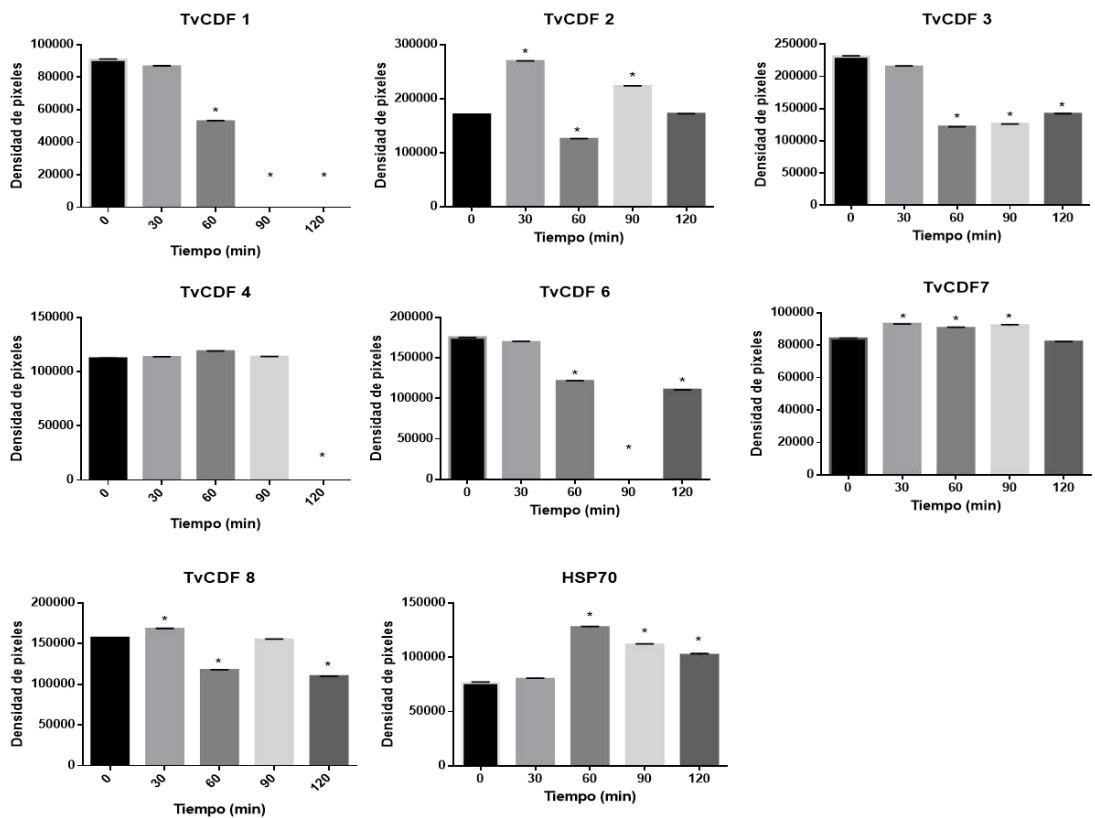


Figura 25. Evaluación de la densidad de bandas de TvCDF en diferentes tiempos de exposición a una temperatura de 43°C. Los resultados representan la media \pm DE. Se realizó ANOVA de una vía, seguido por una prueba *post hoc* de Dunnett, donde * $p < 0.05$ respecto al tiempo de 0 minutos.

VIII. DISCUSIÓN

Se realizó por primera vez la identificación y caracterización *in silico* de ocho transportadores de tipo ZIP (TvZIP) y ocho de tipo CDF (TvCDF) el genoma del parásito protozoario *T. vaginalis*, este resultado es diferente a lo reportado para otros parásitos como los protozoarios *Leishmania major* (4 ZIP y 4 CDF) y *Leishmania infantum* (3 ZIP) y para el nematodo *C. elegans* (6 ZIP y 8 CDF), incluso difiere con la hipótesis de que el número de genes que codifican transportadores de tipo ZIP y CDF aumenta en paralelo con la evolución de los organismos, ya que *T. vaginalis* se considera como un organismo eucariota primitivo. Sin embargo, la duplicación de genes ha sido reportada como un mecanismo importante para *T. vaginalis*.^{63,52,31,54,64}

Los ocho transportadores TvZIP y los ocho transportadores TvCDF identificados en *T. vaginalis* presentan características estructurales y fisicoquímicas similares a lo reportado para otros miembros de estas familias, pero dos TvZIP mostraron siete RTM (TvZIP4 y TvZIP6) como los ZmZIP1 y ZmZIP8 pertenecientes a *Zea mays* y uno de ellos que presentó cinco RTM (TvZIP7) que de acuerdo a su topología pudo haber perdido las primeras tres RTM y coincide con lo descrito para *Cryptococcus gattii*, el cual se reporta como un transportador ZIP pequeño al presentar únicamente cinco RTM.^{39,65-68} En el caso de los TvCDF casi todos presentaron seis RTM a excepción de TvCDF4 con nueve RTM y el TvCDF6 con 10 RTM que coinciden con otros transportadores CDF como el Msc2 de *S. cerevisiae* con 12 RTM o los SLC30A1 y SLC30A5 de humano con 10 y 15 RTM respectivamente.^{45,69,70}

Con respecto a la función y localización de los transportadores TvZIP y TvCDF, el análisis bioinformático indicó ambos son transportadores de iones o cationes y se localizan en la membrana u organelos (datos no mostrados), lo que está

ampliamente reportado en la bibliografía para este tipo de transportadores.^{31,67,70,71}

Las regiones aminoacídicas conservadas que se mencionan para los transportadores tipo ZIP son importantes para la función del transportador y se han reportado en diversos organismos como *H. sapiens*, *L. major* y *L. infantum*.^{51,72,73} La presencia de estos aminoácidos conservados coincide también con lo obtenido en el árbol filogenético, al ubicar a los transportadores en la subfamilia ZIP-II, ya que los aminoácidos H en la RTM II y HS en la RTM IV se presentan en miembros de dicha subfamilia como son el ZIP1, ZIP2 y el ZIP3 de humanos.^{59,73,74} Los TvZIP también se ubican en una de las dos ramas de la subfamilia ZIP-II con *N. gruberi* y *C. elegans*, esta división en la subfamilia podría indicar que a pesar de que los transportadores tienen un antecesor en común existen divergencias genéticas que los ubican en la rama con organismos menos evolucionados que los eucariontes de la otra rama (*M. musculus*, *H. sapiens*).

En cuanto a las regiones de aminoácidos conservados para los TvCDF, estos motivos se relacionan con el transporte de zinc y manganeso (Mn^{2+}).^{34,45,75} También se identificaron regiones ricas en histidina en la región que corresponde al carboxilo y amino terminal, que según lo reportado para otro transportador CDF (CzcD) son importantes para la unión del Zn^{2+} .⁴² En el caso de los TvCDF restantes (TvCDF4, TvCDF5 y TvCDF6) no se encontró ninguna región que indicara el transporte de zinc o manganeso, esto puede deberse a la gran diversidad que existe en esta familia de transportadores.^{34,44} La identificación de los motivos conservados se relaciona con lo obtenido en el análisis filogenético, donde los primeros 3 TvCDF se agrupan en la rama de la subfamilia CDF-Zn lo que sugiere que genéticamente se relacionan con genes de otros organismos que transportan Zn^{2+} y los últimos dos (TvCDF7 y TvCDF8) se relación más de cerca a los transportadores de la familia CDF-Mn, lo que sugiere una divergencia en entre la misma familia de genes TvCDF.

El uso del análisis bioinformático proporciona una herramienta útil para la detección de secuencias de interés, además permiten dirigir la parte experimental hacia lo que en realidad tiene importancia y no invertir los recursos en ensayos que no aportaran nada a la investigación, de igual forma Gaither y Eide mencionan que el aumento en los registros de secuencias y análisis *in silico* se debe a la utilización de herramientas de análisis y bases de datos más sensibles. Además, que los análisis filogenéticos que se realizaron permiten identificar un ancestro en común para este tipo de transportadores para inferir las relaciones existentes entre especies y las divergencias genéticas que puedan existir entre los transportadores de ambas familias.^{30,37}

Como se mencionó anteriormente, *T. vaginalis* tiene la particularidad de presentar genes parálogos que, aunque no se conoce cual el la razón de estas múltiples copias proporcionan una oportunidad para desarrollar la expresión diferencial de muchos de estos genes durante el crecimiento y desarrollo del parásito en condiciones ambientales variables.

Sabiendo esto, en el presente trabajo se evaluó por primera vez la expresión basal y diferencial de los transportadores TvZIP y TvCDF bajo diferentes estímulos ambientales, como son altas concentraciones de Zn^{2+} como en el microambiente prostático, altas concentraciones de Fe^{2+} como en el ambiente vaginal, el cambio de temperatura que se presenta durante el ciclo menstrual o por inflamación crónica y el tratamiento con peróxido de hidrogeno (H_2O_2) haciendo referencia al estrés oxidativo que sufre el parásito debido al sistema inmune del huésped.

Al someter al parásito a diferentes concentraciones de concentraciones de $ZnSO_4$ los transportadores TvZIP1, TvZIP3, TvZIP5 y TvZIP7 se regulan de forma negativa mientras que TvCDF3 que muestra una regulación positiva. En

contraste a lo observado para los transportadores Znt1 (transportador tipo CDF) que disminuyen su expresión y por ende hay una disminución del flujo de salida de Zn^{2+} celular y un aumento en el transportador de Zn^{2+} intestinal, ZIP4, que da como resultado un aumento de la absorción de Zn^{2+} . Pero también se ha reportado que el transportador Zip10 se oponen a los transportadores ZnT al aumentar las concentraciones de Zn^{2+} celular a través de la absorción de Zn^{2+} en la membrana plasmática o eflujo vesicular. Los mecanismos de regulación por Zn^{2+} en la expresión de transportadores como ZnT1 y ZnT2 (Transportadores tipo CDF) es mediada por el factor de transcripción de respuesta al metal 1 (MTF-1, por sus siglas en inglés). El MTF-1 es activado por zinc para unirse a elemento de respuesta al metal (MRE, por sus siglas en inglés) en el promotor del gen lo que resulta en una mayor tasa de transcripción y por ende se reduce la toxicidad causada por altas concentraciones de zinc. Por otro lado, Lichten *et al*⁶ demuestran que la unión del MTF-1 a un MRE localizado 17 pb “río abajo” del sitio de la transcripción reprime la expresión de genes implicados en la absorción de zinc como ZIP10, asimismo, mencionan que el MTF-1 activado por el zinc causa una regulación negativa de la transcripción de este transportador al bloquear físicamente el movimiento de la Polimerasa II a través del gen. Este mecanismo de regulación es reportado también para otros genes que participan en la homeostasis del Zn^{2+} como la metalotioneína 1 (MT1).⁷⁶⁻⁸⁰

Recientemente se ha publicado que *T. vaginalis* tiene un factor de regulación transcripcional similar a MTF-1 nombrado TvZNF1 el cual mostró una capacidad de unión a MRE de humano.⁸¹ Este nuevo hallazgo más lo mencionado anteriormente podrían indicar que la regulación de los transportadores TvZIP y TvCDF en concentraciones altas de Zn^{2+} tienen el mismo mecanismo de regulación que otros transportadores de Zn^{2+} reportados. Sin embargo, se requiere de más estudios para determinar este mecanismo de regulación, ya que no se ha demostrado la unión de TvZNF1 a MREs del parásito o incluso si estos

sitios de respuesta a metales se encuentran en las secuencias genómicas de los transportadores TvZIP y TvCDF que se reportan en este trabajo.

Por otro lado, el hierro ha sido implicado como un factor importante en la regulación de la virulencia de *T. vaginalis*, pero en concentraciones elevadas puede ser tóxico, además, hasta ahora no existen informes sobre un transportador de Fe^{2+} así que este sería el primer reporte de ello. En concentraciones elevadas de hierro el transportador TvZIP2 mostró una regulación positiva dependiente de la concentración mientras que, TvZIP4 se regula de forma negativa dependiendo de la concentración de FeSO_4 . La variación en la expresión de estos transportadores se ha reportado para Zip2 de mamíferos, ZIP6, ZIP7 y ZIP10 de humano y ZmIRT1 del maíz, además Connolly *et al*⁸², menciona que en las plantas el efecto del hierro en el ARNm de IRT1 (transportador tipo ZIP) se induce cuando la concentración Fe^{2+} se elimina o es muy baja, mientras que, este transportador se reprime cuando aumenta la concentración de dicho ion, esto a causa del factor de transcripción FIT-1 (Factor de Transcripción Inducido por la deficiencia de hierro FER-like).⁸²⁻⁸⁵ Sin embargo, esto solo coincide con lo observado para el transportador TvZIP4, que a concentraciones elevadas se observó una disminución en su expresión. De igual forma, se ha reportado que en el caso de *A. thaliana* la sobreexpresión de IRT-1 se da por control post-transcripcional.^{82,85}

La regulación post-transcripcional de genes que participan en la homeostasis del hierro en mamíferos es regulada principalmente por el sistema IRP/IRE, en el cual las proteínas reguladoras de hierro IRP1 e IRP2 se unirán a estructuras de tallo burbuja denominadas elementos de respuesta a hierro o elementos de respuesta sensibles al hierro (IRE, por sus siglas en inglés) localizadas en las regiones no traducidas (UTR, por sus siglas en inglés) de los ARN mensajeros (ARNm).^{22,86}

El sistema IRP/IRE se ha descrito en *T. vaginalis* para genes que se regulan positiva o negativamente por hierro como los de las cisteín proteinasas, TVCP4 y TVCP12. En el caso de TVCP4, se encontró un elemento sensible al hierro (tvcp4) en el extremo 5'-UTR de la región codificante del ARN mensajero y proteínas similares a IRP citoplasmáticas en dicho parásito, además, Solano *et al*⁸⁷ sugiere que en altas concentraciones de hierro una proteína tipo IRP está ausente, por lo que no existe interacción IRP/IRE y el mRNA de tvcp4 se traduce obteniendo mayores cantidades de TVCP4. Por otro lado, TVCP12 se regula negativamente por Fe²⁺ y la estabilidad de su ARNm varía dependiendo de las concentraciones de hierro. El elemento de regulación por hierro se identificó en el extremo 3'-UTR del transcrito tvcp12. Ambas proteínas se unen a los IRP humanos y a proteínas citoplasmáticas tipo IRP de *T. vaginalis*.⁸⁶⁻⁸⁸

Lo expuesto anteriormente podría explicar los cambios en la expresión de TvZIP al someter al parásito *T. vaginalis* a diferentes concentraciones FeSO₄, también se podría inferir que el aumento en la expresión de TvZIP2 se debe a que podría encontrarse en un organelo por lo que el Fe²⁺ se almacenaría mientras que el TvZIP4 que podría ubicarse en la membrana del parásito disminuye su expresión y así se evita la toxicidad causada por un exceso de Fe²⁺, pero se requiere de más experimentos para determinar la ubicación de estos transportadores, cuáles son los mecanismos de regulación involucrados en dichos cambios de expresión y también para resolver la incógnita de qué es lo que sucede con los TvCDF que no modifican su expresión en concentraciones elevadas de Fe²⁺.

Los cambios en la expresión de algunas de las proteínas de *T. vaginalis* ocurren debido a que el parásito debe de adaptarse al microambiente y generar una protección ante cambios en las concentraciones de iones, cambios de temperatura y en respuesta a células del sistema inmune como macrófagos y neutrófilos que secretan especies reactivas de oxígeno, esta regulación le permite sobrevivir en dichas condiciones de estrés.⁸⁹⁻⁹¹

En el caso de la expresión de los transportadores al ser sometidos a un tratamiento de H_2O_2 se puede observar en las Figuras 20-22 que la mayoría de los TvZIP y los TvCDF después de 60 min disminuyeron su expresión, esto podría explicarse porque los factores de transcripción MTF-1 e IRP son sensible a especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.^{92,93} Por otro lado, se ha reportado que la transcripción de la metalotioneína (MT1) que es una proteína que participa en conjunto con los transportadores ZIP y CDF para el mantenimiento de la homeostasis de Zn^{2+} y Fe^{2+} y que además es útil para la protección contra radicales libres, es mediada por MTF-1 y durante el estrés oxidativo, por efecto del H_2O_2 se induce la liberación del Zn^{2+} a través de la oxidación de grupos sulfhidrilo de la MT1, dichos iones de Zn^{2+} activan al MTF-1 para la transcripción génica y se cree que el Zn^{2+} liberado podría suprimir además el daño por radicales libres. También se ha descrito que la MT-1 es capaz de secuestrar Fe^{2+} , de tal manera que este ion ya no puede participar en la reacción de Fenton y por ende no se generan radicales hidroxilo y un estado de oxidación^{92,94,95}. En el caso de *T. vaginalis* se ha reportado un gen para MT por lo que se esperaría observar este factor de protección en el parásito caso contrario a lo aquí expuesto, cabe mencionar, que no se han realizado estudios experimentales en donde se demuestre su función en la regulación de zinc, hierro o protección contra el estrés oxidativo además que sería importante realizar una evaluación conjunta de la TvMT y los TvZIP y TvCDF en concentraciones altas de zinc y hierro más el tratamiento con H_2O_2 para demostrar si el efecto en la expresión de los transportadores es igual o se modifica.

De igual forma, se ha evaluado el estrés oxidativo por el grupo de investigación de Davis *et al*⁴⁸ y ellos reportan que diferentes proteínas de *T. vaginalis* se expresan en mayor o menor medida al someter a los parásitos a diferentes concentraciones y tiempos de exposición de peróxido de hidrogeno. Pero, en su reporte no hacen referencia a los mecanismos de regulación ni a la expresión de

transportadores tipo ZIP o CDF durante el estrés oxidativo, por lo que este trabajo es el primero en mencionar el comportamiento de genes TvZIP y TvCDF ante este estímulo, pero es importante seguir con las investigaciones para determinar el mecanismo por el cual el H₂O₂ afecta la expresión de dichos transportadores.

Por otro lado, en este trabajo se evaluaron los TvZIP y TvCDF por choque térmico a 43°C y se observó que el mayor cambio en la expresión se observó a los 90 minutos de incubación. Con respecto al estrés por choque térmico se ha reportado que el aumento de la temperatura, aunque sea de forma moderada afecta la homeostasis celular por lo que existen proteínas que contrarrestan esta pérdida de equilibrio, estas son las proteínas de estrés o choque térmico (HSP) y tienen un efecto citoprotector, además, en el caso de algunos parásitos estas proteínas juegan un papel importante en su diferenciación, desarrollo y virulencia.^{96,97}

Este tipo de proteínas reguladoras se han descrito en el genoma de *T. vaginalis* por Davis y Lushbaugh⁶¹ lo que sugiere que estas proteínas de estrés podrían estar interactuando con los transportadores evaluados, ya que los transportadores muestran una disminución o nula expresión por lo menos en uno de los tiempo evaluados, sin embargo, el nivel de expresión se normaliza transcurrido unos minutos, esto se respalda también con el aumento en la expresión de la HSP70, esto podría explicarse también porque el grado de protección de las HSP depende de varios factores, como la relación entre las HSP que se inducen durante el estrés o la presencia de otras proteínas citoprotectoras.^{61,98-100}

Cabe mencionar que la sobreexpresión de HSP se ha reportado también como protección contra peróxido de hidrogeno y otras especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, este efecto de protección no se observó en los transportadores evaluados, ya que la expresión de HSP70 también disminuyó con respecto al

tiempo de exposición al H₂O₂ (Resultados en la sección de Anexos), aunque no se debe descartar la participación de otras HSP reportadas para *T. vaginalis*, así como la concentración y el tiempo de exposición a dicho reactivo ya que en el caso de TvCDF1 y TvCDF8 se observa una banda tenue a los 180 minutos.^{97,101,102}

La expresión de estos transportadores proporciona los primeros datos de como *T. vaginalis* es capaz de adaptarse a diferentes condiciones ambientales, sin embargo, se deben continuar los estudios para determinar los mecanismos de regulación de estos transportadores ante cada estrés y así poder diseñar nuevas estrategias para el control de la tricomoniasis.

