

# EFECTO DEL HIERRO SOBRE LA VIRULENCIA Y EXPRESIÓN DE ADHESINAS EN AISLADOS ESTABLECIDOS DE TRICHOMONAS VAGINALIS

Leslie Cristine Rodríguez Mejía (1), Luis Fernando Anaya-Velázquez (2), Bernardo Franco Bárcenas (2), Luis Felipe Padilla-Vaca

1 Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato. leslicristine21@hotmail.com

2 Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato. padillaf@ugto.mx

## Resumen

La trichomonosis urogenital es la enfermedad de transmisión sexual no viral más importante en humanos, producida por el parásito *Trichomonas vaginalis*. La virulencia de cultivos frescos de este parásito está relacionada con los niveles de expresión de adhesinas, proteasas y de los niveles de Fe en el medio de cultivo. En el presente trabajo se evaluó el efecto del hierro en el medio de cultivo sobre la virulencia de cultivos establecidos de *T. vaginalis* de las cepas GT-7, GT-21 y 9910-E. Las cepas GT-7 y GT-21 de *T. vaginalis* presentaron baja y alta virulencia, respectivamente, determinada por la destrucción de monocapas de células HeLa (efecto citopático) y por la lisis de eritrocitos. *T. vaginalis* cultivada en ausencia y presencia de Fe en el medio de cultivo, modificó significativamente su virulencia, encontrándose un aumento directamente e inversamente proporcional a la concentración de Fe para GT-7 y GT-21, respectivamente. Existe una relación directa entre el efecto citopático y la actividad hemolítica de *T. vaginalis*. El nivel de los mensajeros de las adhesinas AP65 fue similar entre las diferentes cepas establecidas de *T. vaginalis* cultivadas sin Fe y con Fe 250  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, los niveles de la adhesina AP65 sobre la superficie de las tricomonas, correlacionan con el efecto del Fe sobre la virulencia de las cepas evaluadas.

## Abstract

Urogenital trichomonosis is the most important non-viral sexually transmitted disease in humans, caused by the parasite *Trichomonas vaginalis*. Virulence of fresh cultures of this parasite is associated with the expression levels of adhesins, proteases and Fe concentration in the culture medium. In this study the effect of iron in culture medium of GT-7, GT-21 and GT-9910-E strains of *T. vaginalis* was evaluated. GT-7 and GT-21 strains showed low and high virulence, respectively, determined by the destruction of monolayers of HeLa cells (cytopathic effect) and erythrocyte lysis. *T. vaginalis* cultured in the absence and presence of Fe change significantly its virulence, increasing to GT-7 and decreasing to GT-21. There is a direct relationship between the cytopathic effect and the hemolytic activity of *T. vaginalis*. The mRNA level of the AP65 adhesins were similar in different strains of *T. vaginalis* cultured without Fe and Fe 250  $\mu\text{M}$ . However, the level of AP65 adhesin protein on the surface of trichomonas, correlate with the effect of Fe on the virulence of the strains evaluated.

## Palabras Clave

Trichomonosis; Virulencia; Hierro; Transcript; Adhesins

## INTRODUCCIÓN

### Trichomonosis

La trichomonosis urogenital es la enfermedad de transmisión sexual no viral más importante en humanos, producida por el parásito protozoario *Trichomonas vaginalis*. Es una infección ampliamente diseminada alrededor del mundo, la cual puede presentarse con una sintomatología típica de vaginitis en la mujer y de uretritis no gonocócica en el hombre [1].

### Manifestaciones Clínicas

*T. vaginalis* infecta el epitelio escamoso en el tracto genital, lo cual puede ocasionar un cuadro clínico que va desde un estado asintomático hasta una vaginitis flagrante. Todos los síntomas son cíclicos y se intensifican en la etapa de menstruación [2]. Otras complicaciones asociadas a la infección que se pueden presentar son: infertilidad, en mujeres embarazadas riesgo de ruptura prematura de la membrana placentaria con nacimientos de niños con bajo peso, erosiones cervicales y predisposición al cáncer cérvico-uterino [3].

