

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

Subdirección de Parasitología

**Caracterización parcial de aislamientos de *Trichomonas vaginalis*.
Estudios relacionados con la virulencia y la patogenicidad.**

Tesis presentada en opción al Grado de Doctor en Ciencias Médicas

Autor: Dra. Lázara Rojas Rivero
Asesor: Dr. Jorge Sarracent Pérez

Ciudad de La Habana
2004

A todos los adolescentes del mundo.

La única gloria verdadera del hombre, _si un poco de fama fuera cosa alguna en la composición tan vasta como el mundo,_ estaría en la suma de servicios que hubiese, por sobre su propia persona, prestado a los demás.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar y reconocer con profundo sentido de gratitud, la ayuda extraordinaria prestada por mis compañeros de trabajo, sin la cual hubiera sido imposible la culminación de esta tesis.

En primer lugar y muy especialmente al Dr. Jorge Sarracent, por su guía científica, preocupación, entrega e inagotable paciencia.

A los licenciados Idalia Sariego y Jorge Fraga, a quienes he considerado como mi brazo derecho en el laboratorio.

A mis compañeros del Departamento de Parasitología muy en especial al Dr. Carlos M. Finlay y demás integrantes de nuestra comisión científica, por toda la ayuda prestada y el tiempo dedicado en la revisión del texto.

De esta misma forma también agradecer a mis compañeros de trabajo de otras áreas del IPK, por sus prudentes consejos y comentarios críticos son ellos los Doctores: Herio Toledo, Virginia Capó, Alina Llop y Guadalupe Guzmán..

A la Dra. Adibel Goycolea, por su magnífica cooperación en la consulta médica y obtención de las muestras. *A las Doctoras Magalys Alonso, María Teresa Del Valle y Leonor Lobaina por sus consejos prácticos.*

Al Dr. René Gato, por su incondicional ayuda fundamentalmente en el diseño de gráficos.

A las jóvenes figuras Maité y Carmencita, que con gran entusiasmo colaboraron en la mecanografía.

A mis compañeros de la subdirección docente, especialmente la Dra. Nereyda Cantelar, Armando Martínez y Maribel Chao.

A los profesores Michel Tibayrenc, director del Instituto de Investigaciones de Montpellier, Francia, Gary Garber de la División de Enfermedades Infecciosas, Hospital General de Ottawa, Canadá y Andre Capron, del Instituto de investigaciones Louis Pasteur, Lille, Francia, por la magnífica asistencia científico-técnica prestada en la revisión de las publicaciones que avalan este trabajo.

Como olvidar a la Dra. Luisa y su compañero el profesor Ochoa, a mi amiga *la Dra. Olguita Pomier, a Victor y Valentin por su gran apoyo moral, espiritual y emocional.*

A mi familia, especialmente a mi hija por su enorme comprensión sobre el tiempo dedicado por mi al trabajo y mis responsabilidades y restado a ella de forma personal. A ella que pacientemente esperó que se culminara este trabajo, a ella solo le puedo pedir disculpas y asegurarle mi gratitud y todo mi cariño.

Es evidente que la calidad que pueda tener mi trabajo de tesis depende de muchas personas, los errores han de corresponder estrictamente al autor.

Dra. Lázara Rojas.

Lista de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Acido ribonucleico

BrdU: 5-bromo-2'-desoxiuridina

BSA: Albumina sérica bovina

CDF: (del inglés Cell Detaching Factor) Factor de desprendimiento celular

CEV: Células epiteliales vaginales

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

CLM: Concentración Letal Mínima

Cols. : Colaboradores

cpm: Conteos por minutos

DO: densidad óptica

EDTA: Ácido Etilendiamino Tetracético

ELISA: Ensayo inmunoenzimático en fase sólida

g: gravedades

ITS: Infección de Transmisión Sexual

Kda: Kilodaltons

mL: Mililitro

NIC I, II, III : Neoplasia Intracervical grados I, II y III

pb: pares de bases

PBS: Solución salina tamponada con fosfato

PCR: (del inglés Polymerase Chain Reaction) Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PMT: Placa de Microtitulación

PVH: Papillomavirus Humano

RAPD: (del inglés Random Amplified Polymorphic DNA) ADN polimórfico amplificado al azar.

TBE: Tampón compuesto por 0,4 M tris, 0,5 M ácido bórico, 0,01M EDTA.

[³H]-timidina :Timidina tritiada.

TV-1 al TV-10: Cebadores para *Trichomonas vaginalis* del 1-10.

TVV: Virus o partículas virales asociadas a *Trichomonas vaginalis*.

UPGMA: (del inglés Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average)

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

(g: microgramo

(L: microlitro

(M: micromolar

(Ci: microcuries

SÍNTESIS

La trichomonosis vaginal es la principal enfermedad de transmisión sexual de etiología parasitaria. Es producida por un protozoo flagelado denominado *Trichomonas vaginalis*. Los mecanismos de patogenidad y los factores de virulencia relacionados con la enfermedad no están totalmente esclarecidos. En el presente trabajo se reportan los resultados de la caracterización parcial de 40 aislamientos de *Trichomonas vaginalis* obtenidos a partir de muestras de exudado vaginal de pacientes adolescentes femeninas procedentes de las consultas infanto-juvenil, de interrupción de embarazo y de ITS de los Hospitales Ginecobstétricos Docentes "Ramón González Coro" y "Eusebio Hernández", en el período comprendido de Junio de 1999 a Junio del 2001. Desde el punto de vista clínico fueron clasificadas en asintomáticas y sintomáticas leves, moderadas y severas. Se seleccionaron para el estudio 10 aislamientos de *T. vaginalis* provenientes de cada grupo de pacientes según la clasificación clínica, para un total de 40 aislamientos. Encontramos una elevada correlación entre la sintomatología clínica de las pacientes y la capacidad de los aislamientos de producir lesiones en ratones NMRI posterior a su inoculación por vía intraperitoneal.

Se demostró que el parásito puede incorporar 5-bromo-2'-desoxiuridina en su ADN y este hecho sirvió de base para la utilización por primera vez en la literatura de un modelo no radioactivo para medir citoadherencia de los parásitos a las células HeLa. El nivel de adherencia de los aislamientos, fue directamente proporcional a la severidad de las manifestaciones clínicas en las pacientes de cada grupo.

En este trabajo se informa por primera vez en nuestro país, la existencia de aislamientos de *T. vaginalis* resistentes al metronidazol.

Utilizando la prueba de RAPD, se demostró la presencia de una banda de 490 pares de bases en todos los aislamientos provenientes de pacientes sintomáticas, no así en los aislamientos de pacientes asintomáticas, por lo cual se consideró como un posible marcador genético de patogenidad. Este hecho constituye el primer reporte en la literatura internacional.

Estos resultados contribuyen a ampliar el conocimiento sobre el parásito y la enfermedad que provoca.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
HIPOTESIS	5
OBJETIVO	5
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS ESPECIFICOS	5
NOVEDAD CIENTÍFICA	6
EVENTOS CIENTÍFICOS DONDE HAN SIDO EXPUESTOS LOS RESULTADOS DEL PRESENTE TRABAJO	6
ARTÍCULOS DEL AUTOR DONDE SE PRESENTAN LOS RESULTADOS	7
ARTÍCULOS DEL AUTOR RELACIONADOS CON EL TEMA DE TESIS	7
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
<i>T. VAGINALIS</i> . UBICACIÓN TAXONÓMICA	9
ASPECTOS MORFOLÓGICOS GENERALES	9
CICLO BIOLÓGICO	10
MANIFESTACIONES CLÍNICAS	10
<i>T. VAGINALIS</i> COMO CAUSA DE INFERTILIDAD	12
RELACIÓN TRICHOMONOSIS VAGINAL Y EL VIH	12
DIAGNÓSTICO	13
EPIDEMIOLOGÍA	16
TRATAMIENTO	17
PATOGENIA	20
EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE	22
INTERACCIÓN DE <i>T. VAGINALIS</i> CON LA FLORA VAGINAL	23
VACUNAS	24
<i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i> Y ARN VIRAL	24
<i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i> Y PAPILOMAVIRUS HUMANO	25
MODELOS BIOLÓGICOS PARA EXPERIMENTACIÓN <i>IN VIVO</i>	26
ALGUNAS CONSIDERACIONES ACERCA DE LAS DIFERENTES VÍAS DE INOCULACIÓN	27
TÉCNICA DE ADN POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AL AZAR (RAPD)	29
EL ANÁLISIS DE DATOS DEL RAPD	30
ANÁLISIS DE AISLAMIENTOS DE <i>T. VAGINALIS</i> BASADOS EN SU POLIMORFISMO GENÉTICO	30
MATERIALES Y MÉTODOS	32
PACIENTES ESTUDIADAS	32
Criterios de Inclusión y de Exclusión.	32
Procedimientos para la toma de muestra y análisis de la misma	32
Clasificación de las adolescentes de acuerdo a la sintomatología clínica	33
Axenización de los cultivos de <i>T. vaginalis</i>	34
Análisis estadístico	34
CARACTERIZACIÓN <i>IN VIVO</i> DE AISLAMIENTOS DE <i>T. VAGINALIS</i>	34
Animales de experimentación	34
Cantidad ideal de inóculo	35
Grupos controles	35
Inoculaciones y análisis posterior	35
Diseño estadístico	36
ENSAYO DE CITOADHESIÓN " <i>IN VITRO</i> "	37
Modelo de células epiteliales vaginales	37
Marcaje de los parásitos	37
Adhesión de <i>T. vaginalis</i> a las células epiteliales HeLa	38

Optimización para la realización de la técnica ELISA	39
Realización del ensayo con el Kit comercial “Cell Proliferation ELISA; BrdU colorimetric	39
Procesamiento estadístico	39
ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> AL METRONIDAZOL	40
Diluciones del metronidazol	40
Realización del ensayo	40
CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE AISLAMIENTOS DE <i>T. VAGINALIS</i> MEDIANTE LA TÉCNICA DE RAPD	41
Colección del material celular de aislamientos de <i>T. vaginalis</i> en el estudio	41
Extracción y purificación del ADN de los aislamientos de <i>T. vaginalis</i> utilizando el método del fenol-cloroformo	42
Calidad del ADN purificado	42
Determinar la concentración espectrofotométrica del ADN genómico aislado	43
Diseño de los cebadores al azar y síntesis de los mismos	43
Optimización de la técnica de RAPD para estudios genéticos de aislamientos de <i>T. vaginalis</i>	44
Análisis del polimorfismo genético	45
RESULTADOS	46
FRECUENCIA DE LA TRICHOMONOSIS VAGINAL EN EL GRUPO ESTUDIADO	46
RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN <i>IN VIVO</i>	49
RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i>	52
Optimización de la técnica ELISA para medir citoadherencia	52
Resultados obtenidos en el ensayo de adhesión utilizando los 40 aislamientos	57
RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE SUSCEPTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> AL METRONIDAZOL	58
RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE AISLAMIENTOS	60
Optimización de la técnica de RAPD	60
Caracterización genética de los aislamientos	64
DISCUSION	72
CONCLUSIONES	84
RECOMENDACIONES	85
BIBLIOGRAFIA	86
ANEXOS	102
ANEXO 1	102

1. INTRODUCCIÓN

Trichomonas vaginalis (Donne, 1836) es un protozoo flagelado causante de la trichomonosis urogenital en el hombre, enfermedad considerada como una de las causas más comunes de infección de transmisión sexual (ITS). Esta parasitosis presenta una distribución cosmopolita, identificándose en todos los grupos raciales y en todos los estratos socioeconómicos (Petrin *et al*, 1998; Sorvillo *et al*, 2001; Wallace *et al*, 2002). Los datos más recientes muestran una incidencia anual de más de 170 millones de casos en el mundo (WHO, 1997), pero la prevalencia real es desconocida pues la enfermedad no se notifica. En la mayoría de los casos el diagnóstico se realiza mediante la observación microscópica del frotis directo simple del exudado vaginal, que tiene baja sensibilidad (oscila entre un 38 y un 80 %) (Martin *et al*, 1967; Mc Cann, 1974; Borchardt y Smith, 1991).

En los Estados Unidos se reportan aproximadamente 3 millones de casos nuevos por año (WHO, 1997). En Cuba existen muy pocos antecedentes de estudios que indiquen la prevalencia de la trichomonosis y la mayoría han estado dirigidos a relacionar la presencia o no del parásito con alguna enfermedad del sistema genito-urinario.

Esta infección se ha relacionado con el cáncer cervical (Gram *et al*, 1992; Kharsany *et al*, 1993; Zhang y Begg, 1994; Viikki *et al*, 2000), la enfermedad pélvica inflamatoria (Heine y Mc Gregor, 1993) y la infertilidad (Grodstein *et al*, 1993). Las mujeres infectadas durante el embarazo poseen predisposición a la ruptura prematura de membranas placentarias (Minkoff *et al*, 1984; Saurina y McCormack, 1997), al parto prematuro y a tener hijos de bajo peso al nacer (Cotch *et al*, 1997), lo cual se traduce en importantes implicaciones médicas, sociales y económicas (Carey y Klebanoff, 2001; Smith *et al*, 2002).

