



UNAP



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TESIS

**POTENCIALES ANTÍGENOS DE INTERÉS DIAGNÓSTICO EN
EL SECRETOMA DE *Tritrichomonas foetus***

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO**

PRESENTADO POR:

GEORCKI GEOR DANO ROPÓN PALACIOS

ASESOR:

Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL ÁGUILA, Dr.

IQUITOS, PERÚ

2018

ACTA DE SUSTENTACIÓN



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Dirección de Escuela de Formación
Profesional de Ciencias Biológicas

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 031

Iquitos, 29 de enero de 2018

En la ciudad de Iquitos, a los veintinueve días del mes de enero del 2018 y, siendo las 11:00 horas; se reunió en el auditorio de las Direcciones de Escuelas de la Facultad de Ciencias Biológicas – UNAP, el Jurado Calificador y Dictaminador de la tesis que suscribe, designado con Resolución Directoral N° 071-2017-DEFP-B-FCB-UNAP, presidido e integrado por; Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GOMEZ, Dr., (Presidente), Blgo. JORGE ANGULO QUINTANILLA, (Miembro), Blga. CARMEN TERESA REÁTEGUI DE KAHN, Mgr. (Miembro), para escuchar, examinar y calificar la sustentación de la tesis titulada: "POTENCIALES ANTÍGENOS DE INTERÉS DIAGNÓSTICA EN EL SECRETOMA DE *Trichomonas foetus*", por el Br. GEORCKI GEOR DANO ROPÓN PALACIOS.

La Dirección de Formación Profesional de Ciencias Biológicas, mediante Resolución Directoral N° 019-2018-DEFP-B-FCB-UNAP, de fecha 26 de enero de 2018, declara expedita para SUSTENTAR LA TESIS del Br. GEORCKI GEOR DANO ROPÓN PALACIOS, promoción 2011-II, graduado con R.R. N° 1436-2017-UNAP, de fecha 03 de noviembre 2017. Se reconoce como ASESOR de la tesis al profesional: Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL AGUILA, Dr.

Durante todo el desarrollo de la sustentación y defensa de la tesis, el Jurado Calificador y Dictaminador, considerando lo establecido en el nuevo Reglamento de Grados y Títulos, aprobado y puesto en vigencia mediante RESOLUCIÓN DECANAL N° 206-2012-FCB-UNAP; realizó la evaluación del desempeño del bachiller, considerando los criterios y el puntaje consignados en la tabla de valoración.

Culminado el acto, el Jurado Calificador y Dictaminador, con el puntaje alcanzado por el Bachiller y, aplicando los términos establecidos en la tabla de calificación; dió como veredicto; APROBAR LA SUSTENTACIÓN DE TESIS, CALIFICADA COMO MUY BUENA; quedando en consecuencia el candidato apto para ejercer la profesión de Biólogo, previo otorgamiento del título profesional por la autoridad universitaria competente y, su correspondiente inscripción al Colegio de Biólogos del Perú.

Finalmente, el Presidente del Jurado Calificador y Dictaminador levantó la sesión siendo las 13:00 horas y en fe de lo cual, todos los integrantes suscriben la presente acta de sustentación por septuplicado.

Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GOMEZ, Dr.
PRESIDENTE

Blgo. JORGE ANGULO QUINTANILLA
MIEMBRO

Blga. CARMEN TERESA REÁTEGUI DE KAHN, Mgr.
MIEMBRO

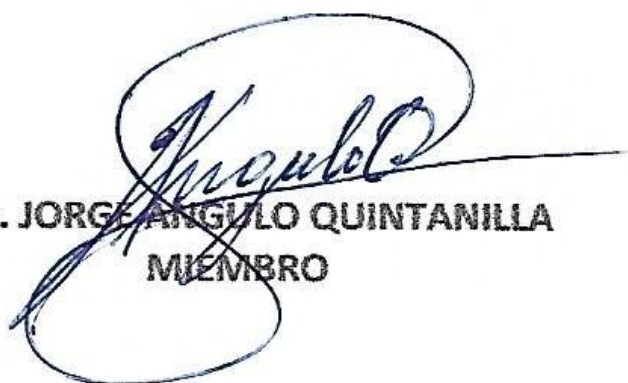
Dirección: Plaza Serafín Filomeno S/N, Iquitos, Perú
Teléfono: 236121

www.unapiquitos.edu.pe
e – mail: fccb@unapiquitos.edu.pe

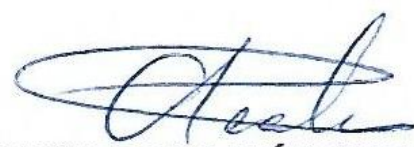
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR



**Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GOMEZ, Dr.
PRESIDENTE**



**Blgo. JORGE ANGLULO QUINTANILLA
MIEMBRO**



**Blga. CARMEN TERESA REÁTEGUI DE KAHN, Mgr.
MIEMBRO**

ASESOR

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. Marapara', is centered on the page. The signature is fluid and cursive.

Blgo. JORGE MARAPARA DEL ÁGUILA, Dr.

DEDICATORIA

<<A Dios y en especial a mi amada madre, Rosa Palacios>>

G. Geor Dano Ropón

AGRADECIMIENTOS

- Expreso mis más sincero y humilde agradecimiento por sobre todo a las Dras. Natalia de Miguel y Verónica Coceres, por brindarme su apoyo su tiempo y la gentileza de compartir sus conocimientos y experiencia profesional, además de la confianza, afecto y amistad fundamentales durante el desarrollo del presente estudio.
- Al Laboratorio de Parásitos Anaerobios del Instituto Tecnológico de Chascomús-Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, por haberme permitido la residencia, el desarrollo y cubrir con los gastos del presente estudio en sus instalaciones.
- A la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana por haberme albergado en sus aulas y por permitirme estudiar y lograr una carrera profesional.
- A todos los becarios doctorales del laboratorio por sus enseñanzas consejos y retroalimentaciones, que permitieron un desarrollo óptimo del presente trabajo.
- A mi familia, por apoyarme siempre en todo momento y brindarme la oportunidad de seguir adelante en mis estudios, y con especial énfasis a mi hermano Ángel Ropón Palacios, por su apoyo incondicional durante mi carrera.
- A mis amigos y compañeros, que me acompañaron todo este tiempo de mi formación académica y especialmente a aquellos, que me brindaron su apoyo en todo momento en la cursada de la tesina.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pàgs.
PORTADA.....	i
ACTA DE SUSTENTACIÓN	ii
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR	iii
ASESOR.....	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO	3
1.1. Antecedentes	3
1.2. Bases Teóricas	5
1.3. Definición de términos básicos.....	13
CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y VARIABLES.....	14
2.1. Hipótesis	14
2.2. Variables y su operacionalización.....	14
CAPÍTULO III. METODOLÓGIA	16

3.1. Diseño Metodológico	16
3.2. Diseño Muestral	16
3.3. Procesamiento de recolección de datos	16
3.4. Procesamiento de datos	19
CAPÍTULO IV. RESULTADOS	24
4.1. Proteínas identificadas en el secretoma de <i>T. foetus</i> por MudPIT.....	24
4.2. Potenciales antígenos identificados en el secretoma de <i>T. foetus</i>	37
4.3. Diseño in silico de proteínas multiepitopes con potencial diagnóstico.	53
CAPITULO V. DISCUSIÓN.....	58
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES	70
CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES.....	71
CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Proteínas identificadas en el secretoma de <i>Trichomonas foetus</i> por MudPIT.....	29
Cuadro 2. Identificación inmunoinformática de potenciales antígenos para el diagnóstico y el desarrollo de vacunas, basadas en las proteínas con probabilidad de ser secretadas	41
Cuadro 3. Predicción de epitopes B usando tres diferentes métodos inmunoinformáticos	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figure 1. Esquema de un trofozoíto de <i>T. foetus</i>	8
Figure 2. Ubicación del parásito.....	12
Figura 3. Secretoma de <i>T. foetus</i>	26
Figura 4. Identificación de antígenos.	38
Figura 5. Identificación de homólogos	38
Figura 6. Mapeo de epitopes B.....	52
Figura 7. Representación esquemática de la construcción de los modelos de proteína multiepitope	54
Figura 8. Modelos de las proteínas multiepitopes.....	56
Figura 9. Plot de Ramachandran	57

RESUMEN

La trichomonosis bovina, es una enfermedad, de transmisión sexual, causada por el parásito protozoario extracelular *Trichomonas foetus*, que causa pérdidas económicas en el ganado bovina y que hasta el momento no cuenta con un diagnóstico reproducible y eficiente. Por lo que está en este estudio se identificaron proteínas del secretoma de este parásito, con la finalidad de encontrar potenciales antígenos. Para lo cual se usó la técnica proteómica de MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology) y con métodos inmunoinformáticos se seleccionaron potenciales antígenos. Un total de 60 proteínas fueron identificadas, de las cuales el ~ 38% fue predicha como secretada, siendo el ~ 36%, secretada por vía alternativa. De este total secretado (~ 38%) se identificaron un total de 14 nuevos antígenos. Además, combinando 4 potenciales antígenos identificados previamente en un estudio piloto de proteína secretadas por *T. foetus* se combinaron para generar 3 modelos de proteínas multiepitopes conteniendo epitopes B de las tres proteínas. Nuestros resultados son el primer aporte, en este tipo de enfoque para *T. foetus*. Estos resultados permitirán entender la biología de la infección de *T. foetus* y el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos, y su futura eliminación.

Palabras clave: Trichomonosis bovina, MudPIT, proteína multiepitope.

ABSTRACT

Bovine trichomonosis is a sexually transmitted disease caused by the extracellular protozoan parasite *Tritrichomonas fetus*, which causes economic losses in cattle and it doesn't count as a reproducible and efficient diagnosis until the moment. Therefore, in this study, the proteins of the secretome of this parasite were identified to find the possible symptoms. The MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology) proteomics technique and immunoinformatic methods were used in this study to select the proteins potentially resistant. A total of 60 proteins were identified, of which ~ 38% were predicted to be secreted, ~ 36% were being secreted by the alternative pathway. Of this total secreted (~ 38%) were identified 14 new shoots. Furthermore, combining 4 possible potential tumors that were identified in a pilot study of proteins secreted by *T. fetus*, they were combined to generate 3 multiepitope protein models that contain the B epitope of the 3 proteins. Our results are the first contribution in this type of approach for *T. fetus*. These results will allow us to understand the biology of *T. fetus* infection and the development of new diagnostic methods, and its future elimination.

Key words: Bovine trichomonosis, MudPIT, multiepitope protein.

INTRODUCCIÓN

La trichomonosis es una enfermedad venérea causada por el protozoo flagelado *Tritrichomonas foetus* que reside en la mucosa del tracto reproductor del hospedador bovino. Dicha enfermedad ocasiona muertes embrionarias, abortos, reducción de la fertilidad ⁽¹⁾; y por ende considerables pérdidas económicas en la ganadería de diferentes regiones del mundo ⁽²⁻⁴⁾.

Hasta la fecha no se han reportado vacunas eficientes, los tratamientos no han sido optimizados y las herramientas diagnósticas no han permitido un diagnóstico rápido, confiable y eficiente; lo cual genera serias complicaciones para la explotación ganadera bovina ⁽⁵⁾. En este contexto resulta vital diseñar métodos más eficaces, sensibles y específicos que permitan la identificación del parásito en volúmenes grandes de muestra que posibiliten la futura erradicación de la parasitosis. ^(2-4,6).

Entre los métodos diagnósticos, actuales, se encuentran los basados en microscopía óptica y los que utilizan herramientas moleculares ⁽⁷⁻⁹⁾. Si bien es cierto, estos métodos son utilizados con frecuencia en la identificación del parásito, presentan desventajas, que podrían conllevar un mal diagnóstico por generar resultados falsos positivos ó falsos negativos, y por ende importantes pérdidas económicas ⁽⁹⁻¹³⁾. Por un lado, mediante la microscopía resulta difícil diferenciar el

parásito de otros comensales del tracto digestivo que puedan accidentalmente residir en el aparato reproductor (*Tetratrichomonas sp.* y *Pentatrichomonas sp.*); ya que este método se basa en el conteo de los flagelos. Por otro lado, los métodos basados en pruebas moleculares, tienen una deficiencia sobre todo en lo que concierne al mantenimiento y el transporte del material biológico que garanticen la integridad del material genético, su complejidad operativa y los elevados costos; lo cual imposibilita su uso como prueba de rutina ^(9,14-17).

En cuanto a las pruebas inmunológicas, si bien son las más usadas en el diagnóstico de diversas enfermedades, no son una alternativa para el diagnóstico de esta enfermedad debido a que los niveles séricos de anticuerpos no son determinantes en los ensayos realizados hasta la fecha.

En este contexto, en este trabajo se propone identificar potenciales antígenos de interés diagnóstica entre las proteínas secretadas por el parásito extracelular *Tritrichomonas foetus*.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

Las muestras utilizadas para el diagnóstico de rutina de la trichomonosis bovina son el esmegma prepucial de machos y el mucus cérvico-vaginal de las hembras; muestras a partir de las cuales se procede a la identificación morfológica del parásito; debido a que los niveles séricos de anticuerpos no son determinantes para el diagnóstico de la enfermedad. El parásito crece en un medio apropiado para aumentar la densidad y analizar mediante microscopía óptica. Básicamente, el método consiste en la cuantificación de los flagelos *Tritrichomonas foetus* (es el único que cuenta con tres flagelos anteriores) lo que permite diferenciarlo de los protozoos de origen intestinal no patógenos (especies de los géneros *Pentatrichomonas*, *Tetratrichomonas*, *Pseudotrichomonas* y otros); método que puede resultar en diagnósticos falsos positivos/negativos. Si bien existen técnicas moleculares como la PCR, éstas son utilizadas solamente como técnicas confirmatorias debido al alto costo, necesidad de equipamiento específico y personal capacitado. Dicha técnica, presenta numerosos puntos críticos como los componentes del esmegma prepucial ⁽¹⁸⁾, el mucus presente en las muestras ⁽¹⁹⁾ y la degradación de los ácidos nucleicos ^(12,20). Entonces resulta indispensable plantear una estrategia diagnóstica simple que permita diferenciar a *T. foetus* de los trichomonadidos no patógenos presentes en las muestras. En este contexto, es importante destacar que se identificaron en reportes previos proteínas secretadas presentes

diferencialmente en parásitos patógenos y no patógenos ⁽²¹⁾, siendo éste un antecedente de interés en el marco de la búsqueda de marcadores específicos.

Reportes previos demuestran que los parásitos (helminths y protozoarios) secretan proteínas que le permiten atravesar barreras biológicas ^(22,23), degradar proteínas del hospedador y evadir la respuesta inmune ⁽²⁴⁾. En algunos patógenos muchas de estas proteínas han sido utilizadas como marcadores de la infección en el desarrollo de técnicas inmunodiagnósticas, debido a su presencia y abundancia en el medio extracelular ⁽²²⁾. Actualmente los estudios proteómicos constituyen una potente herramienta tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo para el estudio de diferentes enfermedades; han abierto nuevas perspectivas en la investigación clínica, principalmente en la búsqueda de nuevos biomarcadores de diagnóstico temprano y en el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas más efectivas. En este sentido, optimizamos un protocolo de obtención de la fracción proteica secretada de *T. foetus* y con el cual realizamos estudios de proteómico utilizando espectrometría de tipo MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*).

Este análisis se realizó en colaboración con el laboratorio del Dr. Yates (The Scripps Research Institute, La Jolla, USA), líder mundial en este tipo de análisis.

Es interesante destacar además que, de las proteínas identificadas, posteriormente mediante análisis bioinformáticos se pudo determinar la capacidad antigénica de alrededor de 15 proteínas (entre ellas algunas Peptidasas) utilizando programas como TAPPred (para predecir péptidos de unión a proteínas transportadoras asociadas al procesamiento antigénico) y Rankpep (para predecir los péptidos ligando a moléculas MHCI y MCHII). De dicho análisis y basados además en antecedentes bibliográficos, se seleccionaron cuatro blancos proteicos de estudio: un carbamato quinasa, una Metalloproteasas del Clan MH, una cisteína proteasa del Clan CD y el factor de elongación alfa de *T. foetus*; los cuales demostraron *in silico* poseer mayor capacidad antigénica.

1.2. Bases Teóricas

Trichomonosis

La trichomonosis bovina es una enfermedad de transmisión sexual del ganado bovino que cursa con fallo reproductivo temprano y es frecuente en los sistemas extensivos donde se utiliza la monta natural ^(25,26). Antiguamente se le conocía con el nombre de “aborto bovino por Trichomonas”, “peste de la cubrición” o “catarro vaginal contagioso” en referencia a su principal manifestación clínica. Esta enfermedad fue descrita por primera vez hace más de 100 años por Kunstler en Francia en 1888, sin embargo, su descubrimiento es atribuido al científico italiano Mazzanti en 1900, quien describió el agente en dos vacas y una novilla sacrificadas por su bajo nivel de fertilidad ⁽²⁷⁾. En 1928, en un

estudio de 105 fetos abortados se detectó la presencia del parásito en 9 casos ⁽²⁸⁾. En este momento se propuso el nombre de *Tritrichomonas foetus*. En 1932, la enfermedad se describió por primera vez en sistemas ganaderos de leche en EE.UU. A partir de 1933, los casos se describieron en todo el mundo ⁽²⁹⁾.

Actualmente, la trichomonosis bovina está incluida en la Lista de enfermedades de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Asimismo, se recoge en la Directiva Europea que regula el comercio de semen bovino (European Union) y la OIE establece una serie de recomendaciones en relación a esta enfermedad para la importación de animales de cría, sementales y semen de origen bovino.