### Diagnóstico y Tratamiento

El diagnóstico clínico se realiza mediante la observación de los signos característicos de la infección, la observación microscópica del parásito directo del exudado vaginal en mujeres, y en secreciones uretrales y prostáticas en el hombre. También se puede identificar por medio del cultivo *in vitro* [4], tinción de Papanicolaou y pruebas moleculares. El medicamento de elección para el tratamiento de la trichomonosis es el metronidazol.

### Factores de virulencia

Las investigaciones actuales se han enfocado en los eventos iniciales requeridos para el establecimiento de la infección. Se ha descrito que muchos de estos mecanismos tienen que ver con la

adhesión y la secreción de factores solubles como proteasas extracelulares [5]; por lo cual, la superficie celular del parásito juega un papel importante en la interacción parásito-hospedero.

### Adhesinas

La adhesión es un proceso específico y clave en la patogenicidad de *T. vaginalis*, en donde participan interacciones del tipo adhesina-receptor que inducen la forma ameboide y que son importantes para que este parásito colonice y se lleve a cabo el proceso patogénico [6,7].

### Cisteín Proteasas

Las cisteín proteasas juegan un papel muy importante dentro de la patogénesis del parásito ya que han sido descritas como factores líticos en la hemólisis de eritrocitos y en la degradación de componentes de la matriz extracelular [8,9].

### Cambio en las condiciones de cultivo *in vitro*

Se ha reportado que las condiciones de cultivo tienen efecto sobre la patogenicidad de diversos protozoos, entre ellos *T. vaginalis*. El cultivo prolongado de aislados frescos de este parásito y la concentración de Fe en el medio de cultivo modifica la expresión de factores de virulencia y en consecuencia de su virulencia. También se ha descrito que otros elementos como el pH del medio, suero y el extracto de levadura, pueden afectar la fisiología y patogenicidad de *T. vaginalis* [10].

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo y cosecha de los trofozoítos de *T. vaginalis*

Se utilizaron los aislados establecidos GT-7 y GT-21 de *T. vaginalis*, los cuales fueron obtenidos de pacientes sintomáticas del Estado de Guanajuato [11] y la cepa de referencia 9910 obtenida de un paciente en Estados Unidos. Todos los aislados fueron cultivados durante 48 horas en medio TYI-S-33 en ausencia y en presencia de Fe (100 y 250

$\mu\text{M}$ ). Los trofozoítos se cosecharon enfriando los tubos en un baño de agua-hielo por 10 min, se centrifugan 10 min a 3000 x g, se lavaron con PBS y se ajustaron a la concentración deseada.

### Destrucción de monocapas de células MDCK y HeLa

Para determinar la capacidad de *T. vaginalis* para destruir monocapas de células epiteliales, se cosecharon los trofozoítos de 48 hr de crecimiento en fase exponencial y se ajustaron a una concentración de  $2 \times 10^6$  trofozoítos/ml. Se colocaron  $1 \times 10^6$  trofozoítos/ml en cada pozo de una placa con monocapas confluentes de células MDCK o HeLa y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante diferentes tiempos. Después de la interacción, las células se fijaron con formaldehído y se tiñeron con azul de metileno al 0.1% por 30 min. Se extrajo el colorante con HCl 0.1 M a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 min. Se cuantificó el colorante extraído en un espectrofotómetro con lector de placas (Multiskan Go Thermo Scientific) a 660 nm.

### Determinación de la actividad hemolítica de *T. vaginalis*

Para medir la capacidad de *T. vaginalis* de lisar eritrocitos se cosecharon trofozoítos de 48 horas y se lavaron 1 vez con amortiguador PIPES-Tris y se ajustaron a una concentración de  $30 \times 10^6$  trofozoítos/ml. Los eritrocitos se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^9$  eritrocitos/ml de PIPES-Tris. La interacción trofozoíto-eritrocito se llevó a cabo mezclando 125  $\mu\text{l}$  de la suspensión de *T. vaginalis*, 250  $\mu\text{l}$  de la suspensión de eritrocitos y 125 ml de amortiguador PIPES-Tris, teniendo una proporción final trofozoíto-eritrocito de 1:33. Después de 90 minutos de incubación a  $37^\circ\text{C}$  la mezcla se resuspendió y se centrifugó por 10 segundos a 6000 x g. La absorbencia del sobrenadante se determinó a 570 nm en un lector de placas.

### Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Se cosecharon las *T. vaginalis* crecidas en diferentes concentraciones de Fe. Se utilizó el kit Aurum<sup>TM</sup> Total RNA (BioRad) para la extracción de RNA de acuerdo al procedimiento descrito por el

fabricante. Al paquete celular se le adicionaron 350  $\mu\text{L}$  de solución de lisis y 350  $\mu\text{L}$  de etanol al 70%. Se colocó el lisado en una columna de unión a RNA. Se incubó con DNasa I durante 30 min a temperatura ambiente. El RNA obtenido se cuantificó a 260 nm y se determinó su calidad e integridad en un gel de agarosa al 1 %.

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 3  $\mu\text{g}$  de RNA total en 1  $\mu\text{l}$  de oligo RT primer 50  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{l}$  de dNTP 10 mM y 7  $\mu\text{l}$  de agua DEPC. Se incubó a  $65^\circ\text{C}$  por 3 minutos y se adicionó 1  $\mu\text{l}$  de transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen). Se incubó a  $42^\circ\text{C}$  por 50 minutos y después a  $70^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$ . Se realizó PCR con oligonucleótidos específicos para determinar los niveles de expresión en las diferentes cepas de *T. vaginalis*.

### Inmunolocalización de adhesinas por microscopía Confocal

Trofozoítos de *T. vaginales* cultivados en diferentes concentraciones de Fe, fueron cosechados y fijados con p-formaldehído. Se incubaron con anticuerpos monoclonales contra las adhesinas AP65 (donados por el Dr. Alderete) y posteriormente con un segundo anticuerpo marcado con fluoresceína. Las muestras se observaron en un microscopio confocal Zeiss LSM700

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluó la capacidad de destrucción de monocapas de células epiteliales HeLa por trofozoítos de *T. vaginalis* de los cultivos establecidos: GT-7, GT-21 y 9910-E. Estas cepas se han mantenido en cultivo por al menos 6 meses en medio TYI-S-33 con diferentes concentraciones de hierro (en ausencia de Fe, Fe 100 y Fe 250  $\mu\text{M}$ ). Se evaluó el efecto de la presencia o ausencia de Fe en el medio de cultivo sobre la destrucción de monocapas de células HeLa. La cepa GT-7 mostró un mayor efecto citopático conforme aumenta la concentración de Fe (Figura 1A), contrario a lo observado con la cepa virulenta GT-21, la cual mostró una disminución a mayor concentración de Fe (Figura 1B). Los resultados con la cepa 9910-E fueron similares a la cepa GT21 (Figura 1C). En la

destrucción de monocapas celulares participan las adhesinas y proteasas, las cuales son inversamente reguladas por el Fe. El efecto citopático dependerá del balance final de dichas moléculas a las diferentes concentraciones de Fe evaluadas.

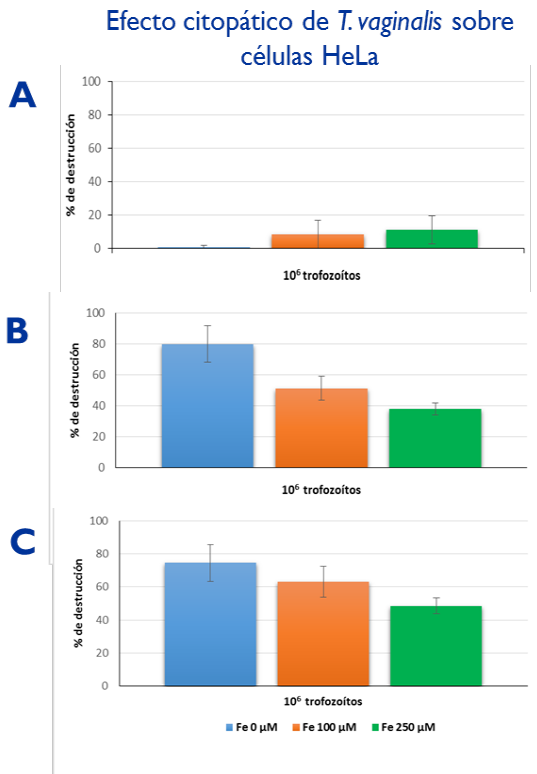


Figura 1. Efecto citopático de diferentes cepas de *T. vaginalis* cultivadas en diferentes concentraciones de Fe. A) GT7; B) GT21; C) 9910

Estos resultados son comparables con los datos reportados para estas cepas, pero sobre monocapas de células MDCK [12], lo que sugiere que el efecto citopático no depende de la línea celular. También se evaluó el efecto del Fe sobre la capacidad de la cepa GT-21 para destruir monocapas de células MDCK, encontrándose resultados similares a los obtenidos con células HeLa (datos no mostrados).