La asociación y coexistencia de *T. vaginalis* con otros gérmenes, también causantes de ITS, es bastante común (Laga *et al*, 1991; Zhang y Begg, 1994; Sobel, 1997). Existen estudios en los cuales se hace mención de la relación existente entre la trichomonosis y las infecciones provocadas por Papilomavirus humano (PVH) (Ter Meuien *et al*, 1992; Jaminson *et al*, 1995). Además se ha reportado que *T. vaginalis* puede actuar como transportador de otros virus (Pindak *et al*, 1998; Cu-Uvin *et al*, 2002).

Las formas clínicas en el curso de la trichomonosis son muy diversas y van desde las formas asintomáticas hasta formas sintomáticas severas con presencia fundamentalmente de leucorrea, prurito, dispareunia y punteados hemorrágicos que pueden tener localización vulvar, vaginal y en el cuello uterino (Wendel, 2003). En el hombre, generalmente la infección se presenta de forma asintomática, en algunos casos puede ser la causa de uretritis y prostatitis (Skerk *et al*, 2002; Price *et al*, 2003).

Desde 1959, el metronidazol constituye el fármaco de elección para el tratamiento de la trichomonosis, aunque ya en la década de los años 60 se comenzó a reportar la aparición de casos clínicos con infecciones refractarias después de un tratamiento adecuado (Aure y Gjonnes, 1969; Diddle, 1969; Kurnatowska, 1969). Sin embargo, la existencia de cepas de *T. vaginalis* resistentes a esta droga no fue confirmada hasta 1979 (Meingassner y Thurner, 1979).

Los mecanismos que influyen en la patogénesis aún no han sido bien identificados, lo cual ha motivado polémica entre algunos investigadores. Varios estudios han tratado de correlacionar el daño producido en animales experimentales con las formas clínicas de la infección (Toyos, 1974; Escario *et al*, 1995; Vanacova *et al*, 1997; Gómez-Barrio *et al*, 2002). En este sentido, el ratón ha sido el modelo animal que más se ha utilizado para simular una infección por *T. vaginalis* (Honigberg, 1978; Kulda, 1990; Nogal *et al*, 1997).

En el ratón la inoculación subcutánea de *T. vaginalis* provoca la aparición de abscesos subcutáneos en el sitio de la inyección y el volumen de la lesión puede ser usado como un estimado del nivel de virulencia de la cepa. La inyección intraperitoneal produce necrosis visceral especialmente en el páncreas y en el hígado, que puede provocar hasta la muerte del animal. Estos acontecimientos

también se han relacionado con la virulencia de los aislamientos o cepas del parásito (Kulda, 1990).

Otros investigadores han sugerido que para una mejor valoración de los resultados de ensayos para medir virulencia *in vivo* y su posible relación con la clínica, los mismos deben ser interpretados de forma paralela con otros resultados de ensayos *in vitro* realizados con igual finalidad y no conformarse solamente con los hallazgos en el animal de experimentación, pues no siempre los resultados experimentales revelan correlación entre la posible virulencia y la presentación clínica de la trichomonosis vaginal (Krieger *et al*, 1990).

Entre los factores que intervienen en la patogenia se han descrito dos tipos de mecanismos: mecanismos contacto dependientes y mecanismos contacto independientes.

La adherencia de *T. vaginalis* a las células epiteliales está considerada como uno de los mecanismos contacto-dependientes. Alderete *et al.*, en 1992, hicieron referencia a la existencia de 4 proteínas de superficie denominadas adhesinas, con masas moleculares de 65, 51, 33 y 23 Kda que median la interacción de *T. vaginalis* con las células epiteliales. Ellos demostraron que los anticuerpos antiadhesinas inhiben la unión de los parásitos vivos a las células epiteliales protegiéndolas de la citotoxicidad contacto dependiente. Estos mismos autores han hecho referencia a la existencia de cepas virulentas con notables diferencias en su adhesión a las células (Alderete *et al*, 1992). La actividad hemolítica (Krieger *et al*, 1983), y la citotoxicidad en cultivos *in vitro* (Brasseur y Savel, 1982 ; Garber y Bowie, 1990; Alderete *et al*, 1995) también se incluyen dentro de este tipo de mecanismo que influye en la patogénesis.

En relación a los mecanismos contacto independiente se citan, la excreción de factores solubles como las proteinasas extracelulares (Arroyo y Alderete, 1989; Garber y Lemchuk-Favel, 1994; Mendoza *et al*, 2000) y el factor de desprendimiento celular que provocan efectos líticos en cultivos celulares (Garber *et al*, 1989). La interacción de *T. vaginalis* con los miembros de la flora vaginal (Petrin *et al*, 1998) así como los mecanismos propios del parásito para evadir la respuesta inmune del hospedero (Alderete *et al*, 1992; Provenzano y Alderete, 1995) también han sido mencionados como importantes factores relacionados con la patogenicidad. Todos estos aspectos han contribuido a que la relación huésped parásito en el curso de la trichomonosis se considere muy compleja y que el amplio rango de síntomas clínicos que pueden tener lugar durante el proceso de infección no debe ser atribuido a un solo mecanismo de patogenicidad.

Recientemente, se han empleado técnicas moleculares como la del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) en investigaciones epidemiológicas y en estudios para conocer el polimorfismo genético y su relación con diferentes fenotipos clínicos en aislamientos de *T. vaginalis* (Vanacova *et al*, 1997; Snipes *et al*, 2000; Hampl *et al*, 2001). La técnica de RAPD representa un nuevo ensayo para el estudio del polimorfismo genético del ADN. Este consiste en la amplificación de segmentos de ADN genómico mediante la tecnología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando como cebadores oligonucleótidos cortos diseñados al azar (Williams *et al*, 1990). El RAPD requiere de cantidades muy pequeñas de ADN y no es necesario el clonaje, la secuenciación o la hibridización, lo que constituye una ventaja sobre otras técnicas moleculares usadas en la caracterización genómica (Papp *et al*, 1997; Singh, 1997). El polimorfismo es detectado a partir de patrones de ADN amplificados que no son más que marcadores anónimos. La capacidad de detectar regiones altamente variables en el ADN a partir de un método rápido tiene una gran importancia en investigaciones biomédicas, en la caracterización de aislamientos parasitarios, identificación de cepas, en estudios epidemiológicos y taxonómicos, así como en el análisis de rasgos simples y complejos del fenotipo como es el fenómeno de la resistencia a drogas (Ellsworth *et al*, 1993; Carlton *et al*, 1995; Howard *et al*, 1996).

La variabilidad genética y las manifestaciones clínicas en enfermos portadores de una

trichomonosis han sido motivos de estudios por algunos investigadores. Vanacova *et al.*, (Vanacova *et al.*, 1997) no encontraron correlación entre el polimorfismo genético y la severidad de la trichomonosis vaginal. Snipes *et al.*, (Snipes *et al.*, 2000) encontraron correlación entre las agrupaciones genéticas y el origen geográfico de los aislamientos y también con la resistencia al metronidazol. Más recientemente Hampl *et al.*, (Hampl *et al.*, 2001) demostraron correlación entre el origen geográfico de los aislamientos, la intensidad de las manifestaciones clínicas de los pacientes portadores de la parasitosis y la resistencia al tratamiento con metronidazol .

De acuerdo con los estudios anteriores, podemos decir que los aspectos relacionados con la patogenicidad y virulencia han sido motivos de discusión y contradicción entre algunos investigadores y aún no existen suficientes estudios concluyentes. Se ha considerado que sólo cuando los mecanismos de patogenicidad y los factores de virulencia estén bien definidos se podrán establecer nuevas estrategias para el control de la enfermedad.

En aras de contribuir al esclarecimiento de estas interrogantes, decidimos realizar la presente investigación, en la cual profundizamos en la relación huésped parásito, realizando el mayor énfasis sobre el parásito, y así tratar de obtener más información relacionada con los posibles factores asociados a la virulencia y a los mecanismos de patogenicidad de *T. vaginalis*.

Se seleccionó como material para el estudio los aislamientos provenientes de un grupo poblacional muy activo sexualmente como son las adolescentes (Menéndez del Dago, 1996), en cuyo grupo, con anterioridad, habíamos demostrado una elevada incidencia de la infección con *T. vaginalis*.

Para llevar a cabo este trabajo, nos propusimos la siguiente hipótesis.

1.2 Hipótesis

En modelos experimentales, el comportamiento de aislamientos de *T. vaginalis* puede ser asociado a la virulencia y a la patogenicidad y está estrechamente relacionado con la presentación de las formas clínicas de la enfermedad en el hospedero humano.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general:

Profundizar en los conocimientos acerca de la trichomonosis vaginal, haciendo especial énfasis en aspectos relacionados con la patogenicidad y la virulencia .

1.3.2 Objetivos específicos:

1. Determinar la frecuencia de la trichomonosis vaginal en un grupo de adolescentes objeto de estudio .
2. Evaluar el comportamiento *in vivo* de aislamientos del parásito mediante inoculación intraperitoneal en ratones NMRI.
3. Cuantificar los niveles de adherencia a células HeLa que manifiesten los aislamientos.
4. Conocer la respuesta de los aislamientos del parásito frente al metronidazol mediante pruebas de susceptibilidad *in vitro*.
5. Determinar el polimorfismo genético entre aislamientos de *Trichomonas vaginalis* mediante el RAPD.
6. Identificar la posible correlación de los resultados de la caracterización biológica del parásito con las manifestaciones clínicas presentadas por las pacientes de las cuales proceden los aislamientos.

1.4 Novedad Científica

La novedad científica de nuestro trabajo consiste en:

Demostrar la importancia de la trichomonosis como infección de transmisión sexual en nuestro medio en una población de jóvenes adolescentes que acuden a una consulta de interrupción de embarazo y de enfermedades de transmisión sexual.

Abordar por primera vez en nuestro país aspectos relacionados con los factores de virulencia, susceptibilidad al metronidazol de *T. vaginalis* y su posible relación con las manifestaciones clínicas en las pacientes estudiadas.

Demostrar que *T. vaginalis* puede incorporar 5-bromo-2'-desoxiuridina en su ADN, lo que permitió la utilización por primera vez de un método no radioactivo para medir citoadherencia del parásito.

Encontrar un posible marcador genético de patogenicidad en los aislamientos de *T. vaginalis* cuyo reporte se

hace por primera vez en la literatura internacional.

1.5 Valor práctico.

Con la introducción del conocimiento de que *T. vaginalis* es capaz de incorporar 5-bromo-2'-desoxiuridina en su ADN, se cuenta con un nuevo procedimiento para medir adherencia celular, evitando de esta forma la utilización de isótopos radioactivos con igual finalidad, los cuales pueden implicar daños para la salud humana y al medio ambiente.

Por otro lado el personal de nuestro laboratorio ha adquirido una valiosa experiencia en la caracterización biológica de aislamientos de *T. vaginalis*, los cual nos permitirá asumir nuevos retos científicos en el campo de estudios básicos de patogenia, incluyendo aquellos a nivel molecular.

El conocimiento de la existencia de aislamientos de *T. vaginalis* resistentes al metronidazol es útil para lograr que los médicos que atienden a estas pacientes apliquen el tratamiento adecuado para cada caso.

1.6 Eventos científicos donde han sido expuestos los resultados del presente trabajo.

- > XIII Congreso Latinoamericano de Parasitología. Ciudad de La Habana, 1997.
- > Reunión de Resultados Relevantes. Consejo Científico IPK. 2002.
- > Forum de Ciencia y Técnica Municipal y Provincial, Ciudad de La Habana, 2001
- > VI Jornada Medicas Luso-Cubanas de enfermedades infecciosas en medio familiar, Ciudad de La Habana, Junio 2001.
- > Sixth International Meeting on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases, París, Francia, Julio 2002.
- > Primera Reunión del Cuerpo Académico de Parasitología y Sanidad Acuícola. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. Monterrey. Mexico. Febrero del 2004.

1.7 Artículos del autor donde se presentan los resultados.

Rojas Rivero L., Izquierdo A., Sarría C., Sariego I., Fraga J. Comportamiento de la Trichomonosis vaginal en un grupo de adolescentes. Revista Cubana de Medicina Tropical 2003; 55(3) 179-84.

Rojas Rivero L, Sariego I, Sarría C, Fraga J. Comportamiento "in vivo" de aislamientos de *Trichomonas vaginalis*, utilizando ratones NMRI como modelo experimental. Revista Chilena de Infectología 2004; 21(3):179-85.