Clasificación taxonómica

El agente etiológico de la trichomonosis bovina es *Tritrichomonas foetus*, un protozoo parásito extracelular, piriforme, encuadrado taxonómicamente en el Phylum Sarcomastigophora, Subphylum Mastigophora (trofozoítos flagelados), Clase Zoomastigophorea (sin cloroplastos), Superorden Parabasalidea (con uno o más aparatos parabasales), Orden Trichomonadida, Familia Trichomonadidae, Subfamilia Tritrichomonadinae y género Tritrichomonas. A esta familia también pertenecen otros tricomonádidos que afectan al hombre (*T. vaginalis*), aves domésticas (*T. gallinae*) y cerdo (*T. suis*) ^(16,30).

Morfología

T. foetus no posee estadios pero si sufre cambios morfológicos dependiendo del entorno, la forma más característica es el trofozoíto,

de aspecto piriforme u ovoide, y cuyo tamaño oscila entre 8-18 μm de longitud y 4-9 μm de ancho ⁽³¹⁾. Los trofozoítos poseen varias estructuras con función locomotora tales como los flagelos y la membrana ondulante (Figura 1). *T. foetus* posee 4 flagelos, originados a partir de los cuerpos basales o cinetosomas, situados en el polo apical de la célula. Tres de los flagelos son de longitud similar entre sí y se dirigen hacia adelante, son los flagelos libres; cuyo número caracteriza a cada género de la familia Trichomonadidae. De esta forma, el género Tritrichomonas se caracteriza por tener 3 flagelos libres, mientras que los géneros Tetratrichomonas y Pentatrichomonas poseen 4 y 5 flagelos, respectivamente. En *T. foetus*, el cuarto flagelo, denominado flagelo recurrente, se dirige hacia la parte posterior del cuerpo, asociado al mismo por una membrana ondulante, y se continúa como flagelo libre más allá del extremo posterior de la membrana ondulante, continuándose como flagelo libre más allá del extremo posterior de la membrana ondulante ^(16,30,32) (Figura 1).

El citoesqueleto presenta, además, una serie de elementos de soporte, entre los que destacan el complejo pelta-axostilar, la costa (bordea el flagelo recurrente), el axostilo y dos filamentos parabasales que soportan un complejo de Golgi simple ⁽³³⁾. El axostilo se origina en la misma zona del nacimiento de los flagelos, rodeado en este punto de un anillo de cromatina, y se dirige hacia la parte posterior del parásito. La pelta es una estructura semilunar muy poco desarrollada, situada en la parte anterior del axostilo. Ambas estructuras forman el complejo pelta-axostilar, compuesto de grupos de microtúbulos conectados

formando una especie de hendidura que aloja el núcleo y los cuerpos parabasales (32,33)

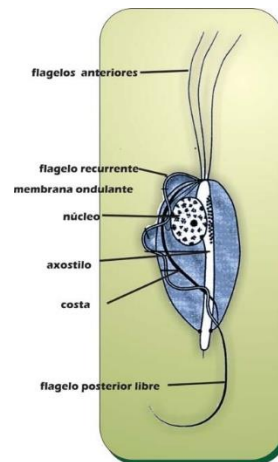


Figure 1. Esquema de un trofozoíto de *T. foetus*

En trichomonas, el axostilo tiene dos funciones, sirve como una organela de soporte (mientras la pelta refuerza la pared del canal flagelar) y además participa en los procesos de división celular, permitiendo la constricción de los núcleos durante la cariocinesis (34). La costa es una estructura rígida que se sitúa en el margen interno de la membrana ondulante y le sirve de soporte. Los filamentos parabasales por su parte, son también elementos filamentosos rayados perpendicularmente y su misión parece ser la de servir de apoyo al cuerpo parabasal (aparato de Golgi). Los filamentos parabasales y el cuerpo parabasal constituyen el aparato parabasal, situado en la parte anterior de la célula (32,33).

T. foetus tiene un núcleo simple anterior y las organelas denominadas hidrogenosomas, las cuales aparecen como corpúsculos electro-densos que reemplazan funcionalmente a las mitocondrias. Otros

componentes celulares que pueden observarse en el citoplasma son los ribosomas libres, polisomas, gránulos de glucógeno, vesículas y vacuolas relacionadas con procesos de endocitosis, digestión y transporte ^(32,33).

Bajo condiciones desfavorables, tales como una baja concentración de nutrientes, la presencia de ciertos fármacos como la griseofulvina, o cambios abruptos en la temperatura, los trofozoítos internalizan el flagelo y adquieren una forma denominada pseudoquiste, el cual no está rodeado de una pared celular manifiesta ⁽³⁵⁾.

Estructura antigénica

De acuerdo con la reacción de aglutinación, tradicionalmente se consideran tres serotipos de *T. foetus*: Belfast, Manley y Brisbane, poseedores de determinantes antigénicos específicos, además de otros compartidos. Aunque los estudios no son recientes, se ha descrito que dichos serotipos son morfológicamente indiferenciables y manifiestan una patogenicidad similar en los bovinos, si bien muestran diferente comportamiento en animales de laboratorio y en cultivos celulares. Se ha podido demostrar que los animales inmunizados frente a un serotipo desarrollan anticuerpos frente al serotipo homólogo, así como frente a los serotipos heterólogos. En general, se suele encontrar un único serotipo en infecciones naturales individuales, aunque puede existir una mezcla de serotipos en un rebaño ⁽³⁶⁾.

En cuanto a la composición antigénica de *T. foetus*, Hall et al. (1986) ⁽³⁷⁾ describieron una serie de 55 a 60 proteínas con pesos moleculares

que variaban entre 25 kDa y 210-220 kDa. Se ha señalado que el suero de vacas inmunizadas con el parásito reconoce aproximadamente 38 antígenos distintos, entre los que destaca un antígeno de superficie de 150 kDa que está ampliamente distribuido en diversas poblaciones del parásito ⁽³⁷⁾. En general, existe una fuerte reacción cruzada entre diferentes aislados de *T. foetus*, mostrando una gran similitud tanto en el perfil de proteínas totales como en el perfil antigénico que muestran al enfrentarse a diferentes sueros ⁽³⁸⁾. Asimismo, se ha descrito la presencia de diversos polisacáridos de superficie y antígenos de naturaleza proteica, que muestran una gran estabilidad incluso después de varios pases por cultivo *in vitro* ⁽³⁶⁾. Existen también antígenos que se comportan como adhesinas con potencial inmunogénico, entre los que se encuentran los lipofosfoglicanos (LPG), presentes en la superficie de *T. foetus* unidos a la membrana parasitaria por una molécula de inositol-fosfoceramida ⁽³⁹⁾. Los LPG son glicoconjugados ricos en fructosa y en menor cuantía manosa, galactosa, glucosamina, glucosa y galactosamina ⁽⁴⁰⁾. Su composición lipídica incluye principalmente ácido palmítico y esteárico. Otra adhesina superficial es la Tf 190 denominada así por su peso molecular, la cual contiene 2 subunidades inmunogénicas de 140 kDa y 60 kDa, más ciertos componentes polipeptídicos. El antígeno Tf 190 tiene la propiedad de inducir una respuesta inmunitaria caracterizada por una respuesta de linfocitos T que pueden desarrollar memoria ⁽³⁹⁾.

La adhesina superficial Tf 1.17 es otra glicoproteína altamente glicosilada (50-70kDa) que posee un péptido extra unido

covalentemente con el resto de la molécula de lipofosfoglicano. Este péptido exclusivo le otorgaría un gran poder inmunogénico comparado con el LPG ⁽⁴⁰⁾. Se ha descrito que la proteína Tf 1.17 estimula la síntesis de anticuerpos que inhiben la adhesión parasitaria al epitelio vaginal y favorecen la aglutinación y destrucción de *T. foetus* mediante el complemento ⁽⁴¹⁾.

Otra adhesina de *T. foetus* es el antígeno soluble y glicosilado (SGA), el cual se libera continuamente desde la superficie del protozoo y está relacionado químicamente con LPG y Tf 1.17. Se han descrito otras adhesinas, de aproximadamente 100kDa de peso molecular, en la superficie del protozoo y en las vesículas citoplasmáticas, aunque normalmente estarían enmascaradas por carbohidratos específicos que se expondrían sólo ante determinadas condiciones ⁽⁴²⁾. Finalmente, la similitud química y fisiológica de varias de las adhesinas descritas para *T. foetus* sugieren que, en ciertos casos, podría tratarse de una misma molécula o grupo de ellas.

Otros antígenos de superficie son glicoproteínas de membrana con un peso molecular entre 45 y 70 kDa que estimulan el desarrollo de una respuesta protectora en el ganado bovino y se han asociado con la inmunidad mediada por el complemento y la prevención de la adherencia del parásito ⁽⁴³⁾.

Localización y Ciclo biológico

En los bovinos, *T. foetus* se localiza en el aparato reproductor (13,27). (Figura 2). En toros se encuentra en la cavidad prepucial,

concentrándose mayoritariamente en la mucosa peneana y zonas adyacentes de la mucosa posterior (14,44,45). El parásito se ubica específicamente sobre la superficie del epitelio escamoso estratificado del pene y el prepucio proximal en el área del fórnix. Con la edad, este epitelio llega a sufrir numerosos plegamientos, produciéndose un mayor desarrollo de las criptas, donde *T. foetus* puede desarrollarse al darse un microambiente adecuado para microorganismos anaerobios facultativos o microaerofílicos (46).

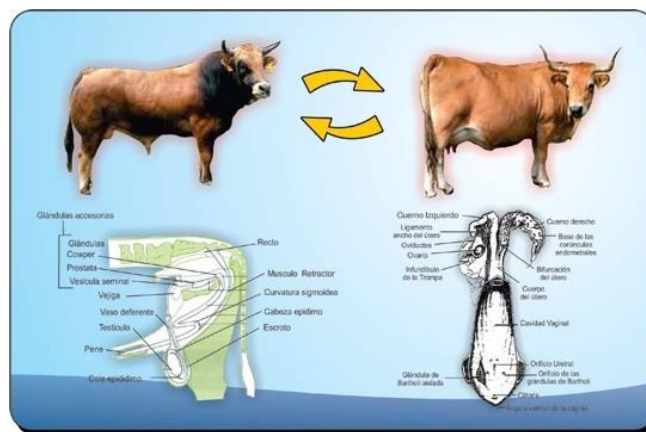


Figure 2. Ubicación del parásito. *T. foetus* se ubica sobre la superficie del epitelio escamoso estratificado del pene y el prepucio proximal, en las criptas prepuciales. En la hembra, el parásito se concentra preferentemente en los pliegues del cérvix. La transmisión del parásito se produce de animal infectado a animal sano, casi exclusivamente mediante la cópula.

En la hembra, el parásito se concentra preferentemente en los pliegues del cérvix (13). La infección es autolimitante, desapareciendo simultáneamente el parásito de todas las áreas del tracto genital al cabo de un periodo mínimo de 90-95 días (29,47,48).

Al igual que otros tricomonádidos, *T. foetus* tiene un ciclo biológico directo exhibiendo la forma de trofozoíto, que no presenta formas de

vida libre, ni hospedadores intermediarios y tiene como hospedador definitivo a los bovinos tanto de las razas *Bos taurus* (*Bos primigenieus taurus*) como *Bos indicus* (*Bos primigenieus indicus*)⁽⁴⁹⁾.

En condiciones naturales, *T. foetus* se transmite directamente de animal infectado a animal sano, casi exclusivamente mediante la cópula (Figura 2). Los toros se infectan durante la cubrición de vacas infectadas, quedando como portadores asintomáticos

1.3. Definición de términos básicos

MHCI: un grupo de antígenos que se encuentra en superficie de las células e impide cuerpos extraños propagar-se en el organismo⁽²²⁾.

MudPIT: Tecnología multidimensional de identificación de proteínas

Trichomonosis: Una de las enfermedades sexuales transmitidas por bovinos, donde caracteriza una falla reproductiva del gado⁽²⁵⁾.

Tritrichomonas foetus: protozoo parasito extracelular, responsable por⁽³⁰⁾.

CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.1. Hipótesis

En el proteoma del secretoma de *T. foetus*, existen proteínas liberadas al medio externo que podrían tener propiedades antigénicas. Del mismo modo en la superficie del parásito se expresan proteínas consideradas como adhesinas, que podrían tener importancia antigénica, algunas de estas han sido estudiadas parcialmente con anticuerpos monoclonales Tf 1.15 Y Tf 1.17. Por lo que estas proteínas son potenciales targets como biomarcadores de la enfermedad, que tiene interés en el uso de pruebas diagnósticas.

2.2. Variables y su operacionalización

2.2.1. Variables

Variable independiente:

Proteoma del secretoma de *Tritrichomonas foetus*

Variable dependiente:

Antígenos secretados/ excretados.

Antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales Tf1.15 y 1.17.

2.2.2. Operacionalización de variables

Se realizará, la expresión y purificación de las proteínas secretadas/excretadas seleccionadas en este estudio en sistemas bacterianos y se purificarán como proteínas recombinantes. Se analizará mediante tecnología de análisis multidimensional de proteínas, las proteínas reconocidas por los anticuerpos monoclonales

Tf 1.15 y Tf 1.17. Ambos grupos de proteínas, serán verificadas, para sus potenciales usos diagnósticos mediante pruebas de ELISA.

Variable	Indicador	Índices
Independiente: Proteoma del secretoma de <i>T. foetus</i>	Proteínas con actividad inmunógena	>400 proteínas
Dependiente:		
- Antígenos secretados/excretados	Proteínas reconocidas por anticuerpos policlonales y monoclonales Tf 1.15 y Tf 1.17	Sensibilidad > 50% y Especificidad > 50%

CAPÍTULO III. METODOLÓGIA

3.1. Diseño Metodológico

El tipo de investigación es descriptivo ya que se describirá si existe reconocimiento entre los antígenos recombinantes producidos y los anticuerpos presentes en las muestras obtenidas de los animales. El diseño de investigación es no experimental – transversal ya que se efectuará en un solo momento del tiempo, y no se manipularán las variables. El estudio se realizó en el Laboratorio de Parásitos Anaerobios, IIB-INTECH y se llevó a cabo en el año 2017 durante los meses de mayo a diciembre.

3.2. Diseño Muestral

La población esta conformada por todo el animal vacuno de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Del total de todos los animales vacunos se obtendrán muestras de secreciones prepuciales y de mucus cérvico-vaginal de animales infectados y no infectados (analizadas previamente por laboratorios de la zona). Los cuáles serán 50 muestras positivas, 50 muestras negativas; como así también 50 muestras en las que se hayan detectado organismos contaminantes morfológicamente afines no patógenos.

3.3. Procesamiento de recolección de datos

Cultivo del parásito

Se activaron parásitos criopreservados a -80°C de *Tritrichomonas foetus*, se descongelaron rápidamente para minimizar los daños,

seguidamente se mezcló el contenido del tubo criogénico con 1 mL de medio Diamond complementado con 5% de Suero fetal equino (SFE) fresco en un eppendorf de 2 mL; para eliminar los restos de DMSO (Dimetil Sulfóxido); se centrifugó a 3000 rpm durante 10min, seguidamente se eliminó el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en 8 mL de medio Diamond complementado (50 mL : 45 mL de Diamond, 5 mL de SFE y , 500 μ L de penicilina/estreptomicina) para su posterior incubación a 37°C hasta alcanzar una concentración de 1×10^6 parásitos/mL (contados en cámara de Neubauer), pasados cada 24 horas.

Obtención del secretoma

Se utilizaron parásitos previamente descongelados y cultivados, descritos en el ídem 3.1. Con éstos se realizó un escalado del cultivo de parásitos partiendo de un volumen de 5 mL hasta llegar a 200 mL. Pasadas 24 horas, se procedió a centrifugar el cultivo a 3000 rpm durante 10 minutos y, se eliminó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 200 mL de tampón fosfato salino (PBS) a 1X y se incubó a 37°C durante 90 minutos, luego se volvió a centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos y se separó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 300 μ L de PBS 1X y se le adicionó 2X de inhibidor de proteasas (PMSF). Al sobrenadante con las proteínas secretadas también se le agregó 2X de PMSF y se filtró todo el volúmen a través de un filtro de 0,22 μ m de poro, para evitar restos contaminantes en la muestra. Al filtrado se le adicionó 200 mL de acetona que es el agente precipitante de las proteínas; esta mezcla se llevó a -20°C y se dejó en

reposo durante toda la noche; al otro día se centrifugó a 10.000 g durante 15-20' minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar hasta evaporar la acetona. Las proteínas obtenidas, fueron mantenidas a -20°C hasta su uso.

Ensayo de lisis celular

El control de lisis se realizó a través de la identificación de β -tubulina en las muestras, utilizando la técnica de western blot. Para ello se empleó el lisado de *T. foetus* como control del ensayo y las alícuotas de las muestras de proteínas secretadas para evaluar la presencia del indicador de lisis β -tubulina; si no ocurrió muerte celular durante el ensayo de secreción la tubulina (proteína citoplasmática) debería estar ausente en nuestras muestras secretadas. El inmunoblot se realizó de la siguiente manera: se depositaron 15 μ L de cada una de las muestras y el lisado en diferentes pozos del gel de poliacrilamida, posteriormente se corrieron las muestras en la cuba de electroforesis de Bio-Rad en tampón de corrida 1X a 60 voltios hasta llegar al límite del gel de apilamiento, de ahí en adelante el voltaje se subió a 120 voltios hasta que las muestras corrieran hasta el límite del frente de corrida en el gel de resolución, seguido se retira el gel resolución y con él se armó el sándwich para la transferencia de las proteínas a la membrana de transferencia fluoruro de polivinilideno (PVDF), previa activación de la misma con metanol. La transferencia se llevó a cabo durante 2 horas a 60 voltios en una cuba de Bio-Rad sumergiendo el sándwich en tampón blot. Después de la transferencia se le realizó tinción con rojo ponceau a la membrana para corroborar la correcta transferencia; se bloqueó

dicha membrana con solución salina tamponada con tris - tween (TBS-T) con 5% de leche desnatada en constante agitación durante 1 hora; luego se desechó la solución de bloqueo y se le agregó el anticuerpo primario anti- β -tubulina (ratón) diluido en TBS-T con 5% de leche descremada, se dejó en agitación constante durante toda la noche a 4°C, se recuperó el anticuerpo, y la membrana se lavó tres veces con TBS-T 1X (10 minutos por cada lavado). Se agregó el anticuerpo secundario anti-ratón IgG total conjugado con fosfatasa alcalina diluido en TBS-T 1X con 5% leche descremada, y se dejó durante 1 hora en agitación a 4°C; luego se lavó nuevamente como con el anticuerpo primario y para el revelado se le adicionó a la membrana 5 mL de la solución reveladora (NBT: 25 μ L, BCID: 18,75 μ L y buffer Fosfatasa para completar) en condiciones de poca luz, pasado 10 minutos se observaron las membranas para verificar las reacción y la observación de las bandas.