Se determinó la capacidad de las diferentes cepas de *T. vaginalis* para lisar eritrocitos, crecidas en medio TYI-S-33 con diferentes concentraciones de Fe (0, 100 y 250 μM). Los resultados de actividad

hemolítica para las cepas GT-7 y GT-21 fueron muy similares a los obtenidos para el efecto citopático (Figura 2). Por lo anterior, la actividad hemolítica de *T. vaginalis*, al igual que el efecto citopático depende de los niveles de adhesinas y proteasas expresadas con diferentes concentraciones de Fe.

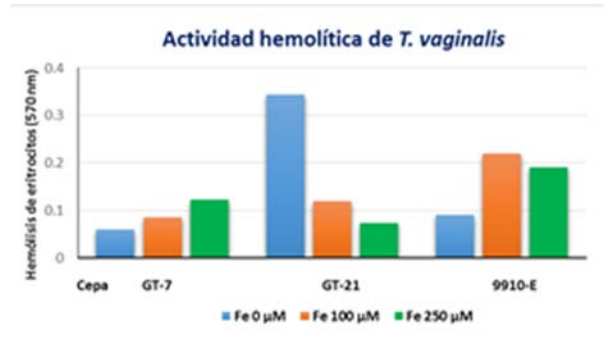


Figura 2. Actividad hemolítica de aislados establecidos de *T. vaginalis* crecidos en diferentes concentraciones de Fe. Trofozoítos de las cepas GT-7, GT-21 y 9910-E, trichomonas crecidas en 0, 100 y 250 μM Fe, se incubaron con eritrocitos humanos en una proporción 1:33 durante 90 min a 37°C. La hemoglobina liberada se determinó a 570 nm. Se realizó un ensayo por triplicado.

**Niveles de expresión de la familia AP65 de las adhesinas**

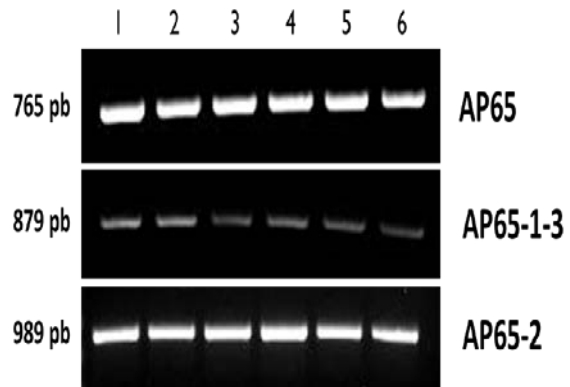


Figura 3. Niveles de transcrito de las adhesinas AP65. 1, GT-7 [0] μM Fe; 2, GT-7 [250] μM Fe; 3, GT-21 [0] μM Fe; 4, GT-21 [250] μM Fe; 5, 9910 [0] μM Fe; 6, 9910 [250] μM Fe.

En la Figura 3 se muestra que los niveles de transcrito del gen que codifica para la familia de las adhesinas AP65 no presentaron diferencias en los niveles de expresión con o sin Fe. Por otro lado, la localización de las adhesinas AP65 en la superficie del parásito aumentó en la cepa GT7 al aumentar la

concentración de Fe, mientras que disminuyó en la cepa GT21 bajo las mismas condiciones (Figura 4).