Rojas Rivero L., Sariego I, Fraga J, Sarría C, Sarracent J, Sánchez L. Use of *in vitro* cytoadherence assays in the comparative study of the virulence of isolates of *Trichomonas vaginalis*. Journal of Parasitology Research 2004; 93(4): 332-7.

Fraga J., **Rojas Rivero L.** , Sariego I., Sarría C. Optimization of Random Amplified Polymorphic Techniques for its use in genetics studies of *Trichomonas vaginalis* isolates. Journal of Molecular

Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases 2002; 2:73-75.

Rojas Rivero L., Fraga J , Sariego I. Genetic variability between *Trichomonas vaginalis* isolates and correlation with clinical presentation. Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases 2004; 4: 53-8.

1.8 Artículos del autor relacionados con el tema de tesis.

Rojas Rivero L., Matamoros M., Garrido N. , Finlay C. Acción del extracto acuoso de Aloe barbadensis Miller en el cultivo *in vitro* de *Trichomonas vaginalis*. Revista Cubana Medicina Tropical 1995; 47(3):181-184.

Rojas Rivero L., Sarria C., Sariego R.I., Goicolea A. , Morales E. Trichomonosis en pacientes con patología de cuello uterino. Revista Mexicana de Patología Clínica 1998;45(3): 177-80.

Rojas Rivero L., Solano S. R. , Sariego I. Frecuencia de *Trichomonas vaginalis* en mujeres supuestamente sanas. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología. 1999; 37(2):66-70.

Rojas Rivero L., Rodríguez ME, Sariego I, Sarría C. Trichomonosis vaginal y pacientes VIH. Revista Cubana de Medicina Tropical 2000; 52 (3):230-2.

Meneses A., **Rojas Rivero L.**, Sifontes S., López Y., Sariego I. Aplicación de un método alternativo al conteo en cámara de Neubauer para determinar la concentración de *Trichomonas vaginalis* . Revista Cubana de Medicina Tropical 2001; 53 (3)

Rojas Rivero L., Rodríguez M., Sarría C., Sariego I., Fraga J. Frecuencia de infección por *Trichomonas vaginalis* en parejas con trastornos de la fertilidad. Revista Cubana de Medicina Tropical 2002; 54(2):85-90.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1 *T. vaginalis*. Ubicación taxonómica (Beaver *et al*, 1994)

Reino: Protistas (Haeckel, 1866)

Sub Reino: Protozoa (Goldfuss, 1817)

Phylum: Sarcomastigophora (Deising, 1866)

Sub Phylum: Mastigophora (Deising, 1866)

Clase: Zoomastigophorea (Calkins, 1909)

Orden: Trichomonadida (Beaver, 1986)

Familia: Trichomonadidae

Género: *Trichomonas* (Donne, 1836)

Especie: *Trichomonas vaginalis* (Donne, 1836)

2.2 Aspectos morfológicos generales

Dentro del género *Trichomonas spp.*, la especie *vaginalis* ha sido la más ampliamente estudiada. Este patógeno urogenital varía en talla y en forma, mide como promedio 10 micras de largo por 7 de ancho. Su apariencia varía de acuerdo a las condiciones físico químicas del medio donde se encuentre. En cultivos axénicos adopta una forma ovalada, y tiende a ser más uniforme que cuando se adhiere a las células epiteliales vaginales, donde adquiere una forma ameboide (Arroyo *et al*, 1993).

T. vaginalis es un protozoo que posee 5 flagelos; cuatro de ellos localizados en su porción anterior y un quinto que recorre todo el borde externo de una expansión protoplasmática llamada membrana ondulante que ocupa los dos tercios anteriores del parásito. La principal función de estos flagelos es el desplazamiento del parásito con movimientos de rotación y traslación. En condiciones medio ambientales desfavorables el parásito puede internalizar los flagelos adoptando una forma semirredondeada a la cual algunos han denominado pseudoquistes (Honigber y Brugerolle, 1990).

El citoesqueleto está compuesto por tubulinas y fibras de actina. Posee un núcleo redondeado u ovalado, localizado en la porción anterior del trofozoito, con cromatina granular uniformemente distribuida y cariosoma subcentral. A partir del núcleo sale una estructura de aspecto hialino denominada axostilo que se extiende en forma longitudinal por todo el parásito. El citoplasma incluye gránulos que tienen importantes funciones metabólicas como son las vacuolas digestivas y los hidrogenosomas (análogos de las mitocondrias), denominados así por su relación con la producción de hidrógeno molecular (Muller, 1987).

2.3 Ciclo biológico

T. vaginalis sólo existe en forma de trofozoito. Se localiza en la vagina, glándulas prostáticas, vesícula seminal y uretra; en condiciones óptimas se multiplica de forma asexual por fisión binaria longitudinal dando lugar a dos nuevos trofozoitos. La forma más común de transmisión es de persona a persona, a través del contacto sexual.

2.4 Manifestaciones clínicas

Según datos experimentales, el período de incubación de la trichomonosis es de 4 a 28 días (Beaver *et al*, 1994). La presencia de síntomas es más frecuente en el sexo femenino; en el

hombre generalmente provoca escasa o nula sintomatología (Dragsted *et al*, 2001). Las variadas formas clínicas de la enfermedad dependen probablemente del número y virulencia del parásito, de la resistencia del huésped y del valor de pH en la vagina.

La importancia de conocer el grupo de individuos asintomáticos radica en que ellos se comportan como portadores "sanos", y pueden transmitir el parásito a otros individuos. En un estudio realizado en el laboratorio de parasitología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK), donde se incluyeron un total de 475 mujeres supuestamente sanas y sin antecedentes de enfermedad ginecológica, cuyas edades oscilaron entre 15 y más de 50 años, la frecuencia de positividad fue de un 8,2% (Rojas *et al*, 1999).

La vulvovaginitis de evolución aguda o crónica es una de las manifestaciones clínicas más frecuentes. *T. vaginalis* es causa de un 20 a un 25% de las vulvovaginitis que se presentan en la práctica médica. Otros síntomas y signos comunes son la leucorrea, vulvitis, prurito vulvar y disuria. El cuadro clínico clásico descrito en la trichomonosis con presencia de leucorrea de tipo purulento y espumosa, e irritación vaginal, está presente solo en algunas mujeres, y ha sido cuestionado en su sensibilidad y especificidad. Sin embargo, por examen físico, se encuentra leucorrea en aproximadamente 80% de las mujeres infectadas. La leucorrea puede ser variable en cantidad, de color blanco, amarillo o verde, espumosa, inodora o de olor fuerte. Otros síntomas son el prurito vulvar, el ardor y la irritación genital dolorosa, que puede llegar a provocar intensa dispareunia. Cerca de un 20% de las mujeres con *T. vaginalis* tienen disuria y este puede ser el síntoma de presentación de la infección. *T. vaginalis* puede aparecer asociada a una endometritis postparto, siendo dos veces más frecuente que en mujeres libres de la infección (Atias, 1994).

Al examen ginecológico, la presencia del cuello uterino puede estar alterado con aspecto edematoso, eritematoso y friable, con áreas puntiformes de color rojo intenso, lo cual ha sido considerado como el signo clínico más específico para el diagnóstico de la trichomonosis vaginal (Krieger *et al*, 1990). El exudado inflamatorio puede cubrir la mucosa vaginal y la vulvitis estar marcada por la presencia de eritema, dolor y edema. Las erosiones cervicales se han interpretado como un índice de predisposición al carcinoma de cuello (Beaver *et al*, 1994). En un estudio realizado en los laboratorios de Parasitología del IPK, donde se incluyeron 204 pacientes portadoras de patología del cuello uterino, se encontró una frecuencia de trichomonosis vaginal de un 13,2% (Rojas *et al*, 1998). Se ha sugerido que este protozoo pudiera ser el responsable de la inducción de cambios en la mucosa cervical humana, que van desde la displasia hasta el carcinoma *in situ* (Bechtold y Reicher, 1991).

Actualmente, han cobrado gran interés los estudios relacionados con la asociación entre trichomonosis y alteraciones patológicas relacionadas con la presencia de PVH, agente etiológico de los condilomas acuminados de los genitales externos, región perianal y de los condilomas planos del cervix (Jamison *et al*, 1995)

En general las manifestaciones clínicas de la trichomonosis son inespecíficas y cualquier causa de cervicitis y vulvovaginitis como las provocadas por *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis* y *Gardnerella vaginalis* pueden ser semejantes a las provocadas por *T. vaginalis* (Atias, 1994).

Respecto al uso de métodos contraceptivos, algunos autores han reportado una tasa aumentada de trichomonosis en pacientes portadoras de dispositivos intra uterinos comparadas con las que hacen uso de contraceptivos orales (Atias, 1994).

Se ha planteado que las glándulas de Bartolini son ocasionalmente focos de infección. Entre las complicaciones asociadas con la trichomonosis se incluyen las adenitis, piosalpingitis, endometritis y erosión cervical.

Las formas de presentación de la trichomonosis en el hombre pueden ser divididas en tres grupos: estado de portador asintomático, la trichomonosis aguda, caracterizada por una profusa uretritis purulenta y la enfermedad sintomática que clínicamente es indistinguible de otras causas de uretritis no gonococcica (Hobbs *et al*, 1999).

Krieger en 1995, planteó que en el hombre, la causa del 11% de todos los casos de uretritis no gonococcica es provocada por *T. vaginalis* (Krieger, 1995). Las complicaciones incluyen prostatitis, balanopostitis, epididimitis e infertilidad (Krieger, 1984; Joyner *et al*, 2000).

2.5 *T. vaginalis* como causa de infertilidad

La participación de *T. vaginalis* como causa de infertilidad ha sido planteada por algunos investigadores. Desde 1960, Hynie *et al.*, propusieron que las secreciones tóxicas del parásito contribuyen a la esterilidad (Hynie *et al.*, 1960). Más recientemente Jarecki-Black *et al.*, desarrollaron un modelo "in vitro" para estudiar la viabilidad y motilidad de los espermatozoides humanos en cultivo, identificando que proteasas secretadas por el parásito son capaces de inmovilizar y/o matar a los espermatozoides (Jarecki-Black *et al.*, 1998; Daly *et al.*, 1999). Según resultados obtenidos, en población que acude a la consulta de infertilidad del Instituto de Endocrinología de Ciudad de La Habana, se ha planteado que la presencia de la infertilidad provocada por ITS oscila entre 12 y 14 % del total de parejas atendidas en esa consulta (Padrón *et al.*, comunicación personal).

Resultados de un estudio reciente realizado por nuestro grupo de trabajo en esa institución, donde fueron incluidas 172 parejas que acudían por primera vez a la consulta de infertilidad, se encontró un 10,5% de positividad a *T. vaginalis*. Resultó ser altamente significativo, el hecho de que dentro de las parejas infértiles habían personas que tenían antecedentes de haber padecido de trichomonosis vaginal y otras ITS (Rojas *et al.*, 2002).

2.6 Relación trichomonosis vaginal y el VIH

Se ha planteado que en los individuos infectados por *T. vaginalis* puede aumentar la predisposición a contraer el VIH (Cameron y Padian, 1990; Laga *et al.*, 1993 y 1994; Susan *et al.*, 2000; Prashini *et al.*, 2002).

Laga *et al.*, en 1994, informaron que la seroconversión a VIH positivo en mujeres prostitutas estuvo significativamente asociada con la presencia de otras ITS dentro de las que se citó a la trichomonosis vaginal (Laga *et al.*, 1994).

En un estudio anterior se había demostrado que la infección por *T. vaginalis* provoca una agresiva respuesta inmune celular local con inflamación del epitelio vaginal y del exocervix en las mujeres y de la uretra en el hombre. Esta respuesta inflamatoria induce una gran infiltración de leucocitos, incluyendo linfocitos CD4 y macrófagos los cuales son blancos del virus de la inmunodeficiencia adquirida (Laga *et al.*, 1991).

En personas seronegativas al VIH, la infiltración leucocitaria y las lesiones genitales inducidas por *T. vaginalis*, pueden aumentar las posibles vías de entrada del virus por un incremento de células blanco y un acceso más directo a través de la sangre en las lesiones hemorrágicas. Similarmente en personas infectadas por el VIH, las hemorragias y la inflamación pueden incrementar el número de linfocitos y macrófagos infectados con el virus presentes en las áreas de contacto genital. La resultante es que ambos mecanismos aumentan las probabilidades de exposición al virus. *T. vaginalis* tiene la capacidad de degradar inhibidores de proteasas secretados por los leucocitos; por lo que se considera que este evento también puede facilitar la transmisión del VIH (Magnus *et al.*, 2003).

En estudios recientes realizados en 64 mujeres portadoras del VIH, atendidas en la consulta de Dermatología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", se encontró que el 15,6% de las pacientes fueron positivas a *T. vaginalis* (Rojas *et al.*, 2000).