3.4. Procesamiento de datos

MudPIT y Análisis Bioinformático

Una vez verificada la ausencia de lisis, la muestra se envió a analizar mediante técnicas de espectrometría de masas con la plataforma MudPIT (Tecnología multidimensional de identificación de proteínas) en colaboración con el Institute, La Jolla, USA, laboratorio del Dr. Yates – (The Scripps Research) siguiendo el mismo procedimiento como se describe en ⁽⁴⁹⁾. Los datos obtenidos, fueron procesados, por métodos bioinformáticos usando computación de alto rendimiento para

compararlo con el genoma de *T. foetus* anotado por el grupo de la Dra. Marlene Benchimol ⁽⁵⁰⁾, para la identificación de las proteínas.

Las proteínas identificadas, mediante la técnica de MudPIT, por comparación con el genoma de *T. foetus* anotado, fueron extraídas en Microsoft Excel con la extensión “.xlsx”. Las secuencias de estas proteínas fueron extraídas de la base de datos de proteínas del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=>), usando el código (ID), con el cual fueron depositadas. Las secuencias de aminoácidos se extrajeron en extensión “.fasta”, en un block de notas. Estas secuencias fueron usadas para la identificación del número de aminoácidos (#aa) peso molecular (M_w), punto isoeléctrico (pI), para lo cual se usó el programa online ProtParam ⁽⁵¹⁾, además se predijo la probabilidad de que sean secretadas, para lo que se usó el programa SecretomeP v.1.0 ⁽⁵²⁾ tomando un cut-off ≥ 0.5 , proteínas mayores o iguales al cut-off, son predichas como secretadas por vía alternativa, y proteínas que además tengan un péptido señal son predichas como secretadas por vía clásica, aquellas inferiores al cut-off son predichas como no secretadas. La función biológica de cada proteína fue identificada usando el programa InterProScan ⁽⁵³⁾ identificando Gene Ontology (GO), para cada proteína.

Análisis inmunoinformáticos

Se seleccionaron las proteínas identificadas como secretadas del ídem 3.4. y se analizaron usando métodos inmunoinformáticos. Se predijo,

la probabilidad de ser antigénica usando el programa VaxiJen v.2.0 ⁽⁵⁴⁾ proteínas con un cut-off ≥ 0.5 , fueron consideradas como potenciales antígenos. Los dominios transmembrana fueron identificados, mediante el programa TMHMM v.2.0 ⁽⁵⁵⁾. Además, se realizó la búsqueda de ortólogos contra el genoma de *Trichomonas vaginalis* cepa G3 usando la herramienta online OrthoMCLdatabase (<http://orthomcl.org/orthomcl/>), output con un % de identidad ≥ 50 y e-value $< 10^{-20}$ fueron considerados como posibles ortólogos. Homólogos, fueron también identificados en el genoma de *Bos taurus* taxid: 9913 y *Campylobacter fetus* taxid: 196, depositados en el GenBank (NCBI), con tal fin se hizo uso de la herramienta BlastP ⁽⁵⁶⁾ disponible en el base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=>), con los siguientes parámetros: (i) Algoritmo BlastP (Protein-Protein BlastP), (ii) Matriz BLOSUM62, (iii) Base de datos de secuencias no redundantes (nr), (iiii) % de identidad ≥ 50 y e-value $< 10^{-20}$. Proteínas que cumplían con el ídem (iiii), fueron identificadas como homólogas (+) y aquellas que no, como no homólogas (-).

Predicción de epitopes B

Se evaluarán 4 proteínas identificadas previamente por MudPIT a partir de un análisis piloto de proteínas secretadas/excretadas de *T. foetus* enfrentadas con el genoma de *T. vaginalis*, a priori, al no disponerse del genoma de *T. foetus* hasta ese primer ensayo, las cuales fueron: Carbamato quinasa (ID: OHT17023.1), Cisteína Peptidasa (ID:

OHT06513.1) Factor de elongación 1-alfa (ID: OHT05707.1) y de una Metalopeptidasa (ID: OHT14292.1). Las proteínas fueron sometidas a análisis para verificar si eran potencialmente secretadas y probables antígenos, lo cual se hizo del mismo modo que en el ídem 3.4 y 3.5, respectivamente. Seguidamente se procedió a la predicción de epitopes para células B, Usando 2 pipeline diferentes ABCpred (cut-off >0.9) ⁽⁵⁷⁾, Bepipred v. 1.0 (Sensibilidad: 0.56/Especificidad: 0.68; cut off>0.2) ⁽⁵⁸⁾ y el método de propensión escala de antigenicidad de Kolaskar & Tangaonkar (K&T) ⁽⁵⁹⁾, que se encuentra disponible en la web del ImmunoEpitopeDatabase (<http://tools.immuneepitope.org>). Se seleccionaron los epitopes con longitud entre 11-mer y 27-mer, que tengan los niveles más altos de score. Dichos epitopes fueron mapeados en el modelo 3D de las proteínas, para tal fin se usó el programa Phyre2 v.2.0 ⁽⁶⁰⁾ y el software PyMol Molecular Graphics v. 1.0.

Diseño *in silico* de proteínas multiepitopes

Se realizó un ensamblado de las secuencias de epitopes predichas por la combinación de los 2 pipeline y el método de propensión escala de antigenicidad de k & T. Para conectar los epitopes se usaron dos linker flexibles “Lys2” y “Gly3”, generando cuatro modelos en total, dos que representaran a los epitopes con mayor score, y dos con scores menores. Una vez ensamblado la proteínas, se realizó el modelamiento de la estructura 3D usando el pipeline Phyre2 v.2.0 ⁽⁶⁰⁾ en modo avanzado

por reconocimiento de folding. Los modelos fueron extraídos en extensión “.pdb” y visualizados en software PyMol Molecular Graphics v 1.0, donde se analizó la estructura. Se usó el programa online ProtParam ⁽⁵¹⁾ para predecir características bioquímicas de los modelos y se obtuvo un Plot de ramachandran para evaluar la calidad del modelo, haciendo uso de la herramienta online RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>).

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó utilizando tablas y gráficos con porcentajes haciendo uso del Microsoft Excel.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1. Proteínas identificadas en el secretoma de *T. foetus* por MudPIT.

Se identificó una gran abundancia de proteínas en la fracción secretada, como se muestra en la Figura 3A, teñida con Coomassie Brilliant Blue. En el ensayo de Western Blot, al no observarse una banda en la calle B para la proteína β -tubulina, la cual, si es observada en calle A, que comprende el lisado total de los parásitos (control), se afirma la ausencia de lisis celular.

Este *pool* de proteínas (fracción secretada) se identificó mediante MudPIT, en colaboración con el grupo de Dr. Yates, como se describe en (49), encontrándose un total de 60 proteínas, de las cuales el ~ 38% fueron identificadas por análisis bioinformáticos, como potencialmente secretadas, de las cuales el ~2% pertenece a la clase secretadas por vía clásica y el ~ 36% por vía alternativa, y con un ~ 62% de proteínas probablemente no secretadas por ninguna de las vías (Figura 3B y Cuadro 1).

El análisis bioinformático también arrojó información sobre las posibles funciones biológicas en las que estas proteínas se encuentran involucradas. Siendo las de menor porcentaje aquellas relacionadas con procesos de Aminoacilación de ARNt y Procesamiento metabólico del piruvato, con un porcentaje de ~ 1.6% (1/60) para ambas. Mientras que se corroboró un mayor porcentaje de proteínas en procesos biológicos involucrados en la constitución funcional (~ 8.33%) y

estructural del ribosoma (~ 13.33%) y la motilidad celular/citocinesis. Estando, ésta última, comprendida con el mayor número de proteínas, con un porcentaje de ~ 15% (9/60) (ver Fig1C).

Se identificaron también otras proteínas relacionadas con procesos metabólicos, que podrían comprender la adquisición de nutrientes por el parásito, asegurando su supervivencia (Figura 3C). Estas, están comprendidas tanto en reacciones catabólicas (i.e. *procesos glicotlíticos, hidrólisis de ATP, procesamiento del piruvato, degradación de carbohidratos, como la glucosa*); y anabólicas (i.e. *síntesis de GTP, UTP y CTP, elongación translacional, plegamiento de proteínas*). Cabe resaltar, que la Actina, fue una de las proteínas con mayor abundancia en el secretoma de *Tritrichomonas foetus*, lo que señala la importancia de esta proteína, para el parásito (Cuadro 1).

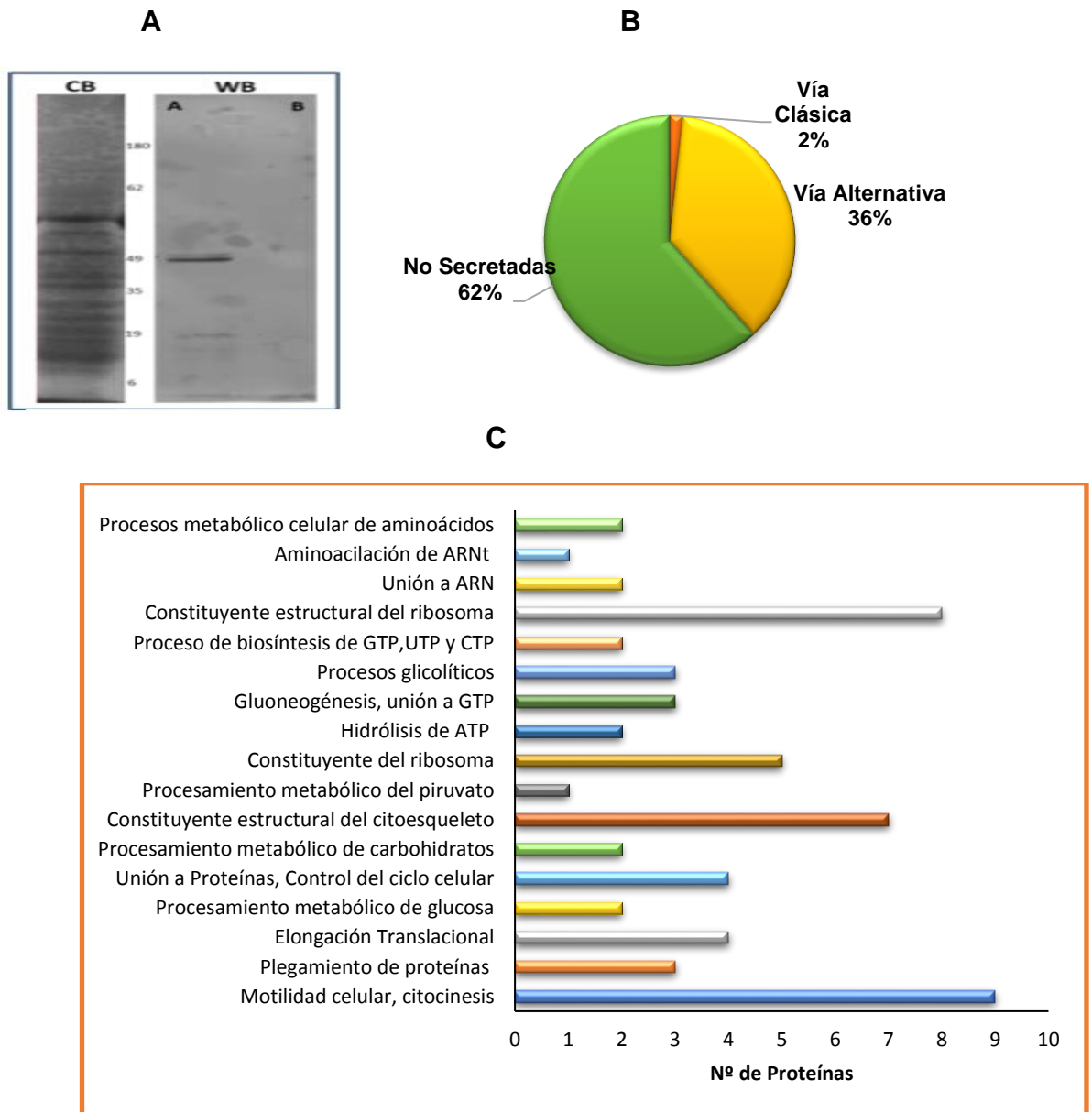


Figura 3. Secretoma de *T. foetus*. (A) Las proteínas secretadas al medio extracelular se concentraron utilizando acetona, se separaron mediante SDS-PAGE y se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue (CB). Notar la abundancia de proteínas en la fracción secretada. Western Blot (WB) realizado utilizando el anticuerpo primario anti-tubulina como control de lisis celular. En la calle A puede observarse el extracto proteico celular de *T. foetus* y la calle B corresponde a la fracción proteica secretada, claramente indicando ausencia de lisis celular. (B) Porcentaje de proteínas no secretadas y secretadas por vía clásica y/o alternativa, encontradas en el secretoma. (C) Proteínas identificadas en el secretoma por MudPIT, agrupadas por funciones biológicas por análisis con InterproScan(53).

Se identificaron también dos proteínas con información desconocidas categorizadas como hipotéticas en el secretoma de *T. foetus* (Cuadro 1). La proteína Hipotética TRFO_36906, que mediante el análisis con el programa InterProScan ⁽⁵³⁾, se predijo tentativamente relaciona con la familia de la ubiquitina, posiblemente involucrada en la unión de proteínas y la proteína hipotética TRFO_24132, posible constituyente estructural del ribosoma. Ésta última proteína fue predicha como secretada por vía alternativa con una probabilidad de $p= 0.529$, superando el cutt-of ($p \geq 0.5$).

El uso del programa SecretomeP ⁽⁵²⁾, reveló la diversidad de probalbilidades de que las proteínas identificadas en el secretoma de *T. foetus*, fuesen secretadas por el parásito. Indicando que algunas de ellas, tiene la capicidad de ser secretadas por vía clásica y otras por vía alternativa. Siendo la Proteína S27a Ubiquitina-40S ribosomal la predicha con la mayor probabilidad de ser secretada ($p= 0.88$), mientras que la Nucleósido difosfato quinasa fue la que obtuvo la menor probabilidad de ser secretada ($p= 0.201$), considerándose como una proteína, no secretada. El análisis con el programa online ProtPam ⁽⁵¹⁾, predijo variados pesos moleculares (M_w), puntos isoeléctricos (pI) y # de aminoácidos (aa) para las proteínas identificadas en el secretoma de *T. foetus*. Los pesos moleculares se mantuvieron en un rango de 13kDa – 179kDa, siendo 13.9kDa el de menor peso molecular perteneciente a la Actina (ID: OHS93670.1) y el mayor con 178.9kDa para la proteína Hipotética TRFO_36906. Los puntos isoeléctricos

indican proteínas con un rango de acción de pH entre ácido - básico. Ninguna de estas proteínas tuvo un punto isoelectrico que indicara un pH neutro y en el análisis de # aa, se encontró proteínas con hasta 917aa (ID: OHS95539.1), evidenciando su gran tamaño.

Cuadro 1. Proteínas identificadas en el secretoma de *Tritrichomonas foetus* por MudPIT.