IX. CONCLUSIONES

- Se identificaron tanto *in silico* como de forma experimental ocho transportadores de tipo ZIP y ocho de tipo CDF en el genoma de *T. vaginalis*.
- Los transportadores TvZIP1, 3, 5 y 7 se regularon negativamente por altas concentraciones de zinc, al igual que los TvCDF1, 2, 4, 5, 7 y 8.
- El transportador TvCDF3 se reguló de forma positiva a concentraciones elevadas de zinc.
- En altas concentraciones de hierro el transportador TvZIP2 se reguló de forma positiva, mientras que, el TvZIP4 se reguló negativamente.
- Los parásitos expuestos a H₂O₂ mostraron una disminución en la expresión de los transportadores TvZIP1-5, 7 y TvCDF1-8.
- Los transportadores TvZIP3, 4, 6 y 7 y los TvCDF1, 3 y 6 disminuyeron su expresión a los 90 min de incubación a 43°C.
- La expresión de los transportadores TvCDF2 y TvCDF7 aumento luego de 90 minutos de incubación a 43°C.
- El parásito protozooario *T. vaginalis* cuenta con un mecanismo de regulacion de iones que le permiten mantener la homeostasis de estos y sobrevivir a los constantes cambios de su microambiente.
- Determinar la regulación de estos transportadores permitirá el diseño de nuevas estrategias para el control de la tricomoniasis.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMS (Organización Mundial de la Salud). *Modelo OMS de Información Sobre Prescripción de Medicamentos: Medicamentos Utilizados En Las Enfermedades Parasitarias.*; 1993. <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2924s/>.
2. CDC. Enfermedades de transmisión sexual. Tricomoniasis. <http://www.cdc.gov/std/spanish/tricomoniasis/default.htm>.
3. SUVE, DGE, SALUD. *Información Epidemiológica de Morbilidad.* México, D.F.; 2011.
4. Quintas-Granados LI, Villalpando JL, Vázquez-Carrillo LI, Arroyo R, Mendoza-Hernández G, Alvarez-Sánchez ME. TvMP50 is an immunogenic metalloproteinase during male trichomoniasis. *Mol Cell Proteomics.* 2013;12(7):1953-1964. doi:10.1074/mcp.M112.022012.
5. Kusdian G, Gould SB. The biology of *Trichomonas vaginalis* in the light of urogenital tract infection. *Mol Biochem Parasitol.* 2014;198(2):92-99. doi:10.1016/j.molbiopara.2015.01.004.
6. Ryu JS, Choi HK, Min DY, Ha SE, Ahn MH. Effect of iron on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *J Parasitol.* 2001;87(2):457-460. doi:10.1645/0022-3395(2001)087[0457:EOIOTV]2.0.CO;2.
7. Figueroa-Angulo EE, Rendón-Gandarilla FJ, Puente-Rivera J, et al. The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect.* 2012;14(15):1411-1427. doi:10.1016/j.micinf.2012.09.004.
8. Harp DF, Chowdhury I. Trichomoniasis: Evaluation to execution. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011;157(1):3-9. doi:10.1016/j.ejogrb.2011.02.024.
9. Menezes CB, Amanda Piccoli Frasson AP, Tasca T. Trichomoniasis – are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually

- transmitted disease worldwide? *Microb Cell*. 2016;3(9):404-418. doi:10.15698/mic2016.09.526.
10. SINAVE. *Distribución de Casos Nuevos de Enfermedad Por Fuente de Notificación.*; 2016.
 11. SINAVE. *Boletín Epidemiológico Semana 49.*; 2017. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/282347/sem49.pdf>.
 12. Diéguez IS. Tricomoniasis: Una vision amplia. *Iatreia*. 2014;27(2):198-205.
 13. Nu PAT, Nguyen VQH, Cao NT, Dessì D, Rappelli P, Fiori PL. Prevalence of trichomonas vaginalis infection in symptomatic and asymptomatic women in central vietnam. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9(6):655-660. doi:10.3855/jidc.7190.
 14. Soper D. Trichomoniasis: Under control or undercontrolled? *Am J Obstet Gynecol*. 2004;190(1):281-290. doi:10.1016/j.ajog.2003.08.023.
 15. Gram IT, Macaluso M, Churchill J, Stalsberg H. Trichomonas vaginalis (TV) and human papillomavirus (HPV) infection and the incidence of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade III. *Cancer Causes Control*. 1992;3(3):231-236. doi:10.1007/BF00124256.
 16. Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. Clinical and microbiological aspects of Trichomonas vaginalis. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(2):300-317. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9564565> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC106834>.
 17. Schwebke J, Burgess D. Trichomoniasis. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(4):794-803. doi:10.1128/CMR.17.4.794.
 18. Kissinger P. Epidemiology and Treatment of Trichomoniasis. *Curr Infect Dis Rep*. 2015;17(6):484. doi:10.1016/S2215-0366(16)30284-X.Epidemiology.
 19. Arroyo R. Biología molecular de la tricomonosis. In: Limusa, ed. *Genética Y Biomedicina Molecular*. ; 2000:287-304.
 20. Salazar P., Bucio M. Tricomoniasis urogenital, intestinal y bucal. In: McGraw Hill, ed. *Parasitología Medica*. 4th ed. México; 2014:65-71.
 21. Werner A. *Parasitología Humana*. 1st ed. (McGraw Hill, ed.). México; 2013.

22. Garza M de la, Vaca S. *La Lucha Por El Hierro*. 1st ed. (CINVESTAV, ed.). México, D.F.; 2010.
23. Smith A, Johnson P. Gene expression in the unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Res Microbiol*. 2011;162(6):646-654. doi:10.1016/j.resmic.2011.04.007.
24. Alderete JF, Garza GE. Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence. *Infect Immun*. 1988;56(1):28-33.
25. Lehker MW, Arroyo R, Alderete JF. The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *J Exp Med*. 1991;174(2):311-318. doi:10.1084/jem.174.2.311.
26. Ma L, Meng Q, Cheng W. Involvement of the GP63 protease in infection of *Trichomonas vaginalis*. 2011:71-79. doi:10.1007/s00436-010-2222-2.
27. Dyall SD, Lester DC, Schneider RE, et al. *Trichomonas vaginalis* Hmp35, a putative pore-forming hydrogenosomal membrane protein, can form a complex in yeast mitochondria. *J Biol Chem*. 2003;278(33):30548-30561. doi:10.1074/jbc.M304032200.
28. Vazquez-Carrillo LI, Quintas-Granados LI, Arroyo R, et al. The effect of Zn²⁺ on prostatic cell cytotoxicity caused by *Trichomonas vaginalis*. *J Integr OMICS*. 2011;1(2):198-210. doi:10.5584/jiomics.v1i2.56.
29. Dean P, Major P, Nakjang S, Hirt RP, Embley TM. Transport proteins of parasitic protists and their role in nutrient salvage. *Front Plant Sci*. 2014;5(April):153. doi:10.3389/fpls.2014.00153.
30. Gaither A, Eide D. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *BioMetals*. 2001;14:251-270.
31. Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Isumura N. The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiol Rev*. 2015;95(3):749-784. doi:10.1152/physrev.00035.2014.
32. Zeytuni N, Uebe R, Maes M, et al. Cation diffusion facilitators transport

- initiation and regulation is mediated by cation induced conformational changes of the cytoplasmic domain. *PLoS One*. 2014;9(3). doi:10.1371/journal.pone.0092141.
33. Eide DJ. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2006;1763(7):711-722. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.03.005.
 34. Kolaj-Robin O, Russell D, Hayes KA, Pembroke JT, Soulimane T. Cation diffusion facilitator family: Structure and function. *FEBS Lett*. 2015;589(12):1283-1295. doi:10.1016/j.febslet.2015.04.007.
 35. Hirt RP. *Trichomonas vaginalis* virulence factors: an integrative overview. *Sex Transm Infect*. 2013;89(6):439-443. doi:10.1136/sextrans-2013-051105.
 36. Eide DJ. The SLC39 family of metal ion transporters. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2004;447(5):796-800. doi:10.1007/s00424-003-1074-3.
 37. U.S. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Published 2017.
 38. Kambe T, Yamaguchi-Iwai Y, Sasaki R, Nagao M. Overview of mammalian zinc transporters. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(1):49-68. doi:10.1007/s00018-003-3148-y.
 39. Guerinot M Lou. The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2000;1465(1-2):190-198. doi:10.1016/S0005-2736(00)00138-3.
 40. Kambe T, Suzuki T, Nagao M, Yamaguchi-Iwai Y. Sequence similarity and functional relationship among eukaryotic ZIP and CDF transporters. *Genomics, Proteomics Bioinforma*. 2006;4(1):1-9. doi:10.1016/S1672-0229(06)60010-7.
 41. McGowan SJ, Gorham HC, David A. Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: DNA sequence analysis of the *carR* region. 1993;10:713-735.
 42. Anton A, Weltrowski A, Haney CJ, et al. Characteristics of zinc transport by

- two bacterial cation diffusion facilitators from *Ralstonia metallidurans* CH34 and *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2004;186(22):7499-7507. doi:10.1128/JB.186.22.7499-7507.2004.
43. Huang L, Tepasamorndech S. The SLC30 family of zinc transporters-A review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. *Mol Aspects Med.* 2013;34(2-3):548-560. doi:10.1016/j.mam.2012.05.008.
 44. Cubillas C, Vinuesa P, Tabche ML, García-de los Santos A. Phylogenomic analysis of Cation Diffusion Facilitator proteins uncovers Ni²⁺/Co²⁺ transporters. *Metallomics.* 2013;5(12):1634. doi:10.1039/c3mt00204g.
 45. Paulsen IT, Saier Jr. MH. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J Membr Biol.* 1997;156(2):99-103. doi:10.1007/s002329900192.
 46. Lu M, Fu D. Structure of the Zinc Transporter YiiP. *Science (80-).* 2007;317(5845):1746-1748. doi:10.1126/science.1143748.
 47. Fu D. Zinc Transporter YiiP *Escherichia coli*. *Handb Met.* 2010. doi:10.1002/0470028637.met286.
 48. Grass G, Otto M, Fricke B, et al. FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Arch Microbiol.* 2005;183(1):9-18. doi:10.1007/s00203-004-0739-4.
 49. Grotz N, Fox T, Connolly E, Park W, Guerinot ML, Eide D. Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95(12):7220-7224. doi:10.1073/pnas.95.12.7220.
 50. Kobae Y, Uemura T, Sato MH, et al. Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis. *Plant Cell Physiol.* 2004;45(12):1749-1758. doi:10.1093/pcp/pci015.
 51. Jacques I, Andrews NW, Huynh C. Functional characterization of LIT1, the *Leishmania amazonensis* ferrous iron transporter. *Mol Biochem Parasitol.*

- 2010;170(1):28-36. doi:10.1016/j.molbiopara.2009.12.003.
52. Huynh C, Sacks DL, Andrews NW. A *Leishmania amazonensis* ZIP family iron transporter is essential for parasite replication within macrophage phagolysosomes. *J Exp Med.* 2006;203(10):2363-2375. doi:10.1084/jem.20060559.
 53. Roh HC, Collier S, Deshmukh K, Guthrie J, Robertson JD, Kornfeld K. ttm-1 Encodes CDF Transporters That Excrete Zinc from Intestinal Cells of *C. elegans* and Act in a Parallel Negative Feedback Circuit That Promotes Homeostasis. *PLoS Genet.* 2013;9(5). doi:10.1371/journal.pgen.1003522.
 54. Nies DH. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* 2003;27(2-3):313-339. doi:10.1016/S0168-6445(03)00048-2.
 55. Lu M, Chai J, Fu D. Structural basis for autoregulation of the zinc transporter YiiP. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(10):1063-1067. doi:10.1038/nsmb.1662.
 56. Mathews WR, Wang F, Eide DJ, Van Doren M. *Drosophila* fear of intimacy encodes a Zrt/IRT-like protein (ZIP) family zinc transporter functionally related to mammalian ZIP proteins. *J Biol Chem.* 2005;280(1):787-795. doi:10.1074/jbc.M411308200.
 57. Pielage J, Kippert A, Zhu M, Klämbt C. The *Drosophila* transmembrane protein Fear-of-intimacy controls glial cell migration. *Dev Biol.* 2004;275(1):245-257. doi:10.1016/j.ydbio.2004.07.039.
 58. Santos O, Rigo GDV, Frasson AP. Optimal Reference Genes for Gene Expression Normalization in *Trichomonas vaginalis*. 2015:1-17. doi:10.1371/journal.pone.0138331.
 59. Vazquez-carrillo LI, Quintas-granados LI, Arroyo R, et al. The effect of Zn²⁺ on prostatic cell cytotoxicity caused by *Trichomonas vaginalis*. 2011;1(2):198-210. doi:10.5584/jiomics.v1i2.56.
 60. Davis SR, Lushbaugh WB. Oxidative stress and *Trichomonas vaginalis*: the effect of hydrogen peroxide in vitro. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;48(4):480-487. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8480855>.

61. Davis SR, Lushbaugh WB. Characterization of the heat-shock response of *Trichomonas vaginalis*. *Am J Trop Med Hyg.* 1992;47(1 II SUPPL.):70-77.
62. Rogers EE, Eide DJ, Guerinot M Lou. Altered selectivity in an Arabidopsis metal transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(22):12356-12360. doi:10.1073/pnas.210214197.
63. Carvalho S, Barreira da Silva R, Shawki A, et al. LiZIP3 is a cellular zinc transporter that mediates the tightly regulated import of zinc in *Leishmania infantum* parasites. *Mol Microbiol.* 2015;96(3):581-595. doi:10.1111/mmi.12957.
64. Horváthová L, Šafaříková L, Basler M, et al. Transcriptomic identification of iron-regulated and iron-independent gene copies within the heavily duplicated *trichomonas vaginalis* genome. *Genome Biol Evol.* 2012;4(10):1017-1029. doi:10.1093/gbe/evs078.
65. Proteomics G. Sequence Similarity and Functional Relationship Among Eukaryotic ZIP and CDF Transporters. 2015;(November). doi:10.1016/S1672-0229(06)60010-7.
66. Schneider RDO, Diehl C, Melise F, et al. Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence. :1-11. doi:10.1038/srep10104.
67. Li S, Zhou X, Huang Y, et al. Identification and characterization of the zinc-regulated transporters, iron-regulated transporter-like protein (ZIP) gene family in maize. *BMC Plant Biol.* 2013;13(1):114. doi:10.1186/1471-2229-13-114.
68. Mondal TK, Ganie SA, Rana MK, Sharma TR. Genome-wide Analysis of Zinc Transporter Genes of Maize (*Zea mays*). *Plant Mol Biol Report.* 2014;32(2):605-616. doi:10.1007/s11105-013-0664-2.
69. Li L, Kaplan J. The Yeast Gene MSC2, a Member of the Cation Diffusion Facilitator Family, Affects the Cellular Distribution of Zinc. *J Biol Chem.* 2001;276(7):5036-5043. doi:10.1074/jbc.M008969200.
70. Seve M, Chimienti F, Devergnas S, Favier A. In silico identification and expression of SLC30 family genes: an expressed sequence tag data mining

- strategy for the characterization of zinc transporters' tissue expression. *BMC Genomics*. 2004;5(1):32. doi:10.1186/1471-2164-5-32.
71. Palmiter RD, Findley SD. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J*. 1995;14(4):639-649. doi:10.1002/j.1460-2075.1995.tb07042.x.
 72. Ambe TK. An Overview of a Wide Range of Functions of ZnT and Zip Zinc Transporters in the Secretory Pathway. 2011;75(6):1036-1043. doi:10.1271/bbb.110056.
 73. Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Itsumura N. The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiol Rev*. 2015;95(3):749-784. doi:10.1152/physrev.00035.2014.
 74. Gaither LA. Eukaryotic Zinc transporters and their regulation. 2015;(AUGUST 2001). doi:10.1023/A.
 75. Montanini B, Blaudez D, Jeandroz S, Sanders D, Chalot M. Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics*. 2007;8(1):107. doi:10.1186/1471-2164-8-107.
 76. Lichten LA, Ryu M, Guo L, Embury J, Cousins RJ. MTF-1-Mediated Repression of the Zinc Transporter Zip10 Is Alleviated by Zinc Restriction. *PLoS One*. 2011;6(6). doi:10.1371/journal.pone.0021526.
 77. Ryu M-S, Lichten LA, Liuzzi JP, Cousins RJ. Zinc transporters ZnT1 (Slc30a1), Zip8 (Slc39a8), and Zip10 (Slc39a10) in mouse red blood cells are differentially regulated during erythroid development and by dietary zinc deficiency. *J Nutr*. 2008;138(11):2076-2083. doi:10.3945/jn.108.093575.
 78. Langmade SJ, Ravindra R, Daniels PJ, Andrews GK. The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J Biol Chem*. 2000;275(44):34803-34809. doi:10.1074/jbc.M007339200.
 79. Andrews GK. Cellular zinc sensors: MTF-1 regulation of gene expression. *BioMetals*. 2001;14(3-4):223-237. doi:10.1023/A:1012932712483.

80. Kimura T, Kambe T. The functions of metallothionein and ZIP and ZnT transporters: An overview and perspective. *Int J Mol Sci.* 2016;17(3):10-12. doi:10.3390/ijms17030336.
81. Villalpando JL, Arreola R, Puente-Rivera J, et al. TvZNF1 is a C2H2 zinc finger protein of *Trichomonas vaginalis*. *BioMetals.* 2017. doi:10.1007/s10534-017-0053-7.
82. Connolly EL, Fett JP, Guerinot M Lou. Expression of the IRT1 Metal Transporter Is Controlled by Metals at the Levels of Transcript and Protein Accumulation. *Plant Cell.* 2002;14(June):1347-1357. doi:10.1105/tpc.001263.1348.
83. Wang CY, Jenkitkasemwong S, Duarte S, et al. ZIP8 is an iron and zinc transporter whose cell-surface expression is up-regulated by cellular iron loading. *J Biol Chem.* 2012;287(41):34032-34043. doi:10.1074/jbc.M112.367284.
84. Nam H, Knutson MD. Effect of dietary iron deficiency and overload on the expression of ZIP metal-ion transporters in rat liver. *Biometals.* 2012;25(1):115-124. doi:10.1111/obr.12065.Variation.
85. Kobayashi T, Nishizawa NK. Iron Uptake , Translocation , and Regulation in Higher Plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2012;63:131-152. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105522.
86. J.C. Torres-Romero, Arroyo R. Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations : Evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE / IRP-like system. *Infect Genet Evol.* 2009;9:1065-1074. doi:10.1016/j.meegid.2009.06.003.
87. Solano-Gonzalez E, Burrola-barraza E, Leo C, Ortega-lo J, Gutie L, Avila-gonza L. The trichomonad cysteine proteinase TVCP4 transcript contains an iron-responsive element. *FEBS Lett.* 2007;581:2919-2928. doi:10.1016/j.febslet.2007.05.056.
88. Cárdenas-Guerra RE, Arroyo R, Rosa de Andrade I, Benchimol M, Ortega-López J. The iron-induced cysteine proteinase TvCP4 plays a key role in

- Trichomonas vaginalis haemolysis. *Microbes Infect.* 2013;15(13):958-968. doi:10.1016/j.micinf.2013.09.002.
89. Puente-rivera J, Figueroa-angulo EE, Rendo FJ, Ortega-lo J. The effects of environmental factors on the virulence of Trichomonas vaginalis. 2012;14:1411-1427. doi:10.1016/j.micinf.2012.09.004.
 90. Davis SR, Lushbaugh AB. OXIDATIVE STRESS AND TRICHOMONAS VAGINALIS: THE EFFECT OF HYDROGEN PEROXIDE IN VITRO. 1993;48(4):480-487.
 91. Lushbaugh WB. RESPONSE OF THE HEAT-SHOCK. 1992;47(1):70-77.
 92. Zhang B, Georgiev O, Hagmann M, et al. Activity of metal-responsive transcription factor 1 by toxic heavy metals and H₂O₂ in vitro is modulated by metallothionein. *Mol Cell Biol.* 2003;23(23):8471-8485. doi:10.1128/MCB.23.23.8471.
 93. Joshi RS, Morán E, Sánchez M. Cellular Iron Metabolism – The IRP / IRE Regulatory Network. *inTech.* 2012. Ricky S. Joshi, Erica Moran and Mayka Sanchez (2012). Cellular Iron Metabolism – The IRP/IRE Regulatory Network, Iron Metabolism, Dr. Sarika Arora (Ed.), ISBN: 978-953-51-0605-0, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/iron-metabolism/cell>.
 94. Ebadi M, Leuschen MP, Refaey HEL, Hamada FM, Rojas P. The antioxidant properties of zinc and metallothionein. *Neurochem Int.* 1996;29(2):159-166. doi:10.1016/0197-0186(95)00116-6.
 95. Jiménez I, Gotteland M, Zarzuelo A, Uauy R, Speisky H. Loss of the metal binding properties of metallothionein induced by hydrogen peroxide and free radicals. *Toxicol.* 1997;120(1):37-46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9160107>.
 96. Lex H. T. Van Der Ploeg SHG and CRC. Heat Shock Genes : Regulatory Role for Differentiation in Parasitic Protozoa Author (s): Lex H . T . Van Der Ploeg , Suzanne H . Giannini and Charles R . Cantor Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL :

- [http://www.j. Science \(80- \). 1985;228\(4706\):1443-1446.](http://www.j. Science (80-). 1985;228(4706):1443-1446)
97. Coronato S, Di Girolamo W, Salas M, Spinelli O, Laguens G. Biología de las proteínas del shock térmico. *Medicina (B Aires)*. 1999;59(5 I):477-486.
 98. Gupta SC, Sharma A, Mishra M, Mishra RK, Chowdhuri DK. Heat shock proteins in toxicology: How close and how far? *Life Sci*. 2010;86(11-12):377-384. doi:10.1016/j.lfs.2009.12.015.
 99. Verghese J, Abrams J, Wang Y, Morano KA. Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012;76(2):115-158. doi:10.1128/MMBR.05018-11.
 100. Ciocca D, Oesterreich S, Chamness GC, McGuire WL, Fuqua SAW. Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 1993;85(19):1558–1570. doi:<https://doi.org/10.1093/jnci/85.19.1558>.
 101. Richter K, Haslbeck M, Buchner J. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Mol Cell*. 2010;40(2):253-266. doi:10.1016/j.molcel.2010.10.006.
 102. Morimoto R. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science (80-)*. 1993;259(5100):1409-1410. doi:10.1126/science.8451637.

XI. ANEXOS

11.1 Análisis *in silico*

Se presentan las secuencias obtenidas en el genoma de *T. vaginalis* con cada una de las secuencias consenso empleadas para la búsqueda de secuencias homologas.

11.1.1 Transportadores tipo ZIP

Secuencias homologas a los transportadores tipo ZIP encontradas en *T. vaginalis* a partir de las secuencias consenso de los transportadores IRT1, ZRT1 y ZRT2.

Cuadro 1. Secuencias homologas a IRT1 que se identificaron en el genoma de *T. vaginalis*.