Más recientemente Magnus *et al.*, informaron que la trichomonosis vaginal constituye la ITS más comúnmente encontrada en mujeres VIH positivas. En un total de 1578 mujeres en su gran mayoría por debajo de los 35 años, heterosexuales y de la raza negra, el 30,2% resultaron ser portadoras de *T. vaginalis*. No informaron asociación entre la presencia de *T. vaginalis* con el

hecho de que las pacientes VIH positivas estuvieran o no recibiendo tratamiento con inhibidores de proteasas (Magnus *et al*, 2003).

2.7 Diagnóstico

Las manifestaciones clínicas no brindan elementos suficientes para efectuar un diagnóstico exacto o de certeza de la trichomonosis vaginal. La existencia de portadores asintomáticos hace que necesariamente el diagnóstico esté basado en algún método que demuestre la presencia del parásito. La sensibilidad de las diferentes técnicas guarda estrecha relación con el número de parásitos y con el método empleado. Los métodos directos consisten en la demostración por microscopía óptica de parásitos móviles, principalmente en secreción vaginal y son: el examen directo simple del exudado vaginal y el cultivo *in vitro*.

En la mujer, la muestra se obtiene después de la inserción de un espéculo no lubricado en la vagina y por medio de un hisopo estéril que se aplica en los fondos de saco. Posteriormente la muestra es rotada en una pequeña gota de solución salina sobre un portaobjetos y examinada inmediatamente al microscopio. Utilizando una pipeta, también se puede practicar la irrigación vaginal con 10 mL de cloruro de sodio al 0.9% estéril; luego de producir un lavado vaginal esa solución es aspirada para ser cultivada o examinada al microscopio. En el hombre, tanto el diagnóstico clínico como de laboratorio es dificultoso y el parásito se debe buscar en muestras de orina y de secreción prostática obtenida por masaje de la glándula (Atias, 1994).

El método de examen directo simple del exudado vaginal, permanece aún como el más ampliamente usado para el diagnóstico de la trichomonosis, por ser un procedimiento útil, sencillo, rápido y de bajo costo, aunque poco sensible.

Bajo las mejores circunstancias alcanza una sensibilidad de solo un 38-80% (Martin *et al*, 1967; Mc Cann, 1974; Borchardt y Smith, 1991). La posibilidad del examen directo para detectar el parásito está directamente relacionada con el número de *Trichomonas*; se requieren aproximadamente mil parásitos por mL de secreción para un examen directo positivo. La aplicación de ducha vaginal poco tiempo previo a la toma de la muestra, puede provocar una reducción importante de la sensibilidad del diagnóstico.

El examen directo de la orina es útil especialmente en pacientes del sexo masculino. Consiste en la observación directa de la orina o del sedimento urinario obtenido por centrifugación a baja velocidad de la muestra.

La técnica de coloración de Papanicolaou se ha usado como medio de pesquisa de bajo costo y efectiva para detectar mujeres con *T. vaginalis*.

El método de cultivo *in vitro*, (considerado como la "regla de oro"), es el proceder diagnóstico más sensible para la detección de la trichomonosis vaginal. Este método debe ser incluido en la evaluación cuando el examen directo simple fracasa, para identificar *T. vaginalis*. Tiene una sensibilidad de un 97% y requiere tan solo de 300 a 500 parásitos por mL de inóculo para

iniciar el crecimiento (Garber *et al*, 1987) . Sin embargo, esta técnica es costosa y no está disponible en todas partes, además requiere de 2-7 días para identificar el parásito en cultivo, período durante el cual las personas infectadas pueden continuar transmitiendo la infección (Moldwin, 1992). Ofrece la ventaja de poder diagnosticar situaciones clínicas en las cuales puede haber un bajo número de trichomonas, o en estudios de hombres y mujeres asintomáticos.

Para mejorar el diagnóstico por el método de cultivo, se desarrolló el sistema "InPouch", que consiste en una bolsa flexible de dos cámaras separadas por un canal estrecho, que contiene medio líquido de cultivo y es utilizado para el examen inmediato de la muestra, además del cultivo del parásito (Draper *et al*, 1993). En 1996, Levi *et al.*, demostraron que para la detección de *T. vaginalis* el sistema In Pouch es menos sensible que el método de cultivo en medio de Diamond (Levi *et al*, 1996). Otros autores han demostrado lo contrario (Borchardt *et al*, 1996). A pesar de todo, el método de cultivo *in vitro* en medio de Diamond continua considerándose como el procedimiento de elección para el diagnóstico de la trichomonosis vaginal.

Como consecuencia de la lentitud para obtener un resultado por los métodos de cultivo *in vitro*, fueron introducidas las tinciones del parásito, mejorando de esta forma la sensibilidad de la microscopía directa. Las tinciones más comúnmente utilizadas son la naranja de acridina, la de Leishman, la coloración de Schiff, y la de Papanicolaou. Esta última se emplea además para la detección de anomalías citológicas particularmente en mujeres mayores de 35 años y en poblaciones con una alta prevalencia de ITS. Las técnicas de tinción tienen sus limitaciones, pues no siempre el parásito se presenta en su forma típica de pera, otras veces aparecen redondeados, similares a leucocitos polimorfonucleares y además en algunas ocasiones, durante el proceso de tinción, se pierden las características morfológicas típicas del parásito, haciendo más difícil su identificación.

Métodos indirectos.

Existen varias técnicas para estudiar la respuesta inmune a este parásito. Con métodos indirectos de diagnóstico se ha demostrado la reactividad a antígenos de *T. vaginalis* por hemaglutinación, fijación de complemento, inmunofluorescencia indirecta, y por la prueba de transformación de linfocitos T periféricos (Petrin *et al*, 1998).

La función de los anticuerpos producidos durante la respuesta inmune en individuos infectados y la identificación de los antígenos contra los cuales están dirigidos, son aspectos que actualmente continúan en estudio. Existen en el suero de personas infectadas anticuerpos anti-*T. vaginalis* de tipo IgA, IgM e IgG y de estos tres tipos de inmunoglobulinas, es evidente que la respuesta de tipo IgG es predominante en las infecciones crónicas. (Petrin *et al*, 1998).

La detección directa de *T. vaginalis* en muestras clínicas usando anticuerpos monoclonales, constituye un método rápido para el diagnóstico. Se han obtenido anticuerpos monoclonales contra proteínas de 62 y 65 Kda y su empleo arrojó resultados muy similares a los obtenidos

por los métodos de examen directo. El empleo de la detección de otros antígenos, tales como el factor de despegamiento celular de 200 Kda y la cisteína proteinasa de 60 Kda pueden constituir una alternativa para el diagnóstico (Garber y Lemchuk-Favel, 1989).

Con la finalidad de elevar la sensibilidad y la especificidad en el diagnóstico de la trichomonosis vaginal, también se han empleado las técnicas de ADN recombinante (Black y Stephen, 2000). En un estudio realizado por Briselden y Hillier, el sistema Affirm VP (MicroProbe Corp, Bothwell, Wash) que emplea oligonucleótidos sintéticos para la detección por hibridización de *Gardnerella vaginalis* y *Trichomonas vaginalis* en muestras de exudado vaginal, resultó ser superior al método de frotis directo simple, pero no a las técnicas de cultivo *in vitro* (Briselden y Hillier, 1994).

La técnica de hibridización dot-blot, la cual emplea un fragmento de ADN de 2,3 Kb de *T. vaginalis*, como sonda, puede detectar el ADN del parásito en exudado vaginal. Sin embargo, debido a la inestabilidad de la sonda y al cuidado especial que se necesita en el manejo del material radioactivo, la utilización de esta técnica tiene desventajas significativas (Rubino *et al*, 1991).

2.8 Epidemiología.

T. vaginalis, tiene una distribución cosmopolita. La infección tiene una incidencia de más de 170 millones de casos anualmente a nivel mundial (WHO, 1997). La tasa de incidencia depende fundamentalmente de algunos factores como la edad, la intensidad de la actividad sexual, número de parejas sexuales, fase del ciclo menstrual y tipo de examen de laboratorio realizado para el diagnóstico. El principal mecanismo de transmisión de la infección es el contacto sexual. En forma ocasional puede ser contraída a través de baños de inmersión en piscinas, y por uso compartido de ropa interior y toallas. Esta forma de transmisión extravénerea tiene lugar fundamentalmente en niñas y en mujeres vírgenes. Los recién nacidos hijos de madres infectadas pueden adquirir el parásito a través de su paso por el canal de parto. Del 2-17% de las infecciones en el neonato han tenido lugar por este mecanismo (Petrin *et al*, 1998).

En los Estados Unidos, la tasa de infección por *T. vaginalis* es mayor en mujeres de la raza negra que en las blancas, lo que parece estar asociado a factores socioeconómicos y al nivel de educación (Petrin *et al*, 1998).

El trofozoito es muy lábil y se destruye con facilidad en el medio ambiente, especialmente en ausencia de humedad y pH adecuados, sucumbe a temperaturas mayores de 40° C o a la exposición directa de la luz solar. Sin embargo, pueden sobrevivir en toallas húmedas por varias horas, lográndose obtener cultivos positivos en muestras tomadas de ropas húmedas hasta 24 horas después de la inoculación, lo que indica la posibilidad de transmisión por este mecanismo. En la orina es capaz de sobrevivir por más de 24 horas.

La temperatura óptima de desarrollo en cultivos es de 37° C, reproduciéndose cada 5 a 9 horas. La acidez normal de la vagina (pH 4 - 4.5) generalmente desfavorece la infección. Una vez establecida la infección el

mismo parásito provoca una tendencia a la alcalinidad, con lo cual favorece su crecimiento.

El hallazgo de este protozoo en las adolescentes está en estrecha relación con la presencia de factores de riesgo tales como, el inicio precoz de las relaciones sexuales y la falta de educación en cuanto al uso del condón como método no solo anticonceptivo sino también preventivo de las ITS. En relación a estas causas, Jaminson *et al.*, reportaron que un 39% de las adolescentes estudiadas habían comenzado su actividad sexual antes de los 15 años (Jaminson *et al.*, 1995). Otro factor condicionante de no menos importancia, lo es sin dudas, las múltiples parejas sexuales.

2.9 Tratamiento

No fue hasta el año 1959 cuando se encontró que un nitroimidazol derivado del *Streptomyces*, tenía alta efectividad en el tratamiento sistémico de la trichomonosis. Se trataba del (,(-hydroxietil-2-metil-5-nitroimidazol, comúnmente denominado metronidazol o flagyl. Con anterioridad a esta fecha, solamente se disponían de preparaciones tópicas vaginales que atenuaban los síntomas de la enfermedad, pero no se lograba su absoluta curación, pues este tratamiento local no era capaz de penetrar el epitelio vaginal ni uretral (Lossick y Kent, 1991).

El metronidazol penetra a las células por el mecanismo de difusión simple y es activado en los hidrogenosomas (Muller, 1986), donde el grupo nitro de la droga es reducido anaeróticamente por la enzima piruvato ferridoxina-oxidoreductasa, resultando en radicales intermediarios citotóxicos. Estos radicales se fijan a las cadenas de ADN del parásito provocando su ruptura y por consecuencia la muerte del parásito. La respuesta es rápida cesando la motilidad y la división celular una hora después de la administración de la droga. La muerte del parásito ocurre a las 8 horas de aplicado el medicamento como ha quedado demostrado en cultivos celulares (Tocher y Edwards, 1994; Martínez y Caume, 2001; Crossnoe *et al.*, 2002).

El parásito puede desarrollar tanto resistencia anaeróbica como aeróbica (Cerkasovova *et al.*, 1986). Sin embargo, en la mayoría de los casos esta última ha sido reportada en aislamientos clínicos resistentes al metronidazol (Upcroft y Upcroft, 2001).

La resistencia aeróbica aparece con la disminución de la habilidad de los parásitos para mantener la anaerobiosis en su interior. Esto ocurre debido a un decrecimiento de la afinidad de su sistema respiratorio por el O₂, el cual es un potente aceptor de electrones de los radicales nitro y puede inhibir la acción de la droga e incluso interferir con la activación del metronidazol (Cerkasovova *et al.*, 1986; Quon *et al.*, 1992). Se ha demostrado que el factor responsable de la resistencia aeróbica de *Trichomonas* al metronidazol se encuentra en la oxidasa hidrogenosomal terminal, cuya K_M para la respiración es alrededor de 4 veces mayor que en el caso de trichomonas sensibles (Lloy *et al.*, 1988). La resistencia anaeróbica de los aislamientos de *T. vaginalis* al metronidazol se debe a que estos microorganismos retienen la vía hidrogenosomal responsable de la activación de la droga (Kulda, 1999). Además decrece o desaparece la actividad de la enzima piruvato-ferredoxina-oxidoreductasa e hidrogenasa y por tanto, no hay muerte celular (Kulda *et al.*, 1993).