ID	Proteína	#aa	M _w	pI	Ab. Relat.	SecP (p≥0.5)	Función biológica
OHT10984.1	Actina 1	376	42.1 kDa	6.81	2	No (0.42)	Motilidad celular, citocinesis
OHS93670.1	Actina	124	13.9 kDa	5.77	2	No (0.38)	Motilidad celular, citocinesis
OHS93735.1	Proteína cognitiva de shock térmico 71kD	630	68.6 kDa	5.17	5	No (0.27)	Plegamiento de Proteínas
OHS95216.1	Actina	375	41.7 kDa	5.29	4	Sí + (0.50)	Motilidad celular, citocinesis
OHS96168.1	Factor de elongación 1-alfa 2	439	48.7 kDa	9.12	4	No (0.14)	Elongación Transnacional, Actividad GTPasa
OHS96835.1	Gliceraldehido-3-fofato dehidrogenasa	359	39 kDa	6.51	4	Sí + (0.5)	Proceso de óxido-reducción, Procesamiento metabólico de glucosa
OHS96904.1	Actina	375	41.7 kDa	5.29	4	Sí + (0.51)	Motilidad celular, citocinesis

OHS97832.1	Factor de elongación 1-alfa	439	48.7 kDa	9.12	4	No (0.14)	Elongación Transnacional, Actividad GTPasa
OHS98991.1	Gliceraldeido-3-fosfato dehidrogenasa	360	39.4 kDa	5.63	4	Sí + (0.6)	Proceso de óxido- reducción, Procesamiento metabólico de glucosa
OHS99104.1	Poliubuquitina B	305	34.6 kDa	6.10	4	No (0.38)	Unión a Proteínas, Control del ciclo celular
OHS99450.1	Fructosa bifosfato aldolasa	329	36.1 kDa	5.8	6	Sí + (0.56)	Procesamiento metabólico de carbohidratos, Actividad aldehído-liasa
OHS99766.1	Factor de elongación 1-alfa	439	48.6 kDa	9.05	4	No (0.18)	Elongación Transnacional, Actividad GTPasa
OHT01812.1	Cadena beta tubulina	445	49.8 kDa	4.81	6	Sí + (0.5)	Constituyente estructural del citoesqueleto, Proceso basado microtúbulo
OHT05707.1	Factor de elongación 1-alfa 2	439	48.8 kDa	9.05	4	No (0.2)	Elongación Transnacional, Actividad GTPasa
OHT05742.1	Actina	375	41.7 kDa	5.36	4	No (0.493)	Motilidad celular, citocinesis

OHT06169.1	Actina	375	41.7 kDa	5.29	4	No (0.499)	Motilidad celular, citocinesis
OHT08962.1	Actina	375	41.7 kDa	5.29	4	Sí + (0.5)	Motilidad celular, citocinesis
OHT11264.1	Actina	377	42.1 kDa	5.31	4	No (0.499)	Motilidad celular, citocinesis
OHT11265.1	Actina	377	42.1 kDa	5.31	4	No (0.499)	Motilidad celular, citocinesis
OHT15111.1	Proteína cognitiva de shock término 71 kDa	605	67 kDa	5.14	5	No (0.21)	Plegamiento de Proteínas
OHS94177.1	Cadena 1A tubulina alfa	452	50.2 kDa	4.93	4	No (0.46)	Constituyente estructural del citoesqueleto, GTPasa actividad
OHS95539.1	Piruvato, Familia de las proteínas fosfato diquinasas	917	101.2 kDa	5.43	3	Sí + (0.509)	Proceso metabólico del piruvato, Actividad quinasa
OHT03461.1	Proteína S27a Ubiquitina-40S ribosomal	164	19 kDa	10	4	Sí (0.88)	Constituyente del ribosoma, translación, unión de proteínas

OHT04445.1	Cadena 1D tubulina alfa	321	35.6 kDa	4.87	4	Sí + (0.53)	Constituyente estructural del citoesqueleto, GTPasa actividad
OHT09272.1	Cadena 1D tubulina alfa	321	35.6 kDa	4.82	4	Sí + (0.526)	Constituyente estructural del citoesqueleto, GTPasa actividad
OHT11904.1	Poliubiquitina	153	17.3 kDa	6.09	4	Sí+ (0.577)	Unión a Proteínas, Control el ciclo celular
OHT13277.1	Subunidad B tipo V protón ATPasa	506	56.6 kDa	5.68	3	No (0.470)	Hidrólisis de ATP acoplado transporte de protones, Catálisis del movimiento de sustancias transmembrana
OHT14314.1	Proteína L40 Ubiquitina-60S ribosomal	132	15 kDa	9.55	4	Sí + (0.518)	Constituyente del ribosoma, translación, unión de proteínas
OHT15762.1	Poliubiquitina	153	17.3 kDa	6.09	4	Sí + (0.577)	Unión a Proteínas, Control el ciclo celular
OHT16117.1	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	600	66.6 kDa	5.84	4	No (0.451)	Gluconeogénesis, unión a GTP

OHS92916.1	Subunidad B tipo V protón ATPasa	506	56.6 kDa	5.63	3	No (0.376)	Hidrólisis de ATP acoplado transporte de protones, Catálisis del movimiento de sustancias transmembrana
OHS96346.1	Familia de la proteína Enolasa	474	52.4 kDa	8.68	4	No (0.311)	Procesos glicolíticos, Actividad fosfopiruvato hidratasa
OHT00365.1	Proteína L40 Ubiquitina-60S ribosomal	132	15 kDa	9.55	4	Sí + (0.518)	Constituyente del ribosoma, translación, unión de proteínas
OHT02583.1	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	600	66.7 kDa	5.56	3	Sí + (0.516)	Gluconeogenesis, unión a GTP
OHT03681.1	Cadena 1D tubulina alfa	453	50.3 kDa	4.93	4	No (0.474)	Constituyente estructural del citoesqueleto, GTPasa actividad
OHT04286.1	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	600	66..6 kDa	5.91	3	No (0.463)	Gluconeogenesis, unión a GTP
OHT04569.1	Proteína L40 Ubiquitina-60S ribosomal	132	15 kDa	9.55	4	Sí + (0.518)	Constituyente del ribosoma, translación, unión de proteínas

OHT05488.1	Cadena 1D tubulina alfa	321	35.6 kDa	4.82	4	Sí + (0.526)	Constituyente estructural del citoesqueleto, GTPasa actividad
OHT06319.1	Familia de la proteína Enolasa	484	52.9 kDa	5.11	3	No (0.327)	Procesos glicolíticos, Actividad fosfopiruvato hidratasa
OHT06402.1	Fructosa bifosfato aldolasa	328	36 kDa	5.69	4	Sí + (0.527)	Procesamiento metabólico de carbohidratos, Actividad aldehído-liasa
OHS93481.1	Nucleósido difosfato quinasa	205	22.9 kDa	5.68	2	No (0.201)	Proceso de biosíntesis de GTP, UTP y CTP biosíntesis
OHT03240.1	Proteína S14-1 40S ribosomal	158	16.6 kDa	10.59	2	No (0.424)	Traducción, Constituyente estructural del ribosoma
OHT12977.1	Proteína de la familia factor de iniciación translacional eIF-5A	166	18.1 kDa	4.92	3	No (0.240)	Regulación positiva de terminación translacional, Unión a ARN
OHS95401.1	Proteína de la familia factor de iniciación translacional eIF-5A	162	18 kDa	4.83	3	Sí + (0.614)	Regulación positiva de terminación translacional, Unión a ARN
OHS96977.1	Proteína hipotética TRFO_36906	1539	178.9 kDa	6.28	2	No (0.485)	Unión a proteínas**, Familia de la Ubiquitina **

OHS97944.1	Aspartato ARNt ligasa	489	55.4 kDa	5.51	2	No (0.428)	Aminoacilación de ARNt para translación de proteínas, Unión de nucleótidos
OHS98422.1	Proteína de shock térmico 90-2	710	82.2 kDa	4.86	4	No (0.272)	Plegamiento de proteínas, respuesta a estrés
OHS99789.1	Proteína S14-1 40S ribosomal	158	16.6 kDa	10.59	2	No (0.424)	Translación, Constituyente estructural del ribosoma
OHT01928.1	Proteína L15-2 60S ribosomal	204	24.4 kDa	10.78	2	No (0.391)	Translación, constituyente estructural del ribosoma
OHT03110.1	Proteína L15-2 60S ribosomal	230	27.4 kDa	10.81	2	No (0.382)	Translación, constituyente estructural del ribosoma
OHT04438.1	Proteína S14-1 40S ribosomal	158	16.6 kDa	10.59	2	No (0.424)	Translación, Constituyente estructural del ribosoma
OHT06429.1	Glutamato dehidrogenasa NAD-específico	447	49.5 kDa	8.23	2	No (0.354)	Procesos metabólico celular de aminoácidos, Actividad oxidoreductasa
OHT07104.1	Familia de Nucleósido difosfato quinasa	99	10.7 kDa	5.66	2	Sí + (0.847)	Proceso de biosíntesis de GTP, UTP y CTP biosíntesis

OHT07341.1	Familia de la proteína Enolasa	498	55 kDa	4.72	3	No (0.472)	Procesos glicolíticos, Actividad fosfopiruvato hidratasa
OHT07573.1	Proteína L15-2 60S ribosomal	232	27.8 kDa	10.69	2	No (0.455)	Traducción, constituyente estructural del ribosoma
OHT07636.1	Proteína hipotética TRFO_24132	92	98 kDa	11.94	2	Sí + (0.529)	Traducción**, constituyente estructural del ribosoma**
OHT11915.1	Proteína L15-2 60S ribosomal	204	24.4 kDa	10.78	2	No (0.391)	Traducción, constituyente estructural del ribosoma
OHT13114.1	Proteína S27a Ubiquitina-40S ribosomal	151	17.3 kDa	9.81	2	Sí + (0.88)	Constituyente del ribosoma, traducción, unión de proteínas
OHT13285.1	Putativa beta-eliminación liasa	392	44.1 kDa	6.04	2	No (0.407)	Proceso metabólico celular de aminoácidos, actividad liasa
OHT15380.1	Cadena alfa tubulina	152	17 kDa	4.68	2	No (0.208)	Constituyente estructural del citoesqueleto, Unión a GTP

Leyenda: Sí: secretada por vía clásica; Sí +: secretada por vía alternativa; No: no secretadas; éstos datos fueron obtenidos usando el programa SecretomeP v. 1.0 (52); Proteínas superiores al cut-off ($p \geq 0.5$), fueron tomadas como secretadas por vía alternativa, además aquellas con un cut-off ($p \geq 0.5$) mayor y la presencia de un péptido señal, se indican como secretadas por vía clásica. Aquellas inferiores al cut off ($p \geq 0.5$), se indican como no secretadas. ** Posible función biológica.

4.2. Potenciales antígenos identificados en el secretoma de *T. foetus*

La secuencia primaria de los aminoácidos del ~ 38% (23/60) de las proteínas identificadas como potencialmente secretadas, tanto por vía clásica, como alternativa, fueron extraídas en extensión “.fasta”, en un block de notas a partir de la base de datos de proteínas del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=>). El análisis de éstas con el programa VaxiJen (54), identificó un total de 14 antígenos de un *pool* de 23 candidatos (~ 60%), de entre los cuales la proteína de la familia factor de iniciación translacional eIF-5A, fue la que obtuvo la mayor probabilidad de ser antígeno ($p=0.775$), mientras que la proteína de la familia de Nucleósido difosfato quinasa, se predijo como un mal candidato a antígeno ($p=0.310$). Los potenciales antígenos fueron predichos en un rango de probabilidad de 0.5-0.77. Ninguno de los antígenos obtuvo una probabilidad perfecta ($p= 1$), pero sí sobrepasaron el cut-off $p\geq 0.5$, ratificando su aceptabilidad como potenciales antígenos (Figura 4 y Cuadro 2). Por otro lado, se identificaron 16 (Figura 5 y Cuadro 2) potenciales proteínas homólogas compartidas con el genoma de *Bos taurus*, éstas se ajustaron al parámetro establecido en la búsqueda usando el algoritmo BLASTP⁽⁵⁶⁾, con un % de identidad ≥ 50 y e-value $<10^{-20}$, que usó con la finalidad de evitar errores, en la búsqueda que sean resultado del azar. Indicando que éstas deberían ser evaluadas con cautela en inmunensayos.

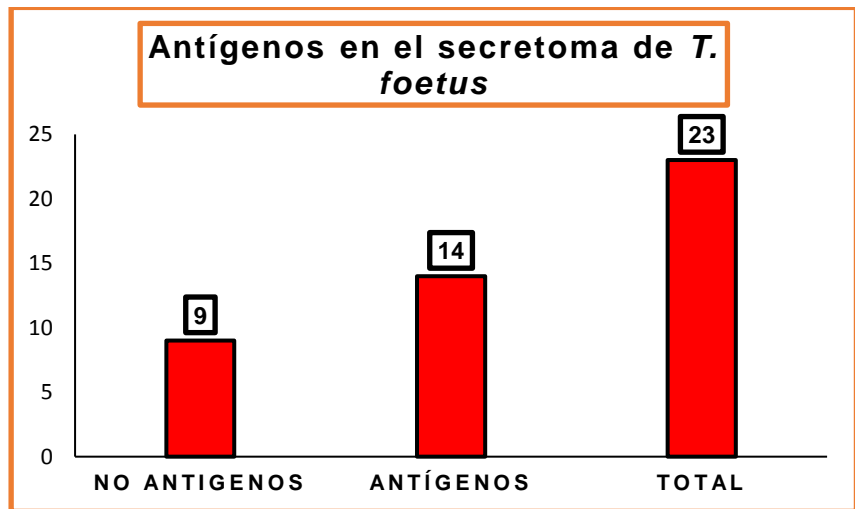


Figura 4. Identificación de antígenos. Se observa que hay un mayor número de antígenos, que de no antígenos. Las proteínas de la **Cuadro 2**, se usarón para predecir potenciales antígenos usando el programa VaxiJen ⁽⁵⁴⁾. Aquellas con un cut-off ($p \geq 0.5$), fueron consideradas como potenciales antígenos.

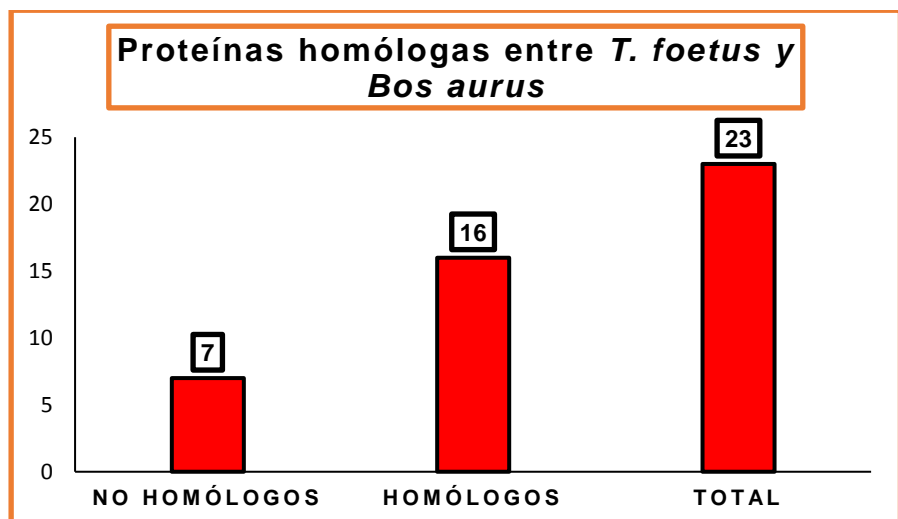


Figura 5. Identificación de homólogos. Se observa, un gran número de homólogos, con relación a los no homólogos entre *T. foetus* y *Bos taurus*. La secuencia de proteínas de la Cuadro 2, se usaron en

la identificación de homólogos, enfrentándolo con el genoma de *Bos taurus* taxid:9913, para lo cual se usó el algoritmo BLASTP ⁽⁵⁶⁾, disponible en: (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

La identificación, de estas proteínas homólogas en el genoma de *Bos taurus*, previene de un uso adecuado de estos antígenos para evitar autoinmunidad en el hospedero, si se pretende usarlos como candidatos vacunales. Por otro lado, como se muestra en la Cuadro 2, no se identificaron proteínas homólogas para ninguna de las 23 proteínas analizadas, en el genoma de *Campylobacter fetus*, resaltando así el uso como reactivos en inmunodiagnósticas sin complicaciones de reacción cruzada, para los 14 antígenos identificados.

Estos 14 antígenos, ni el resto predicho como no antígenos, presentaron dominios transmembrana, los cuales fueron analizados con el programa TMHMM v.1.0 ⁽⁵⁵⁾, verificando, por lo tanto, la probabilidad que estas proteínas sean secretadas, antes ya arrojados por el programa SecretomeP ⁽⁵²⁾. En contraste, sí fueron identificadas proteínas ortólogas, en el genoma de *Trichomonas vaginalis*, taxonómica y genómicamente relacionado con *T. foetus*, por lo que, las 23 proteínas identificadas como potencialmente secretadas (vía clásica y alternativa), tuvieron sus potenciales ortólogos, en el genoma de *T. vaginalis*. Esto indica el potencial uso y su extrapolación como potenciales candidatos en el desarrollo de pruebas de inmunodiagnóstico y de testado como potenciales vacunas, en *T. vaginalis*.

Estas proteínas ortólogas, se encuentran en un rango de identidad 62%-100%, siendo la proteína poliubiquitina la que obtuvo un porcentaje de 100%, sugiriendo la alta conservación de esta proteína en ambos parásitos, mientras que la proteína de la familia factor de iniciación translacional eIF-5A, fue la que obtuvo el menor porcentaje de identidad (62%). Este análisis en general identificó, un alto grado de conservación de las 23 proteínas entre el genoma de *T. foetus* y *T. vaginalis*, lo que es consistente por ser parásitos emparentados.

Cuadro 2. Identificación inmunoinformática de potenciales antígenos para el diagnóstico y el desarrollo de vacunas, basadas en las proteínas con probabilidad de ser secretadas.