No. Acceso TrichDB	Score	E
TVAG_372990	77.0	1e-15
TVAG_040010	64.3	3e-11
TVAG_053760	48.5	4e-06
TVAG_415420	48.1	6e-06
TVAG_273550	47.8	9e-06
TVAG_434800	45.4	5e-05
TVAG_495850	40.0	0.002
TVAG_444590	32.3	0.79

Cuadro 2. Secuencias homologas a ZRT1 que se identificaron en el genoma de *T. vaginalis*.

No. Acceso TrichDB	Score	E
TVAG_495850	42.7	3e-04
TVAG_273550	42.4	6e-04
TVAG_434800	39.3	0.005
TVAG_053760	35.4	0.081
TVAG_040010	34.7	0.16
TVAG_372990	33.5	0.39
TVAG_415420	33.5	0.33
TVAG_223490	31.6	2.0
TVAG_297700	31.2	2.3
TVAG_312180	31.2	2.6
TVAG_424420	30.8	3.7
TVAG_179720	29.6	8.4
TVAG_210180	29.6	4.5
TVAG_444590	29.6	7.8

Cuadro 3. Secuencias homologas a ZRT2 que se identificaron en el genoma de *T. vaginalis*.

No. Acceso TrichDB	Score	E
TVAG_040010	40.4	0.003
TVAG_444590	36.2	0.060
TVAG_374570	33.9	0.54
TVAG_495850	32.3	0.77
TVAG_434800	31.2	2.7
TVAG_098350	30.4	6.5
TVAG_297700	30.4	4.1
TVAG_106580	30.0	8.8

11.1.2. Transportadores tipo CDF

Secuencias homologas a los transportadores tipo CDF encontradas en *T. vaginalis* a partir de las secuencias consenso de los transportadores CzcD, YiiP y ZRC1.

Cuadro 4. Secuencias homologas a CzcD que se identificaron en el genoma de *T. vaginalis*.

No. Acceso TrichDB	Score	E
TVAG_132220	154	2e-42
TVAG_285720	149	3e-40
TVAG_228020	139	5e-37
TVAG_524900	69.7	5e-14
TVAG_060360	37.4	0.022
TVAG_027220	33.5	0.28
TVAG_312240	32.3	0.79
TVAG_520310	32.3	0.75
TVAG_522400	32.3	0.65
TVAG_597210	32.3	0.77
TVAG_515470	32.0	0.99
TVAG_526850	32.0	1.1
TVAG_RG_DS113544_3	32.0	1.3
TVAG_521880	31.6	1.3
TVAG_604560	31.6	1.1
TVAG_235060	31.2	2.3
TVAG_287700	30.8	2.9
TVAG_RG_DS113601_7	30.8	2.5
TVAG_102590	29.6	6.1
TVAG_271260	29.6	6.1

Cuadro 5. Secuencias homologas a YiiP que se identificaron en el genoma de *T. vaginalis*.

No. Acceso TrichDB	Score	E
TVAG_364570	52.0	4e-07
TVAG_283320	49.3	3e-06
TVAG_237080	46.6	2e-05
TVAG_437450	43.5	2e-04
TVAG_204400	43.1	2e-04
TVAG_132220	38.1	0.011
TVAG_228020	35.4	0.070
TVAG_242740	30.4	3.0
TVAG_556320	30.0	1.3
TVAG_050290	29.3	7.8

Cuadro 6. Secuencias homologas a ZRC1 que se identificaron en el genoma de *T. vaginalis*.

No. Acceso TrichDB	Score	E
TVAG_132220	128	3e-32
TVAG_285720	122	4e-30
TVAG_228020	111	1e-26
TVAG_524900	72.0	3e-14
TVAG_027220	34.7	0.21
TVAG_319090	32.3	1.50
TVAG_265400	32.0	1.40
TVAG_093530	31.6	2.40
TVAG_440440	30.0	4.10

Cuadro 7. Secuencias homologas al TVAG_132220 de *T. vaginalis*

No. Acceso TrichDB	Score	E
TVAG_132220	875	0.0
TVAG_285720	624	0.0
TVAG_228020	587	0.0
TVAG_524900	188	8e-57
TVAG_060360	51.6	9e-07
TVAG_027220	33.9	0.43
TVAG_203320	33.9	0.48
TVAG_090740	33.5	0.71
TVAG_093530	32.7	1.1
TVAG_056520	31.2	3.4
TVAG_437450	31.2	3.2
TVAG_372990	30.4	5.0
TVAG_436970	30.0	8.0
TVAG_169460	29.6	4.8
TVAG_474490	29.6	9.3
TVAG_181570	28.9	6.3

11.1.3. Árbol filogenético de transportadores de tipo CDF

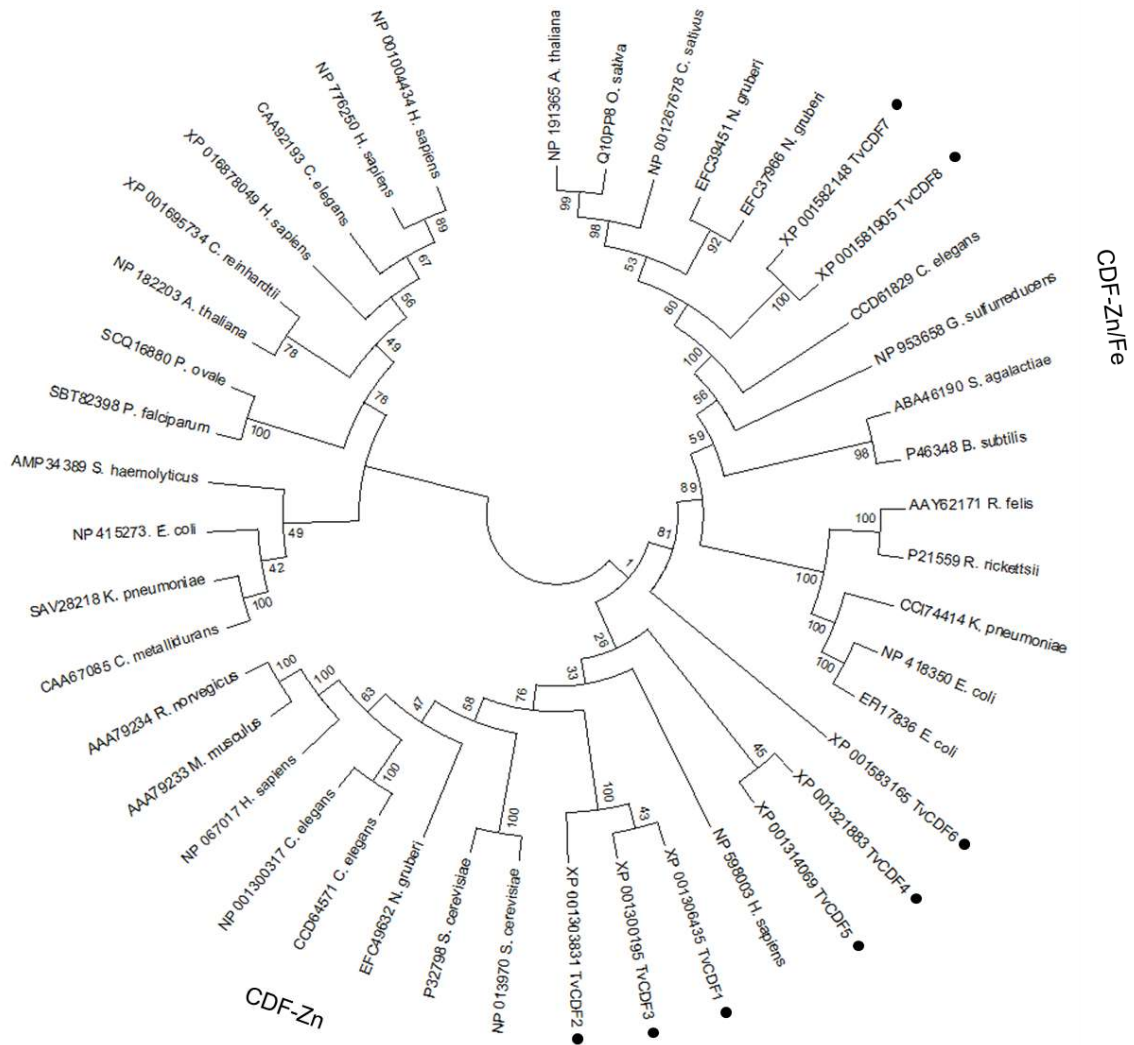


Figura 1. Árbol filogenético de los transportadores tipo CDF. En la figura se muestra el árbol filogenético realizado por el método NJ-JTT con las secuencias de las tres subfamilias (CDF-Zn²⁺, CDF-Zn/Fe y CDF-Mn²⁺) de los transportadores tipo CDF. • Secuencias tipo CDF identificadas en *T. vaginalis*.

11.2. Expresión de HSP70 en parásitos tratados con H₂O₂

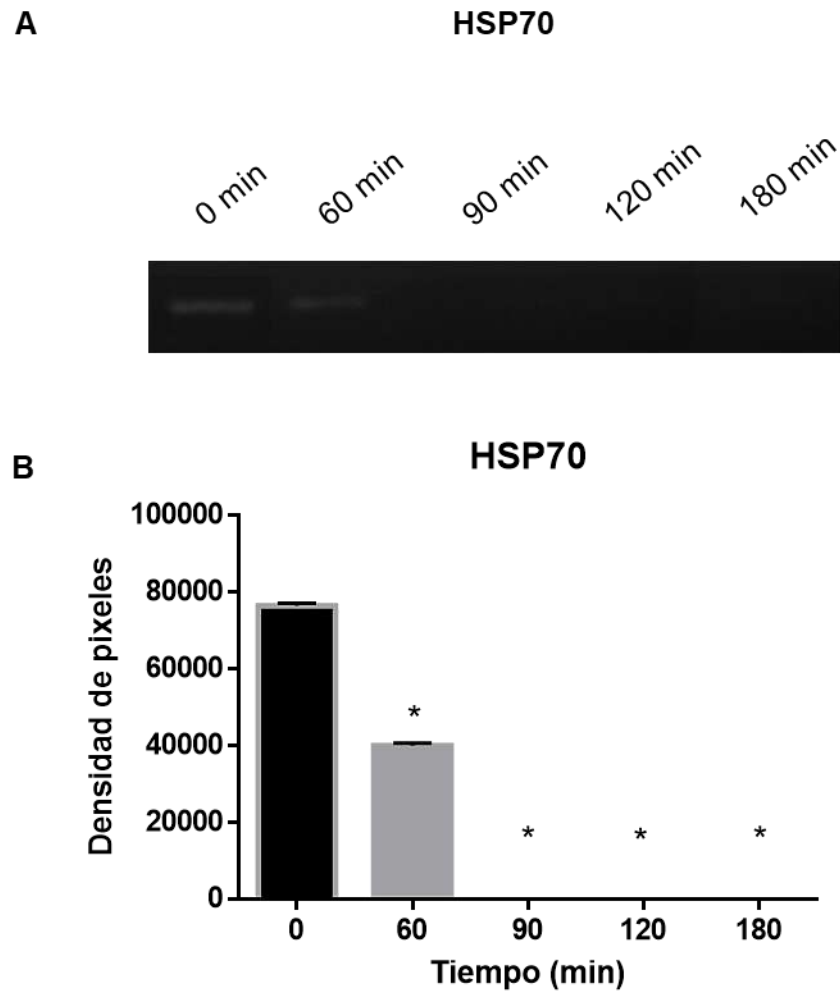


Figura 2. Evaluación de HSP70 en diferentes tiempos de exposición a H₂O₂. **A)** Expresión de HSP70 bajo el estímulo con H₂O₂ (400 μ M) en diferentes tiempos (0, 60, 90, 120 y 180 minutos). **B)** Evaluación de la densidad de bandas de HSP70 en diferentes tiempos de exposición a H₂O₂. Los resultados representan la media \pm DE. Se realizó ANOVA de una vía, seguido por una prueba *post hoc* de Dunnett, donde * $p < 0.05$ respecto al tiempo de 0 minutos.

11.3 Artículo sobre los transportadores tipo ZIP encontrados en *T. vaginalis*

Biometals
DOI 10.1007/s10534-017-0034-x



Genome-wide identification, in silico characterization and expression analysis of ZIP-like genes from *Trichomonas vaginalis* in response to Zinc and Iron

K. G. Fernández-Martín · M. E. Alvarez-Sánchez · V. E. Arana-Argáez ·
L. C. Alvarez-Sánchez · J. C. Lara-Riegos · J. C. Torres-Romero

Received: 5 April 2017 / Accepted: 12 July 2017
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

Abstract Trace elements such as Zinc and Iron are essential components of metalloproteins and serve as cofactors or structural elements for enzymes involved in several important biological processes in almost all organisms. Because either excess or insufficient levels of Zn and Fe can be harmful for the cells, the homeostatic levels of these trace minerals must be tightly regulated. The Zinc regulated transporter, Iron regulated transporter-like Proteins (ZIP) comprise a diverse family, with several paralogues in diverse organisms and are considered essential for the Zn and

Fe uptake and homeostasis. Zn and Fe has been shown to regulate expression of proteins involved in metabolism and pathogenicity mechanisms in the protozoan pathogen *Trichomonas vaginalis*, in contrast high concentrations of these elements were also found to be toxic for *T. vaginalis* trophozoites. Nevertheless, Zn and Fe uptake and homeostasis mechanisms is not yet clear in this parasite. We performed a genome-wide analysis and localized the 8 members of the ZIP gene family in *T. vaginalis* (*TvZIP1-8*). The bioinformatic programs predicted that the *TvZIP* proteins are highly conserved and show similar properties to the reported in other ZIP orthologues. The expression patterns of *TvZIP1*, 3, 5 and 7 were diminished in presence of Zinc, while the rest of the *TvZIP* genes showed an unchanged profile in this condition. In addition, *TvZIP2* and *TvZIP4* showed a differential expression pattern in trophozoites growth under different Iron conditions. These results suggest that *TvZIP* genes encode membrane transporters that may be responsible for the Zn and Fe acquisition in *T. vaginalis*.

K. G. Fernández-Martín · J. C. Lara-Riegos ·
J. C. Torres-Romero (✉)
Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular,
Facultad de Química de la Universidad Autónoma de
Yucatán, Calle 43 No. 613 x C. 90 Col. Inalámbrica,
97069 Mérida, Yucatán, Mexico
e-mail: julio.torres@correo.uady.mx

M. E. Alvarez-Sánchez
Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma
de la Ciudad de México (UACM), San Lorenzo # 290,
Col. Del Valle, 03100 Ciudad de México, Mexico

V. E. Arana-Argáez
Laboratorio de Farmacología, Facultad de Química de la
Universidad Autónoma de Yucatán, Calle 43 No. 613 x C.
90 Col. Inalámbrica, 97069 Mérida, Yucatán, Mexico

L. C. Alvarez-Sánchez
Laboratorio de Virología, Centro de Investigaciones
Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" de la Universidad
Autónoma de Yucatán, Calle 43 s/n x C. 90 Col.
Inalámbrica, 97069 Mérida, Yucatán, Mexico

Keywords Zinc · Iron · ZIP transporters ·
Trichomonas vaginalis · Gene family · Expression
analysis

Introduction

Trace elements have several roles in living organisms. Some are integral components of enzymes involved in

Published online: 21 July 2017



attracting substrate molecules and converting them into specific end products. Some trace elements donate or accept electrons in reactions of reduction and oxidation, which results in the generation and utilization of metabolic energy (Nielsen 2002). One trace element, Zinc (Zn), play a vital role in the catalytic activity and structural stability of many regulatory proteins, including DNA-binding Zn-finger, Zn-cluster, RING finger and LIM domain, which are involved in cellular regulation, signal transduction networks, and metabolic control (Maret 2013). Among the trace elements, Iron (Fe) is a most crucial element for growth and survival of almost all living organisms, which employ it as a cofactor for fundamental biochemical activities, such as oxygen transport, energy metabolism and DNA synthesis. This is due to numerous enzymatic reactions involving Fe-oxidation and Fe-reduction (redox) reactivity, which allow it to associate with proteins and bind to oxygen, transfer electrons or mediate catalytic reactions (Wang and Pantopoulos 2011).

Zn and Fe are toxic at high intracellular concentrations. Therefore, all organisms require mechanisms to maintain a controlled balance of uptake, utilization and storage to ensure divalent metals availability in accordance with physiological needs (Porcheron et al. 2015). However, the key to metal homeostasis is transport. This metal homeostasis can be envisioned as the equilibrium between metal uptake and efflux. Understanding metal homeostasis thus requires knowledge of the structure and function of the transport proteins involved (Nies 2007). In many organisms, there are several different types of membrane transporters that maintain Zn and Fe homeostasis; these include P1B-ATPase family, natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP) family, cation diffusion facilitator (CDF) family, and zinc-regulated transporter (ZRT), iron-regulated transporter (IRT)-like protein (ZIP) (Kambe et al. 2004; Nadadur et al. 2008).

Some members of the ZIP family have been shown to transport Zn^{2+} while others transport Fe^{2+} , and a few have been shown to transport a range of metal ions. The majority of ZIP proteins consist of 220–650 amino acid residues with eight putative transmembrane (TM) domains, but some members may have as few as five, and can be further classified into four subfamilies (ZIPI, ZIPIL, gufA, and LIV-1) based on sequence alignments (Dempski 2012; Saier et al.

2016). Histidine-rich repeat found in a long variable region in the cytoplasmic loop between TM3 and TM4 is considered to be a metal-binding domain with a role in metal ion transport. TM4 and TM5 are particularly amphipathic and form a cavity through which metal ions pass (Eide 2006; Antala et al. 2015). ZIP transporters are widespread among living organisms and have been detected in all genera of the three kingdoms of life (Guerinot 2000; Grass et al. 2002; Huynh et al. 2006; Li et al. 2013).

In *Trichomonas vaginalis*, an obligate human genitourinary parasite, the importance of Zn and Fe has been emphasized due to their potential roles in a wide range of molecular and biochemical metabolisms (Figuroa-Angulo et al. 2012). High Zn concentrations have been demonstrated that reduce trichomonal cytotoxicity, growth and survival, but it has been postulated that is necessary for genes encoding Zn-finger, Zn-binding motif, RING finger proteins and other virulence factors (Ma et al. 2001; Jesus et al. 2002; Dyllal et al. 2003; Quintas-Granados et al. 2013). By other hand, *T. vaginalis* have high-Fe requirements, supporting its growth and multiplication in culture. In addition, Fe differentially regulates many mechanisms and virulence factors involved in *T. vaginalis* pathogenicity (Ryu et al. 2001; Torres-Romero and Arroyo 2009; Figuroa-Angulo et al. 2012; Arroyo et al. 2015). However, until now very little is known about the uptake and transport of Zn and Fe in this protozoan. In this work, by utilizing all available bioinformatic resources, we localized 8 putative ZIP genes across the *T. vaginalis* genome and provide detailed information on the gene identification, subcellular localizations and expression patterns of eight *TvZIP* genes which may encode membrane transporters involved in the Zn and Fe acquisition in this parasite.

Materials and methods

Identification of *TvZIP* genes

The protein sequences of two representative ZIP family members: *Saccharomyces cerevisiae* ZRT1 (GenBank Accession Number: CAA96975.1), *Arabidopsis thaliana* IRT1 (GenBank Accession Number: OAO96873.1); were used as probes to run a tBLASTn search to find putative ZIP genes in the *T. vaginalis*

genome database (www.trichdb.org). The genome location of the *T. vaginalis* ZIP (TvZIP) like genes was analyzed and the accession numbers were used to get the complete gene sequences and used as query on GenBank database at NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

In silico analysis of TvZIP sequences

The candidate TvZIP sequences were evaluated through the identification of ZIP domains predicted by homology using the NCBI Conserved Domains Database (CDD) and confirmed by the SMART program (Schultz et al. 2000). The prediction of the transmembrane regions with cartoon diagrams were constructed based on TMHMM (Krogh et al. 2001) and MEMSAT-SVM (Buchan et al. 2013) methods.

A multiple alignment with the deduced amino acid sequences from the putative TvZIP proteins was achieved with the MUSCLE algorithm (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) and presented using the program BOXSHADE at a threshold fraction of 0.3 (no reference sequence). Motif analysis was performed using MEME tool (<http://meme.nbcr.net/meme/tools/meme>) with following parameters; maximum number of motifs to find, 5; minimum width of motif, 6 and maximum width of motif, 50. Protein domain families were searched in Pfam database (<http://pfam.xfam.org/>).

In order to establish evolutionary relationships between TvZIP proteins and reference ZIP proteins, a phylogenetic tree was constructed with members of the four subfamilies from various species using the neighbor-joining method and the JTT correction model. The reliability of the phylogenetic tree was estimated using bootstrap values with 1000 replicates using MEGA version 7.0 software (www.megasoftware.net).

Physicochemical properties (sequence length, molecular weight and isoelectric point) of TvZIP proteins were analyzed by using Expasy's ProtParam server (Gasteiger et al. 2005). The sub-cellular locations of TvZIP proteins were predicted by CELLO server (Yu et al. 2006). For putative functional analysis of the TvZIP proteins, a specialized tool PFP from Kihara Bioinformatics laboratory (<http://kiharalab.org/web/pfp.php>) was used. Disorder predictions were performed using FoldIndex (<http://bip.weizmann.ac.il/fldbin/findex>) and IUPred (<http://iupred.enzim.hu/>) programs.

Parasite culture and quantification of Zn and Fe content

T. vaginalis strain MICH01 was grown in Diamond's trypticase-yeast-extract-maltose (TYM medium) supplemented with 12% heat-inactivated horse serum. The zinc-supplemented medium was prepared by adding zinc sulfate at different final concentrations (0.5, 1.0, and 1.5 mM), according to previous reports (Rogers et al. 2000). The iron-supplemented medium was prepared by adding ferrous sulfate at different final concentrations (62.5, 125, and 250 μ M). Iron-restricted cells were prepared by supplementation with 2,2'-Dipyridyl (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) to a final concentration of 100 μ M.