El tratamiento básico de la trichomonosis es a razón de 250 mg de metronidazol por vía oral, 3 veces al día, durante 7 días o en dosis única de 2 g. Cuando se administra simultáneamente a ambos integrantes de la pareja sexual, la efectividad del tratamiento es de un 95% (Hager *et al.*, 1980).

Se ha mencionado que el metronidazol puede atravesar la barrera placentaria y que pudiera provocar malformaciones en el feto (Rosa *et al.*, 1987) por lo cual está contraindicado en el primer trimestre del embarazo. En algunos modelos experimentales, el metronidazol es capaz de inducir la formación de tumores (Beard *et al.*, 1979). Estas reacciones adversas, no han sido directamente asociadas con el uso del metronidazol en el humano. Las mujeres embarazadas que presenten severa sintomatología deberán ser tratadas con 100 mg de clotrimazol por vía intravaginal durante 14 días de forma

ininterrumpida. A este procedimiento solo se le ha atribuido un 50% de curación; si la sintomatología persiste, puede aplicarse tratamiento con metronidazol en dosis única de 2 g al final del segundo o en el tercer trimestre del embarazo. El tratamiento en mujeres que están lactando también deberá ser en dosis única de 2g de metronidazol e interrumpir la lactancia durante 24 horas. El tratamiento del neonato solo se realizará después de la octava semana de nacido.

Los fallos en el tratamiento casi siempre han sido relacionados con tratamientos incompletos e inadecuados (Grossman y Galask, 1990), con pobre absorción de la droga (Kane *et al*, 1961), inactivación del medicamento por la flora vaginal (Benazet y Gillaume, 1971) y con las reinfecciones (Korner y Jensen, 1976). La existencia de aislamientos de *T. vaginalis* resistentes a los nitroimidazólicos fue confirmada a partir de los estudios de susceptibilidad *in vitro* y desde entonces se han reportado aislamientos resistentes a la droga en Estados Unidos y en varios países europeos y africanos (Van der Weiden y Van der Meijden, 1990; Meri *et al*, 2000; Schmid *et al*, 2001; Lo *et al*, 2002; Dunne *et al*, 2003).

Para confirmar la presencia de resistencia clínica, deberán realizarse ensayos de susceptibilidad *in vitro*. Desafortunadamente, la concentración letal mínima en los ensayos de susceptibilidad *in vitro* no se corresponden con la necesaria concentración de droga en el suero para obtener una definitiva curación, pero puede ofrecer un estimado de la dosis necesaria para estos fines (Lossick *et al*, 1986).

Los casos de trichomonosis refractaria, que después de un segundo ciclo de tratamiento no logran la curación, deben ser tratados con altas dosis de metronidazol; y debe combinarse al mismo tiempo la vía oral, vaginal e intravenosa (Narcisi y Secor, 1996).

Entre otras drogas y formas de tratamiento que se utilizan contra la trichomonosis podemos mencionar las siguientes: tinidazol 2g en dosis única, nimorazol 2 g en dosis única y clotrimazol 100 mg intravaginal durante 7 días.

2.10 Patogenia

El mecanismo exacto de patogenia se desconoce. Las investigaciones actuales están dirigidas a los eventos iniciales que se requieren para el establecimiento de la infección.

Entre los factores que intervienen en la patogenia se han descrito dos tipos de mecanismos: mecanismos contacto dependientes y mecanismos contacto independientes. En relación con los primeros se ha señalado la adherencia de *T. vaginalis* a las células epiteliales. Alderete *et al.*, en 1992 describieron cuatro proteínas de superficie denominadas adhesinas con masas moleculares de 65, 51, 33 y 23 Kda que median la interacción del parásito con las células epiteliales y las protegen de la citotoxicidad contacto-dependiente (Alderete *et al.*, 1992). Las adhesinas se expresan de forma alterna con una glicoproteína altamente inmunogénica que se conoce como P270 (Arroyo y Alderete, 1989). El proceso de adhesión requiere además de la presencia de cisteína proteinasas del parásito. Se han identificado al menos 11 proteinasas en la superficie del parásito que participan en los procesos de adhesión por mecanismos aún no esclarecidos (Arroyo y Alderete, 1989).

La laminina es una glicoproteína especializada de las células vaginales localizadas en la membrana basal del epitelio que promueve la adhesión, diferenciación y se ha comprobado que tiene propiedades quimiotácticas. Se ha demostrado a *T. vaginalis* adheridas a plásticos cubiertos con laminina (Costa e Silva Filho *et al.*, 1988) y endocitando partículas de poliestireno cubiertas con laminina (Benchimol *et al.*, 1990).

T. vaginalis tiene receptores para otra glicoproteína que está presente en las células de la vagina, denominada fibronectina, la cual se expresa en la membrana basal y es secretada al suero. *T. vaginalis* puede encontrarse unida a la fibronectina de las células del hospedero (Peterson y Alderete, 1982), pero no está claro si la función del receptor de fibronectina está relacionado con la adquisición de nutrientes, con la adhesión (Alderete *et al.*, 1994) o con la combinación de ambas funciones (Gold y Ofek, 1992).

Los carbohidratos (D-lactosa y N-acetil-B-D-glucosamina) presentes en la superficie de *T. vaginalis* y el posible papel de estas moléculas en el fenómeno de adhesión fueron descritas por Wantor y Honigberg en 1983 (Wantor y Honigberg, 1983). La presencia de carbohidratos parece estar relacionada con la virulencia (Kon *et al.*, 1988) y se piensa que algunas de estas moléculas pudieran estar involucradas en la lisis del eritrocito (De carli *et al.*, 1994), en la fagocitosis de células blanco (Benchimol y De Souza, 1995) y asociadas al fenómeno de susceptibilidad a drogas (Dias Filho *et al.*, 1992).

La actividad hemolítica, es otro de los mecanismos contacto dependiente que posee *T. vaginalis* (Dailey *et al.*, 1990; Fiori *et al.*, 1993). La mucosa vaginal constituye un pobre entorno nutricional para el parásito. Los lípidos y el hierro son importantes nutrientes para *T. vaginalis* y pueden ser adquiridos por la vía de lisis de los eritrocitos (Levi *et al.*, 1996). Aunque no está bien definido el por qué y cómo ocurre la hemolisis, se ha sugerido que la membrana del hematíe, que es rica en colesterol, puede servir de nutriente para el parásito y que para que tenga lugar la hemolisis se requieren al menos cuatro pasos: adhesión del parásito a los hematíes, liberación de proteínas formadoras de poros (posiblemente cisteína-proteinasas), separación del parásito y lisis del hematíe.

La actividad hemolítica de *T. vaginalis* es importante para la nutrición del parásito, lo que explicaría en parte el por qué durante la menstruación se observa un aumento de la intensidad de las manifestaciones clínicas de la infección.

En relación a los mecanismos contacto independientes, Garber *et al.*, en 1989, describieron una sustancia soluble denominada factor de despegamiento celular (CDF), que cuando se pone en contacto con monocapas de células en cultivo *in vitro* provoca el desprendimiento de estas células de los

cultivos (Garber *et al*, 1989). Esta sustancia parece ser una glicoproteína y es inmunogénica en el hombre. Su papel patógeno no se conoce, pero podría ser responsable de la producción del eritema visto en la mucosa vaginal durante la infección aguda. En otra comunicación, Garber y Lemchuk-Favel en 1990 hacen referencia a que los niveles de CDF se correlacionan de forma directamente proporcional con la severidad de los síntomas clínicos producidos en el curso de la trichomonosis, por lo que se considera que puede ser un importante marcador de virulencia de esta parasitosis. (Garber y Lemchuk-Favel, 1990).

La concentración de CDF puede variar por tres factores fundamentalmente: el tiempo en que se demoran en crecer los parásitos previo a la preparación del filtrado, el tamaño inicial del inóculo y el pH del medio. El CDF purificado es activo en un rango de pH entre 5,0-8,5 con una actividad óptima a pH 6,5 e inactivo por debajo de 4,5. Esta observación es muy importante desde el punto de vista clínico pues como es conocido el pH normal de la vagina es de 4,5, pero durante la trichomonosis puede elevarse por encima de 5,0 lo cual sugiere que el CDF puede constituir un importante factor en la patogénesis de la enfermedad (Garber *et al*, 1989).

El factor de despegamiento celular disminuye su actividad con el beta estradiol. Los síntomas de la infección pueden estar influenciados por la concentración vaginal de estrógenos. Esto puede explicar el empeoramiento de los síntomas durante la menstruación, cuando los niveles de estrógenos son más bajos (Garber *et al*, 1991).

2.11 Evasión de la respuesta inmune

En condiciones medio ambientales hostiles, *T. vaginalis* puede sobrevivir gracias a la habilidad de poder evadir la respuesta inmune del hospedero, lo cual se considera como un importante aspecto relacionado con la patogénesis. Es conocido que el parásito puede activar la vía alternativa del complemento (Gillin y Sher, 1991). El moco cervical es deficiente en complemento a diferencia de la sangre menstrual que representa la única fuente disponible del complemento en la vagina.

Como mecanismo de evasión de la respuesta inmune, *T. vaginalis* puede desplegar una variación fenotípica. En relación con este planteamiento se ha encontrado que dos clases de marcadores se expresan de forma alternativa en la superficie del parásito. Ellos son: La proteína altamente inmunogénica P270 y las adhesinas Ap23, Ap33, Ap65 y Ap51 (Alderete *et al*, 1992). Mientras todos los aislamientos sintetizan P270, solo algunos organismos pueden sufrir variación fenotípica entre la expresión de la glicoproteína P270 de la superficie de las células y la citoplasmática. Así, los fenotipos se describen como A+ B- (P270 positivo) y A-B+(P270 negativo) (Alderete, 1988). A los organismos de fenotipo positivo les faltan las adhesinas y no pueden citoadherirse o parasitar células del hospedero, solo los organismos del fenotipo negativo tienen la habilidad de citoadherencia. Se ha planteado que después de un tiempo prolongado en cultivo *in vitro*, los parásitos cambian la citoadherencia hacia el fenotipo positivo (Alderete, 1988).

En ensayos *in vitro* se ha demostrado que algunos organismos que llevan el antígeno P270 sobre la superficie de la célula son susceptibles a la lisis independiente del complemento mediada por anticuerpos. La falta de expresión de P270 de superficie y la naturaleza inmunorecesiva de las adhesinas permiten a los organismos del fenotipo negativo sobrevivir al ataque de los anticuerpos (Musatovova y Alderete, 1988). Las adhesinas parecen poder imitar la estructura de la enzima málica de las células vaginales, lo que parece ser la causa de su baja inmunogenicidad (Alderete *et al*, 1995; Engbring *et al*, 1996). Esta imitación molecular es otro ejemplo de cómo *T.vaginalis* puede escapar al sistema inmune del hospedero.

P230 es otro inmunógeno que está presente en la superficie del parásito, pero sufre cambios conformacionales que le permiten evadir a los anticuerpos (Alderete, 1988). La IgG vaginal que reconoce la proteína P230 de *T. vaginalis*, no produjo ningún efecto citolítico, incluso en presencia del complemento (Alderete *et al*, 1991). Además la respuesta del anticuerpo se restringió solamente a uno o varios epítopes de la proteína de 230Kda, permitiendo al organismo evadir el proceso de opsonización (Alderete *et al*, 1991).

Numerosas cisteína proteinasas secretadas por *T.vaginalis* degradan IgG, IgM e IgA, lo cual también permite al parásito sobrevivir a la respuesta inmune (Provenzano y Alderete, 1995).

Este parásito también secreta grandes cantidades de antígenos solubles, altamente inmunogénicos (Alderete y Garza, 1984). Una liberación continua de estos antígenos podría neutralizar linfocitos T citotóxicos o anticuerpos y de esta manera bloquear los mecanismos de defensa específicos del sistema inmune contra *T. vaginalis*. Otro mecanismo de evasión del parásito consiste en cubrirse con proteínas del plasma del hospedero, lo que no permite al sistema inmune reconocerlo como extraño (Peterson y Alderete, 1982).

2.12 Interacción de *T. vaginalis* con la flora vaginal.

La interacción de *T. vaginalis* con los miembros de la flora normal de la vagina puede ser un importante factor para evadir el sistema inmune del hospedero. La flora microbiana vaginal humana está condicionada por la presencia de Bacilos de Doderlein. Estos actúan sobre la glucosa 6 fosfato proveniente del glucógeno liberado por la citólisis celular, transformándolo en ácido láctico lo cual favorece el mantenimiento de las cifras de pH vaginal normal, que oscila entre 3,8 a 4,5. *T. vaginalis* sustrae el glucógeno de las células epiteliales compitiendo activamente con los Bacilos de Doderlein, impidiendo el mecanismo anterior y provocando una alcalinización del pH vaginal, favoreciéndose el desarrollo del parásito y de otros gérmenes patógenos (Petrin *et al*, 1998).