ID	Proteína	Probabilidad de Antígeno (p≥0.5)	Dom. Trans.	Ortólogos		
				(Identidad, e-value < 10 ⁻²⁰) ^a	Homólogos ^b	
				<i>Trichomonas vaginalis</i> G3	<i>Bos taurus</i>	<i>Campylobacter fetus</i>
OHS95216.1	Actina	0.53	Ninguno	TVAG_149090 (83%, 0.0)	+	-
OHS96835.1	Gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa	0.37	Ninguno	TVAG_347410 (75%, 0.0)	-	-
OHS96904.1	Actina	0.52	Ninguno	TVAG_090470 (83%, 0.0)	+	-
OHS98991.1	Gliceraldeido-3-fosfato dehidrogenasa	0.50	Ninguno	TVAG_347410 (74%, 0.0)	-	-
OHS99450.1	Fructosa bifosfato aldolasa	0.43	Ninguno	TVAG_043060 (86%, 0.0)	-	-

OHT01812.1	Cadena beta tubulina	0.49	Ninguno	TVAG_034440 (98%, 0.0)	+	-
OHT08962.1	Actina	0.53	Ninguno	TVAG_149090 (83%, 0.0)	+	-
OHS95539.1	Piruvato, Familia de las proteínas fosfato diquinasas	0.443	Ninguno	TVAG_437410 (76%, 0.0)	-	-
OHT03461.1	Proteína S27a Ubiquitina-40S ribosomal	0.742	Ninguno	TVAG_441960 (95%, 1e-46)	+	-
OHT04445.1	Cadena 1D tubulina alfa	0.399	Ninguno	TVAG_523980 (96%, 0.0)	+	-
OHT09272.1	Cadena 1D tubulina alfa	0.392	Ninguno	TVAG_523980 (97%. 0.0)	+	-
OHT11904.1	Poliubiquitina	0.544	Ninguno	TVAG_069570 (100%, 1e-104)	+	-
OHT14314.1	Proteína L40 Ubiquitina-60S ribosomal	0.764	Ninguno	TVAG_110140 (90%, 4e-78)	+	-

OHT15762.1	Poliubiquitina	0.544	Ninguno	TVAG_069570 (100%, 1e-104)	+	-
OHT00365.1	Proteína L40 Ubiquitina-60S ribosomal	0.764	Ninguno	TVAG_110140 (90%, 4e-78)	+	-
OHT02583.1	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	0.574	Ninguno	TVAG_213710 (75%, 0.0)	+	-
OHT04569.1	Proteína L40 Ubiquitina-60S ribosomal	0.764	Ninguno	TVAG_110140 (90%, 4e-78)	+	-
OHT05488.1	Cadena 1D tubulina alfa	0.392	Ninguno	TVAG_523980 (97%, 0.0)	+	-
OHT06402.1	Fructosa bifosfato aldolasa	0.426	Ninguno	TVAG_043060 (89%, 0.0)	-	-
OHS95401.1	Proteína de la familia factor de iniciación translacional eIF- 5A	0.775	Ninguno	TVAG_361780 (62%, 2e-65)	-	-
OHT07104.1	Familia de Nucleósido difosfato quinasa	0.310	Ninguno	TVAG_167320 (90%, 2e-59)	-	-

OHT07636.1	Proteína hipotética TRFO_24132	0.611	Ninguno	TVAG_299380 (84%, 2e-33)	+	-
OHT13114.1	Proteína S27a Ubiquitina-40S ribosomal	0.692	Ninguno	TVAG_441950 (99%, 1e-45)	+	-

Leyenda: NR: no reportado; + : Homólogas; - : No Homólogos; ^a Ortólogos identificados, usando la herramienta OrtoMCLdatabase (<http://orthomcl.org/orthomcl/>) ; ^b Las proteínas Homólogas fueron identificadas usando la herramienta BLASTP (56) de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>); probabilidad mayor al cut-off ($p \geq 0.5$), son consideradas como antígenos. Las proteínas que cumplan con el parámetro de % de identidad ≥ 50 y e-value $< 10^{-20}$, fueron aceptadas como potenciales hómologos presentes en en el genoma de *Bos taurus* y *Campylobacter fetus*. Cabe resaltar que en el genoma de *C. fetus*, no se econtraron homólogos.

En un análisis piloto del secretoma de *T. foetus*, se seleccionaron 4 proteínas, con potencial para ser usados en el diseño de una proteína multiepitope. Estas proteínas fueron: Carbamato quinasa (ID: OHT17023.1), Cisteína Peptidasa (ID: OHT06513.1), el Factor de elongación 1-alfa (ID: OHTO5707.1) y de una Metalopeptidasa (ID: OHT14292.1) (Coceres *et al.*, 2017, datos no publicados), Las cuales fueron analizadas inmunoinformaticamente, para predecir su probabilidad de ser secretadas y de ser antígenos, usando los mismos parámetros de la Cuadro 1 y 2, respectivamente. Tres de las 4 proteínas fueron predichas como potencialmente secretadas por la vía alternativa, por no poseer el péptido señal y superar el cut-off propuesto en la Cuadro 1 , para identificar proteínas secretadas. Reportando las siguientes probabilidades: Carbamato quinasa ($p=0.55$), Cisteína peptidasa($p=0.65$), Factor de elongación 1-alfa ($p=0.0.2$) y la Metalopeptidasa ($p=0.67$). En el análisis de antigenicidad se obtuvo una probabilidad de $p=0.6$, $p=0.5$, $p=0.45$ y $p=0,54$, para la Carbamato quinasa, Cisteína peptidasa, Factor de elongación 1-alfa y la Metalopeptidasa, respectivamente; de éste análisis se descartó al Factor de elongación 1-alfa, por no superar el cut-off, usado en la Cuadro 2, para predecir, antígenos. De acuerdo a los resultados, el Factor de elongación 1-alfa, no se predijo como secretada ni como antígeno, por cual se descartó su uso en el diseño de la proteína multiepitope.

Seguidamente con éstas 3 proteínas se predijeron epitopes B, usando la combinación de 3 métodos inmunoinformáticos como se muestra en

la Cuadro 3. Los epitopes reportados, tuvieron una longitud de entre 11-mer y 27-mer. Epitopes B promiscuos fueron identificados, por los dos pipelines y el método de propensión escala de antigenicidad de K&T. Siendo este último el que predijo el epitope B más promiscuo respecto a los demás (posición de inicio del aminoácido #12).

Cuadro 3. Predicción de epitopes B usando tres diferentes métodos inmunoinformáticos.

PROGRAMA	DATOS						
	Proteína	Rank	ID	Epitope	Inicio ^d	Longitud	Score
ABCpred ^a	CK	*1	KEP_1	LPKVQACIRFVKRTNK	271	16-mer	0.93
		***2	KEP_2	KPAIITSLDHCLEALD	286	16-mer	0.91
	CP	*1	CEP_1	GPGILGTPVGDYITTI	71	16-mer	0.93
		***4	CEP_2	DQESSYAAVYDPTLGT	129	16-mer	0.9
Bepipred ^b	MP	*1	CEP_2	HGVYCMSPEIQGMVNT	224	16-mer	0.9
		***3	MEP_2	TGLLIHENRQNAVKWL	337	16-mer	0.93
	CK	*1	KEP_3	RGTFEDQQQAA	18	11-mer	†
	***5	KEP_4	SYVDPKDPAFQNPTKPIGQF	113	20-mer		

	CP	*3	CEP_3	NVYPGATAHNYRQNTVTA	27	18-mer	
		***5	CEP_4	DNHGGPGILGTPVGDYI	67	17-mer	†
	MP	*7	MEP3	TFNPDGSVPVKIENGR LTS	97	19-mer	
		***20	MEP4	VPKIAVNEAGSAVALTEEDSN	306	21-mer	
Antigenicidad de K&T^c	CK	*1	KEP_5	ARVAMAQIVQLVKNGN	28	16-mer	
		***3	KEP_6	FLQNVNSEPAIPAMPLHVCGAMSQG	59	25-mer	†
	CP	*1	CEP_5	NPFLGNVYHTLDHKVNVYPG	12	20-mer	
		***4	CEP_6	LNALRCKNCLFGIEACYSGLAQEF	92	25-mer	
	MP	*1	MEP_5	QLPKEQELFFKWFLAVTQVHRPSHHLE	17	27-mer	
		***3	MEP_6	LGADDGIAVAACFALMECEKSFPH	120	24-mer	

Leyenda: CK: Carmato quinasa, CP: Cisteína proteínasa, MP: Metalopeptidasa. ^aSe uso un cut-off $p > 0.9$, sólo aquellas superiores a éste valor, fueron seleccionadas. ^b Se úso uso el cut-off $p > 0.2$, para equilibrar la sensibilidad (0.56) y especificidad (0.68),. ^c Se uso el método de propensión escala de Antigenicidad de Kolaskar & Tongaonkar, disponible en el InmunoEpitopeDB (IEDB) (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>), ^dPocisión de inicio con el que empieza el epitope. † El output no muestra socres (puntuaciones) para Bepipred y k&T, para éstos. * Se combinarón éstos epitopes en el diseño de la proteína multiepitope, ligados por el Linker “Lys₂” y “Gly₃”. *** Se combinaron éstos epitopes en el diseño de la prroteína multiepitope, ligada por el Linker “Lys₂” y “Gly₃”.

Se realizó modelos 3D, usando el programa Phyre2 v.2.0 (60), estos modelos se usaron como base para mapear, los epitopes como se muestran en la Figura 6. Se demostró, que todos los epitopes predichos, se encuentran expuestos en la superficie de las proteínas, indicando su potencial acceso al sistema inmunológico, especialmente a la interacción antígeno-anticuerpo (Figura 6). Los epitopes predichos por ABCpred para la Carbamato quinasa (Figura 6 Ia), revelan la superposición de dos epitopes mapeados, con el aminoácidos lisina (K) en común para ambos (color verde). Los epitopes predichos para la proteína Cisteína Peptidasa (Figura 6 IIf) y Metaloproteasa (Figura 6 IIIg y IIIi) , se muestran físicamente cercanos, lo que supone que éstas regiones tienen importancia inmunológica. Todos los demás epitopes predichos, estuvieron separados unos del otro como se puede observar en la Figura 6 (Ia, Ic, IId, IIIf, IIIh).

ABCpred predijo cuatro epitopes cercanos físicamente, dos para la Carbamato quinasa (KEP_1 y KEP_2) y dos para la Metalopeptidasa (MEP_1 y MEP_2), mientras que Bepipred predijo dos epitopes físicamente cercanos para la proteína Cisteína proteínasa (CEP_3 y CEP_4), al igual que con el método de propensión escala de K & T, para la proteína Metalopeptidasa (MEP_5 y MEP_6) (Figura 6). El pipeline Bepipred fue el que predijo los epitopes más alejados físicamente (MEP_3 y MEP_4) , que corresponde a la proteína Metalopeptidasa. La predicción de epitopes cercanos y lejanos físicamente, muestra la amplia cobertura de la superficie proteica de

estos tres potenciales antígenos, permitiendo así, un diseño racional más eficiente de una proteína multiepitope, por combinatoria de ellas.

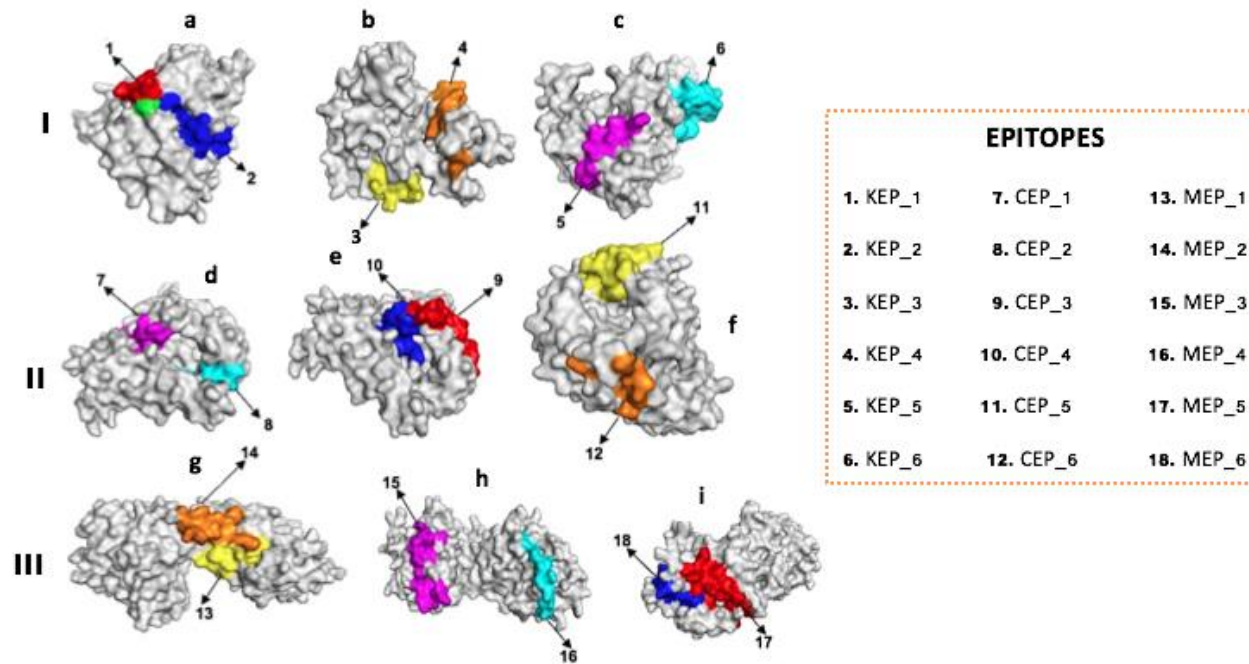


Figura 6. Mapeo de epitopes B. Se realizó un mapeo in silico de los epitopes identificados, en los modelos 3D generados para: Carbamato quinasa (I), Cisteína Peptidasa (II) y Metalopeptidasa (III), por el programa Phyre2 v. 2.0 (60). Las figuras a, d y g son epitopes predichos por el programa ABCpred (57), b, e, h por Bepipred (58) y c, f e i por el método de propension escala de Antigenicidad de Kolaskar & Tongaonkar (59), disponible en el InmunoEpitopeDB (IEDB) (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>)

4.3. Diseño in silico de proteínas multiepitopes con potencial diagnóstico.

En base a los epitopes B predichos, listados en la Cuadro 3, se realizó una esquematización, para representar la forma en la que se combinaron los epitopes. Se presentan cuatro esquemas (Figura 7), Los dos primeros (Figura 7A) que están contruidos con los epitopes B, que corresponden a aquellos con mayor probabilidad de ser antígenos, codificados con un asterisco (*) (PME1_Lys₂) y aquellos con menor probabilidad de ser antígenos, codificados con 3 asteriscos (***) (PME2_Lys₂) (ver Cuadro 3, para observar la codificación), la unión de cada epitope se representó con una línea y una flecha indicando el tipo de linker usado, para éstos dos primero la di-lisina.

Los dos siguientes esquemas (Figura 7B) corresponden de igual manera que para los primeros, a los epitopes con mayor (PME1_Glys₃) y menor (PME2_Glys₃), probabilidad de ser antígenos, respectivamente, la unión de los mismos también es representada con una línea y una flecha indicando el linker con el que se unieron, para éste caso se usó la tri-glicina. Cada esquema (PME1_Lys₂, PME2_Lys₂, PME1_Glys₃ y PME2_Glys₃), tuvo un total de 9 epitopes, cada uno.

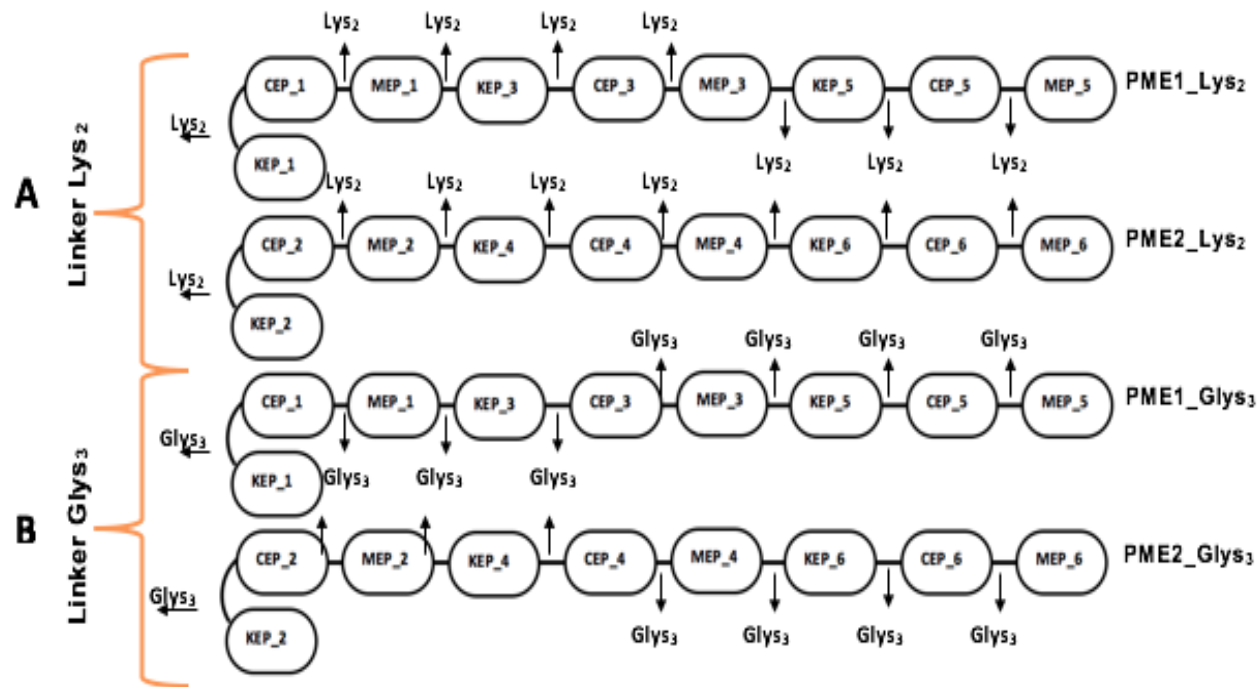


Figura 7. Representación esquemática de la construcción de los modelos de proteína multiepitope. Los epitopes predichos fueron asociados mediante el uso de dos linker. **A**, muestra la unión de los epitopes mediante un linker de di-lisina (Lys₂). **B**, muestra la unión de los epitopes mediante el linker tri-glicina (Gly₃). Las flechas indican, los lugares en donde se incorporaron los linker. Los modelos fueron nombrados según el linker usado (**PME1_Lys₂**, **PME2_Lys₂**, **PME1_Gly₃**, **PME2_Gly₃**).

Se logró construir cuatros modelos tridimensionales (3D) (Figura 8B), uno por cada proteína multiepitope (PM) diseñada (Figura 8A). En el modelo 3D de la estructura terciaria de la PM, PME1_Lys₂ (Figura 8B (1)), se pueden observar estructuras secundarias, loops y cinco hélices alfa, en PME2_Lys₂ (Figura 8B (2)), se observan loops, y más de cinco hélices alfa, mientras que en el modelo PME1_GLys₃(Figura 8B (3)), se observan alrededor de 4 hélices alfa bien definidas, además de las hélices alfa y loops notados en los otros modelos, en PME2_Glys₃ (Figura 8B (4)), se pueden observar dos hojas beta plegadas.