The zinc and iron concentration was determined according to previous reports (Alvarez-Sánchez et al. 2007; Carvalho et al. 2015). Briefly, representative aliquots from each treatment were dissolved in 69% (v/v) nitric acid and digested by microwave heating (T = 175 °C, P = 15 bar, 10 min ramp from room temperature) by 10 min and analyzed by flame atomic absorption spectroscopy (FAAS) in the M series Atomic Absorption Spectrometer (Thermo Scientific). The TYM medium in standard conditions contains 3–5 μ M of Zn²⁺ (taken as <5 μ M of Zn²⁺) and 13–16 μ M of Fe²⁺ (taken as 15 μ M of Fe²⁺). We observed that the TYM medium supplemented with ZnSO₄ contained similar molar concentrations of Zn²⁺: 0.47 ± 0.01 mM (for 0.5 mM of ZnSO₄), 0.97 ± 0.05 (for 1.0 mM of ZnSO₄), and 1.46 ± 0.03 (for 1.5 mM of ZnSO₄). In addition, the TYM medium supplemented with FeSO₄ contains: 66.4 ± 2.4 μ M of Fe²⁺ (for 62.5 μ M of FeSO₄), 129 ± 1.7 μ M of Fe²⁺ (for 125 μ M of FeSO₄), and 255 ± 1.3 μ M of Fe²⁺ (for 250 μ M of FeSO₄). The Fe²⁺ concentration in the TYM medium, that contains the iron chelating agent 2,2'-Dipyridyl, was undetectable.

Isolation of RNA and RT-PCR

Total RNA was isolated from normal and treated *T. vaginalis* trophozoites incubated for 24 h using RNeasy (Qiagen) following the manufacturer's protocol. The isolated RNA (150 ng) was treated with DNase (Roche) according to the manufacturer's protocol. First-strand cDNA was synthesized using RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo

Fisher Scientific, USA) using DNase-treated RNA from normal and treated *T. vaginalis* trophozoites following manufacturer's protocol.

To examine the expression profiles of target genes, semi-quantitative RT-PCR was employed using 0.2 μ l cDNA preparation as a template. All gene-specific primers for *T. vaginalis* target genes were designed using Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). As an internal control the constitutively expressed *tubulin* gene from *T. vaginalis* was used. For each primer pair the PCR program was empirically adjusted. PCR products were analyzed using 1% agarose gels stained with Ethidium Bromide.

Results

The availability of sequenced genome of *T. vaginalis* provided an opportunity to annotate and predict the complete set of protein coding genes using various bioinformatic tools. Through a genome-wide search strategy, here we report the identification of 8 putative *T. vaginalis* ZIP transporters genes based on similarity to previously characterized ZIP proteins in eukaryotic organisms. All trichomonad ZIP genes have full-length open reading frames (ORF) ranging from 627 to 825 base pairs (bp). All TvZIP genes identified were found annotated from the whole genome as putative Zinc–Iron transporters. The amino acids number varied from a minimum of 208 (TvZIP7) to maximum of 299 (TvZIP2).

TvZIP sequences identified were confirmed in the SMART database based on ZIP domain and had e-values higher than 1^{-10} . All TvZIP proteins possess at least one Zip domain, of which TvZIP1, TvZIP3 and TvZIP8 possess two Zip domains (Fig. 1). The predicted topology of TvZIP proteins were illustrated in Fig. 1. TvZIP1, TvZIP2, TvZIP3, TvZIP5 and TvZIP8 demonstrated the presence of the expected eight transmembrane (TM) regions and both the N- and C-terminus located on the extracellular surface of the cell. TvZIP4 and TvZIP6 exhibited the presence of seven TM regions. Surprisingly, TvZIP7 exhibits the presence of five TM domains. It was found that all TM structures are α -helices consisting of 19–23 amino acid residues.

To find out conserved regions of TvZIP proteins, we aligned all eight transporter sequences by ClustalW, and shaded identical and similar residues as

black and gray, respectively (Fig. 2). Due to variations between TvZIP predicted sequences, TvZIP1 was used as reference to enumerate potential TM domains. Predicted locations of TM domains were labeled above the sequences as TM I–VIII (Fig. 2). The region best conserved among TvZIP family members encompasses TM domains IV–VII.

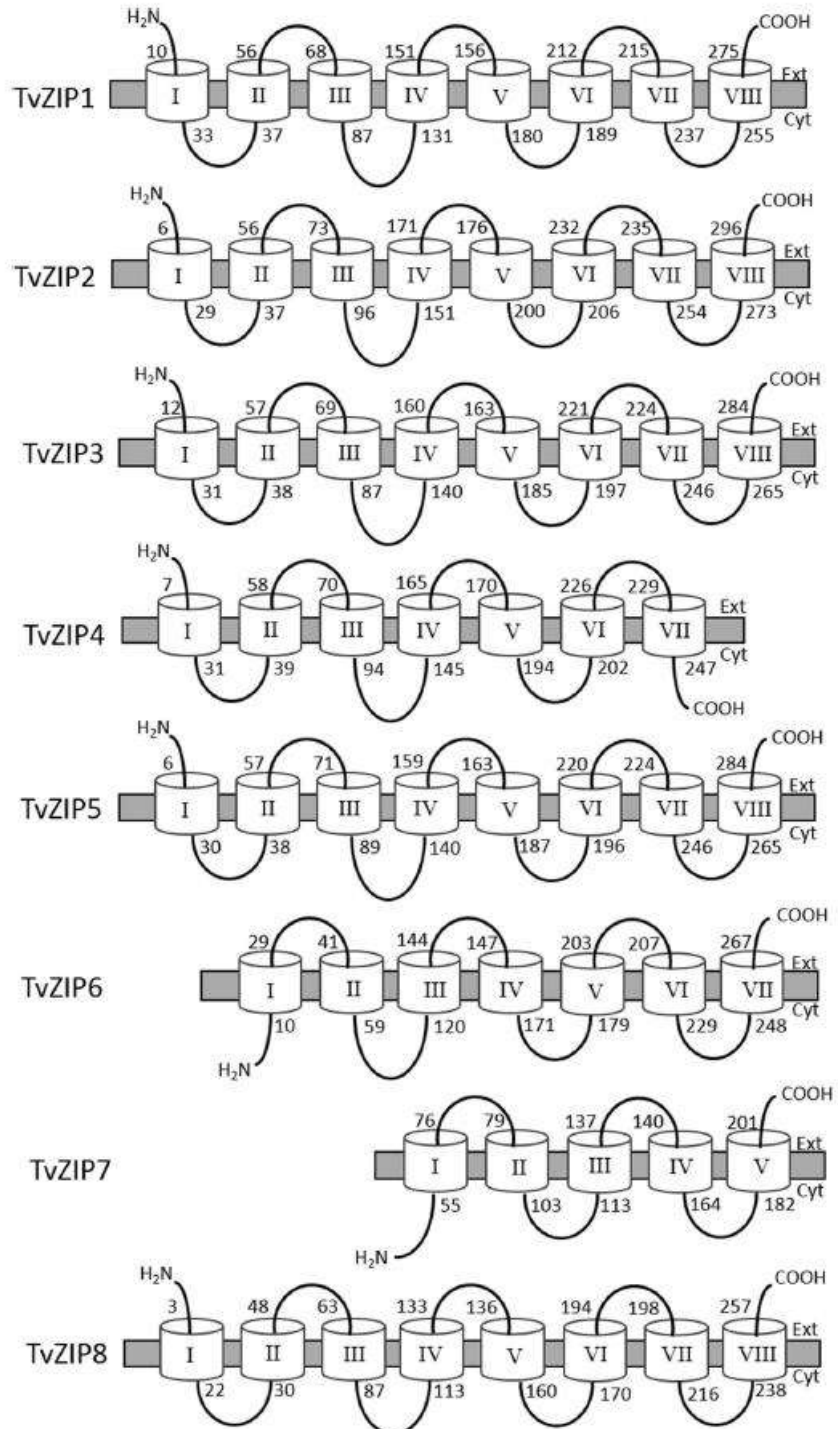
With the exception of TvZIP7 which lack the three first TM domains, all the TvZIP sequences contain a histidine (H) conserved residue in the TM II. Also, the amino acid residue aspartate (D), between TM II and TM III, suggested to be responsible for Fe transport (Rogers et al. 2000) is conserved in TvZIP2, 3, 4, 5 and 6, but TvZIP1 and TvZIP8 contain the similar amino acid glutamate (E). Remarkably, all TvZip transporters have four conserved residues, which lie in TM IV as two adjacent amino acids, YI and HS, separated by a four amino acid spacer sequence. Also, presents the conserved motif (GHKPVE) which lie in TM V in all TvZIP sequences. These histidines in TM domains are suggested to have a possible role for the substrate transport through the membrane.

In addition, all TvZIP members showed a variable region (VR) located on the long intracellular loop between TM III and IV (Fig. 2), which in TvZIP7 corresponds to a 59 aa long segment starting at the N-terminal end. Interestingly, TvZIP1 contain two histidine-rich domains (HXH $\underline{\text{D}}$ H) located at the beginning of the VR. In addition, other two histidine-rich domains (H $\underline{\text{D}}$ HHXHXH and HHHHXHXH $\underline{\text{D}}$) were identified in the VR of the TvZIP2 and TvZIP6, respectively. In the ZIP family members, the histidine-rich motif HXHXH thought to be important in zinc and iron transport (Guerinot 2000).

We have searched the most conserved motif sequences in TvZIP proteins using MEME tool (Table 3). Five motifs were identified with an e-value support lower than 1^{-35} and their annotation was performed using Pfam. Motifs 1 and 2 were 50 amino acid residue long, while motifs 3–5 were 29 amino acids. Although only motif 1 was found to be related with ZIP protein family, interestingly all identified motifs corresponds to TM domains.

A phylogenetic study was carried out to evaluate evolutionary relationships within ZIP proteins. To this purpose, 52 sequences from 15 different species were used, including a selection of previously identified mammalian, invertebrate, fungal, protozoan, and bacterial ZIP sequences. The phylogenetic tree classified

Fig. 1 Putative topology of TvZIP transporters. Prediction of the topology for *T. vaginalis* ZIP transporters summarizing the linear coordinates for the helices and indicating the extra- and intracellular regions. Circles with roman numerals represented transmembrane regions. Filled gray boxes represented membrane regions



			I	II
TvZIP1	1	-MKICIEHLKKGWSSVFLVGLVSSVLPFLIKSISLSSVLDSEAGGVFLGAALVHLIPGG		
TvZIP2	1	--MDKKTLLKNIISAFVIFFTLIGSSLPICISIRWQSRLEALAGGVFLGAGLAHLLADS		
TvZIP3	1	-MINKVVLAKYIGSFIFLSAIAGLSPFLFFKATWQIRGECLAGGIFLGAGIVHLLDDA		
TvZIP4	1	MSHKLEELKYISAGIIFFTLIGSAMPMCICTIKWQSRLEALAGGVFLGAGLAHFLSDS		
TvZIP5	1	-MISWILLAKYIGSFIFLSAIAGLSCLPFFKATWQIRGESLAGGIFLGAGIVHLLDDA		
TvZIP6	1	-----VCIRATIKWQSRLEALAGGVFLGAGLAHLLADS		
TvZIP7	1	-----		
TvZIP8	1	-----MLKICIEHLIIFINIVFSFIPLFSPETLWVSRAESMAAGVFLGAAVLHFPES		
			III	
TvZIP1	60	IENIN---KSEIPLGSLICAGFLVMYLIESFGSHGHDHGASHNHCHDKNGKHN----		
TvZIP2	59	FEELFKVEKIDYPLAPAVICIGTFVIFTSIELEFSYGEHD-EEFQIGDEHHGHKPKHEKL		
TvZIP3	60	FLNIGNI---KINYPLAPAVICATFVIFTLISFLVSEKPAEIAISQDENMITL---MT		
TvZIP4	61	FVDIGS---FHNYPLASAVASTFVITIAVELEFSYGEHD-KEFDTSSEKBEAKEM----I		
TvZIP5	60	FLSHRKL---KHNYPLAPAVASTVVIPTLISCHISEKNEEASSEIFDESSITL---MT		
TvZIP6	33	FEELGD---KINYPLAPAVASTFVITIAVELEFSYGEHD-EEFQIGDEHHGHKPKHEKL		
TvZIP7	1	-----MEEFGEHDASQEFINANHNANEGNSATER		
TvZIP8	54	IHCFG---IYSSPIPIFTIVISYLAAMLYFE-----KSVETLIEIPHOYSDEE		
			IV	
TvZIP1	111	---DELAT-----DHKVAKLINR---LSPSKALYIALEHSFVFAISLGVNDLIT		
TvZIP2	118	ENKSELNSNLLSNE-SEYVTSYFSSQCNAISVPASALYIIMDIHSAIEGLALGIMKELG		
TvZIP3	115	GTENMLSDA-----QSITFTLFTKY--LSIQKASLYIILCHSFIEGELGLIILKFTI		
TvZIP4	113	RTDNPLEANNEIPN---EEQIQGFMSTSNKGLYITFISLYIIMDVHVSIEGLALGIMKTFN		
TvZIP5	115	GTPSMLSDA-----QSVLEFFGTNY--LTIQKASLYIILCHSFIEGELGLIIPKLT		
TvZIP6	88	VFSSLEDNLLVSNPIEEKVPEMFGETNSNLVPMISLYIIMDIHVSIEGLALGIMKTFD		
TvZIP7	30	SEASPLEE-----DEEIKEMFSDKCKLSIFPISLYIIMCHSITAGLALGIILKLD		
TvZIP8	98	-----DEEQEQVSES---LPKQIIMFYIVLSIHSFVFSFAFSGFKMTNA		
			V	VI
TvZIP1	157	VIKSIIYALAGHYPAVFSILGLQIFGNKISKIKPAMNCFYSFVTPFTIIASYVVG-KAC		
TvZIP2	177	SIIAIFCAIVGHKPVFAFALSILILKDRPKKILFWWVIVYTLMPPIGIVGIIIA-NPK		
TvZIP3	166	KVVGLYVAMIGFKPEAFALGLFMIEDRPKKSLSWILSVIYSIITPIFSIVGIYID-KIA		
TvZIP4	171	GIIAIFFAIVGHKPVFAFALSILILKDRPKKILFWWVIVYTLMPPIGIVGIIITKHVG		
TvZIP5	166	PTIEFLAVGFKPEAFALGLFMIEDRPKKSLSWILSVIYSIITPIFSIVGIYVN-KKS		
TvZIP6	148	GVIAIFCAIVGHKPVFAFALSILILKDRPKKILFWWVIVYTLMPPIGIVGIIITKLV		
TvZIP7	82	GVIAIFCAIVGHKPVFAFALSILVVKRPRPKLEWPLIFVYTLMPPIGIVGILVVEFVQ		
TvZIP8	139	RIIAIFFAFVGHKPVCEVILGLQILHTRPPKCKIQLSTEAASPLTINVTSEFT-HAT		
			VII	VIII
TvZIP1	216	NETVSGCVVNISSGIFAFVPEHELSEALEKIHEENSGKSRFYHLIAITIGALWMAGIAIGI		
TvZIP2	236	SGITGTIIRAFSAGTFLFVGCHEWAEMFEHKATACGEKFWHFMMFFIGVLWMLIAIVE		
TvZIP3	225	GHDITGIISAFSAGFLYVGSYEWKNIYKCKDSRKEAWNIFMFLGGVWMLIAIET		
TvZIP4	231	NRIVMGTIIRAFSAGTFLFVGCN-----		
TvZIP5	225	GEQITGIISAFSAGFLYVGFTEWKNIYSKKEKLSKKEKOWNIFMFFGGVLWMLIAIGIE		
TvZIP6	208	NQIVMGTIIRAFSAGTFLFVGCHEWAEMFEHKTEWNOAEKTHWFMMFLIGVLCMLIAIVE		
TvZIP7	142	NNIANGIVSAGTFLFVGCAYEWSYVADKQQLANCEKLWHEFMFFIGVWMLIAIIVE		
TvZIP8	198	SEIFNGVVISISTGVETTYGHELCETLEKCLNEYRQELIHVWVIFGLLWMLINLFA		
TvZIP1	276	HEHSHGQHHDDL		
TvZIP2	296	TFAL-----		
TvZIP3	285	TTYE-----		
TvZIP4		-----		
TvZIP5	285	TTYE-----		
TvZIP6	268	TENPEDK-----		
TvZIP7	202	TLSPEEN-----		
TvZIP8	258	GEHSH-----		

◀ Fig. 2 Alignment of predicted *Trichomonas vaginalis* ZIP proteins. Sequences alignment was performed by use of the MUSCLE algorithm (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) and identical or similar amino acids were shaded by BOXSHADE (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Boxes with roman numerals above the sequence indicated the transmembrane spanning domains. Single lines represented the extra- and intracellular regions between TM domains, where the curved line indicated the variable region in each TvZIP protein

the ZIP proteins into four main subfamilies: *gufA*, LIV-I, ZIP-I and ZIP-II (Fig. 3), consistent with published data and sequence similarities between ZIP orthologs. Interestingly, all TvZIP sequences were clustered together and resided in a single branch including a predicted sequence from the free-living amoeba *Naegleria gruberi* (GI: 290994797) and four ZIP-II

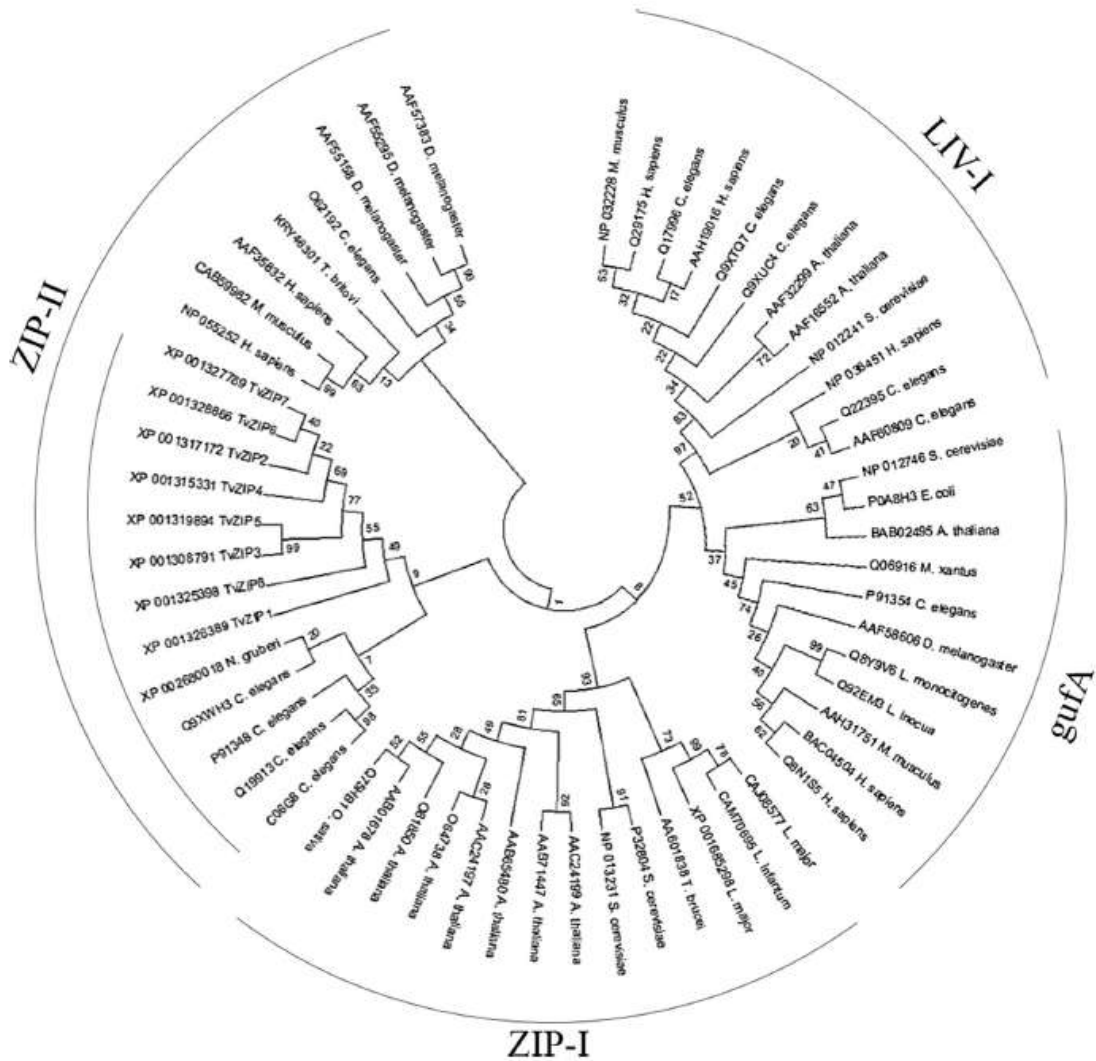
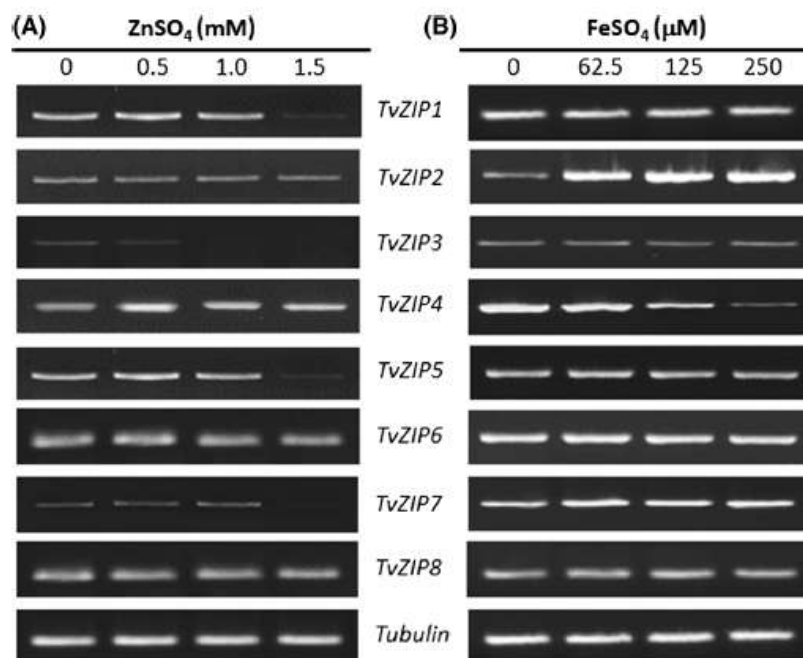


Fig. 3 Phylogenetic relationship of the TvZIP proteins with homologous sequences from selected species. A rooted, neighbor-joining (NJ)-based tree of the ZIP proteins was constructed with the deduced sequences of ZIP proteins from the

four different subfamilies (LIV-I, *gufA*, ZIP-I, and ZIP-II). The second line in the clade of ZIP-II subfamily indicate the location of TvZIP proteins and other parasite-specific ZIP sequences

Fig. 4 Expression analysis of *TvZIP* genes in *T. vaginalis* trophozoites cultured under excess zinc and iron concentrations. Expression levels of *TvZIP1* (315 bp), *TvZIP2* (370 bp), *TvZIP3* (166 bp), *TvZIP4* (432 bp), *TvZIP5* (360 bp), *TvZIP6* (195 bp), *TvZIP7* (253 bp), and *TvZIP8* (174 bp) genes were addressed by adding increasing concentrations of $ZnSO_4$ (0, 0.5, 1.0, 1.5 mM) (a) or increasing concentrations of $FeSO_4$ (0, 62.5, 125, 250 μM) (b) to the culture medium for 24 h. *Tubulin* (101 bp) gene was used as a constitutively expressed control gene. Analysis was performed by RT-PCR



sequences from *C. elegans* (GI: 7495573, 74964172, 74961590 and 75028986). This branch was closely related to clusters with other ZIP-II orthologs forming a specific ZIP-II clade, suggesting that *TvZIP* transporters belongs to ZIP-II subfamily.