La elevación del pH de la vagina conjuntamente con la reducción de *Lactobacillus acidophilus* y el incremento en la producción de bacterias anaeróbicas pueden ser marcadores de la enfermedad. Sin embargo, se ha demostrado que el parásito tiene un efecto supresivo sobre el crecimiento de los *Lactobacillus acidophilus* (McGrory *et al*, 1994), el cual puede ejercer a través de dos mecanismos diferentes: se ha observado a *T. vaginalis* fagocitando bacterias y lactobacilos (Rendon-Maldonado *et al*, 1998) y por otro lado, se ha planteado que las proteinasas secretadas por el parásito son capaces de destruir a los lactobacilos (McGrory y Garber, 1992).

2.13 Vacunas

En el huésped humano las infecciones a repetición producidas por el parásito no causan inmunidad natural protectora (Ackers, 1990). Aparte de los anticuerpos encontrados en el suero (Garber *et al*, 1986) y en las secreciones vaginales de personas infectadas, la participación de la respuesta inmune mediada por células también ha sido mencionada (Yano *et al*, 1983). En 1996, Abraham *et al.*, lograron inducir inmunidad después de inoculaciones subcutáneas de *T. vaginalis* utilizando ratones BALB/c como modelo animal, lo cual puede ser de gran ayuda para el ulterior desarrollo de una vacuna (Abraham *et al*, 1996).

Solamente una vacuna ha sido producida contra *T.vaginalis*, denominada "Trichovac", está compuesta por microorganismos inactivados (lactobacilos y *T.vaginalis*) (Gombosova *et al*, 1986). La utilización de *Lactobacillus acidophilus* como vacuna contra *T. vaginalis* ha sido reportada por diferentes autores (Alderete, 1988; Mayer y Pelak, 1990). En un principio, se pensó que el éxito de la inmunización era debido a la generación de anticuerpos que reconocen determinantes comunes a antígenos de lactobacilos y de *Trichomonas*, pero esta relación antigénica no se ha demostrado por métodos más sofisticados, por lo que se prefiere enfocar este fenómeno como mecanismos inmunes no específicos.

Hasta el momento, la protección alcanzada no ha sido del todo efectiva, de ahí la importancia de la búsqueda de nuevas moléculas con capacidad protectora contra *T. vaginalis*.

2.14 *Trichomonas vaginalis* y ARN viral.

Resulta muy interesante conocer que solamente en los organismos con fenotipo positivo para la proteína P270 se han encontrado cadenas dobles de ARN viral (Khoshnan y Alderete, 1994) y este fenómeno se ha denominado *Trichomonas vaginalis virus* (TVV) (Wang y Wang, 1991). Desde entonces se ha correlacionado la presencia de la P270 con la presencia de TVV, a su vez la pérdida de la P270 ha sido asociada con la pérdida de TVV (Wang y Wang, 1991). A pesar de esta correlación es muy paródico el hecho de que la P270 se mantenga de generación en generación en los microorganismos que han sido sometidos durante tiempo prolongado a cultivos *in vitro* (Alderete, 1988). Sin embargo TVV es encontrado solamente en aislamientos frescos y se pierde después de un tiempo prolongado de los aislamientos en cultivos *in vitro* (Shaio *et al*, 1993; Khoshnan y Alderete, 1994; Wang y Wang, 1991).

Aunque existen reportes preliminares de la caracterización del genoma de TVV (Khoshnan y Alderete, 1995; Su y Tai, 1996), la función que juega TVV en la patogenicidad e inmunogenicidad de *T. vaginalis* aún está por investigar (Petrin *et al*, 1998).

2.15 *Trichomonas vaginalis* y Papilomavirus humano.

Algunos estudios epidemiológicos consideran la infección por PVH como una importante causa de neoplasia cervical e intraepitelial. Sin embargo, las causas de aproximadamente el 10% al 15% de los pacientes con cáncer cervical que no presentan PVH están aún por explicar. Otros agentes infecciosos comunes en el tractus genito urinario como es la infección por *T. vaginalis* puede estar relacionada a estos procesos neoplásicos. Zhang y Begg en 1994 sugirieron una fuerte asociación entre la trichomonosis y la neoplasia cervical y plantearon que del 2-4% de todas las neoplasias cervicales, el riesgo puede ser atribuido a la infección por el flagelado (Zhang y Begg, 1994). Bechtold y Reicher en 1991, sugirieron que este protozoo puede ser el responsable de la inducción de cambios en la mucosa cervical humana (displasia o carcinoma *in situ*). Estudios epidemiológicos prospectivos reportan un incremento del riesgo de neoplasia cervical en mujeres con infección por *T. vaginalis* después de haber contraído la infección por PVH (Bechtold y Reicher, 1991).

Cada vez se le confiere mayor importancia al papel de *T. vaginalis* en la aparición de la infección por PVH, pues se plantea que el parásito puede actuar como transportador de partículas virales hacia el interior de las células del epitelio vaginal. Según resultados de estudios realizados en el laboratorio de trichomonosis vaginal de la Subdirección de Parasitología del IPK, se pudo demostrar que la presencia de PVH fue más frecuente en las mujeres con trichomonosis que las que no tenían esa condición, lo cual demostró que el hecho de presentar una infección por *T. vaginalis* puede aumentar la posibilidad de una infección por PVH (Rojas *et al*, 1998). Similares planteamientos fueron realizados por Sobel en 1997 (Sobel, 1997).

Gram *et al.*, en 1992, demostraron una asociación entre la infección por este protozoo y la neoplasia cervical, sugiriendo que las mujeres con frotis de Papanicolau positivos a *T. vaginalis* o a PVH tenían un mayor riesgo de presentar NIC grado III que las mujeres controles negativas (Gram *et al*, 1992).

16. Modelos biológicos para experimentación *in vivo*

El poder disponer de un adecuado modelo animal para estudio de la trichomonosis humana es una dificultad que todavía no ha sido resuelta satisfactoriamente.

Las primeras descripciones de lesiones producidas en ratones después de la inoculación

intraperitoneal, intramuscular y subcutánea de *T. vaginalis* humanas fueron publicadas por Schnitzer *et al.*, en 1950 (Schnitzer *et al.*, 1950).

Posterior a ello, varios investigadores han utilizado roedores en estudios de interacción huésped parásito, ensayos de virulencia y susceptibilidad a drogas. El ratón ha sido el modelo más utilizado, aunque las ratas, curieles y hamsters también han sido empleados.

La vía de inoculación más frecuentemente utilizada ha sido la subcutánea, seguida de la intraperitoneal, y por último la intravaginal. En este sentido, la más amplia revisión con que cuenta la literatura fue la realizada y publicada por Honigberg en 1978 (Honigberg, 1978).

Aunque existen algunos reportes relacionados con la infección de animales de laboratorio con *T. vaginalis*, no todos contribuyen significativamente a una buena comprensión de la enfermedad y del parásito. En esto está involucrado, entre otros, el complejo medio ambiente donde habita el parásito, es decir la vagina humana, los cambios locales provocados por los ciclos hormonales y los mecanismos específicos de defensa del parásito. Se ha pensado que sean los primates los animales experimentales que aporten los mejores resultados como modelo biológico (Kulda, 1990).

La inoculación intravaginal pudiera ser la vía más real que simulara la infección humana, pero aquí el parásito se encuentra con condiciones que difieren considerablemente de las que presenta el sistema genitourinario humano.

Las inoculaciones ectópicas más comunes (subcutánea e intraperitoneal) que exponen al parásito a sitios de localización no naturales, deben ser interpretadas cuidadosamente, tratando de evitar la realización de erróneas conclusiones. La vía intramuscular, intratorácica, ocular y escrotal constituyen otras localizaciones ectópicas que con menor frecuencia también se han utilizado para inoculaciones del parásito.

2.17 Algunas consideraciones acerca de las diferentes vías de inoculación.

La inoculación intravaginal de *T. vaginalis* en animales de experimentación, es un procedimiento que presenta algunas dificultades técnicas que limitan los éxitos de las investigaciones. La susceptibilidad de los animales de laboratorio a la infección intravaginal está relacionada con sus sistemas endocrinos y varía grandemente en dependencia de los cambios de fases de sus ciclos sexuales. Este tipo de inoculación ha sido practicada en cobayos, hamsters, ratas, ratones y en monos. De todos los animales utilizados con estos fines, han sido los monos (*Macaca mulatta*) los únicos que presentan un ciclo menstrual similar al humano. Usualmente se proporciona al animal experimental un tratamiento a base de estrógenos lo cual ayuda al establecimiento y persistencia de la infección (Kulda, 1990).

La inoculación intratesticular fue establecida por Roigas *et al.*, para lo cual utilizó como modelos biológicos las ratas y los cobayos. Los animales fueron inoculados con 7 aislamientos axénicos de *T. vaginalis* procedentes de hombres y mujeres. La inoculación se realizó por inyección entre los túbulos seminíferos causando rápido desarrollo de lesiones con formación de focos de necrosis alrededor de los túbulos seminíferos y final desaparición de los mismos una semana después de la inoculación. Los autores señalan que las lesiones y cambios patológicos fueron semejantes a los ocurridos en el curso de enfermedades tales como la tuberculosis y la brucelosis (Roigas *et al.*, 1969).

Infecciones ectópicas

Inoculación Intraperitoneal.

Este tipo de inoculación puede ser producida consistentemente y a diferencia de la vía intravaginal, no ofrece dificultades técnicas. Su uso generalmente se relaciona con estudios de patogenicidad, virulencia, inmunológicos y terapéuticos, en el curso de infecciones por el parásito.

La inoculación intraperitoneal de *T. vaginalis* en el animal experimental es causa de peritonitis fibrinopurulenta con focos de necrosis y abscesos en vísceras abdominales y producción de líquido ascítico. La severidad de la infección aunque depende en parte del estado biológico y de la sensibilidad del animal de experimentación, es un reflejo del grado de virulencia de la cepa

inoculada.

La inoculación subcutánea de *T. vaginalis* en ratones, puede conducir al desarrollo de abscesos localizados en el sitio de la inyección. El desarrollo de la lesión depende de la habilidad del parásito para multiplicarse en el sitio de inoculación .

Bajo condiciones normales el crecimiento y duración de la lesión dependen de las características de la cepa en cuestión, reflejando el grado de virulencia de la misma, en consecuencia, el volumen de la lesión puede ser empleado como un estimado del nivel de virulencia de la cepa .

Los sitios preferibles de inoculación subcutánea en el ratón son en la región dorsal o ventral de la pata trasera. El tipo de lesión se corresponde con abscesos compactos, purulentos. Típicamente estos abscesos crecen durante las primeras dos semanas después de la inoculación, eventualmente se rompen y drenan. Se ha planteado que los abscesos causados por cepas virulentas se rompen a finales de la primera semana después de la inoculación y que pequeños abscesos producidos por cepas de baja virulencia no necesariamente se rompen. Ocasionalmente la ruptura de los abscesos pueden cerrar y producir abscesos secundarios .

Inoculación Intramuscular

La posibilidad de utilizar esta vía para ensayos de virulencia de *T. vaginalis* fue sugerida por Gavrilesco en 1962, quien manifestó que las diferencias histopatológicas de las lesiones pueden ser correlacionadas con las formas clínicas de la enfermedad en los pacientes que la padecen y que la inoculación intramuscular de *T. vaginalis* en el ratón, produce abscesos localizados en el sitio de la inyección (Gavrilesco,1962).

Sin embargo más tarde otros investigadores sugirieron que la inoculación intramuscular es inadecuada para evaluar la virulencia debido a la considerable variación en la talla de la lesión y la pobre accesibilidad al sitio de la infección (Ivey y Hall, 1984).

2.18 Técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).

Los métodos de análisis del ADN basados en la reacción en cadena de la polimerasa han cobrado gran importancia en los últimos años. Entre estos el RAPD, desarrollado por Williams *et al.*, en 1990, recibe una atención particular debido a su extrema simplicidad y el requerimiento de cantidades mínimas de ADN genómico. La estrategia básica consiste en la amplificación por PCR de fragmentos al azar de ADN genómico con uno o múltiples cebadores de secuencias arbitrarias o no específicas. El polimorfismo entre individuos (o cepas) es detectado por diferencias entre los patrones de fragmentos de ADN amplificado de diferentes ADNs usando un cebador dado (Williams *et al*, 1990).

El RAPD-PCR es una herramienta sumamente poderosa empleada en el mapeo de genes, poblaciones y análisis de la genealogía (pedigree), estudios filogenéticos y la identificación de cepas.

El producto del PCR con cebadores arbitrarios usualmente se resuelve por electroforesis en gel de agarosa visualizado con bromuro de etidio y luz ultravioleta (Welsh y Mc Clelland, 1990), en geles de poliacrilamida seguido de autoradiografía, si se añade ATP marcado con fósforo 32 al último ciclo de amplificación (Caetano-Anolles, 1993), o visualizado con plata (Steindel *et al*, 1993; Gomez *et al*, 1995). Los productos de la amplificación considerados como firmas o huellas digitales del ADN molde analizado, son detectados como un complejo de multibandas (aplicones) y patrones hipervariables resultado de desiguales sitios de impresión y longitudes variables de la secuencia intermedia de amplificación (Welsh y Mc Clelland, 1990; Caetano-Anolles *et al*, 1991).