Los datos bioquímicos en el modelo 3D PME1_Lys₂ indican un peso molecular (M_w) de 19.7kDa, con 175 aminoácidos (aa), un punto isoeléctrico (pI) de 10.18 y un índice de estabilidad (index) de 36.21, catalogándose como estable; para PME2_Lys₂ un M_w de 21.15kDa, con 196 aa, pI de 8.41 e index 41.11, siendo inestable; PME1_Glys₃ con un M_w de 19.06kDa, 183 aa, pI de 9.36 e index de 40.62, siendo también inestable; PME2_Glys₃ con un M_w 20.47kDa, 204 aa, pI de 4.05 e index de 51.83, también inestable.

En base al modelo 3D, se logró generar un plot de ramachandran (Figura 9), para evaluar la calidad de los modelos 3D generados. Indicando ~ 72%, ~ 63%, ~ 66-6% y ~ 72%, de los aminoácicos en regiones favorables; ~ 11%, ~19 %, ~ 15.5% y ~ 11%, de los aminoácidos en las regiones permitidas; ~ 16%, ~ 16.5%, ~ 17-7% y ~ 16%, de los aminoácidos en las regiones no permitidas, para los modelos PME1_Lys₂, PME2_Lys₂, PME1_Glys₃ y PME2_Glys₃, respectivamente.

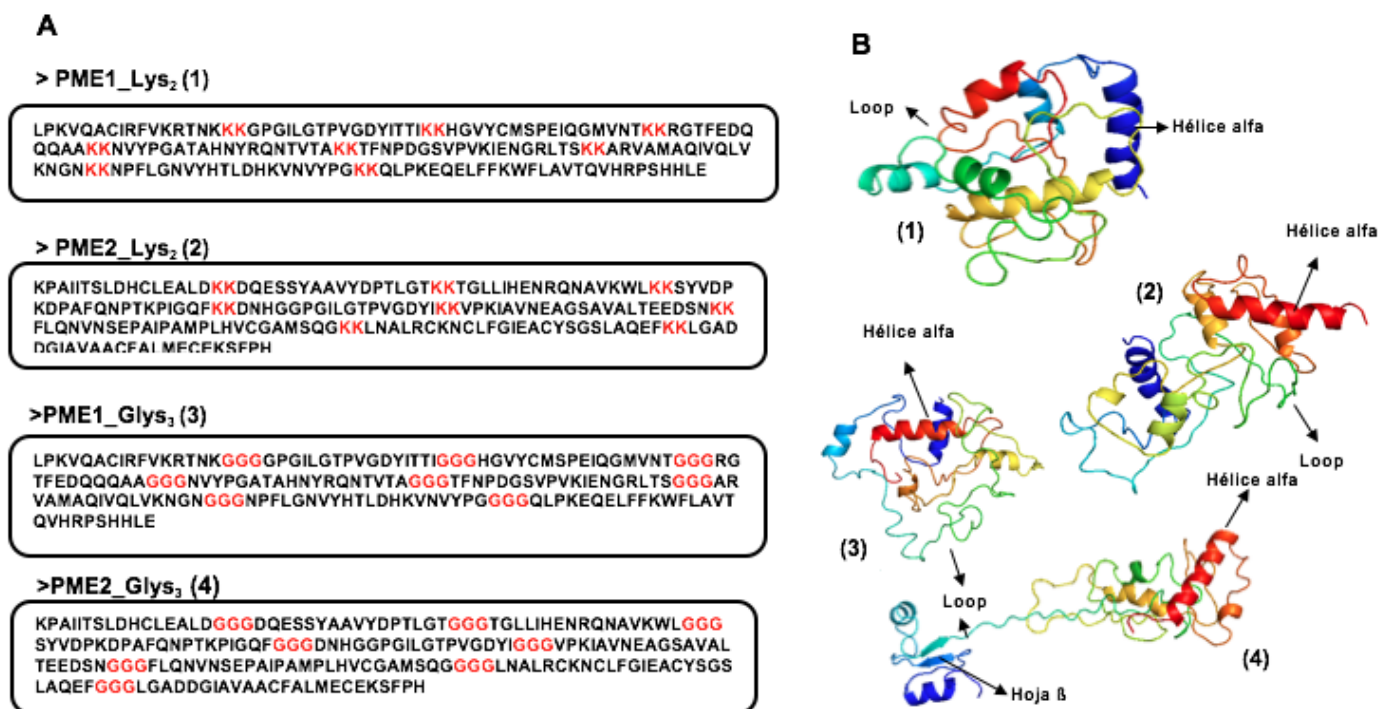


Figura 8. Modelos de las proteínas multiepitopes. Se representó la secuencia primaria de los modelos (A), con los respectivos linker (rojo). En B, se pueden observar los modelos 3D de las proteínas multiepitopes, generados por el programa Pyhre2 v.2.0 (60).

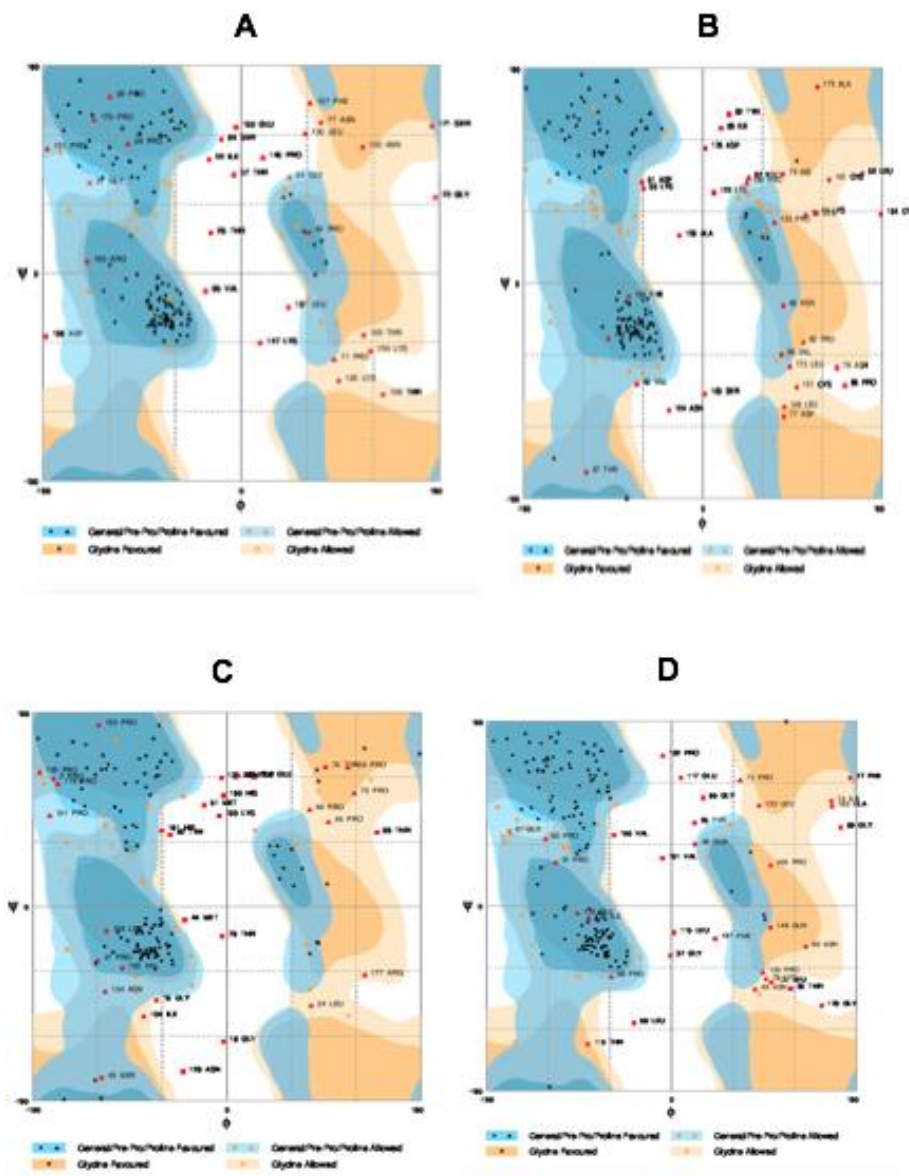


Figura 9. Plot de Ramachandran. Se muestra la distribución de los aminoácidos, según los ángulos diédricos psi (Ψ) vs. phi (Φ), generado con la herramienta online RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>). Las regiones de color celes, son regiones favorables, las de color piel permitidas y las blancas, no permitidas. **(A)** presenta el Plot para el modelo PEM1_Lys₂, **(B)** para PME2_Lys₂, **(C)** para PME2_Glys₃ y **(D)** para PME2_Glys₃.

CAPITULO V. DISCUSIÓN

La trichomonosis bovina actualmente no cuenta con vacunas eficientes ni con terapias que no afecten la salud humana; siendo la única medida de control disponible para los ganaderos la eliminación de los animales ⁽⁶¹⁾. Se postula que, en las próximas décadas, será la optimización de pruebas diagnósticas la principal vía para la erradicación de la enfermedad. Estudios recientes revelan que las proteínas secretadas desempeñan un rol importante en la infección e interacciones entre patógeno-hospedero, por lo que la identificación de proteínas secretadas en infecciones por patógenos dirigiría al descubrimiento de potenciales blancos farmacológicos, biomarcadores para serodiagnóstico y vacunas ⁽⁶²⁾. Actualmente ya se dispone de la información de secretomas de Bacterias, Helmintos, Protozoos, Hongos e incluso del Virus Dengue, muchos de ellos combinando técnicas proteómicas con análisis bioinformáticos ⁽⁶²⁾.

En este estudio, se reporta por primera vez, la identificación de las proteínas secretadas por el parásito *Tritrichomonas foetus* en condiciones *in vitro*.

Se observó gran abundancia de proteínas en la fracción secretada; siendo los resultados similares a los obtenidos en el estudio de proteínas secretadas por *Trichomonas vaginalis* ⁽⁶³⁾. Se encontró un total de 60 proteínas. En muchos otros organismos se han observado

cantidades variables de proteínas secretadas por ejemplo tenemos alrededor de 200 proteínas identificadas en el secretoma de *Aspergillus niger* ⁽⁶⁴⁾, 188 en huevos de *Schistosoma mansoni* ⁽⁶⁵⁾, 838 en análisis *in silico* del genómico de *Taenia solium* ⁽⁸⁶⁾, 270 en promastigotes *Leishmania (v.) braziliensis* ⁽⁶⁷⁾, 440 en *Trypanozoma brucei* (revisado en: ⁽⁶⁸⁾), 80 en adultos de *Brugia malayi* ⁽⁶⁹⁾, 151 en promastigotes de *Leishmania donovani* ⁽⁷⁰⁾, 33 en larvas musculares de *Trichinella spiralis* ⁽⁷¹⁾ y 19 en *Trichomonas vaginalis* ⁽⁶³⁾. Es posible que varios factores como: el contacto celular ⁽⁶³⁾, el ciclo de vida ⁽⁷²⁾, hospederos intermedios, regulación de la expresión de estos dependientes del medio y nutrientes en donde crecen (como se ha observado en el caso de *Aspergillus niger* ⁽⁶⁴⁾) y a las condiciones del experimento, sean las responsables de tal variabilidad en éstos secretomas. Por lo que se sugiere que muchas otras proteínas puedan ser identificadas en el secretoma de *T. foetus*, en otras condiciones.

Los análisis *in silico* sugieren que *T. foetus*, tiene una mayor afinidad por la exportación de proteínas al medio externo, por uso de vías alternativas. En otros patógenos cómo: *Schistosoma mansoni* ⁽⁶⁵⁾, *Leishmania (v.) braziliensis* ⁽⁶⁷⁾, *Brugia malayi* ⁽⁷²⁾ y *Leishmania donovani* ⁽⁷⁰⁾, resultados similares se han observado. Sin embargo, en otros patógenos, tal es el caso de *Apergillus niger* ⁽⁶⁴⁾ y *Taenia solium* ⁽⁸⁶⁾, la exportación de proteínas al medio externo ha sido predicha en mayor número por la vía clásica. Es posible que en patógenos unicelulares, la exportación de proteínas por vías alternativas, sea más eficiente que, en pluricelulares. Además es importante resaltar que el

uso de vías alternativas en patógenos unicelulares, se ha asociado a exosomas, lisosomas ⁽⁶⁵⁾, y otros cuerpos multivesiculares. Éstos han sido identificados en un amplio rango de parásitos unicelulares y pluricelulares, y su relevancia está asociada, porque, median la comunicación celular, transferencia de factores de virulencia e incluso contienen pequeños RNA que podrían modular a las células receptoras, como se ha observado en *Trichomonas vaginalis* ^(73,74). Por lo que, estos podrían también estar presentes en *T. foetus*, y sean importantes en el progreso de la infección y la evasión de la respuesta inmunológica, incluso, proteínas reportadas en éste trabajo han sido similares a las encontradas en los exosomas de *Trichomonas vaginalis* ⁽⁷⁴⁾.

Por otro lado, un porcentaje elevado de proteínas predichas como no secretadas, fueron observadas en este estudio. En el secretoma de *Aspergillus niger* ⁽⁶⁴⁾, *Schistosoma mansoni* ⁽⁶⁵⁾, *Brugia malayi* ⁽⁶⁹⁾ y *Leishmania (v.) braziliensis* ⁽⁶⁷⁾, también fueron observadas. Como sugieren estos mismos autores, esto se debería a las contribuciones pequeñas de la lisis celular, el conjunto de datos con el que se entrena el programa usado, y las limitaciones de los mismos, respectivamente. Además, la regulación a nivel post transcripcional y el mecanismo de secreción RE / Golgi independiente podrían tener influencia ⁽⁶²⁾ e incluso el desconocimiento de éstos podría estar sujeto a *T. foetus* y otros muchos organismos, lo cual resultaría en el déficit de análisis mostrados por los softwares usados. Por lo que el estudio de estos

mecanismos podría ser importante en *T. foetus* para entender mejor las vías por las que exporta proteínas.

El análisis *in silico* de las funciones biológicas, de las proteínas identificadas en este estudio, revela un mayor número de aquellas asociadas a la motilidad celular/citocinesis, constitución funcional y estructural del ribosoma, siendo la actina la de mayor frecuencia. Cambios en la morfología celular e incrementados por la interacción con las células del hospedador están asociados con la expresión diferencial de actina y su papel combinado con coroninas y proteínas de shock térmico (HSP) en *Trichomonas vaginalis* ^{(61); (63)}. Además, en el secretoma de *Schistosoma mansoni*, *Brugia malayi*, también se identificaron proteínas actinas y tubulina, mientras que en el de *Trichomonas vaginalis*, sólo actina, pero con menor frecuencia en todos los casos ^(65,69,63). Interesantemente, se sugiere que en vesículas extracelulares de *Trypanozoma cruzi*, podría haber contenido de proteínas relacionadas con el citoesqueleto ⁽⁶⁸⁾, y en adición proteínas actinas y tubulinas han sido encontradas en exosomas de *Trichomonas vaginalis* ⁽⁷⁴⁾. Por lo que, estas proteínas no necesariamente, sean contribución de la lisis celular o aumento de éstas por el cambio de morfología, como resultado del estrés, si no que por una contribución de posibles vesículas extracelulares secretadas por *T. foetus*, de los cuales no se tiene información hasta el momento. Por otro lado, estudios realizados en el transcriptoma de *T. foetus* a nivel *in vitro*, revelan resultados similares a éstas funciones biológicas (constitución estructural del ribosoma y proliferación celular) ⁽⁶¹⁾. Aunque cabe resaltar

que las proteínas secretadas se regulan a nivel post transcripcional, originando por ende una incongruencia entre las proteínas secretadas y el ARNm ⁽⁶²⁾, por lo que esta similaridad de resultados debería tomarse con mucho cuidado. Sin embargo, es lógico esperar, que estas funciones biológicas (relacionadas con el ribosoma y la citocinesis), estén aumentadas, ya que el parásito tiende a reproducirse, y por ende precisa de proteínas involucradas en estas funciones íntimamente relacionadas con la síntesis de proteínas y la división celular.

Se identificaron también otras proteínas relacionadas con procesos metabólicos, que podrían comprender la adquisición de nutrientes por el parásito, asegurando su supervivencia. Estos resultados concuerdan con los encontrados en el análisis del transcriptoma y proteoma de *T. foetus* ^(61,75) y de los secretomas de *Aspergillus niger* ⁽⁶⁴⁾; *Schistosoma mansoni* ⁽⁶⁵⁾; *Taenia solium* ⁽⁶⁶⁾; *Trichomonas vaginalis* ⁽⁶³⁾; *Leishmania. (v.) braziliensis* ⁽⁶⁷⁾; *Trypanozoma brucei* revisado en: ⁽⁶⁸⁾; *Brugia malayi* ⁽⁶⁹⁾ y *Leishmania donovani* ⁽⁷⁰⁾. Particularmente, proteínas como la Enolasa, GAPDH, Fructosa bi-fosfato identificadas aquí, han sido también reportadas en los secretomas de los parásitos antes mencionados. Interesantemente Cass *et al.* (2007) ⁽⁶⁵⁾, mencionan que la Enolasa y GPDH, está envuelta en la interacción con receptores de plasminógeno, invasión celular, unión a fibronectina y laminina, que podrían mediar el pegado de los huevos de *Schistosoma mansoni* al tejido, además Cuervo *et al.* (2009) ⁽⁶⁷⁾ sugieren que, tanto la Enolasa, GPDH y la Fructosa bi-fosfato podrían ser secretadas vía exosomas, y en sustento a lo que mencionan estos autores, se han

identificado en el exosomas de *Trichomonas vaginalis* éstas tres proteínas ⁽⁷⁴⁾. Otras proteínas involucradas, en procesos diferentes, como el Factor de elongación 1-alfa, de shock térmico, proteína 40 ribosomal, Ubiquitina, identificadas aquí, también se han reportado para *Schistosoma mansoni*, *Trichomonas vaginalis*, *Leishmania (v.) braziliensis*, *Trypanozoma brucei* ^(65,63,67,68). Y finalmente es interesante la presencia de la Poliubiquitina B en el secretoma de *T. foetus*, porque como mencionan Cas *et al.* (2009) ⁽⁶⁵⁾ para su equivalente, la Poliubiquitina C funciones variadas, como la estabilidad de proteínas, dinámica de proteínas en la comunicación celular (conexinas), entre otras, están reguladas por la Poliubiquitina C, por lo que al ser la Poliubiquitina B, miembro de la misma familia, se podría esperar funciones similares. En general estos hallazgos, podrían sugerir la conservación evolutiva de estas proteínas, como resultado de la conversión de estos organismos al parasitismo.