Finally, the predicted molecular weight of the *TvZIP* proteins varied from a minimum of 23.2 kDa (*TvZIP7*) to 33.4 kDa (*TvZIP2*). Also the theoretical isoelectric points were calculated, varying from 5.14 (*TvZIP6*) to 6.83 (*TvZIP3*) (Table 3). Based on CELLO analysis, all *TvZIP* transporters were predicted to be located in the plasma membrane. Also, with the PFP tool from Kihara Bioinformatics laboratory was possible predict that all *TvZIP* proteins have the molecular function as transporter during the biological process of metal ion acquisition (Table 3).

Additionally, it has been reported that the transmembrane proteins could present certain disordered regions and this property has been described in the variable region of ZIP proteins members (Tusnady et al. 2015; Bafaro et al. 2015). Thus, to identify the possible intrinsically disordered regions (IDR) in *TvZIP* family members, the protein sequences were analyzed using the disorder predictors FoldIndex and IUPred. All *TvZIP* proteins, except for *TvZIP3*,

TvZIP5 and *TvZIP8*, showed a high IDR index in the intracellular loop corresponding to the variable region (Table 4). *TvZIP2*, *TvZIP4* and *TvZIP7* showed the higher proportions (>50%) of disorder-promoting residues (A, R, G, Q, S, P, E, K) in the variable region (Bafaro et al. 2015).

To verify the effect of zinc and iron on the expression of the *TvZIP* genes, the transcriptional profiling was conducted with *T. vaginalis* trophozoites grown in media containing varying concentrations of $ZnSO_4$ and $FeSO_4$, by using semi-quantitative RT-PCR. We found that under control conditions without any zinc or iron salt, all of the analyzed *TvZIP* genes could be detected. Moreover, when *T. vaginalis* cultures were supplemented with zinc, the expression of *TvZIP1*, 3, 5 and 7 were suppressed at the higher concentration of $ZnSO_4$ tested (1.5 mM), while the transcript levels of the other *TvZIP* genes were not distinct from those observed in the control condition (Fig. 4a). In contrast, in response to Fe-excess, only *TvZIP2* and *TvZIP4* genes showed changes of the expression levels. Interestingly, the transcript level of *TvZIP2* was increased in presence of $FeSO_4$, while Fe caused a dose-dependent down-regulation of *TvZIP4* expression (Fig. 4b).

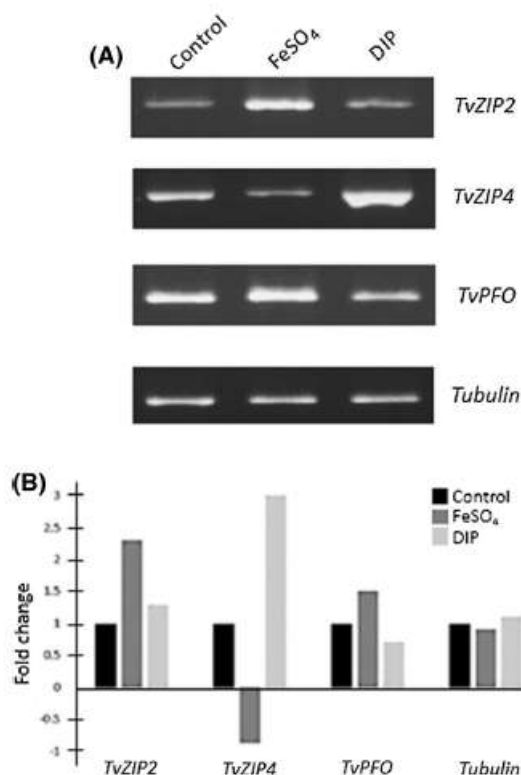


Fig. 5 Expression of *TvZIP2* and *TvZIP4* are regulated by iron concentrations. **a** RT-PCR of *TvZIP2* (370 bp), *TvZIP4* (432 bp), *TvPFO* (103 bp), and *Tubulin* (101 bp) transcripts after growth of *T. vaginalis* cultured under different conditions such as control (standard TYM medium), TYM supplemented with FeSO₄ (250 μ M), and TYM supplemented with 2,2'-dipyridyl (DIP—100 μ M). **b** Relative expression analysis were analyzed by measuring the RT-PCR band intensity using Image J software and represent as relative fold change in expression

In *T. vaginalis*, iron acquisition has been linked to intracellular iron levels, generally this mechanism are repressed under iron-replete conditions and enhanced in iron-restricted conditions. However, iron transporters are still uncharacterized at the molecular level in this protozoa. To more precisely test the effect of iron on the expression of *TvZIP2* and *TvZIP4* we examined how iron deprivation affects the differential expression showed at high iron conditions. *T. vaginalis* trophozoites were cultured in the presence of an ferrous iron chelating agent (2,2' Dipyridyl—DIP) and the transcription levels of *TvZIP2* and *TvZIP4* genes were evaluated. The results revealed that the expression levels of *TvZIP2* were restored to that of control

cultures, when iron was chelated by treatment with 100 μ M of DIP (Fig. 5). Interestingly, we found that mRNA levels of *TvZIP4* were up-regulated under Fe-deficient conditions (Fig. 5). We also include the gene expression of the *TvPFO* transcript, which is a classically regulated gene by iron in *T. vaginalis*, as control to validate the effect of DIP treatment. These data showed that the *TvZIP* genes expression are regulated by zinc and iron availability.

Discussion

The flagellated protist parasite *T. vaginalis*, which colonizes the genitourinary tract of men and women, is the etiological agent for human trichomoniasis. Diverse environmental micronutrients, including Zn and Fe, have been reported to modulate expression of several virulence factors, such as adhesins and proteases, and the expression of crucial metabolic enzymes (Figuroa-Angulo et al. 2012).

Due to essential requirements, but also excess-related toxicity of Zn and Fe, all live organisms have established a tightly controlled system to transport these trace elements. ZIP metal transporters are one of the most important gene families for Zn and Fe cellular uptake and these genes have been reported ubiquitously in diverse organisms, including archaea, bacteria, protozoan, fungi, plants, and mammals.

In this work, eight ZIP genes were identified in the *T. vaginalis* genome and genes were characterized based on similarity to other ZIP family members. Since the genome sequence of *T. vaginalis* was released, the large size suggested that a significant portion of the proteome contains paralogous proteins (Singh et al. 2011). Many studies have reported that the majority of ZIP family members consist of 220–650 amino acid residues. ORF analysis of the *TvZIP* sequences showed that encodes proteins from a minimum of 208 (*TvZIP7*) to maximum of 299 (*TvZIP2*) amino acids (Table 1), which are closely related to the size of ZIPs from other species (Mondal et al. 2014).





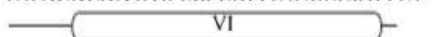
It has been demonstrated that most of ZIP family members have eight predicted transmembrane (TM) domains and a variable region between TM-III and TM-IV where contains a potential metal-binding domain (Guerinot 2000). Prediction of TM domains in *TvZIP* family proteins revealed that the majority presents 8 TM domains, in agreement with the

Table 1 List of ZIP genes identified in *T. vaginalis* genome

Gene name	Gene ID TrichDB	Genome location			ORF (bp)	NCBI accession	Deduced protein length (aa)
		Genome sequence	Start	End			
<i>TvZIP1</i>	TVAG_372990	DS113274	28892	28026	867	XM_001326354	288
<i>TvZIP2</i>	TVAG_040010	DS113461	57721	58620	900	XM_001317137	299
<i>TvZIP3</i>	TVAG_053760	DS113785	26445	27311	867	XM_001308790	288
<i>TvZIP4</i>	TVAG_415420	DS113515	69986	70980	759	XM_001315296	252
<i>TvZIP5</i>	TVAG_273550	DS113394	38182	39048	867	XM_001319859	288
<i>TvZIP6</i>	TVAG_434800	DS 113240	189817	188897	825	XM_001328831	274
<i>TvZIP7</i>	TVAG_495850	DS 113254	130207	129581	627	XM_001327754	208
<i>TvZIP8</i>	TVAG_444590	DS 113290	143988	143137	789	XM_001325363	262

bp base pairs, aa amino acids

Table 2 Conserved motif sequences of TvZIP transporters defined by MEME software

Motif	Width	E value	Sequence	Protein domain family
1	50	1.0e-100	 YIILXHSFIEGLALGIMKXLTGLIAIFCAIVGHKPVVEAFALXLIILKDR	ZIP
2	29	1.4e-055	 RXIXWQSRLEXLAGGVFLGAGLVHLLXDS	Not found
3	50	2.5e-039	 NYPLAPALXISTFVIFTLIELFSYGEHDXEEFQIDDPHEXXXHNHEDGT	Not found
4	29	4.1e-036	 FWXCKFKXWHFIMFLIGVLIWMLIIAIVET	Not found
5	29	6.5e-036	 PKKTI.YWVI.VIVYTI.MTPIGHIVGIYIGK	Not found

X signifies any amino acid residue. Boxes with roman numerals above the motifs indicated the transmembrane spanning domains

observed in most of the ZIP genes in other species. However, two TvZIP members showed only 7 TM domains, which lack the first TM domain (TvZIP6) or the last TM domain (TvZIP4). Exceptionally, TvZIP7 only presents 5 TM domains and based on topology we predict that lack the three first TM domains, however is consistent with other small ZIP members as the reported in *Cryptococcus gattii* (Schneider et al. 2015). This heterogeneity in structure of each TvZIP transporter suggests diversity in functionality.

Multiple alignment of predicted TvZIP protein sequences indicated that all the identified proteins possess two adjacent conserved residues (HS) in the TM-IV and conserved residues (HXXXE) in TM-V. These residues has been implicated to play an important role as heavy metal binding site and pore

formation of the ZIP transporters. This region corresponds precisely to the most conserved motif identified between the TvZIP sequences by MEME tool (Table 2) and was found to be related with ZIP protein family (Pfam: PF02535). Although none of the other four identified motifs were found to be related with any particular protein family, they corresponds specifically to sequences located in TM domains, indicating the highly conserved structures between TvZIP paralogs. The histidine-rich domains (HRD) in variable regions between transmembrane domain III and IV in many ZIPs has been postulated to serve as a potential metal ion binding site (Antala et al. 2015; Bafaro et al. 2015) and could be involved in the ion specificity (Nishida et al. 2008). For TvZIPs identified in this study, only TvZIP1, TvZIP2 and TvZIP6 contains

Table 3 Predicted physicochemical properties, location and functions of TvZIP proteins

Name	NCBI accession	Theoretical properties		Subcellular location	Molecular function	Biological process
		Molecular weight (Da)	Theoretical isoelectric (Da)			
TvZIP1	XP_001326389	31,545	6.41	Plasma membrane	Metal ion transmembrane transporter activity	Metal ion transport
TvZIP2	XP_001317172	33,415	5.33	Plasma membrane	Metal ion transmembrane transporter activity	Metal ion transport
TvZIP3	XP_001308791	32,379	6.83	Plasma membrane	Metal ion transmembrane transporter activity	Metal ion transport
TvZIP4	XP_001315331	27,637	5.47	Plasma membrane	Metal ion transmembrane transporter activity	Metal ion transport
TvZIP5	XP_001319894	32,228	7.61	Plasma membrane	Metal ion transmembrane transporter activity	Metal ion transport
TvZIP6	XP_001328866	30,611	5.14	Plasma membrane	Metal ion transmembrane transporter activity	Metal ion transport
TvZIP7/TvZIP7	XP_001327789	23,181	5.19	Plasma membrane	Metal ion transmembrane transporter activity	Metal ion transport
TvZIP8	XP_001325398	29,963	5.49	Plasma membrane	Metal ion transmembrane transporter activity	Metal ion transport

Table 4 FoldIndex and IUPred predictions of disordered regions within the TvZIP proteins

Name	Disorder sequence	TM domains
TvZIP1	95-HGASHNHDDKNGKHNDLA-114	III-IV
TvZIP2	101-QIGDEHDHGHGHNKHEKLENKSELNS-125	III-IV
TvZIP3	101-ATDS-104	III-IV
TvZIP4	100-DT SE SKEEAKEMIRTDNPLEANNEIPNEEQIQ-131	III-IV
TvZIP5	98-EEAQ SEIPDE S SITLMD GT-116	III-IV
TvZIP6	72-QIGEGHHHHQHFDKNVPPSLEDNLLVS-100	II-III
TvZIP7	1-MFTFGEHDASQFHINANHNANEGNSATERSEASPLEEDEEI-41	I
TvZIP8	90-PHQYSDEEDDQECQV-105	III-IV

All the disordered regions identified are present inside the variable cytoplasmic region of each TvZIP protein

HRD located in the variable region involving at least 5 histidine residues. In order to determine the relationship of the TvZIP proteins with the ZIP family, a phylogenetic tree was constructed, in which all TvZIPs were grouped into a sub-cluster of the subfamily ZIP-II, suggesting the presence of a separation between lower and higher eukaryotes for ZIP-II transporter sequences.

Based on CELLO analysis, all TvZIP proteins were predicted to be located in the plasma membrane, providing basis at cellular level for its possible role in zinc and/or iron uptake in *T. vaginalis*. However, other bioinformatic programs predict the possible location in other membranous organelles (data not shown) that they might be involved in ion detoxification through

compartmentalization. PFP from Kihara Bioinformatics Laboratory, which extracts and scores GO annotations based on the frequency of their occurrence in retrieved sequences, predict the functions of TvZIP proteins, in terms of molecular function and biological process (Table 3), as metal ion transporters. Intrinsically disordered regions (IDR) in transmembrane proteins can occur both in their terminal and loop regions (Tusnady et al. 2015).

In ZIP proteins it has been described that tend to occur in the loop of the variable region between TM-III and TM-IV that serves as a protein-specific regulatory domain (Bafaro et al. 2015). Here, we report that all the TvZIP sequences showed certain IDR index for variable region (Table 4), principally

TvZIP2, TvZIP4 and TvZIP7 (corresponding to their N-terminal region), suggesting a role for these IDR in stabilizing TvZIP proteins or interactions with other proteins.

Both Zn and Fe are considered essential micronutrients for growth and biochemical activities in *T. vaginalis*, however are toxic under excess conditions (Figueroa-Angulo et al. 2012). Concentrations >1.6 mM of Zn salt have a trichomonacidal effect; however, in the presence of ≤ 1.6 mM Zn salt, several trichomonad proteins are up- or down-regulated (Quintas-Granados et al. 2013). The transcription levels of TvZIP1, 3, 5, and 7 genes exhibits down-regulation related to Zn treatment, principally at 1.5 mM of ZnSO₄ (Fig. 4A), these results suggested that these four transporters may play important roles avoiding Zn accumulation in *T. vaginalis*.

By other hand, in high iron conditions only TvZIP2 and TvZIP4 showed differences at transcription level (Fig. 4b). Iron has been implicated as an important factor in the regulation of virulence of *T. vaginalis*, but until now not exist reports about a transporter for ferrous ions. The evaluation of gene overexpression patterns based on Fe treatment provides information on the iron transport ability of the ZIP family transporters (Zhang and Knutson 2012). The transcription levels of TvZIP4 were up-regulated under Fe-deficient conditions (Fig. 5b), which suggest that this transporter may be essential for iron acquisition in *T. vaginalis* trophozoites.

In conclusion, although ZIPs orthologs have been characterized in many eukaryotic cells, to our knowledge, there are few reports concerning the identification and characterization of ZIPs in protozoan parasites (Huynh et al. 2006; Sahu et al. 2014; Carvalho et al. 2015). This study is the first to characterize the ZIP gene family and report the expression profile of these type of proteins in an anaerobic protozoa. Future work will establish the contribution of the various TvZIP proteins identified in the Zn and Fe transport mechanisms in the pathogenic parasite *T. vaginalis*.

Acknowledgements This work was undertaken as part of a research project supported by Grant 237990 (to J.C. Torres-Romero) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México. K.G. Fernández-Martín is a scholarship recipient from CONACYT. We thank MI Jazmín Salett Novelo Castilla, from the Laboratorio de Absorción Atómica, Facultad

de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, for their help in the FAAS measurements assays.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest regarding the publication of this paper.