Diferentes estudios han demostrado que varios factores afectan los perfiles obtenidos manifestándose en la presencia de bandas falsas y la poca reproducibilidad del ensayo, por lo que la optimización y el control interno de la técnica, se hacen imprescindibles para obtener resultados confiables y una resolución consecuente entre reacciones de amplificación separadas o entre estudios. La reproducibilidad del RAPD se ha probado extensivamente y varios

factores afectan los perfiles que se obtienen. La técnica es relativamente sensible a la calidad del ADN en la reacción, a los componentes de la solución salina tamponada, al tipo y concentración de la Taq polimerasa, a la concentración del cebador y al equipo termociclador usado, así como la temperatura de hibridación y el número de ciclos termales. (Caetano-Anolles, 1993; Dias Neto *et al*, 1993; Meunier y Grimont, 1993; Penner *et al*, 1993).

2.19 El análisis de datos del RAPD.

Aunque se están desarrollando alternativas automáticas y sistemas computarizados, el análisis de datos del RAPD se hace según la observación de las bandas obtenidas en la fotografía del gel. Se introducen los datos de cada línea o senda de forma manual a los programas de computación como el DNA-POP (Pena y Nunes, 1991). Estos programas usan como rasgos básicos la división del gel en niveles de movilidad. Un nivel es definido por la presencia de por lo menos una banda en una de las sendas. Así el gel estará compuesto por infinitos niveles teóricos. El gel es examinado desde el inicio hasta el final, y cuando se ve una banda en una senda o línea esta se considera un nivel. Si dos o más bandas están presentes en un nivel, se considera co-migración (compartido) aún cuando están ligeramente desalineados o difieren en la intensidad. La salida del programa debe incluir una exhibición del diagrama que incluye los niveles y las bandas por senda o línea y la proporción de bandas compartidas entre cada par de muestras. Estos datos se utilizan para obtener diferentes matrices de distancia basadas en bandas no compartidas, construyendo el fenograma por UPGMA o métodos similares disponibles en paquetes de computación filogenéticos como MEGA (Kumar *et al*, 1993), PHILIP (Felsenstein, 1978).

2. 20 Análisis de aislamientos de *T. vaginalis* basados en su polimorfismo genético.

El polimorfismo genético entre aislamientos de *T. vaginalis* ha sido demostrado utilizando diferentes métodos genéticos: la técnica de hibridización molecular utilizando la sonda Tv-E650-7 (Pace *et al*, 1992; Ryu *et al*, 1998), la técnica del polimorfismo de las longitudes de los fragmentos de restricción (RFLP) utilizando como sonda el gen HSP-70 (Stiles *et al*, 2000), la secuenciación del gen ribosomal (Snipes *et al*, 2000) y la técnica de RAPD (Vanacova *et al*, 1997; Snipes *et al*, 2000; Hampl *et al*, 2001). Esta última ofrece ventajas para la rápida caracterización genética de aislamientos al no necesitar información de la secuencia del ADN, constituyendo una técnica más rápida y sensible si se compara con otros métodos moleculares empleados en la caracterización genómica (Van Belkum *et al*, 1993; Papp *et al*, 1997; Lin, 1998). Esta técnica ha sido utilizado en investigaciones epidemiológicas y en estudios donde no solo se ha demostrado el polimorfismo genético entre aislamientos de *T. vaginalis* sino también donde se ha relacionado este polimorfismo genético con diferentes fenotipos clínicos en aislamientos de este parásito (Vanacova *et al*, 1997; Snipes *et al*, 2000; Hampl *et al*, 2001).

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Pacientes estudiadas.

El estudio estuvo integrado por un total de 575 adolescentes procedentes de las consultas infanto-juvenil, de interrupción de embarazo y de ITS de los Hospitales Ginecobstétricos Docentes "Ramón González Coro" y "Eusebio Hernández" en el período comprendido de Junio de 1999 a Junio del 2001.

3.1.1 Criterios de Inclusión y de Exclusión.

En este estudio descriptivo experimental se incluyeron solamente aquellas personas que voluntariamente aceptaron participar. Se contó con el consentimiento informado de los padres o tutores (ver anexo 1). En todos los casos fue requisito indispensable cumplir con las siguientes condiciones: no haber ingerido antibióticos ni antiparasitarios al menos 15 días antes de la toma de la muestra, no haber utilizado duchas vaginales ni medicamentos locales en las últimas 72 horas, no haber tenido relaciones sexuales el día anterior y no haber tenido sangramiento abundante el día de la toma de muestra. Las pacientes que no cumplieran con esas condiciones no fueron seleccionadas para el estudio.

3.1.2 Procedimientos para la toma de muestra y análisis de la misma:

Con la paciente en posición ginecológica y después de la inserción vaginal de un espéculo estéril no lubricado se procedió de la siguiente forma:

Se realizó toma de muestra de exudado vaginal, utilizando un hisopo estéril, que fue aplicado en los fondos de saco uterino y resto de la cavidad vaginal. La muestra se colocó en un tubo de cristal correctamente identificado que contenía 1ml de solución salina estéril al 0,9%. Posteriormente se centrifugó a 500g durante 7 minutos y se estudió el sedimento entre cubre y portaobjeto para determinar la presencia o no de *T. vaginalis*. El tiempo transcurrido entre la toma de las muestras y su visualización en el microscopio, no excedió las 3 horas. Este procedimiento fue realizado en los laboratorios de Microbiología de los hospitales donde fue tomada la muestra. En todos los casos, la muestra se llevó a los laboratorios de investigaciones de la Subdirección de Parasitología del IPK, donde 100 (L del sedimento fueron sembrados en el medio TyI-S-33 (Diamond *et al*, 1978) en tubos de cristal con tapa de rosca y se incubaron a 37° C realizando lecturas cada 24 horas durante 7 días consecutivos.

Con el objetivo de corroborar la presencia o no de otros microorganismos, todas las muestras fueron analizadas en el laboratorio de microbiología de los hospitales donde fue atendida la paciente.

A todas las adolescentes se les realizó una encuesta, en la cual se recogieron datos de identidad personal, de la sintomatología referida así como de los signos clínicos observados por el médico de asistencia que guardaran alguna relación con la trichomonosis (Ver anexo 2).

3.1.3 Clasificación de las adolescentes de acuerdo a la sintomatología clínica.

Para realizar la clasificación clínica se procedió según los criterios previamente establecidos por Garber y Lemchuk-Favel en 1990 (Garber y Lemchuk-Favel, 1990) con ligeras modificaciones, como se explica a continuación:

Se tuvieron en cuenta un total de 9 parámetros donde se incluyeron signos y síntomas que pudieran tener relación con la enfermedad, asignándose un punto por la presencia de cada uno de ellos (prurito, presencia de flujo vaginal, color del flujo vaginal, dolor en bajo vientre, disuria, eritema vulvar, eritema vaginal, eritema cervical y dispareunia). Una puntuación adicional de 1 a 3 puntos fue

otorgada en dependencia de la severidad de cada uno de los parámetros anteriores (leves, moderados o severos respectivamente). Para el color del flujo vaginal se tuvieron en cuenta los colores blanco, amarillo y verde. Se asignó 1,2 y 3 puntos respectivamente en función del color. En dependencia del total de puntos alcanzados, las pacientes fueron clasificadas como asintomáticas y sintomáticas leves, moderadas y severas de la siguiente forma:

- 0 asintomática
- 1 - 9 sintomática leve
- 10 - 18 sintomática moderada
- 19 - 27 sintomática severa.

3.1.4 Axenización de los cultivos de *T. vaginalis*

A partir de las muestras de exudado vaginal de las pacientes que resultaron ser positivas se logró axenizar un total de 52 aislamientos del parásito; De ellos 12 asintomáticos y 40 sintomáticos (11, 13 y 16 leves, moderados y severos respectivamente) por pases sucesivos diarios en cultivo *in vitro*, utilizando el medio de cultivo de Diamond (Diamond *et al*, 1978), suplementado con antibióticos (gentamicina 50(g/mL, penicilina 100U/mL y estreptomina 30(g/mL) y nistatina 60(g/mL. Los parásitos aislados fueron conservados en nitrógeno líquido. Se escogieron al azar 10 aislamientos por cada una de las 4 modalidades para su posterior caracterización.

3.1.5 Análisis estadístico.

Para determinar el mejor método para el diagnóstico de la trichomonosis en nuestras condiciones experimentales se comparó la proporción de casos positivos por frotis directo simple del exudado vaginal con los positivos por el método de cultivo *in vitro*. Para determinar el tiempo óptimo para la lectura de los cultivos *in vitro*, se compararon los porcentajes de positividad resultantes a las 24, 48 y 72 horas. En ambos casos se aplicó la prueba de comparación de proporciones empleando los paquetes de programas para análisis estadísticos EPIINFO, versión 6.04 (Dean *et al*,1994). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de *P* fue menor que 0,05.

3.2 Caracterización *in vivo* de aislamientos de *T.vaginalis*.

3.2.1 Animales de experimentación:

Para la realización de los experimentos se emplearon ratones NMRI machos, de 6 semanas de nacidos, con un peso aproximado entre 20 y 22 gramos suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, La Habana. Los animales fueron mantenidos bajo los requerimientos para la especie en condiciones ambientales controladas (temperatura y humedad) además de proporcionarles agua y alimentación adecuada.

3.2.2 Cantidad ideal de inóculo:

Para determinar la concentración parasitaria óptima para nuestros objetivos de trabajo, utilizándose el aislamiento C-76, se evaluaron tres concentraciones: 4×10^6 , 8×10^6 y 10×10^6 de parásitos en un mL de medio de cultivo, administradas por vía intraperitoneal. Se inocularon un total de 10 ratones por cada concentración parasitaria. El único parámetro que se evaluó fue la mortalidad, prefijando el séptimo día como el ideal para el sacrificio (Toyos, 1974). El sacrificio fue realizado mediante la administración de una sobredosis de anestesia con éter.

3.2.3 Grupos controles:

Fueron empleados un total de 60 ratones como grupo control, distribuidos de la siguiente forma: 20 ratones sanos sin inocular y 20 inoculados con un mL de medio de cultivo sin suero.

Con el objetivo de corroborar si el daño provocado al animal era producido por la acción del parásito vivo o por componentes de las estructuras del parásito, se inocularon dos tipos de presentaciones de los parásitos muertos. Un grupo de 10 ratones se inoculó con parásitos muertos íntegros, cuya muerte fue provocada por 3 ciclos de congelación-descongelación y otros 10 ratones se inocularon con parásitos muertos destruidos, para lo cual fueron sometidos a 15 ciclos de congelación-descongelación. En todos los casos los ratones controles fueron sacrificados y examinados al final de cada experimento, la vía de inoculación fue la intraperitoneal y la cantidad de solución inoculada fue igual a 1 mL.

3.2.4 Inoculaciones y análisis posterior

Por cada aislamiento se inocularon diez ratones utilizando la vía intraperitoneal (400 en total). Una vez sacrificados se procedió al examen macroscópico de las cavidades torácica, abdominal y pelviana en busca de lesiones, las cuales fueron corroboradas desde el punto de vista macroscópico y microscópico en el Departamento de Anatomía Patológica del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. De igual forma se procedió con los ratones muertos antes del séptimo día. Los animales que murieron y no pudieron ser examinados por su avanzado estado de descomposición no fueron incluidos en la investigación.

3.2.5 Diseño estadístico

El índice de virulencia de los aislamientos fue determinado al séptimo día post-inoculación, de acuerdo a los criterios empleados por Toyos, por Nogal *et al.*, y más recientemente por Gómez-Barrio *et al.*, (Toyos, 1974; Nogal *et al.*, 1997; Gómez-Barrio *et al.*, 2002). Para esto se confeccionó una base de datos en la cual se hicieron anotaciones de la puntuación correspondiente para cada parámetro, de acuerdo a las lesiones halladas en cada uno de los órganos de los ratones examinados, como se muestra a continuación:

Criterios de puntuación empleados para evaluar las alteraciones y daños encontrados en cada ratón.

Manifestaciones patológicas		Valores asignados
Líquido ascítico	< 1 mL	2 puntos
	1-2 mL	4 puntos
	> 2mL	6 puntos
*Hígado		0-2-4 puntos
*Bazo		0-2-4 puntos
*Riñón		0-2-4 puntos
*Estómago		0-2-4 puntos
*Páncreas		0-2-4 puntos
*Intestino		0-2-4 puntos
*Peritoneo		0-2-4 puntos
*Cara visceral del diafragma		0-2-4 puntos
*Cara parietal del diafragma		0-2-4 puntos
*Lesiones en las vísceras	No lesión	0 puntos
	Abscesos	2 puntos
	Necrosis	4 puntos

Según esta clasificación, la cuantificación del daño producido por cada aislamiento en un solo ratón alcanzaría una puntuación máxima de 42 puntos.