Se identificaron dos proteínas hipotéticas, en el secretoma de *T. foetus*. La proteína Hipotética TRFO_36906, se predijo tentativamente relaciona con la familia de la ubiquitina, y la proteína hipotética TRFO_24132, como posible constituyente estructural del ribosoma. Del mismo modo se han identificado proteínas hipotéticas en el secretoma de *Aspergillus niger* ⁽⁶⁴⁾ y *Trichinella spiralis* ⁽⁷¹⁾. En tanto es lógico, suponer que, debido al gran tamaño del genoma, y la poca información que se dispone de éstas, se lleguen a encontrar proteínas hipotéticas, las cuales, no han sido estudiadas experimentalmente y por ende se desconoce, función y estructura en estos organismos. Por

otro lado, se reportan pesos moleculares (M_w) en un rango de 13kDa – 179kDa, en este trabajo. Resultados similares se han encontrado en el secretoma de *Leishmania (v.) braziliensis* ⁽⁶⁷⁾, mientras que en *Trichomonas vaginalis* ⁽⁶³⁾ y *Trichinella spiralis* ⁽⁷¹⁾, los rangos son menores, 31kDa-69kDa y 40kDa-60kDa, respectivamente. Wang *et al.* (2014) ⁽⁷¹⁾, registraron éstos pesos moleculares, porque refieren que, en estudios previos, proteínas entre 30kDa y 40kDa son reconocidas por sueros de la infección temprana, por lo que ajustan sus medidas a éste rango. Sin embargo, en el caso de *Trichomonas vaginalis*, los rangos de M_w registrados podrían deberse a las limitaciones que presenta el método de 2D-PAGE, como los mismos autores sugieren ⁽⁶³⁾, mencionando que, tuvieron dificultad para identificar proteínas con M_w menores a 30kDa, lo cual corrobora, lo mencionado Washburn *et al.* (2001) ⁽⁷⁶⁾, donde refieren que, proteínas con extremos pesos moleculares son raramente vistos en 2D-PAGE. Mientras que en éste estudio si se observan rangos más amplios de M_w ya que la técnica de MudPIT, que es más sensible y capaz de identificar proteínas con rango de M_w más amplios ⁽⁷⁶⁾. En contraste en un estudio proteómico de *T. foetus* en donde también se usó 2D-PAGE, los autores mencionan que no se identificaron proteínas con M_w superiores a 70kDa ⁽⁷⁵⁾. Además, los puntos isoeléctricos reportados para las distintas proteínas indican un rango de acción de pH entre ácido - básico, sin registro alguno del punto isoeléctrico (pI) que indicara un pH neutro. Resultados similares se encontraron en el análisis del proteoma de *T. foetus* ⁽⁷⁵⁾. Mientras que en *Trichinella spiralis* ⁽⁷¹⁾, *Trichomonas vaginalis* ⁽⁶³⁾ y *Leishmania*

(v.) *braziliensis* ⁽⁶⁷⁾, se identificaron pl entorno a la neutralidad, aunque pl más altos se identificaron en éste estudio. Estos hallazgos, sugieren que las proteínas de estos parásitos, se podrían encontrar adaptados al microambiente en que se desarrollan, permitiendo así, el correcto funcionamiento de las mismas.

Se identificó un total de 14 antígenos de un pool de 23 candidatos (~60%). Éste enfoque, de priorizar, antígenos utilizando herramientas bioinformáticas, se ha realizado en varios patógenos, por ejemplo *Taenia solium* ⁽⁶⁶⁾. Este método permite ahorrar tiempo y facilitar la dirección de los ensayos experimentales para validarlos; además éste enfoque también tiene la ventaja de identificar posibles vacunas sin la necesidad de cultivar el patógeno, siempre y cuando se disponga de datos ómicos (genoma, transcriptoma y proteoma) del mismo ⁽⁷⁷⁾. Algunos antígenos ya se han sugerido previamente, entre ellos se pueden mencionar a las adhesinas Tf 190 y Tf 1.17, Tf. 1.15, también parásitos enteros se han usado como antígenos vacunales ^(78,79), sugiriendo a Tf 1.17 y Tf 1.15 como protectores inmunológicos ⁽⁷⁹⁾, además para Tf 1.17 se observó en vacas vírgenes inmunizadas con él, mejora en la respuesta inmunológica, sugiriéndose también su potencial uso en diagnóstico ^(83,84). Sin embargo, Tf 1.17, se pierde en algunos aislamientos mientras que Tf 1.15 no, como se menciona en el estudio realizado por Ikeda *et al.* (1993) ⁽⁸⁰⁾, además resultados similares se han reportado para Tf 190 ⁽⁸¹⁾, lo que sugiere variabilidad de éstas adhesinas en las diferentes cepas de *T. foetus*, en refuerzo a éste argumento, en *Trichomonas vaginalis*, De miguel *et al.* (2010) ⁽⁸²⁾.

mencionan que proteínas de su superficie son cepa dependientes, por lo tanto el uso de éstas proteínas es limitado. Por lo que, los antígenos inidentificados en éste trabajo, son un importante aporte, en la búsqueda de nuevos candidatos para el desarrollo de pruebas inmunodiagnósticas y alternativas profilácticas para la Trichomonosis bovina, además la ausencia dominios transmembrana, en estos, facilitaría los ensayos para producir proteínas recombinantes de las mismas, lo cual no sucedería si existiera dominios transmembrana ⁽⁸³⁾, lo cual les da un plus a éstas proteínas.

Por otro lado, se identificaron potenciales proteínas homólogas compartidas con el genoma de *Bos taurus*. Las presencias de antígenos homólogos en el genoma del hospedero podrían generar autoinmunidad ⁽⁶³⁾, además la presencia de homólogos podría sugerir, como el parásito, promueve su supervivencia y su desarrollo en el entorno del hospedero como se ha sugerido para *Brugia malayi* ⁽⁶²⁾. Mientras que no se identificaron proteínas homólogas en el genoma de *Campylobacter fetus*. Esto es una ventaja, sobre todo porque, se evitará la reacción cruzada que se podría producir, al usarse estos antígenos, en pruebas de inmunodiagnóstico, ya que éste también infecta al ganado bovino y presenta signos clínico similares a lo de *T. foetus*. ⁽⁷⁸⁾ Sin embargo lo ideal sería, también que se identifiquen homólogos para *Tetratrichomonas spp.* y *Pentratrichomonas spp.*, comensales en el ganado vacuno, con el fin también de evitar reacciones cruzadas, desafortunadamente, no se dispone de información ómica de éstos, por lo que, en este estudio no se pudo

hacer dicha comparación. En contraste, sí fueron identificadas proteínas ortólogas, conservadas en el genoma de *Trichomonas vaginalis*, por lo que, los antígenos, identificados aquí, podrían ser posiblemente antígenos en *T. vaginalis*, ya que la utilidad de la búsqueda de ortólogos subyace justamente en esto ⁽⁸³⁾.

Sólo, tres (Carbamato quinasa, Cisteína peptidasa y Metalopeptidasa) de las cuatro proteínas seleccionadas, fueron elegidas para el diseño de la proteína multiepitope (PM). Ninguna de estas proteínas se identificó en este estudio, sin embargo, se registraron en un ensayo piloto del secretoma de *T. foetus* (datos no mostrados) en donde se analizó con el genoma de *T. vaginalis*, al no estar disponible el genoma de *T. foetus*. Es posible que la ausencia de éstas, en éste estudio, en principio esté relacionado, con la pérdida de información al notarse, que éstas proteínas fueron identificadas a priori con el genoma de *T. vaginalis*, y que al realizar una segunda comparación con el genoma de *T. foetus* recientemente anotado, existiera dicha pérdida, por la diferencias genómicas, que se pueden notar, y algunos procesos de anotación, y ensamblado en relación al genoma de *T. foetus*; podría estar relacionada también con las regulación de la expresión genética de las mismas, en el medio cultivado, como se ha demostrado en las variaciones de proteasas/péptidas, según las condiciones de crecimiento/nutrientes en *Aspergillus niger* ⁽⁶⁴⁾, además se conoce que éstas proteasas están involucradas con numerosas interacciones patógeno-hospedero y se menciona que las cisteínas proteinasas son liberadas durante la infección para evitar la eliminación del parásito ⁽⁶¹⁾,

por lo que cabría esperar, que su presencia sea más notoria en contacto con el hospedero o bajo condiciones de cultivo específicos. La elección de éstas proteínas, se hizo basados en el ensayo piloto del secretoma de *T. foetus* y por revisión de la literatura, en la que las consideran como factores de virulencia en otros patógenos ^(63,62,84,85), además como criterio adicional se pensó que, al ser factores de virulencia, no estarían presentes en los patógenos comensales, *Pentatrichomonas sp.* y *Tetratrichomonas sp.*, lo que facilitaría su uso en el inmunodiagnóstico.

A partir de éstas tres proteínas, se logró identificar *in silico* epitopes B, con un rango de longitud entre 11-mer y 27-mer. La predicción de epitopes B, se hizo bajo el sustento de que son la células B, las encargadas de producir anticuerpos para reconocer a los epitopes (llamados entonces epitopes B ⁽⁸⁶⁾). El uso de este enfoque es el primer reporte para este parásito. La búsqueda de epitopes *in silico* reduce el costo-tiempo, que se consumiría en ensayos experimentales ⁽⁸⁷⁾, además enfoques similares ya se han probado en otro patógenos como, por ejemplo, *Plasmodium falciparum* ⁽⁸³⁾. En adición, se determinó que, todos los epitopes predichos, se encontraron expuestos en la superficie de las proteínas, disponibles para la interacción antígeno-anticuerpo. Con esto epitopes se logró generar cuatro modelos de proteínas multiepitopes (PM), en todas ellas se observaron estructuras secundarias, pero sólo en el modelo PME2_Glys₃, se observó hojas beta. Modelos 3D de PM similares a los de éstos estudio,

se han probado experimentalmente dando buenos resultados ⁽⁸⁸⁾, además en un estudio donde se generó, una proteína multiepitope para el diagnóstico de Hepatitis B, se sugiere que la presencia de hojas beta en la estructura, podrían favorecer la exposición de los epitopes para el reconocimiento antígeno-anticuerpo ⁽⁸⁹⁾. Diversos estudios se han realizado usando proteínas multiepitopes, dando excelentes resultados, en el diagnóstico y protección inmunológica ⁽⁸⁹⁻⁹⁷⁾. Por lo que, el diseño de proteínas multiepitopes, en este trabajo, es el primer aporte de este tipo, en la búsqueda de candidatos para el desarrollo de pruebas de inmunodiagnóstico para la Trichomonosis bovina. Sin embargo, éstas deben ser validadas experimentalmente. Además, se podrían usar los antígenos identificados aquí, para el diseño y validación de nuevas proteínas multiepitopes, que permitan el desarrollo de pruebas inmunológicas y alternativas profilácticas, que promuevan el control y/o la prevención de la trichomonosis bovina y su eliminación a futuro.

Finalmente, la contribución de este trabajo, podría ayudar al entendimiento de la biología de la infección de *T. foetus*, por el estudio profundizado, de las proteínas secretas, su función, su rol en la infección, los mecanismos por las que son secretadas, los niveles de expresión en diferentes condiciones experimentales. Así también explorar la alternativa de generar fármacos contra estas proteínas secretadas, que permitan bloquear la enfermedad y que no tengan efectos adversos sobre el hospedero, y la salud humana.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

- ✓ Se logró identificar un pool de 60 proteínas en el secretoma de *T. foetus*, donde predomina aquellas secretadas por vía alternativa
- ✓ Muchas de las proteínas identificadas, fueron compartidas, con otros patógenos.
- ✓ 14 antígenos fueron identificados, los cuales podrán ser usados en futuras investigaciones, para el desarrollo de inmunoensayos.
- ✓ Se generaron modelos de proteínas multiepitopes, con potencial uso en el inmunodiagnóstico de *T. foetus*.

CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Se sugiere investigar más a fondo, estas proteínas identificadas, para entender la interacción de *T. foetus* con su hospedero.
- ✓ Se sugiere investigar, proteínas secretadas, por *T. foetus* en condiciones *in vivo*, para identificar otros antígenos, que posiblemente no se identificaron aquí.
- ✓ Se deben evaluar, todos los antígenos, para identificar los mejores.
- ✓ Se debe comparar estos antígenos reportados con los comensales *Pentatrichomonas spp* y *Tetratrichomonas spp*, para evitar reacciones cruzadas, que conlleven a un mal diagnóstico.
- ✓ Se sugiere la validación experimental de las proteínas multiepitopes, y el diseño de otras.

CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) GIVENS MD. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. *Theriogenology*. Agosto de 2006;66(3):648-54.
- (2) Mardones FO, Perez AM, Martínez A, Carpenter TE. Risk factors associated with *Tritrichomonas foetus* infection in beef herds in the Province of Buenos Aires, Argentina. *Vet Parasitol*. 31 de mayo de 2008;153(3–4):231-7.
- (3) RILEY DE, WAGNER B, POLLEY L, KRIEGER JN. PCR-based study of conserved and variable DNA sequences of *Tritrichomonas foetus* isolates from Saskatchewan, Canada. *J Clin Microbiol*. 1 de mayo de 1995;33(5):1308-13.
- (4) L.H A, W.D M, M.W T, W.M H. A comparison of techniques used for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in beef cattle. *Agri Pract [Internet]*. 1993 [citado 4 de octubre de 2017]; Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19940049113>
- (5) YAO C. Diagnosis of *Tritrichomonas foetus*-infected bulls, an ultimate approach to eradicate bovine trichomoniasis in US cattle? *J Med Microbiol*. 2013;62(1):1-9.
- (6) NICKEL DD, OLSON ME, SCHULTZ GA. An improved polymerase chain reaction assay for the detection of *Tritrichomonas foetus* in cattle. *Can Vet J*. marzo de 2002;43(3):213-6.
- (7) PARKER S, CAMPBELL J, GAJADHAR A. Comparison of the Diagnostic Sensitivity of a Commercially Available Culture Kit and a Diagnostic Culture Test Using Diamond's Media for Diagnosing *Tritrichomonas Foetus* in Bulls. *J*
- (8) HUBY-CHILTON F, SCANDRETT BW, CHILTON NB, GAJADHAR AA. Detection and identification of *Tetratrichomonas* in a preputial wash from a bull by PCR and SSCP. *Vet Parasitol*. Diciembre de 2009;166(3–4):199-204.
- (9) WANG AL, WANG CC. Isolation and characterization of DNA from *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol*. 1 de marzo de 1985;14(3):323-35.

- (10) BONDURANT RH. Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Trichomoniasis in Cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1 de julio de 1997;13(2):345-61.
- (11) S P, J C, C R, A G. Comparison of two sampling tools for diagnosis of *Tritrichomonas foetus* in bulls and clinical interpretation of culture results. *J Am Vet Med Assoc.* julio de 1999;215(2):231-5.
- (12) ORTEGA-MORA LM, MARTÍN-GÓMEZ S, PEREIRA-BUENO J. Diagnóstico de la Trichomonosis bovina. *Bovis.* 1998;84:41-9.
- (13) MUKHUFHI N, IRONS PC, MICHEL A, PETA F. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls: effects of sample collection method, storage and transport medium on the test. *Theriogenology.* 15 de octubre de 2003;60(7):1269-78.
- (14) MUKHUFHI N, IRONS PC, MICHEL A, PETA F. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls: effects of sample collection method, storage and transport medium on the test. *Theriogenology.* 15 de octubre de 2003;60(7):1269-78.
- (15) HO MS, CONRAD PA, CONRAD PJ, LEFEBVRE RB, PEREZ E, BONDURANT RH. Detection of bovine trichomoniasis with a specific DNA probe and PCR amplification system. *J Clin Microbiol.* 1 de enero de 1994;32(1):98-104.
- (16) TURNER G, MÜLLER M. Failure to Detect Extranuclear DNA in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *J Parasitol.* 1983;69(1):234-6.
- (17) LOCKWOOD BC, NORTH MJ, SCOTT KI, BREMNER AF, COOMBS GH. The use of a highly sensitive electrophoretic method to compare the proteinases of trichomonads. *Mol Biochem Parasitol.* 1 de mayo de 1987;24(1):89-95.
- (18) ALDERETE JF, BENCHIMOL M, LEHKER MW, CROUCH M-L. The complex fibronectin–*Trichomonas vaginalis* interactions and Trichomonosis. *Parasitol Int.* septiembre de 2002;51(3):285-92.