References

- Alvarez-Sánchez ME, Solano-González E, Yañez-Gómez C, Arroyo R (2007) Negative iron regulation of the CP65 cysteine proteinase cytotoxicity in *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect* 9:1597–1605
- Antala S, Ovchinnikov S, Kamisetty H, Baker D, Dempski RE (2015) Computation and functional studies provide a model for the structure of the Zinc transporter hZIP4. *J Biol Chem* 290:17796–17805
- Arroyo R, Cárdenas-Guerra RE, Figueroa-Angulo EE, Puente-Rivera J, Zamudio-Prieto O, Ortega-López J (2015) *Trichomonas vaginalis* cysteine proteinases: Iron response in gene expression and proteolytic activity. *BioMed Res Int*. doi:10.1155/2015/946787
- Bafaro EM, Antala S, Nguyen TV, Dzul SP, Doyon B, Stemmler TL, Dempski RE (2015) The large intracellular loop of hZIP4 is an intrinsically disordered zinc binding domain. *Metallomics* 7:1319–1330
- Buchan DWA, Minneci F, Nugent TCO, Bryson K, Jones DT (2013) Scalable web services for the PSIPRED protein analysis workbench. *Nucl Acids Res* 41:W340–W348
- Carvalho S, da Silva RB, Shawk A, Castro H, Lamy M, Eide D et al (2015) LiZIP3 is a cellular zinc transporter that mediates the tightly regulated import of zinc in *Leishmania infantum* parasites. *Mol Microbiol* 96:581–595
- de Schneider RO, Diehl C, Dos Santos FM, Piffer AC, Garcia AWA, Kulmann MIR et al (2015) Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence. *Sci Rep* 5:10104
- Dempski RE (2012) The cation selectivity of the ZIP transporters. *Curr Top Membr* 69:221–245
- Dyall SD, Lester DC, Schneider RE, Delgadillo-Correa MG, Plümper E, Martinez A et al (2003) *Trichomonas vaginalis* Hmp35, a putative pore-forming hydrogenosomal membrane protein, can form a complex in yeast mitochondria. *J Biol Chem* 278:30548–30561
- Eide DJ (2006) Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim Biophys Acta* 1763:711–722
- Figueroa-Angulo EE, Rendón-Gandarilla FJ, Puente-Rivera J, Calla-Choque JS, Cárdenas-Guerra RE, Ortega-López J et al (2012) The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect* 14:1411–1427
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins R, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM (ed) *The proteomics protocols handbook*. Humana Press, New York, pp 571–607
- Grass G, Wong MD, Rosen BP, Smith RL, Rensing C (2002) ZupT is a Zn (II) uptake system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184:864–866

- Guerinot ML (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1465:190–198
- Huynh C, Sacks DL, Andrews NW (2006) A *Leishmania amazonensis* ZIP family iron transporter is essential for parasite replication within macrophage phagolysosomes. *J Exp Med* 203:2363–2375
- Jesus JBD, Pinheiroa S, Lopes AH, Meyer-Fernandes JR (2002) An ectonucleotide ATP-diphosphohydrolase activity in *Trichomonas vaginalis* stimulated by galactose and its possible role in virulence. *Z Naturforsch C* 57:890–896
- Kambe T, Yamaguchi-Iwai Y, Sasaki R, Nagao M (2004) Overview of mammalian zinc transporters. *Cell Mol Life Sci* 61:49–68
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305:567–580
- Li S, Zhou X, Huang Y, Zhu L, Zhang S, Zhao Y et al (2013) Identification and characterization of the zinc-regulated transporters, iron-regulated transporter-like protein (ZIP) gene family in maize. *BMC Plant Biol* 13:114
- Ma L, Meng Q, Cheng W, Sung Y, Tang P, Hu S, Yu J (2001) Involvement of the GP63 protease in infection of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol Res* 109:71–79
- Maret W (2013) Zinc and the zinc proteome. In: Banci L (ed) *Metallomics and the cell*. Springer, Netherlands, pp 479–501
- Mondal TK, Ganie SA, Rana MK, Sharma TR (2014) Genome-wide analysis of zinc transporter genes of maize (*Zea mays*). *Plant Mol Biol Rep* 32:605–616
- Nadadur SS, Srirama K, Mudipalli A (2008) Iron transport and homeostasis mechanisms: their role in health and disease. *Indian J Med Res* 128:533–544
- Nielsen FH (2002) Trace mineral deficiencies. In: Berdanier CD (ed) *Handbook of Nutrition and Foods*. CRC Press, Boca Raton, pp 1463–1487
- Nies DH (2007) How cells control zinc homeostasis. *Science* 317:1695–1696
- Nishida S, Mizuno T, Obata H (2008) Involvement of histidine-rich domain of ZIP family transporter TjZNT1 in metal ion specificity. *Plant Physiol Biochem* 46:601–606
- Porcheron G, Garénaux A, Proulx J, Sabri M, Dozois CM (2015) Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. In: Veyrier F, Cellier M (eds) *Metal economy in host-microbe interactions*. Frontiers Media SA, Lausanne, pp 172–195
- Quintas-Granados L, Villalpando J, Vázquez-Carrillo L, Arroyo R, Mendoza-Hernández G, Álvarez-Sánchez ME (2013) TvMP50 is an immunogenic metalloproteinase during male trichomoniasis. *Mol Cell Proteomics* 12:1953–1964
- Rogers EE, Eide DJ, Guerinot ML (2000) Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12356–12360
- Ryu JS, Choi HK, Min DY, Ha SE, Ahn MH (2001) Effect of iron on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *J Parasitol* 87:457–460
- Sahu T, Boisson B, Lacroix C, Bischoff E, Richier Q, Formaglio P et al (2014) ZIPCO, a putative metal ion transporter, is crucial for Plasmodium liver-stage development. *EMBO Mol Med* 6:1387–1397
- Saier MH, Reddy VS, Tsu BV, Ahmed MS, Li C, Moreno-Hagelsieb G (2016) The transporter classification database (TCDB): recent advances. *Nucl Acids Res* 44:D372–D379
- Schultz J, Copley RR, Doerks T, Ponting CP, Bork P (2000) SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucl Acids Res* 28:231–234
- Singh S, Singh G, Singh AK, Gautam G, Farmer R, Lodhi SS, Wadhwa G (2011) Prediction and analysis of paralogous proteins in *Trichomonas vaginalis* genome. *Bioinformatics* 6:31–34
- Torres-Romero JC, Arroyo R (2009) Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE/IRP-like system. *Infect Genet Evol* 9:1065–1074
- Tusnády GE, Dobson L, Tompa P (2015) Disordered regions in transmembrane proteins. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1848:2839–2848
- Wang J, Pantopoulos K (2011) Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J* 434:365–381
- Yu CS, Chen YC, Lu CH, Hwang JK (2006) Prediction of protein subcellular localization. *Proteins* 64:643–651
- Zhang W, Knutson M (2012) Iron transport ability of the Slc39a (ZIP) family of metal-ion transporters. *FASEB J* 26(1 Supplement):624–641

11.4. Capítulo de libro sobre los transportadores tipo CDF en *T. vaginalis*.

Consent to Publish

Published under the imprint

Springer

Title of Book/Volume/Conference: Quantitative Models for Microscopic to Macroscopic Biological Macromolecules and Tissues

Editor(s) name(s): Dr. Luis Olivares-Quiroz and Dr. Osbaldo Resendis-Antonio

Title of Contribution:

Author(s) full name(s):

Corresponding Author's name, address, affiliation and e-mail:

When Author is more than one person the expression "Author" as used in this agreement will apply collectively unless otherwise indicated.

§ 1 Rights Granted

Author hereby grants and assigns to **Springer International Publishing AG** (hereinafter called Publisher) the exclusive, sole, permanent, world-wide, transferable, sub-licensable and unlimited right to reproduce, publish, distribute, transmit, make available or otherwise communicate to the public, translate, publicly perform, archive, store, lease or lend and sell the Contribution or parts thereof individually or together with other works in any language, in all revisions and versions (including soft cover, book club and collected editions, anthologies, advance printing, reprints or print to order, microfilm editions, audiograms and videograms), in all forms and media of expression including in electronic form (including offline and online use, push or pull technologies, use in databases and data networks (e.g. the Internet) for display, print and storing on any and all stationary or portable end-user devices, e.g. text readers, audio, video or interactive devices, and for use in multimedia or interactive versions as well as for the display or transmission of the Contribution or parts thereof in data networks or search engines, and posting the Contribution on social media accounts closely related to the Work), in whole, in part or in abridged form, in each case as now known or developed in the future, including the right to grant further time-limited or permanent rights. Publisher especially has the right to permit others to use individual illustrations, tables or text quotations and may use the Contribution for advertising purposes. For the purposes of use in electronic forms, Publisher may adjust the Contribution to the respective form of use and include links (e.g. frames or inline-links) or otherwise combine it with other works and/or remove links or combinations with other works provided in the Contribution. For the avoidance of doubt, all provisions of this contract apply regardless of whether the Contribution and/or the Work itself constitutes a database under applicable copyright laws or not.

The copyright in the Contribution shall be vested in the name of Publisher. Author has asserted his/her right(s) to be identified as the originator of this Contribution in all editions and versions of the Work and parts thereof, published in all forms and media. Publisher may take, either in its own name or in that of Author, any necessary steps to protect the rights granted under this Agreement against infringement by third parties. It will have a copyright notice inserted into all editions of the Work according to the provisions of the Universal Copyright Convention (UCC).

The parties acknowledge that there may be no basis for claim of copyright in the United States to a Contribution prepared by an officer or employee of the United States government as part of that person's official duties. If the Contribution was performed under a United States government contract, but Author is not a United States government employee, Publisher grants the United States government royalty-free permission to reproduce all or part of the Contribution and to authorise others to do so for United States government purposes. If the Contribution was prepared or published by or under the direction or control of Her Majesty (i.e., the constitutional monarch of the Commonwealth realm) or any Crown government department, the copyright in the Contribution shall, subject to any agreement with Author, belong to Her Majesty. If Author is an officer or employee of the United States government or of the Crown, reference will be made to this status on the signature page.

§ 2 Rights retained by Author

Author retains, in addition to uses permitted by law, the right to communicate the content of the Contribution to other research colleagues, to share the Contribution with them in manuscript form, to perform or present the Contribution or to use the content for non-commercial internal and educational purposes, provided the original source of publication is cited according to current citation standards.

§ 3 Warranties

Author agrees, at the request of Publisher, to execute all documents and do all things reasonably required by Publisher in order to confer to Publisher all rights intended to be granted under this Agreement. Author warrants that the Contribution is original except for such excerpts from copyrighted works (including illustrations, tables, animations and text quotations) as may be included with the permission of the copyright holder thereof, in which case(s) Author is required to obtain written permission to the extent necessary and to indicate the precise sources of the excerpts in the manuscript. Author is also requested to store the signed permission forms and to make them available to Publisher if required.

Author warrants that Author is entitled to grant the rights in accordance with Clause 1 "Rights Granted", that Author has not assigned such rights to third parties, that the Contribution has not heretofore been published in whole or in part, that the Contribution contains no libellous or defamatory statements and does not infringe on any copyright, trademark, patent, statutory right or proprietary right of others, including rights obtained through licences; and that Author will indemnify Publisher against any costs, expenses or damages for which Publisher may become liable as a result of any claim which, if true, would constitute a breach by Author of any of Author's representations or warranties in this Agreement.

Author agrees to amend the Contribution to remove any potential obscenity, defamation, libel, malicious falsehood or otherwise unlawful part(s) identified at any time. Any such removal or alteration shall not affect the warranty and indemnity given by Author in this Agreement.

§ 4 Delivery of Contribution and Publication

Author shall deliver the Contribution to the responsible Editor on a date to be agreed upon, electronically in Microsoft Word format or in such form as may be agreed in writing with Publisher. The Contribution shall be in a form acceptable to the Publisher (acting reasonably) and in line with the instructions contained in the guidelines and Author shall provide at the same time, or earlier if the Publisher reasonably requests, any editorial, publicity or other form required by the Publisher.

Publisher will undertake the publication and distribution of the Work in print and electronic form at its own expense and risk within a reasonable time after it has given notice of its acceptance of the Work to Author in writing.

§ 5 Author's Discount for Books and Electronic Access

Author is entitled to purchase for his/her personal use (if ordered directly from Publisher) the Work or other books published by Publisher at a discount of 40% off the list price for as long as there is a contractual arrangement between Author and Publisher and subject to applicable book price regulation.

Resale of such copies or of free copies is not permitted.

Publisher shall provide electronic access to the electronic final published version of the Work on Publisher's Internet portal, currently known as SpringerLink, to Author. Furthermore, Author has the right to download and disseminate single chapters from the electronic final published version of the Work for his/her private and professional non-commercial research and classroom use (e.g. sharing the chapter by mail or in hard copy form with research colleagues for their professional non-commercial research and classroom use, or to use it for presentations or handouts for students). Author is also entitled to use single chapters for the further development of his/her scientific career (e.g. by copying and attaching chapters to an electronic or hard copy job or grant application).

When Author is more than one person each of the co-authors may share single chapters of the Work with other scientists or research colleagues as described above. In each case, Publisher grants the rights to Author under this clause provided that Author has obtained the prior consent of any co-author(s) of the respective chapter.

§ 6 Termination

Either party shall be entitled to terminate this Agreement forthwith by notice in writing to the other party if the other party commits a material breach of the terms of the Agreement which cannot be remedied or, if such breach can be remedied, fails to remedy such breach within 28 days of being given written notice to do so.

On termination of this Agreement in accordance with its terms, all rights and obligations of Publisher and Author under this Agreement will cease immediately, except that any terms of this Agreement that expressly or by implication survive termination of this Agreement shall remain in full force and effect.

§ 7 Governing Law and Jurisdiction

If any difference shall arise between Author and Publisher concerning the meaning of this Agreement or the rights and liabilities of the parties, the parties shall engage in good faith discussions to attempt to seek a mutually satisfactory resolution of the dispute. This agreement shall be governed by, and shall be construed in accordance with, the laws of Switzerland. The courts of Zug, Switzerland shall have the exclusive jurisdiction.

Corresponding Author signs for and accepts responsibility for releasing this material on behalf of any and all Co-Authors.

Signature of Corresponding Author:

Date:

.....

.....

- I'm an employee of the US Government and transfer the rights to the extent transferable (Title 17 §105 U.S.C. applies)
- I'm an employee of the Crown and copyright on the Contribution belongs to Her Majesty

For internal use only:

Order Number: 86941345

GPU/PD/PS: 2/22/662

Legal Entity Number: 1128 Springer International Publishing AG

Springer-C-CTP-05/2016

Zinc efflux in *Trichomonas vaginalis*: In silico identification and expression analysis of CDF-like genes.

Torres-Romero J.C.^{1*}, Alvarez-Sánchez M.E.², [Fernández-Martín K.¹](#), Alvarez-Sánchez L.C.³, Arana-Argáez V.⁴, Ramírez-Camacho M.⁵, Lara-Riegos J.¹.

1 Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular, Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, Calle 43 No. 613 x C. 90 Col. Inalámbrica, CP 97069 Mérida, Yucatán, México.

2 Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), San Lorenzo # 290, Col. Del Valle, CP 03100 Ciudad de México, México.

3 Laboratorio de Virología, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" de la Universidad Autónoma de Yucatán, Calle 43 s/n x C. 90 Col. Inalámbrica, CP 97069 Mérida, Yucatán, México.

4 Laboratorio de Farmacología, Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, Calle 43 No. 613 x C. 90 Col. Inalámbrica, CP 97069 Mérida, Yucatán, México.

5 Centro de Información de Medicamentos, Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, Calle 43 No. 613 x C. 90 Col. Inalámbrica, CP 97069 Mérida, Yucatán, México.

*Corresponding author: Torres-Romero J.C., e-mail address: julio.torres@correo.uady.mx.

ABSTRACT

Zinc (Zn) is a common essential component for all organisms because this metal serves as cofactor or structural element for enzymes and metalloproteins involved in several important biological processes. However, excess levels of Zn can be toxic, as consequence, the cells have evolved homeostatic mechanisms to regulate intracellular levels of this trace mineral. Zinc efflux and sequestration into internal cellular compartments from cells is mediated, in large part, by the ZNT/SLC30 proteins, which belong to the CDF family of ion transporters. The CDF family evolved in prokaryotes and has been reported in several organisms, such as fungi, plants, and animals. Zn have been shown to regulate expression of proteins involved in metabolism and pathogenicity mechanisms in the protozoan pathogen *Trichomonas vaginalis*, in contrast high concentrations of this element was also found to be toxic for *T. vaginalis* trophozoites. Until now, Zn homeostasis mechanisms is not yet clear in this parasite. We performed a genome-wide analysis and localized eight members of the CDF gene family in *T. vaginalis* (*TvCDF1-8*). With the use of *in silico* analyses, the *TvCDF* protein sequences revealed highly conservation and show similar properties to the reported in other CDF orthologues. We analyzed the expression patterns of *TvCDF1-8* transcripts in trophozoites growth under high zinc concentrations, which showed down-regulation in expression. These results indicate that *TvCDF* genes encode membrane transporters and strongly supported their identity as members of CDF-like gene family, and further suggest the function in Zn efflux and sequestration in *T. vaginalis*.

1. Introduction.

The transition metals are necessary for, probably, all organisms as trace elements, which take up the elements they need from their environment. When the metal requirements are satisfied, growth and development of the cells are optimal. If metal uptake is not sufficient, deficiency occurs. By other hand,

when uptake is in excess can lead to toxicity. Each organism has a concentration range for each trace element to maintain an optimal transition metal homeostasis (Maret 2013; Prashanth et al. 2015).

Following iron, zinc is the second most abundant transition metal cofactor. Zinc plays structural, signaling, and regulatory roles and is found in thousands of proteins, commonly required for the function of more than 300 enzymes spanning all classes. For all these reasons, zinc is an essential micronutrient for all living organisms, from the most complex to the most primitive, including microorganisms. However, excess zinc is toxic to the cell, possibly through inhibition of key enzymes and competition with other relevant metal ions. Thus, a specific concentration range for zinc exists for each living organism (Wang and Fierke, 2013; Blindauer 2015).

2. Zinc and pathogenic microorganisms.

In order to grow successfully, microorganisms must have a supply of numerous substances including chemical requirements. Among these chemical requirements for microbial growth include trace elements, such as iron, copper, and zinc. The ability of pathogenic microorganisms to obtain these micronutrients of their host is fundamental to survive and plays a central role in the pathogenesis and the maintenance of a successful infection (Abu Kwaik and Bumann, 2013).

Specifically, the zinc is often used for the synthesis of microbial enzymes. Certain microorganisms may also require zinc as cofactors of enzymes and for the proper function of transcription factors (Cerasi et al. 2013). Bioavailable levels of zinc for microbial growth in nature are sufficiently low that most microbes have evolved high-affinity binding and transport systems (Porcheron et al. 2015). The key of the zinc homeostasis in any cell is the transport. This homeostasis depends on maintaining correct number of transporters in the appropriate location and the concentration of zinc available for transport (Nies 2007). Since the excess of zinc is also toxic for the microorganisms, the zinc homeostasis can be envisioned as the equilibrium between metal uptake and efflux from the microbial cells. In many microorganisms, there are several different types of membrane transporters that maintain zinc homeostasis; these include P1B-ATPase family, natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP) family, zinc-regulated transporter (ZRT), iron-regulated transporter (IRT)-like protein (ZIP), and cation diffusion facilitator (CDF) family (Kambe et al. 2004; Nadadur et al. 2008; Porcheron et al. 2013). The CDF family evolved in prokaryotes and has been reported in several eukaryotic microorganisms, principally in yeasts and parasitic protists (North et al. 2012; Porcheron et al. 2013; Dean et al. 2014).

3. CDF transporters.

The CDF family of transporters was first described as a novel family of heavy metal transporters (Nies and Silver, 1995). Although the first identified member of this family was CzcD of *Cupriavidus* (formerly *Ralstonia*) *metallidurans*, it has been reported that this is a ubiquitous family, members of which are found in all three domains of life (Montanini et al. 2007; Kolaj-Robin et al. 2015). Mammalian members have been named “ZnT” and given the systematic name of SLC30 (Palmiter and Huang, 2004).

Although initially the key feature of this family was that they just transport zinc, CDFs have been shown to mediate the transport of other metal ions such as Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} and Cu^{2+} (Kambe et al. 2015; Kolaj-Robin et al. 2015). All CDF proteins described in bacteria are involved in resistance to Zn^{2+} and other heavy metal cations. Plant CDFs are called MTPs (Metal Tolerance Proteins) and have primarily been characterized as Mn^{2+} transport proteins. In higher animals, including humans, the ZnT proteins, mainly transport Zn^{2+} (Nies 2003; Kolaj-Robin et al. 2015). For this reason the CDF family divided into three subfamilies according to the metals they transport: CDF-Zn, CDF-Fe/Zn and CDF-Mn (Montanini et al. 2007). Based on phylogenetic analysis, the CDF family was divided into 18 clades, which including substrate-defined clades for Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} and Cu^{2+} transporters. This new grouping of CDFs into defined clades also suggests that Zn^{2+} and Mn^{2+} transport, via CDFs, in eukaryotes and prokaryotes is polyphyletic (Cubillas et al. 2013).

The topology of the CDF transporters was predicted based on prokaryotic proteins belonging to this family. Most members possess six transmembrane domains (TMs) with N- and C-termini on the cytoplasmic side of the membrane (Figure 1). However, it has been reported that some CDF members, notably the MSC2 protein of *Saccharomyces cerevisiae* and the ZnT5 and ZTL1 in humans, can exhibit from 12 to 15 TMs (Li and Kaplan, 2001; Cragg et al., 2002; Kambe et al. 2002). The function of these additional transmembrane domains has not been clearly demonstrated, but may be related to how these proteins interact with their partners in the heteromeric complexes, while the rest of the CDF transporters functions as a homodimer (Kambe et al. 2015).

The greatest degree of conservation among CDF proteins is found within transmembrane domains I, II, and V. These three TM domains are also highly amphipathic suggesting an important role in substrate transport. This hypothesis is supported by the observation that certain polar or charged amino acids within these domains are among the most highly conserved (Gaither and Eide, 2001). Several studies have suggested that the composition of the tetrahedral transport site determines the transport specificity in CDF transporters. This tetrahedral transport site, commonly referred to as metal binding site A, contains two aspartic acids and two histidines of TM helices II and V referred to as the quartet or HD-HD motif (Fig. 1). The variant DD-HD of the A-site quartet motif have been shown to be responsible for Cd and Zn transport in bacteria. An asparagine is present in human ZnT10 (ND-HD), is other variant which can function as a manganese transporter, while the DD-DD motif is found in plant ZnT homologs that also transport manganese (Montanini et al. 2007; Gustin et al. 2011; Hoch et al. 2012; Kambe et al. 2015).

In yeast and plant ZnT homologs, many amino acids other than HD-HD have been shown to affect metal specificity. Members of the CDF family often contain a histidine-rich region, either between TMs IV and V or at the N- and/or C-termini or at all three locations (Fig. 1). Such regions are predicted to be cytoplasmic, cis to metal uptake, and could function as potential metal (Zn^{2+} , Co^{2+} , and/or Cd^{2+}) binding domains. The cytosolic histidine-rich loop, between TMs IV and V, is observed in the Zn^{2+} transporters only and is thought to be implicated in sensing and translocating zinc to the HD-HD site (Montanini et al. 2007; Kolaj-Robin et al. 2015; Kambe et al. 2015). Although the histidine-rich located in terminus of CDF proteins could not be determinant for the transport, they could have a function as regulators of transport activity of these proteins (Lee et al. 2002; Nies 2003).