#### Inmunolocalización de las adhesinas AP65 en la superficie de *T. vaginalis*

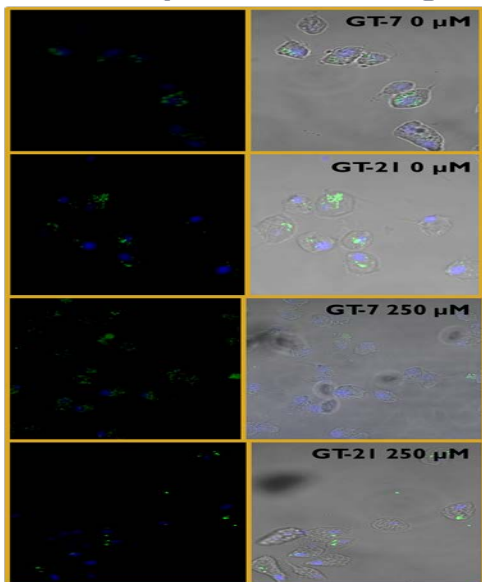


Figura 4. Inmunolocalización de la adhesina AP65 en cepas de diferentes virulencia de *T. vaginalis*, crecidas en ausencia y presencia de Fe. Izquierda: Fluorescencia; Derecha campo claro y fluorescencia. Verde: adhesina; Azul: núcleo.

## CONCLUSIONES

Las cepas **GT-7** y **GT-21** de *T. vaginalis* presentaron baja y alta virulencia, respectivamente, determinada por la destrucción de monocapas celulares y la lisis de eritrocitos. El efecto citopático de la cepa **GT-7** y **GT-21** cultivada en ausencia y presencia de Fe mostró un comportamiento similar usando diferentes monocapas de líneas celulares (HeLa y MDCK). La presencia de Fe en el medio de cultivo modificó positivamente la virulencia en la cepa **GT-7** y negativamente en la cepa **GT-21**.

El nivel de los mensajeros de las adhesinas AP65 fue similar entre las diferentes cepas establecidas de *T. vaginalis* cultivadas sin Fe y con Fe 250  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, los niveles de la adhesina AP65 sobre la superficie de las tricomonas, correlacionan con el efecto del Fe sobre la virulencia de las cepas evaluadas.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ángeles Rangel Serrano, QFB Itzel Páramo Pérez y al Dr. Luis Felipe Padilla Vaca por la colaboración en el proceso experimental y esfuerzo en la elaboración de este trabajo.

## REFERENCIAS

- [1] Chin, J. (2000). Control of Communicable Diseases Manual. (17th ed.). USA: American Public Health Association.
- [2] Rein, M. F. (1990). Clinical manifestations of urogenital trichomoniasis in women. Trichomonads parasitic in humans. Springer-Verlag, New York, NY. B. M. Honigberg (ed.).
- [3] Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R. & Garber, G. (1998). Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. Clin. Microbiol. Rev., 11(2), 300–317.
- [4] Diamond, L. S. (1957). The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. J. Parasitol., 43, 488–490.
- [5] Garber, G. E., Lemchuk-Favel, L. T. & Bowie, W. R. (1989). Isolation of a cell-detaching factor of *Trichomonas vaginalis*. J. Clin. Microbiol. 27, 1548–1553.
- [6] Alderete, J. F. & Pearlman, E. (1984). Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers. Br. J. Vener. Dis., 60, 99–105.
- [7] Krieger, J. N., Ravdin, J. L. & Rein, M. F. (1985). Contact-dependant cytopathogenic mechanisms of *Trichomonas vaginalis*. Infect. Immun., 50, 778–786.
- [8] Crouch, M. & Alderete, J. F. (1999). *Trichomonas vaginalis* interactions with fibronectin and laminin Microbiol. 145, 2835–2843.
- [9] León Sicairos, C., León Félix, J. & Arroyo, R. (2004). tvcp12: a novel *Trichomonas vaginalis* cathepsin L-like cystein proteinase-encoding gene. Microbiology. 150:1131–1138.
- [10] Lehker, M. w., Arroyo, R. & Alderete, J. F. (1991). The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytdherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. J. Exp. Med. 174:311–318.
- [11] Fabela-Leal, S. L. (1997). Comparación entre los medios de cultivo TYI-S-33 y PEHPS para el diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guanajuato, Facultad de Química, Instituto de Investigaciones en Biología Experimental.
- [12] Navarro-Barrón (2005). Niveles de adhesinas y perfiles de actividad proteolítica en aislados de *Trichomonas vaginalis* de diferente virulencia. Tesis de maestría. Universidad de Guanajuato.