- (19) YULE A, SKIRROW SZ, BONDURAN RH. Bovine Trichomoniasis. Parasitol Today. Diciembre de 1989;5(12):373-7.
- (20) BASTIDA-CORCUERA F, BUTLER JE, HEYERMANN H, THOMFORD JW, CORBEIL LB. TRITRICHOMONAS FOETUS EXTRACELLULAR CYSTEINE PROTEINASE CLEAVAGE OF BOVINE IgG2 ALLOTYPES. J Parasitol. Abril de 2000;86(2):328-32.
- (21) CLARK BL, WHITE MB, BANFIELD JC. Diagnosis of Trichomonas Foetus Infection in Bulls. Aust Vet J. 1 de mayo de 1971;47(5):181-3.
- (22) BONDURANT RH, HOOSEAR KA VAN, CORBEIL LB, BERNOCO D. Serological response to in vitro-shed antigen(s) of Tritrichomonas foetus in cattle. Clin Diagn Lab Immunol. 1 de julio de 1996;3(4):432-7.
- (23) S S. Identification of trichomonad-carrier cows. J Am Vet Med Assoc. septiembre de 1987;191(5):553-4.
- (24) ŠLAPETA J, MÜLLER N, STACK CM, WALKER G, LEW-TABOR A, TACHEZY J, et al. Comparative analysis of Tritrichomonas foetus (Riedmüller, 1928) cat genotype, T. foetus (Riedmüller, 1928) cattle genotype and Tritrichomonas suis (Davaine, 1875) at 10 DNA loci. Int J Parasitol. Diciembre de 2012;42(13–14):1143-9.
- (25) RAE DO, CREWS JE, GREINER EC, DONOVAN GA. Epidemiology of Tritrichomonas foetus in beef bull populations in Florida. Theriogenology. febrero de 2004;61(4):605-18.
- (26) TAYLOR MA, MARSHALL RN, STACK M. Morphological differentiation of *Tritrichomonas foetus* from other protozoa of the bovine reproductive tract. Br Vet J. Enero de 1994;150(1):73-80.
- (27) FRANZEN C, MÜLLER A, BIALEK R, DIEHL V, SALZBERGER B, FÄTKENHEUER G. Taxonomic position of the human intestinal protozoan parasite *Isospora belli* as based on ribosomal RNA sequences. Parasitol Res. 1 de julio de 2000;86(8):669-76.
- (28) BENCHIMOL M. Trichomonads under Microscopy. Microsc Microanal. octubre de 2004;10(5):528-50.

- (29) BENCHIMOL M. New ultrastructural observations on the skeletal matrix of *Tritrichomonas foetus*. Parasitol Res. 1 de noviembre de 2005;97(5):408-16.
- (30) RIBEIRO KC, MARIANTE RM, COUTINHO LL, BENCHIMOL M. Nucleus behavior during the closed mitosis of *Tritrichomonas foetus*. Biol Cell. 1 de septiembre de 2002;94(4-5):289-301.
- (31) PEREIRA-NEVES A, BENCHIMOL M. *Tritrichomonas foetus*: Budding from Multinucleated Pseudocysts. Protist. noviembre de 2009;160(4):536-51.
- (32) DENNETT DP, REECE RL, BARASA JO, JOHNSON RH. Observations on the Incidence and Distribution of Serotypes of *Tritrichomonas foetus* in Beef Cattle in North-Eastern Australia. Aust Vet J. 1 de octubre de 1974;50(10):427-31.
- (33) MR H, JC H, R O, D R, D H, RE T. Characterization of *Tritrichomonas foetus* antigens, using bovine antiserum. Am J Vet Res. diciembre de 1986;47(12):2549-53.
- (34) JC H, D H, W K, M H, MR H. Antigenic relationship among field isolates of *Tritrichomonas foetus* from cattle. Am J Vet Res. julio de 1989;50(7):1064-8.
- (35) SHAIA CI, VOYICH J, GILLIS SJ, SINGH BN, BURGESS DE. Purification and Expression of the Tf190 Adhesin in *Tritrichomonas foetus*. Infect Immun. 1 de marzo de 1998;66(3):1100-5.
- (36) SINGH BN, BONDURANT RH, CAMPERO CM, CORBEIL LB. Immunological and Biochemical Analysis of Glycosylated Surface Antigens and Lipophosphoglycan of *Tritrichomonas Foetus*. J Parasitol. Agosto de 2001;87(4):770-7.
- (37) HODGSON JL, JONES DW, WIDDERS PR, CORBEIL LB. Characterization of *Tritrichomonas foetus* antigens by use of monoclonal antibodies. Infect Immun. 1 de septiembre de 1990;58(9):3078-83.
- (38) SILVA NS DA, FILHO BPD, SOUZA W DE. Identification and localization of an adhesin on the surface of *Tritrichomonas foetus*. Parasitol Res. 1 de noviembre de 1999;85(12):984-92.

- (39) BONDURANT RH, CORBEIL RR, CORBEIL LB. Immunization of virgin cows with surface antigen TF1.17 of *Tritrichomonas foetus*. *Infect Immun*. 1 de abril de 1993;61(4):1385-94.
- (40) CLARK BL, PARSONSON IM, DUFTY JH. Experimental Infection of Bulls with *Tritrichomonas Foetus*. *Aust Vet J*. 1 de mayo de 1974;50(5):189-91.
- (41) PARSONSON IM, CLARK BL, DUFTY J. The Pathogenesis of *Tritrichomonas Foetus* Infection in the Bull. *Aust Vet J*. 1 de octubre de 1974;50(10):421-3.
- (42) RHYAN JC, WILSON KL, WAGNER B, ANDERSON ML, BONDURANT RH, BURGESS DE, et al. Demonstration of *Tritrichomonas foetus* in the External Genitalia and of Specific Antibodies in Preputial Secretions of Naturally Infected Bulls. *Vet Pathol*. 1 de septiembre de 1999;36(5):406-11.
- (43) PARSONSON IM, CLARK BL, DUFTY JH. Early pathogenesis and pathology of *Tritrichomonas foetus* infection in virgin heifers. *J Comp Pathol*. Enero de 1976;86(1):59-66.
- (44) BONDURANT RH. Selected diseases and conditions associated with bovine conceptus loss in the first trimester. *Theriogenology*. Agosto de 2007;68(3):461-73.
- (45) FELLEISEN RSJ. Host-parasite interaction in bovine infection with *Tritrichomonas foetus*. *Microbes Infect*. Agosto de 1999;1(10):807-16.
- (46) CASS CL, JOHNSON JR, CALIFF LL, XU T, HERNANDEZ HJ, STADECKER MJ, et al. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. *Mol Biochem Parasitol*. 1 de octubre de 2007;155(2):84-93.
- (47) BENCHIMOL M, G. P. DE ALMEIDA L, TEREZA VASCONCELOS A, DE ANDRADE ROSA I, REIS BOGO M, WILGES KIST L, et al. Draft Genome Sequence of *Tritrichomonas foetus* Strain K. *Genome Announc*. 20 de abril de 2017;5:e00195-17.
- (48) GASTEIGER E, HOOGLAND C, GATTIKER A, DUVAUD S, WILKINS MR, APPEL RD, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASy Server. *SpringerLink*. 2005;571-607.

- (49) BENDTSEN JD, JENSEN LJ, BLOM N, VON HEIJNE G, BRUNAK S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng Des Sel.* 17(4):349-56.
- (50) JONES P, BINNS D, CHANG H-Y, FRASER M, LI W, MCANULLA C, et al. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics.* 1 de mayo de 2014;30(9):1236-40.
- (51) DOYTCHINOVA I, FLOWER D. Bioinformatic Approach for Identifying Parasite and Fungal Candidate Subunit Vaccines. *Open Vaccine J.* 26 de septiembre de 2008;1:22-6.
- (52) Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes¹. *J Mol Biol.* 19 de enero de 2001;305(3):567-80.
- (53) CAMACHO C, COULOURIS G, AVAGYAN V, MA N, PAPADOPOULOS J, BEALER K, et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics.* 15 de diciembre de 2009;10(1):421.
- (54) SAHA S, RAGHAVA GPS. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins.* 1 de octubre de 2006;65(1):40-8.
- (55) LARSEN JEP, LUND O, NIELSEN M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res.* 24 de abril de 2006;2(1):2.
- (56) KOLASKAR AS, TONGAONKAR PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.* 10 de diciembre de 1990;276(1-2):172-4.
- (57) KELLEY LA, MEZULIS S, YATES CM, WASS MN, STERNBERG MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc.* junio de 2015;10(6):845-58.
- (58) MORIN-ADELINE V, LOMAS R, O'MEALLY D, STACK C, CONESA A, ŠLAPETA J. Comparative transcriptomics reveals striking similarities between the bovine and feline isolates of *Tritrichomonas foetus*: consequences for in

silico drug-target identification. BMC Genomics. 5 de noviembre de 2014;15:955.

- (59) RANGANATHAN S, GARG G. Secretome: clues into pathogen infection and clinical applications. Genome Med. 1 de noviembre de 2009;1(11):113.
- (60) KUCKNOOR AS, MUNDODI V, ALDERETE JF. The proteins secreted by *Trichomonas vaginalis* and vaginal epithelial cell response to secreted and episomally expressed AP65. Cell Microbiol. 1 de noviembre de 2007;9(11):2586-97.
- (61) BRAAKSMA M, MARTENS-UZUNOVA E, PUNT P, SCHAAP P. An inventory of the *Aspergillus niger* secretome by combining in silico predictions with shotgun proteomics data. BMC Genomics. 1 de octubre de 2010;11:584.
- (62) CASS CL, JOHNSON JR, CALIFF LL, XU T, HERNANDEZ HJ, STADECKER MJ, et al. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. Mol Biochem Parasitol. 1 de octubre de 2007;155(2):84-93.
- (63) GOMEZ S, ADALID-PERALTA L, PALAFOX-FONSECA H, CANTU-ROBLES VA, SOBERÓN X, SCIUTTO E, et al. Genome analysis of Excretory/Secretory proteins in *Taenia solium* reveals their Abundance of Antigenic Regions (AAR). Sci Rep. 19 de mayo de 2015;5:9683.
- (64) CUERVO P, DE JESUS JB, SABOIA-VAHIA L, MENDONÇA-LIMA L, DOMONT GB, CUPOLILLO E. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. J Proteomics. 2 de noviembre de 2009;73(1):79-92.
- (65) TORRECILHAS AC, SCHUMACHER RI, ALVES MJM, COLLI W. Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. Microbes Infect. 1 de diciembre de 2012;14(15):1465-74.
- (66) HEWITSON J, HARCUS Y, S CURWEN R, A DOWLE A, KURNIAWAN A, ASHTON P, et al. The secretome of the filarial parasite, *Brugia malayi*: Proteomic profile of adult excretory-secretory products. Mol Biochem Parasitol. 1 de agosto de 2008;160:8-21.

- (67) SILVERMAN JM, CHAN SK, ROBINSON DP, DWYER DM, NANDAN D, FOSTER LJ, et al. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol.* 2008;9(2):R35.
- (68) WANG L, CUI J, HU DD, LIU RD, WANG ZQ. Identification of early diagnostic antigens from major excretory-secretory proteins of *Trichinella spiralis* muscle larvae using immunoproteomics. *Parasit Vectors.* 22 de enero de 2014;7:40.
- (69) BENNURU S, SEMNANI R, MENG Z, RIBEIRO JMC, VEENSTRA TD, NUTMAN TB. *Brugia malayi* Excreted/Secreted Proteins at the Host/Parasite Interface: Stage- and Gender-Specific Proteomic Profiling. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 7 de abril de 2009 [citado 7 de diciembre de 2017];3(4). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2659452/>
- (70) MARTI M, JOHNSON PJ. Emerging roles for extracellular vesicles in parasitic infections. *Curr Opin Microbiol.* 1 de agosto de 2016;32(Supplement C):66-70.
- (71) TWU O, MIGUEL N DE, LUSTIG G, STEVENS GC, VASHISHT AA, WOHLSCHEGEL JA, et al. *Trichomonas vaginalis* Exosomes Deliver Cargo to Host Cells and Mediate Host:Parasite Interactions. *PLOS Pathog.* 11 de julio de 2013;9(7):e1003482.
- (72) HUANG K-Y, SHIN J-W, HUANG P-J, KU F-M, LIN W-C, LIN R, et al. Functional profiling of the *Trichomonas foetus* transcriptome and proteome. *Mol Biochem Parasitol.* 1 de enero de 2013;187(1):60-71.
- (73) WASHBURN MP, WOLTERS D, YATES JR. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol.* marzo de 2001;19(3):242-7.
- (74) GOODSWEN S, KENNEDY P, T ELLIS J. A guide to in silico vaccine discovery for eukaryotic pathogens. *Brief Bioinform.* 24 de octubre de 2012;14.
- (75) CHAPWANYA A, USMAN AY, IRONS PC. Comparative aspects of immunity and vaccination in human and bovine

trichomoniasis: a review. Trop Anim Health Prod. 1 de enero de 2016;48(1):1-7.

- (76) HODGSON JL, JONES DW, WIDDERS PR, CORBEIL LB. Characterization of Tritrichomonas foetus antigens by use of monoclonal antibodies. Infect Immun. 1 de septiembre de 1990;58(9):3078-83.
- (77) IKEDA JS, BONDURANT RH, CAMPERO CM, CORBEIL LB. Conservation of a protective surface antigen of Tritrichomonas foetus. J Clin Microbiol. 1 de diciembre de 1993;31(12):3289-95.
- (78) SHAIA CI, VOYICH J, GILLIS SJ, SINGH BN, BURGESS DE. Purification and Expression of the Tf190 Adhesin in Tritrichomonas foetus. Infect Immun. 1 de marzo de 1998;66(3):1100-5.
- (79) DE MIGUEL N, LUSTIG G, TWU O, CHATTOPADHYAY A, WOHLSCHLEGEL J, JOHNSON P. Proteome Analysis of the Surface of Trichomonas vaginalis Reveals Novel Proteins and Strain-dependent Differential Expression. Mol Cell Proteomics MCP. 1 de mayo de 2010;9:1554-66.
- (80) SINGH SP, KHAN F, MISHRA BN. Computational characterization of Plasmodium falciparum proteomic data for screening of potential vaccine candidates. Hum Immunol. 1 de febrero de 2010;71(2):136-43.
- (81) DOUMECQ ML, SOTO P. Tritrichomonas foetus: mecanismos de acción patógena. In Vet [Internet]. 2012 [citado 7 de diciembre de 2017];14(2). Disponible en: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=179130001004>
- (82) SZEMPRUCH AJ, DENNISON L, KIEFT R, HARRINGTON JM, HAJDUK SL. Sending a message: extracellular vesicles of pathogenic protozoan parasites. Nat Rev Microbiol. noviembre de 2016;14(11):669.
- (83) TERRY FE, MOISE L, MARTIN RF, TORRES M, PILOTTE N, WILLIAMS SA, et al. Time for T? Immunoinformatics addresses vaccine design for neglected tropical and emerging infectious diseases. Expert Rev Vaccines. 2 de enero de 2015;14(1):21-35.

- (84) BACKERT L, KOHLBACHER O. Immunoinformatics and epitope prediction in the age of genomic medicine. *Genome Med.* 1 de diciembre de 2015;7(1):119.
- (85) LIN X, CHEN Y, YAN J. RECOMBINANT MULTIEPITOPE PROTEIN FOR DIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS. *Clin Vaccine Immunol.* 1 de noviembre de 2008;15(11):1711-4.
- (86) DE SOUZA MQ, GALDINO AS, DOS SANTOS JC, SOARES MV, DE NÓBREGA YC, ALVARES A DA CM, et al. A recombinant multiepitope protein for hepatitis B diagnosis. *BioMed Res Int.* 2013;2013:148317.
- (87) DING M, WANG H, CAO H, FAN W, MA B, XU P, et al. Development of a multi-epitope antigen of S protein-based ELISA for antibodies detection against infectious bronchitis virus. *Biosci Biotechnol Biochem.* 3 de agosto de 2015;79(8):1287-95.
- (88) DAI J, JIANG M, WANG Y, QU L, GONG R, SI J. Evaluation of a Recombinant Multiepitope Peptide for Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection. *Clin Vaccine Immunol CVI.* marzo de 2012;19(3):338-42.
- (89) Duthie Ms, Hay Mn, Morales Cz, Carter L, Mohamath R, Ito L, et al. Rational design and evaluation of a multiepitope chimeric fusion protein with the potential for leprosy diagnosis. *Clin Vaccine Immunol CVI.* febrero de 2010;17(2):298-303.
- (90) CAMUSSONE C, GONZALEZ V, BELLUZO MS, PUJATO N, RIBONE ME, LAGIER CM, et al. Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16(6):899-905.
- (91) ALDERETE JF. Epitopes within recombinant α -actinin protein is serodiagnostic target for *Trichomonas vaginalis* sexually transmitted infections. *Heliyon.* enero de 2017;3(1):e00237.
- (92) HUANG J, PENG C, XIE Y, ZHANG Q, SHEN X, JI D, et al. Specific immune responses induced by a multi-epitope

antigen of hepatitis C virus in mice and rabbits. *Chin Sci Bull.* 1 de mayo de 2000;45(10):903-8.

- (93) RAHIMI R, EBTEKAR M, MOAZZENI SM, MOSTAFAIE A, MAHDAVI M. Optimization of multi-epitopic HIV-1 recombinant protein expression in prokaryote system and conjugation to mouse DEC-205 monoclonal antibody: implication for in-vivo targeted delivery of dendritic cells. *Iran J Basic Med Sci.* 1 de febrero de 2015;18(2):145-52.
- (94) ZHONG M-C, Rosbo NK de, Ben-Nun A. Multiantigen/multiepitope-directed immune-specific suppression of “complex autoimmune encephalomyelitis” by a novel protein product of a synthetic gene. *J Clin Invest.* 1 de julio de 2002;110(1):81-90.
- (95) TRIPATHI NK, SHRIVASTVA A, PATTNAIK P, PARIDA M, DASH PK, JANA AM, et al. Production, purification and characterization of recombinant dengue multiepitope protein. *Biotechnol Appl Biochem.* 1 de febrero de 2007;46(2):105-13.
- (96) STOLOFF GA, CAPARROS-WANDERLEY W. Synthetic multi-epitope peptides identified in silico induce protective immunity against multiple influenza serotypes. *Eur J Immunol.* 1 de septiembre de 2007;37(9):2441-9.
- (97) FARIA A, DE CASTRO VELOSO L, COURA-VITAL W, REIS A, MIRANDA DAMASCENO L, GAZZINELLI R, et al. Novel Recombinant Multiepitope Proteins for the Diagnosis of Asymptomatic *Leishmania infantum*-Infected Dogs. *PLoS Negl Trop Dis.* 8 de enero de 2015;9:e3429.