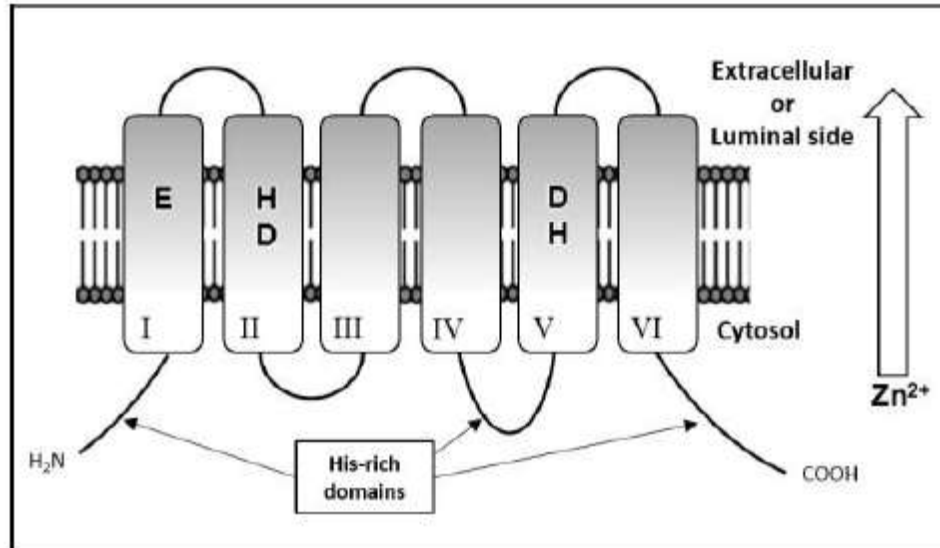


Figure 1. The predicted topology of CDF/Znt/SLC30 family of metal ion transporter. CDF transporters, is predicted to have six transmembrane domains, which are numbered (I–VI). Conserved polar or charged residues that participate in the metal recognition and transport: Glutamate (E) within TM-I and the quartet of Histidine-Aspartate (HD-HD) in the TM-II and -V are indicated. The histidine-rich domains that are implicated in sensing and translocating zinc to the HD-HD site and potentially related in transport activity regulation are also indicated.

4. Zinc in *Trichomonas vaginalis*

The flagellate parasitic protozoan *Trichomonas vaginalis* is the etiologic agent of trichomoniasis, the most common non-viral sexually transmitted infection (STI) in the world. The infection occurs in the female and male urogenital tract and humans are the only natural host for this parasite. The World Health Organization (WHO) estimates an incidence of 276 million new cases each year and prevalence of 187 million of infected individuals. However, the infection is not notifiable (Menezes et al. 2016).

Like other protozoan parasites, *T. vaginalis* require significant quantities of nutrients, which acquires from their hosts through cell membrane transport and phagocytosis. The pathogenesis of *T. vaginalis* is a multifactorial process which depends, in large part, to the ability of trichomonads to acquire essential micronutrients, which include divalent metal ions such as iron, zinc, calcium, among others (Crouch et al. 2001; Torres-Romero and Arroyo, 2009; Figueroa-Angulo et al. 2012).

Trichomoniasis is asymptomatic in 40% to 75% of men. It has been postulated that this is due, in part, to high zinc concentration in prostatic fluid (4-7 mM). However, levels <1.6 mM of zinc are well tolerated by *T. vaginalis* trophozoites and could modulate expression of several proteins involved in the pathogenesis by this parasite (Krieger and Rein, 1982; Vazquez-Carrillo et al. 2011).

4.1. Zinc and trichomonal virulence

Zinc concentration can differentially modulate the virulence factors of *T. vaginalis*. The adhesion of *T. vaginalis* trophozoites to host cells involved at least five adhesins: AP23, AP33, AP51, AP65, and AP120. The expression of four of them (exception by AP120) are at least up-regulated at the transcriptional level by zinc (García et al. 2003; Moreno-Brito et al. 2005; Figueroa-Angulo et al. 2012). Parasite cytoadherence is followed by a cytotoxic effect, where several molecules participate, including proteinases, such as TVCP39 and TVCP65, whose expression are down-regulated in high zinc concentrations (Hernández-Gutiérrez et al. 2004; Vazquez-Carrillo et al. 2011; Figueroa-Angulo et al. 2012). Moreover, the metalloproteinases TvMP50, whose expression is increased in the presence of zinc and TvGP63, which contains a zinc-binding motif (HEXXH), play important roles in parasite proteolytic activity and host cell apoptosis, respectively (Ma et al. 2011; Vazquez-Carrillo et al. 2011; Quintas-Granados et al. 2013; Quan et al. 2014).

5. Zinc homeostasis in *Trichomonas vaginalis*

Despite the evidences that zinc participates in the *T. vaginalis* virulence modulation, little is known regarding their zinc homeostasis-regulating proteins. In eukaryotic cells, zinc homeostasis results from a coordinated regulation by different proteins belonging to the ZIP and CDF transporter families, and zinc-binding proteins (i.e. metallothioneins) involved in uptake, excretion and intracellular storage/trafficking of zinc, respectively.

The information with respect to zinc-binding proteins in *T. vaginalis* is poor. Nevertheless, zinc has been proposed to act as a possible regulator of many proteins that contain “zinc fingers” domains. Many of these proteins have been identified within the *T. vaginalis* genome sequences by *in silico* analysis and others in an experimental way, as the protein HMP35, a protein from hydrogenosomes, which has a putative RING-like, zinc-binding, cysteine-rich motif (Dyall et al. 2003; Carlton et al. 2007).

Recently, we identified in *T. vaginalis* eight ZIP-like genes (*TvZIP*) with high similarity to the canonical ZIP transporters. At least six *TvZIP* genes are regulated at the transcriptional level by zinc, suggesting that these membranous transporters may be implicated in the Zn uptake in this protozoan parasite (Fernández-Martin et al. 2017).

6. Identification of CDF transporters in *T. vaginalis*

Since the genome sequence of the protozoan parasite *T. vaginalis* was published in 2007 (Carlton et al. 2007), this provided an opportunity to identify target genes by homology analysis using various bioinformatic tools. *S. cerevisiae* ZRC1 (NP_013970.1), *C. metallidurans* CzcD (CAA67085.1), and *E. coli* FieF (P69380.1) protein sequences were used as queries in the *T. vaginalis* genome database (www.trichodb.org) to retrieve the CDF transporter homologous. The genome location of the *T. vaginalis* CDF (*TvCDF*) like genes was analyzed and the complete gene sequences were obtained. Through this genome-wide search strategy, we identified in *T. vaginalis* 8 putative *CDF-like* genes based on similarity to previously characterized CDF proteins in other organisms. Several studies suggested that, due to the large size of the *T. vaginalis* genome (~160 Mb); a significant portion of the proteome contains paralogous proteins (Singh et al. 2011; Conrad et al. 2013). All *TvCDF* genes identified were found annotated from the whole genome as putative Cation Diffusion Facilitator or Cation Efflux Protein/Zinc transporters. All trichomonad *CDF* genes have full-length open reading frames (ORF) ranging from 1038 to 1488 base pairs (bp) (Table 1).

Table 1. List of CDF genes identified in *T. vaginalis* genome.

Gene name	Gene ID TrichDB	Genome location			ORF (base pairs)	NCBI accession
		Genome Sequence	Start	End		
<i>TvCDF1</i>	TVAG_132220	DS113908	7072	8382	1308	XM_001306434
<i>TvCDF2</i>	TVAG_228020	DS114074	14310	12594	1314	XM_001303830
<i>TvCDF3</i>	TVAG_285720	DS114481	11412	12722	1308	XM_001300194
<i>TvCDF4</i>	TVAG_060360	DS113353	61220	59982	1236	XM_001321848
<i>TvCDF5</i>	TVAG_027220	DS113573	40429	41474	1038	XM_001314062
<i>TvCDF6</i>	TVAG_093530	DS113185	108078	109568	1488	XM_001581115
<i>TvCDF7</i>	TVAG_283320	DS113192	194739	196067	1326	XM_001582098
<i>TvCDF8</i>	TVAG_437450	DS113194	264494	265792	1296	XM_001581885

6.1 *In silico* analysis of *TvCDF* sequences.

Several studies have investigated the use of multiple *in silico* prediction tools to assess the predictive accuracy or the use of consensus programs (metaservers) that combine the output from several *in silico* prediction tools and produce a single consensus outcome, all of which have been reported to offer improved performance over individual tools (Leong et al. 2015). Here we analyzed the characteristics of *TvCDF* sequences by at least two different algorithms. Genomic annotations of the relative positions of the conserved domains within each *TvCDF* sequence were evaluated through the identification of CDF domains predicted by comparison using the NCBI Conserved Domains Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) and the SMART program (Schultz et al. 1998). The information retrieved by both programs for each gene was used to obtain a graphic representation of the conserved domains found in the selected *TvCDF* sequences using the SMART database based on CDF domain and had e-values higher than 1^{-10} . As shown in Fig. 2, all *TvCDF*s possess at least one Cation_efflux domain, of which *TvCDF6* and *TvCDF8* possess an additional dimerization domain for zinc transporters (*ZT_dimer*).

It has been demonstrated that most of CDF family members have six predicted transmembrane (TM) domains, where two aspartic acids and two histidines in TM-II and TM-V acts as potential metal-binding site (Kambe et al. 2015). The prediction of the transmembrane regions of the *TvCDF*-like transporters were constructed based on TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) and MEMSAT-SVM (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) methods (Krogh et al. 2001; Buchan et al. 2013). The predicted topology of *TvCDF* proteins were illustrated in Fig. 3. *TvCDF1*, *TvCDF2*, *TvCDF3*, *TvCDF5*, *TvCDF7* and *TvCDF8* demonstrated the presence of the expected six transmembrane (TM) regions and both the N- and C-terminus located on the intracellular surface of the cell, in agreement with the observed in most of the CDF transporters previously reported. It was found that all TM structures are α -helices consisting of 16-24 amino acid residues. Exceptionally, *TvCDF4* and *TvCDF6* exhibited the presence of nine and ten TM regions, respectively. However is consistent with other large CDF members as the ZnT5 reported in humans (Kambe et al. 2015). This heterogeneity in structure of each *TvCDF* transporter suggests diversity in functionality.

To find out conserved regions of TvCDF proteins, a multiple alignment with the deduced amino acid sequences of all eight transporter sequences was achieved with the MUSCLE algorithm (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Alignments were shaded using the program BOXSHADE (https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html) at a threshold fraction of 0.3 (no reference sequence). The identical and similar residues were shaded black and gray, respectively. Due to variations between TvCDF predicted sequences, TvCDF1 was used as reference to enumerate potential TM domains. Predicted locations of TM domains were labeled above the sequences as TM I-VI (Fig. 4).

Multiple alignment of these eight sequences shown that TvCDF1, TvCDF2 and TvCDF3 display the same conserved residues found in all members of group I CDF proteins, indicating that these TvCDF transporters are probably responsible for zinc efflux. Also, the amino acid residues histidine (H) and aspartate (D), in the TM II and TM V, suggested to be responsible for zinc binding (Kambe et al. 2015) is conserved in TvCDF1, 2, and 3. Remarkably, TvCDF7 and TvCDF8 presents the conserved motifs: DSXLD and DHRND, which lie in TMs II and V, respectively. The conserved residues (DXXXD) has been implicated to play an important role as a heavy metal binding site and manganese transport through the membrane, principally in plants (Gustin et al. 2011; Kambe et al. 2015). Although conserved metal-binding motif was not found in none of the other three TvCDF (TvCDF4-6) proteins, they specifically presents a CDF domain, as mentioned above, indicating the high diversity between TvCDF paralogs.

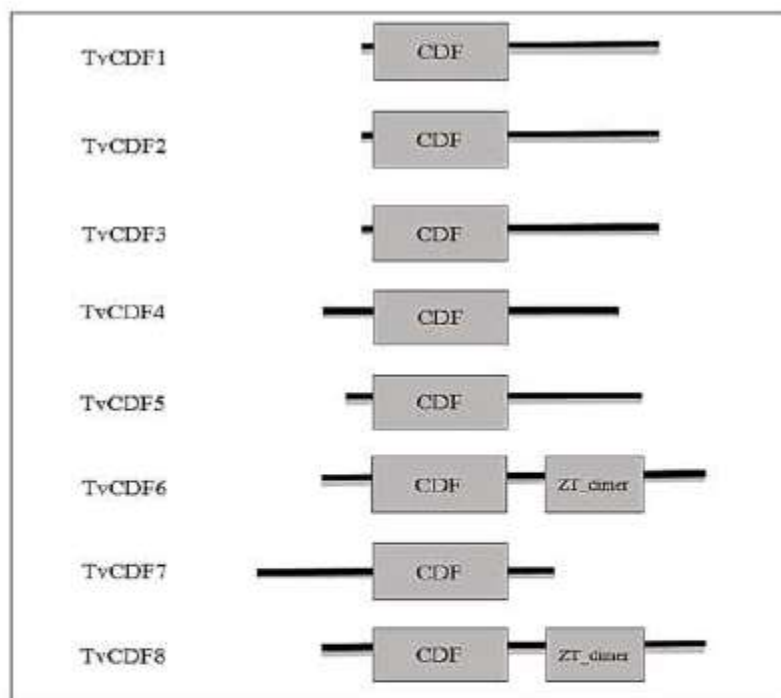


Figure 2. Schematic representation of the domain architecture of CDF transporters in *T. vaginalis*. The proteins were drawn approximately to scale. The domains are named and located according to the CCD and SMART protein domain databases. CDF: Cation Diffusion Facilitator; ZT_dimer: Zinc Transport dimerization.

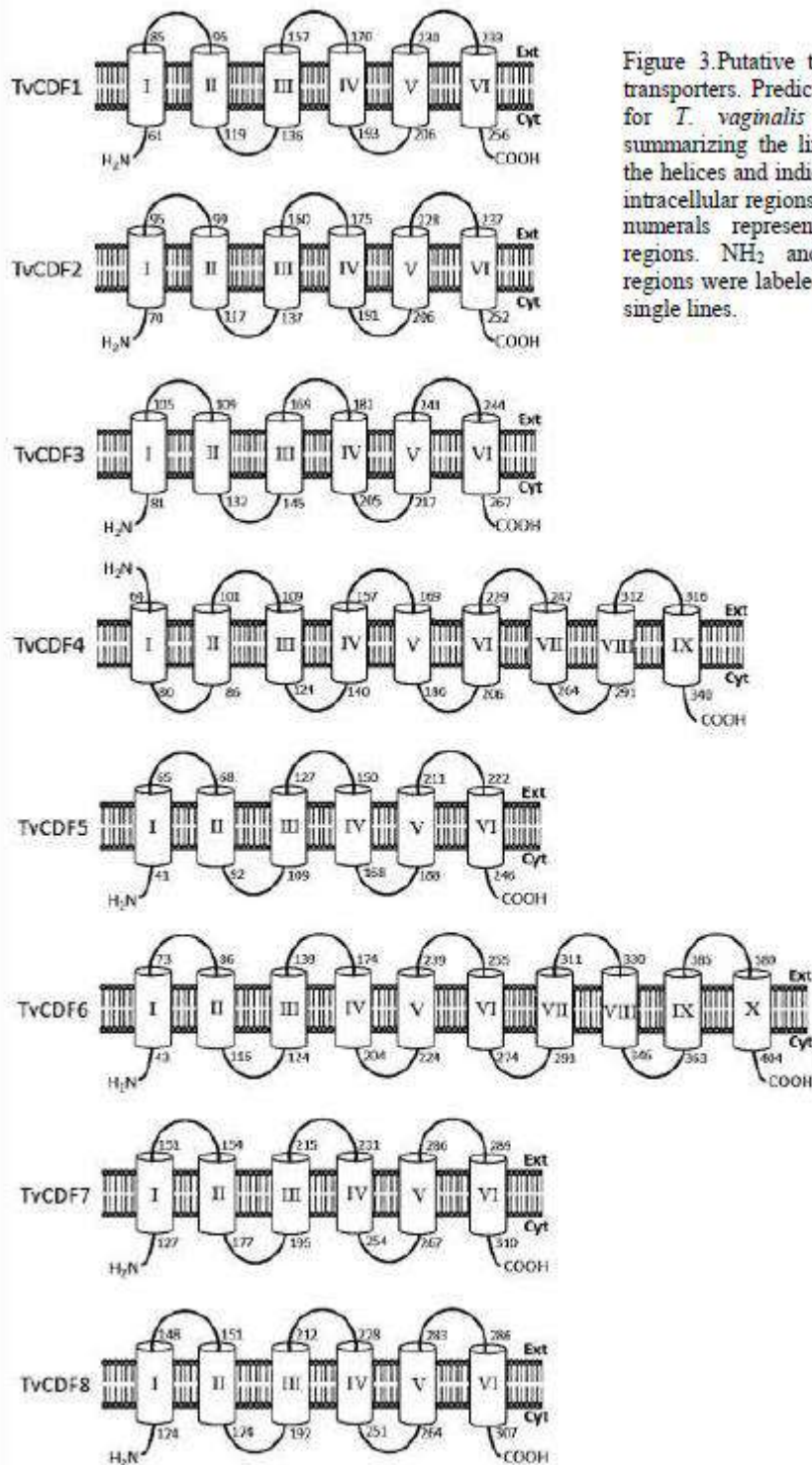


Figure 3. Putative topology of *TvCDF* transporters. Prediction of the topology for *T. vaginalis* CDF transporters summarizing the linear coordinates for the helices and indicating the extra- and intracellular regions. Circles with roman numerals represented transmembrane regions. NH₂ and COOH terminal regions were labeled and represented as single lines.



Figure 4. Alignment of predicted *T. vaginalis* CDF proteins. Sequences alignment was performed by use of the MUSCLE algorithm (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) and identical or similar amino acids were shaded by BOXSHADE (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Boxes with roman numerals above the sequence indicated the transmembrane spanning domains. Single lines represented the extra- and intracellular regions between TM domains.

6.2. Conserved motif and primary sequence analysis of TvCDFs

To identify the most conserved motif sequences in TvCDF proteins we performed a Motif analysis using MEME tool (Bailey et al., 2009) with following parameters; maximum number of motifs to find, 5; minimum and maximum motif width set to 6 and 50 amino acids (<http://meme.nbcrl.net/meme/tools/meme>). Five motifs were identified with an e-value support lower than 1^{-35} and their annotation was searched in Pfam database (<http://pfam.xfam.org/>). Motifs 1-4 were 50 amino acid residue long, while motif 5 was 41 amino acids. Motifs 3, 4 and 5 were related with CDF protein family and present in all TvCDF sequences. Interestingly all identified motifs corresponds to TM domains (Table 2).

The physicochemical parameters of TvCDF sequences were analyzed by using ExPASy's ProtParam server (Gasteiger et al. 2005). The average protein length ranges from 346 to 496 amino acids. Many studies have reported that the majority of CDF family members consist of 220-650 amino acid residues. Also, were included in the study the molecular weight which ranges from 38,716 to 58,607 Daltons and the isoelectric point (pI) ranging from 5.30 to 8.08 (table 3), which are closely related to the characteristics of CDFs from other species. Based on CELLO analysis (Yu et al. 2006), the subcellular location was predicted (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>). All TvCDF transporters were predicted to be located in the plasma membrane, suggesting that they could be responsible for the zinc efflux in *T. vaginalis*. However, other bioinformatic programs predict the possible location in other membranous organelles (data not shown) that they might be involved in ion detoxification through compartmentalization. For putative functional analysis of the TvCDF proteins, a specialized tool PFP from Kihara Bioinformatics laboratory (<http://kiharalab.org/web/pfp.php>), which extracts and scores GO annotations based on their frequency of occurrence in the retrieved sequences, predicted that all TvCDF proteins have the molecular activity as transporter during the biological process of cation transport (Table 3).

Table 2. Conserved motif sequences of TvCDF transporters defined by MEME software.

Motif	Width	E value	Sequence	Protein domain family
1	50	2.4e-065	NTMIAHKVFSTTVQIEFVDDFPQGTDHIGSCFYATSGSDKRIFQTPPVYQH SIGCPHVNLPGHEHHDH	Not found
2	50	7.7e-050	PGVDVNSMKIDLKIEGMVAVHELHVWELCKERYLALLHIVVDSKDRNK KVLEQTHNVMIAHKIFSTTVQ	Not found
3	50	1.7e-044	TGIFFLAELITGFVTKSLSLQSDAWHMSDEASLVIGLLAHEKAKKPPPKRY TFGLARAEVIGGFTNAVF	Cation_efflux
4	50	2.0e-049	GDLGSIIVVISA.AVCQWTTWSGRFYLDPAACSLIFGILVYGTQGLLRRRTGR VLETCPEQIDVEEIKVD	Cation_efflux
5	41	9.9e-023	YTFSLARAEVIGGFTNAIFLLAVCMTILFEAIERFIKVEEIVEPKAFLIVGILG LLVNAIG	Cation_efflux

Table 3. Predicted physicochemical properties, location and functions of TvCDF proteins.

Name	NCBI accession	Deduced protein length (aa)	Theoretical properties			Location Subcellular		Biological Process
			Molecular weight (Da)	Theoretical isoelectric point	CELLO	KHIARA	Molecular Function	
TvCDF1	XM_001306434	436	48,446	5.61	Plasma Membrane	Membrane	Transporter activity	Cation transport
TvCDF2	XM_001303830	438	49,521	5.68	Plasma Membrane	Membrane	Transporter activity	Cation transport
TvCDF3	XM_001300194	436	49,394	5.71	Plasma Membrane	Membrane	Transporter activity	Cation transport
TvCDF4	XM_001321848	412	46,440	6.44	Plasma Membrane	Membrane	Transporter activity	Cation transport
TvCDF5	XM_001314062	346	38,716	5.74	Plasma Membrane	Membrane	Transporter activity	Cation transport
TvCDF6	XM_001583115	496	58,607	8.08	Plasma Membrane	Membrane	Transporter activity	Cation transport
TvCDF7	XM_001582098	442	48,812	5.30	Plasma Membrane	Membrane	Transporter activity	Cation transport
TvCDF8	XM_001581885	432	47,736	5.63	Plasma Membrane	Membrane	Transporter activity	Cation transport

6.3. Phylogenetic analysis of TvCDF sequences

In order to establish evolutionary relationships between TvCDF proteins and reference CDF proteins, a phylogenetic tree was carried out with sequences from various species using the neighbor-joining method and the JTT correction model. To this purpose, nine sequences from different species were used, including a selection of previously identified mammalian, invertebrate, fungal, and bacterial CDF sequences. The reliability of the phylogenetic tree was estimated using bootstrap values with 1,000 replicates using MEGA version 7.0 software (www.megasoftware.net). The phylogenetic tree classified the CDF proteins into three main subfamilies: CDF-Zn, CDF-Zn/Fe and CDF-Mn (Fig. 5), consistent with published data and sequence similarities between CDF orthologs.

The phylogenetic analysis showed that TvCDF1, 2 and 3 were closely related to members of the subfamily CDF-Zn. It was suggested that the amino acid residues DH-DH is responsible for Zn transport (Kambe et al. 2015), that are conserved in these three first TvCDFs, which indicates that they may be functionally related to Zn efflux in *T. vaginalis*. In addition, TvCDF7 and TvCDF8 formed a cluster with other two members of the subfamily CDF-Mn, since they conserved the quartet DD-DD found in CDF homologs that transport manganese (Figs. 4 and 5). For the rest of the TvCDFs is not clear the phylogenetic relationship, at least with the number of sequences used for this study (Fig. 5).

6.4. Gene expression analysis in response to zinc

To verify the effect of zinc on the expression of the *TvCDF* genes, the transcriptional profiling was performed on *T. vaginalis* trophozoites grown in Diamond's trypticase-yeast-extract-maltose (TYM medium) supplemented with 12% heat-inactivated horse serum. The zinc-supplemented medium was prepared by adding zinc sulfate at different final concentrations (0.5, 1.0, and 1.5 mM), according to previous reports (Rogers et al. 2000). Total RNA was isolated from normal and treated *T. vaginalis* trophozoites and treated with DNase. First-strand cDNA was synthesized. To examine the expression profiles of target genes, semi-quantitative RT-PCR was employed using 0.2µl cDNA preparation as a template. All gene-specific primers for *T. vaginalis* target genes were designed using Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). As an internal control, the constitutively expressed *tubulin* gene from *T. vaginalis* was used. For each primer pair the PCR program was empirically adjusted. PCR products were analyzed using 1% agarose gels stained with Ethidium Bromide.

We found that under control conditions without zinc salt, all of the analyzed *TvCDF* genes could be detected. Moreover, when *T. vaginalis* cultures were supplemented with zinc, the expression of *TvCDF1*, 4 and 7 were suppressed at the higher concentration of ZnSO₄ tested (1.5mM), while the transcript levels of *TvCDF2*, 5 and 8 were not distinct from those observed in the control condition (Fig. 6). Interestingly, the transcript level of *TvCDF3* was increased in the presence of ZnSO₄ at 0.5mM and remains unchanged in the higher zinc concentrations. By other hand, *TvCDF6* also shown an increased in the level expression but until the 1.0 mM concentration of ZnSO₄ and returns to basal levels in higher concentration. These data showed that the expression of some of the *TvCDF* genes is regulated by zinc availability.

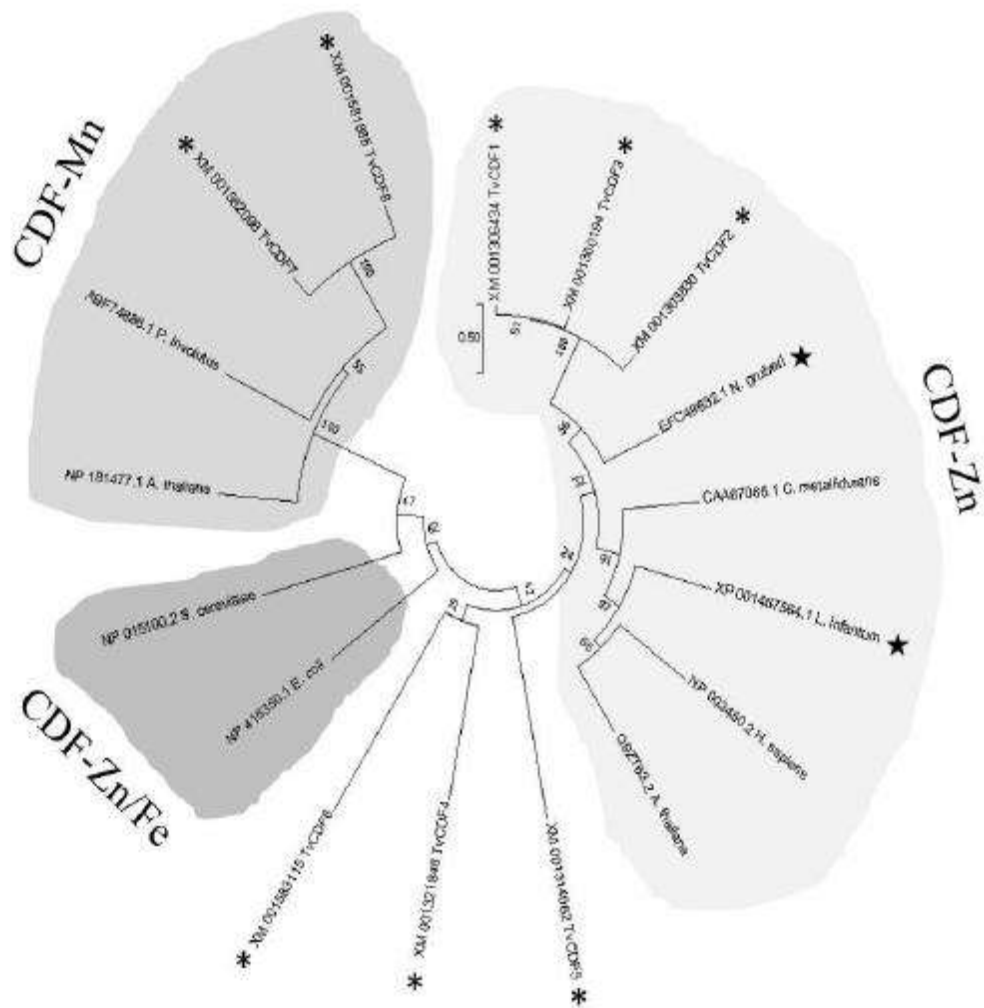


Figure 5. Phylogenetic relationship of the TvCDF proteins with homologous sequences from selected species. A rooted, neighbor-joining (NJ)-based tree of the CDF proteins was constructed with the deduced sequences of CDF proteins from the three different subfamilies (CDF-Zn, CDF-Zn/Fe and CDF-Mn). Asterisks indicate the TvCDF sequences. Stars indicate two closely related protozoan CDFs (*Naegleria gruberi* and *Leishmania infantum*).

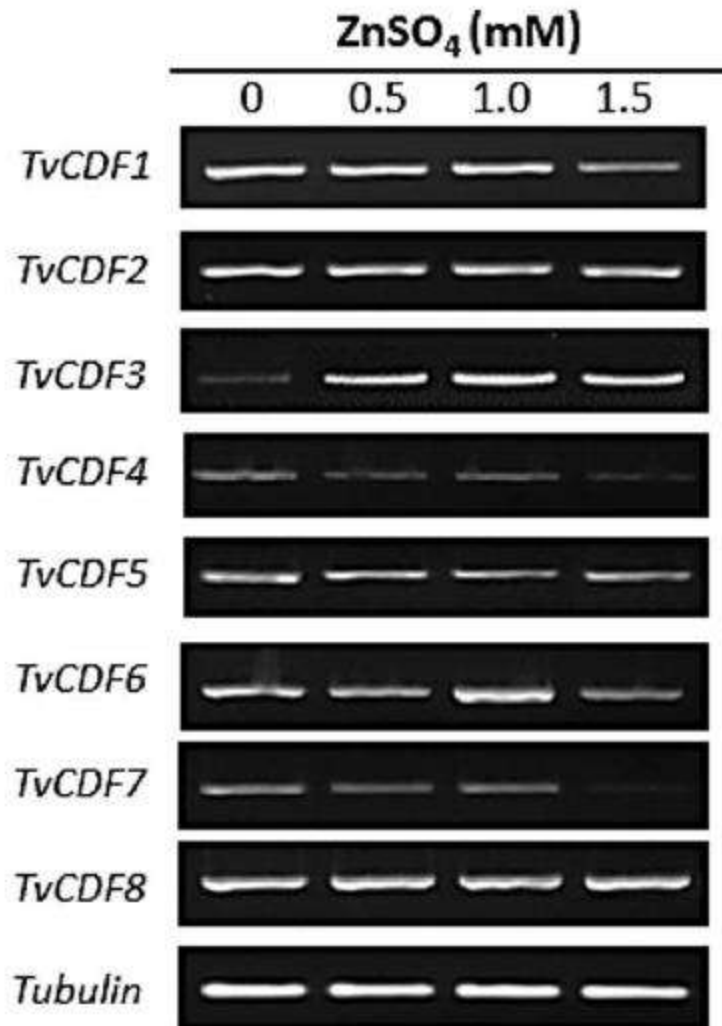


Figure 6. Expression analysis of *TvCDF* genes in *T. vaginalis* trophozoites cultured under excess zinc concentrations. Expression levels of *TvCDF* genes (*TvCDF*1-8) were addressed by adding increasing concentrations of ZnSO₄ (0, 0.5, 1.0, 1.5 mM) to the culture medium for 24 h. Tubulin gene was used as a constitutively expressed control gene. Analysis was performed by RT-PCR.

7. Discussion and Perspectives

Due to the complexity of the biological processes, the biology and computer science did not seem to have any relationship. This link began when some investigators detailed that nature uses algorithm-like procedures to solve biological problems. By viewing these biological systems as information processing units, bringing together computational, statistical, experimental, and technological methods, they gave rise to the computational molecular biology. Over the last few years, this strategy has been successfully used in the improvement in our ability to study detailed aspects of molecular, cellular, organism-level biological systems, and the analysis of large gene lists within the complete genomes of several organisms, actually recognized as bioinformatic analyses.

T. vaginalis depends on zinc to modulate the expression of several genes and proteins that participate in their metabolism. Although the amount of data on zinc-dependency in trichomonads is available, the mechanisms of zinc homeostasis in this parasite have just started to be elucidated. Recently, we found ZIP-like sequences in the *T. vaginalis* genome, demonstrated a zinc-dependent expression at the transcriptional level, which suggest a role for the zinc uptake in this parasitic protist (Fernández-Martín et al. 2017). But not have been reported, until now, transporters involved in the zinc efflux to avoid the excess-related toxicity of this metal in this parasite.

In this work, using bioinformatic tools, we report eight CDF-like transporters in *T. vaginalis*, which were characterized based on similarity to other CDF family members. Since the genome sequence of *T. vaginalis* was released, the large size suggested that a significant portion of the proteome contains paralogous proteins (Singh et al. 2011). Many studies have reported that the majority of CDF family members consist of 220–650 amino acid residues. ORF analysis of the *TvCDF* genes showed that comprises from a minimum of 1038 (*TvCDF5*) to maximum of 1488 (*TvCDF6*) base pairs (Table 1), which are closely related to the size of *CDFs* from other species (Huang L. & Tapaamorndech S. 2013).

Prediction of TM domains in *TvCDF* family proteins revealed that the majority presents 6 TM domains (figure 3), consistent with the observed in most of the *CDF* genes in other species. However, *TvCDF4* and *TvCDF6* exhibits more TM domains, and is more likely to indicate that they belong to the large *CDF* members (Kambe et al. 2015). Taken together all bioinformatic and gene expression analyses, we can conclude that *T. vaginalis* presents at least three *CDF* transporters (*TvCDF1*, 2 and 3) which we found that could be located on the membrane of this protozoan parasite regulating the zinc efflux. Also, this parasite contains other five members of the *CDF* family that may be capable of transporting other divalent metals in addition to zinc, as manganese.

This study is the first to characterize the *CDF* gene family and report the expression profile of these type of proteins in this parasite. Although *CDFs* orthologs have been characterized in many eukaryotic cells, to our knowledge, there are not reports concerning the identification and characterization of *CDFs* in protozoan parasites. Whether our future works will help to explain the way this anaerobic parasite *T. vaginalis* controls gene expression and virulence by the cyclic fluctuations of zinc concentrations in the natural environment during infection, principally in male patients. Nevertheless, these data could bring new insights into the mechanism of zinc transport in *T. vaginalis*.

Acknowledgments

This work was undertaken as part of a research project supported by grant 237990 (to J.C. Torres-Romero) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México. K.G. Fernández-Martín is a scholarship recipient from CONACYT.

Interest conflict

The authors declare that they have no conflict of interest regarding the publication of this paper.

References

- Abu Kwaik, Y., Bumann, D. (2013) Microbial quest for food in vivo: 'nutritional virulence' as an emerging paradigm. *Cellular microbiology*, 15(6), 882-890.
- Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., ... Noble, W. S. (2009). MEME Suite: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 37(Web Server issue), W202–W208.
- Blindauer, C. A. (2015) Advances in the molecular understanding of biological zinc transport. *Chemical Communications*, 51(22), 4544-4563.
- Carlton, J. M., Hirt, R. P., Silva, J. C., Delcher, A. L., Schatz, M., Zhao, et al. (2007) Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*, 315(5809), 207-212.
- Cerasi, M., Ammendola, S., Battistoni, A. (2013) Competition for zinc binding in the host-pathogen interaction. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3.
- Conrad, M. D., Bradic, M., Warring, S. D., Gorman, A. W., Carlton, J. M. (2013) Getting trichy: tools and approaches to interrogating *Trichomonas vaginalis* in a post-genome world. *Trends in parasitology*, 29(1), 17-25.
- Cragg, R. A., Christie, G. R., Phillips, S. R., Russi, R. M., Küry, S., Mathers, J. C., et al. (2002). A novel zinc-regulated human zinc transporter, hZTL1, is localized to the enterocyte apical membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 277(25), 22789-22797.
- Crouch, M. L., Benchimol, M., Alderete, J. F. (2001). Binding of fibronectin by *Trichomonas vaginalis* is influenced by iron and calcium. *Microbial pathogenesis*, 31(3), 131-144.
- Cubillas, C., Vinuesa, P., Tabche, M. L., Garcia-de los Santos, A. (2013). Phylogenomic analysis of cation diffusion facilitator proteins uncovers Ni²⁺/Co²⁺ transporters. *Metallomics*, 5(12), 1634-1643.
- Dean, P., Major, P., Nakjang, S., Hirt, R. P., Embley, T. M. (2014). Transport proteins of parasitic protists and their role in nutrient salvage. *Frontiers in plant science*, 5.
- Dyall, S. D., Lester, D. C., Schneider, R. E., Delgadillo-Correa, M. G., Plümper, E., Martinez, A., et al. (2003). *Trichomonas vaginalis* Hmp35, a putative pore-forming hydrogenosomal membrane protein, can form a complex in yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 30548-30561.
- Fernández-Martín K. G., Álvarez-Sánchez M. E., Arana-Argáez V. E., Álvarez-Sánchez L. C., Lara-Riegos J. C., Torres-Romero J. C. (2017). Genome-wide identification, in silico characterization and expression analysis of ZIP-like genes from *Trichomonas vaginalis* in response to Zinc and Iron. *Biometals*. <https://doi.org/10.1007/s10534-017-0034-x>.

- Figueroa-Angulo EE, Rendón-Gandarilla FJ, Puente-Rivera J, Calla-Choque JS, Cárdenas-Guerra RE, Ortega-López J, et al (2012) The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect*. 14:1411-1427.
- Gaither, L. A., Eide, D. J. (2001). Eukaryotic zinc transporters and their regulation. In *Zinc Biochemistry, Physiology, and Homeostasis* (pp. 65-84). Springer Netherlands.
- Garcia, A. F., Chang, T. H., Benchimol, M., Klumpp, D. J., Lehker, M. W., Alderete, J. F. (2003). Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. *Molecular microbiology*, 47(5), 1207-1224.
- Gustin, J. L., Zanis, M. J., Salt, D. E. (2011). Structure and evolution of the plant cation diffusion facilitator family of ion transporters. *BMC evolutionary biology*, 11(1), 76.
- Hernández-Gutiérrez, R., Avila-González, L., Ortega-López, J., Cruz-Talonia, F., Gómez-Gutierrez, G., Arroyo, R. (2004). *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Experimental parasitology*, 107(3), 125-135.
- Hoch, E., Lin, W., Chai, J., Hershinkel, M., Fu, D., Sekler, I. (2012). Histidine pairing at the metal transport site of mammalian ZnT transporters controls Zn²⁺ over Cd²⁺ selectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(19), 7202-7207.
- Huang L. & Tepasomrdech S. (2013). The SLC30 family of zinc transporters - a review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2-3):548-60.
- Kambe T, Yamaguchi-Iwai Y, Sasaki R, Nagao M (2004) Overview of mammalian zinc transporters. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61:49-68.
- Kambe, T., Narita, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Hirose, J., Amano, T., Sugiura, N., et al. (2002). Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic β cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 19049-19055.
- Kambe, T., Tsuji, T., Hashimoto, A., Itsumura, N. (2015). The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. *Physiological reviews*, 95(3), 749-784.
- Kolaj-Robin, O., Russell, D., Hayes, K. A., Pembroke, J. T., Soulimane, T. (2015). Cation diffusion facilitator family: structure and function. *FEBS letters*, 589(12), 1283-1295.
- Krieger, J. N., Rein, M. F. (1982). Zinc sensitivity of *Trichomonas vaginalis*: in vitro studies and clinical implications. *Journal of infectious Diseases*, 146(3), 341-345.
- Lee, S. M., Grass, G., Haney, C. J., Fan, B., Rosen, B. P., Anton, A. et al. (2002). Functional analysis of the *Escherichia coli* zinc transporter ZitB. *FEMS microbiology letters*, 215(2), 273-278.
- Leong, I.U., Stuckey, A., Lai, D., Skinner, J. R., Love, D. R. (2015). Assessment of the predictive accuracy of five in silico prediction tools, alone or in combination, and two metaservers to classify long QT syndrome gene mutations. *BMC Medical Genetics*, 16, 34.
- Li, L., Kaplan, J. (2001). The yeast gene *MSC2*, a member of the cation diffusion facilitator family, affects the cellular distribution of zinc. *Journal of Biological Chemistry*, 276(7), 5036-5043.
- Ma, L., Meng, Q., Cheng, W., Sung, Y., Tang, P., Hu, S., Yu, J. (2011). Involvement of the GP63 protease in infection of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology research*, 109(1), 71-79.

- Maret W (2013) Zinc and the zinc proteome. In: Banci L (ed.) *Metallomics and the cell*. Springer Netherlands, pp 479-501.
- Menezes, C. B., Frasson, A. P., Tasca, T. (2016). Trichomoniasis-are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide?. *Microbial Cell*, 3(9), 404.
- Montanini, B., Blaudez, D., Jeandroz, S., Sanders, D., Chalot, M. (2007). Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC genomics*, 8(1), 107.
- Nadadur SS, Srirama K, Mudipalli A (2008) Iron transport and homeostasis mechanisms: their role in health and disease. *Indian J. Med. Res.* 128:533-544.
- Nies D. H. (2007) How cells control zinc homeostasis. *Science* 317: 1695–1696.
- Nies D.H., Silver S. (1995) Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J. Ind. Microbiol.* 14:186–199. doi: 10.1007/BF01569902.
- Nies, D. H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3), 313-339.
- North, M., Steffen, J., Loguinov, A. V., Zimmerman, G. R., Vulpe, C. D., & Eide, D. J. (2012) Genome-wide functional profiling identifies genes and processes important for zinc-limited growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS genetics*, 8(6), e1002699.
- Palmiter, R. D., Huang, L. (2004). Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflügers Archiv*, 447(5), 744-751.
- Porcheron G, Garénaux A, Proulx J, Sabri, M, Dozois CM (2013) Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. In: Veyrier F. and Cellier M. (eds.) *Metal economy in host-microbe interactions*. Frontiers Media SA, Lausanne, Switzerland, pp 172-195.
- Prashanth, L., Kattapagari, K. K., Chitturi, R. T., Baddam, V. R. R., Prasad, L. K. (2015). A review on role of essential trace elements in health and disease. *Journal of Dr. NTR University of Health Sciences*, 4(2), 75.
- Quan, J. H., Kang, B. H., Cha, G. H., Zhou, W., Koh, Y. B., Yang, J. B., et al. (2014). *Trichomonas vaginalis* metalloproteinase induces apoptosis of SiHa cells through disrupting the Mcl-1/Bim and Bcl-xL/Bim complexes. *PloS one*, 9(10), e110659.
- Quintas-Granados L, Villalpando J, Vázquez-Carrillo L, Arroyo R, Mendoza-Hernández G, Alvarez-Sánchez ME (2013) TvMP50 is an immunogenic metalloproteinase during male trichomoniasis. *Mol. Cell Proteomics*. 12:1953-1964.
- Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95 (11):5857-5864.
- Singh S, Singh G, Singh AK, Gautam G, Farmer R, Lodhi SS, Wadhwa G (2011) Prediction and analysis of paralogous proteins in *Trichomonas vaginalis* genome. *Bioinformation*. 6:31–34.
- Torres-Romero JC, Arroyo R (2009) Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE/IRP-like system. *Infect. Genet. Evol.* 9:1065-1074.

Vazquez Carrillo, L. I., Quintas Granados, L. I., Arroyo, R., Mendoza Hernández, G., González Robles, A., Carvajal Gamez, B. I., Alvarez Sánchez, M. E. (2011). The effect of Zn²⁺ on prostatic cell cytotoxicity caused by *Trichomonas vaginalis*. *Journal of integrated OMICS*, 1(2), 198-210.

Wang D., Fierke C. A. (2013). The BaeSR regulon is involved in defense against zinc toxicity in *E. coli*. *Metallomics* 5, 372–383.