Los resultados fueron procesados con ayuda del paquete estadístico STATISTICA para Windows (for Windows, Release 5.1, copyright Statsolt, Inc. 1984-1986). Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar las medias de las puntuaciones obtenidas por los aislamientos de cada grupo clínico en cada parámetro analizado individualmente (ascitis, hígado, bazo, riñones, estómago, páncreas, intestino, peritoneo, cara visceral del diafragma (cvd), cara parietal del diafragma (cpd) y para comparar las puntuaciones totales obtenidas por los aislamientos de cada grupo clínico. Se consideraron significativos los valores de P menores que 0,01.

3.3 Ensayo de citoadhesión "in vitro"

3.3.1 Modelo de células epiteliales vaginales.

La línea de células epiteliales humanas HeLa (ATCC CCL2), fue obtenida de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Rockville, Md., USA). Las células fueron mantenidas en Medio Mínimo Esencial (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado con glutamina al 1%, suero fetal bovino al 10% (Bio Whittaker, Walkersville, Md, USA), sulfato de neomicina al 0,1% (medio Memgane) y cultivadas en placas de microtitulación (PMT) de 96 pozos de fondo plano para cultivo de tejido (Corning, NY, USA) (100 (L/pozo) que fueron incubadas en atmósfera de aire con 5% de CO₂ a 37°C hasta alcanzar la confluencia. La monocapa celular fue lavada tres veces antes de realizar el ensayo de citoadhesión con una mezcla de medios sin suero en proporción 2:1 (vol/vol) (Mem-TYI-S-33). Esta mezcla fue empleada previamente por Arroyo y Alderete, 1989 quienes encontraron que resulta apropiada para el mantenimiento de los parásitos y las células mientras tiene lugar el ensayo de adhesión. El suero fetal bovino fue excluido pues contiene inhibidores de las cisteíno-proteinasas del parásito que se ha determinado participan en los procesos de adhesión (Arroyo y Alderete, 1989).

3.3.2 Marcaje de los parásitos.

Se empleó el estuche comercial de reactivos "Cell Proliferation ELISA; BrdU colorimetric" (Boehringer Mannheim, Germany Catálogo No. 1 647 229). Esta técnica es un inmunoensayo colorimétrico para la cuantificación de la proliferación celular, basado en la medición de la incorporación de la 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) durante la síntesis de ADN y constituye una alternativa no radioactiva a los ensayos de incorporación de [³H]-timidina. El marcaje se realizó con BrdU a concentración final de 10 M (concentración recomendada por el fabricante) durante 4h, 8h y 16 horas para conocer el tiempo óptimo de incubación y lograr mayor sensibilidad de la técnica.

Por ser la primera vez que se empleaba este estuche comercial con el propósito de medir citoadhesión de *T. vaginalis* fue necesario validarlo. Con este objetivo se correlacionaron los resultados obtenidos marcando los parásitos con BrdU con los de la técnica habitual que utiliza la [³H]-timidina con igual finalidad (Arroyo y Alderete, 1989). El ensayo en paralelo se realizó marcando los parásitos con 1(Ci/mL de [³H]-timidina (TRK 637, 40 (Ci/mmol) Amersham, Buckinghamshire, England) durante toda la noche. Más del 85% de la radioactividad fue precipitada con 5% de ácido tricloroacético, indicando la incorporación de la [³H]-timidina a las macromoléculas del parásito.

Luego de marcados, los parásitos fueron lavados tres veces con la mezcla de medios sin suero, contados en cámara de Neubauer y diluidos a una concentración de 4x10⁶ parásitos/mL.

3.3.3 Adhesión de *T. vaginalis* a las células epiteliales HeLa

El ensayo para cuantificar la adhesión de *T. vaginalis* a las células epiteliales HeLa se realizó como describieron Arroyo y Alderete en 1989 (Arroyo y Alderete,1989). Un volumen de 100 (L/pozo, con una concentración celular de 4×10^5 parásitos marcados con BrdU o con [^3H]-timidina) fue añadido a la monocapa de células HeLa. La PMT fue incubada durante 30 min a 37(C en atmósfera de aire con 5% de CO_2 . Posteriormente la placa fue lavada tres veces con la mezcla de medios sin suero (Mem-TYI-S-33) a 37(C para eliminar los parásitos no adheridos. Los lavados se realizaron cuidadosamente añadiendo el medio por los bordes de los pozos y extrayendo el líquido con ayuda de una pipeta para no desprender la monocapa de células HeLa. La PMT se dejó secar durante 10 min a 37(C y se procedió a realizar el ELISA. En el caso que se empleó la [^3H]-timidina, la detección de los parásitos unidos a células HeLa se realizó cosechando el contenido de los pozos de las PMT en membranas de fibra de vidrio con una cosechadora de células (SKATRON, Instruments, Norway) y la emisión fue determinada como conteos por minutos (cpm), en un contador de centelleo líquido, empleando SCINTRAN (BDH Chemicals Ltd POOLE, England) como líquido de centelleo.

3.3.4 Optimización para la realización de la técnica ELISA.

Los pasos para la realización del ELISA fueron previamente optimizados para obtener la mayor sensibilidad. Los parámetros evaluados para optimizar la técnica fueron: tiempo de incubación con FIXDENAT (1/2 h y 1 h), bloqueo con concentraciones al 2,5% y 5% peso/volumen de albumina sérica bovina, leche descremada y caseína, tiempo de incubación con el conjugado (1/2 h, 1h, 2h) y tiempo de incubación con el sustrato (5min, 10 min, 15 min, 20 min y 30 min). Se realizaron además controles de fondo con los parásitos y las células sin marcar para conocer la unión inespecífica del anticuerpo conjugado.

3.3.5 Realización del ensayo con el estuche comercial “Cell Proliferation ELISA; BrdU colorimetric”.

Una vez optimizadas las condiciones se procedió a la realización del ensayo con el juego comercial. Primeramente se añadió el FIXDENAT (200 (L/pozo durante una hora a temperatura ambiente), reactivo que permite la destrucción del parásito (la desnaturalización es necesaria para permitir que la BrdU incorporada sea detectada por el anticuerpo anti BrdU), la fijación del ADN al fondo del pozo y su desnaturalización. Posteriormente la PMT se bloqueó con albúmina sérica bovina al 5% en solución salina tamponada con fosfato a razón de 200 (L/pozo durante una hora a 37(C. Posteriormente se adicionó el conjugado anti BrdU (100 (L/pozo) (anticuerpo anti BrdU levantado en ratón y conjugado con peroxidasa) y se incubó por 2 horas a 37(C . A continuación la PMT se lavó 3 veces con solución de lavado y se añadió el sustrato (100 (L/pozo de tetrametil-benzidina) y se incubó durante 15 min en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción fue detenida con H_2SO_4 1M (25 (L/pozo). La PMT fue incubada aproximadamente durante 1 min en un agitador y luego la absorbancia fue medida a 450nm (longitud de onda de referencia 690nm) en un lector de ELISA (Lab Systems, Finlandia).

3.3.6 Procesamiento estadístico.

Se establecieron curvas patrones para la densidad óptica y para los cpm contra el número de parásitos marcados con

el aislamiento C173. En cada caso la curva optimizada fue obtenida mediante dispersión gráfica y regresión lineal empleando el programa "Office Microsoft Excel 97" (Microsoft Corporation, USA). El número mínimo detectable de parásitos adheridos a células HeLa fue estimado introduciendo en la curva optimizada el valor de absorbancia o de cpm correspondiente a la media más dos veces la desviación estandar de seis réplicas del blanco. La repetibilidad y la reproducibilidad fueron evaluadas determinando el coeficiente de variación. La repetibilidad fue determinada ensayando tres veces cada punto de la curva y la reproducibilidad fue determinada ensayando cada curva en tres experimentos diferentes. El coeficiente de correlación fue calculado entre las curvas patrones obtenidas para ambos tipos de marcajes, empleando "Office Microsoft Excel 97" (Microsoft Corporation, USA).

Una vez comprobada la factibilidad del marcaje con BrdU se procedió a estudiar la adhesión de los 40 aislamientos incluidos en el presente estudio. Para cada aislamiento los valores de densidad óptica y el número de parásitos adheridos a células HeLa fueron interpolados en la curva patrón. La media resultante de tres réplicas por aislamiento en dos experimentos diferentes se empleó para obtener una media por grupo clínico. Estas medias fueron comparadas con ayuda del paquete estadístico "STATISTICA" (for Windows, Release 5.1, copyright Statsolt, Inc. 1984-1986), empleando la prueba de Kruskal-Wallis.

3.4 Ensayo de susceptibilidad *in vitro* al metronidazol

3.4.1 Diluciones del metronidazol:

Para la realización del ensayo se utilizó metronidazol en polvo (lote I- 01001101 China). A partir de una solución inicial de metronidazol de 80mg/mL en dimetil sulfóxido, se prepararon diluciones seriadas dobles, a partir de 400 (g/mL hasta 0,4(g/mL como concentración final.

3.4.2 Realización del ensayo.

El método empleado fue el descrito por Meingassner y Thurner en 1979: En placas estériles de 96 pozos (Corning, NY, USA) por duplicado, se aplicó 1(L de cada dilución de metronidazol, añadiendo posteriormente 99(L de medio de cultivo completo y 100(L de la suspensión parasitaria con una concentración de 1×10^5 parásitos/mL (Meingassner y Thurner, 1979). Los pozos de las hileras 11y 12 de cada placa fueron utilizados como controles, los cuales contenían medio de cultivo con igual concentracion parasitaria pero sin solución de metronidazol.

Estas placas por duplicado fueron incubadas en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, lo cual se logró incubando las placas en cámara húmeda y en jarra para cultivo anaeróbico respectivamente. Ambas placas se mantuvieron durante 48 horas a 37°C. Al cabo de este tiempo y con ayuda del microscopio invertido, las placas fueron examinadas para corroborar o no la presencia de parásitos en movimiento.

La menor concentración de metronidazol capaz de inhibir la motilidad del parásito fue considerada como la concentración inhibitoria mínima (CIM).

Luego del examen de cada pozo el contenido de cada uno de ellos correspondiente a la CIM (2 diluciones seriadas dobles, fue transferido a tubos de cultivo con medio de cultivo completo e incubados durante 7 días a 37°C. La menor concentración de la droga que no permitió el crecimiento parasitario en el cultivo se consideró la concentración letal mínima (CLM). Cada ensayo se repitió tres veces, en dos días diferentes.

3.5 Caracterización genética de aislamientos de *T. vaginalis* mediante la técnica de RAPD

3.5.1 Colección del material celular de aislamientos de *T. vaginalis* en el estudio.

Se realizaron siembras de los 40 aislamientos de *T. vaginalis* utilizando frascos de cultivo de 250mL al que se le añadieron 250mL de medio de cultivo TYI-S-33, incubándose a 37(C, hasta obtener la monocapa celular (entre 3 y 4 días). Una vez obtenida la monocapa se puso el frasco a 4(C durante 30 minutos con el objetivo de que se desprendiera la monocapa celular. Se pasó a un tubo de 50mL y se centrifugó a 8000g, durante 10 minutos. El sobrenadante se eliminó y el sedimento celular se resuspendió en 50 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1x (NaCl 0,1M, Na₂HPO₄ 0,05M, KCl 2mM y KH₂PO₄ 0,01M) pH 7.2-7.4 a 4(C y estéril. Se centrifugó a 8000g por 10 minutos. Al precipitado celular obtenido se le añadió 300 (L de PBS 1x a 4(C, estéril y de esa forma se conservó a -20(C.

3.5.2 Extracción y purificación del ADN de los aislamientos de *T. vaginalis* utilizando el método del fenol-cloroformo.

El precipitado celular de *T. vaginalis* conservado a -20(C en PBS 1x, fue centrifugado a 8000g durante 5 minutos. El precipitado se resuspendió en 300(L de buffer lisis (Tris HCl 50mM pH=8, EDTA 25mM, NaCl 25mM y SDS al 1%). La mezcla se trató durante 2 horas a 56(C con 100(g/mL de proteinasa K (Boehringer Mannheim). Seguidamente se realizó una extracción de proteínas con igual volumen (300 (L) de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25 :24 :1) y se centrifugó a 8000g por 10 minutos. A la fase acuosa se le agregó un volumen (300(L) de cloroformo-álcohol isoamílico (24 :1) y se centrifugó a 8000g por 10 minutos. Al sobrenadante se le añadieron dos volúmenes (600(L) de etanol frío y acetato de sodio 0,3 M pH 5.0 y se dejó precipitar durante 30 minutos a -20(C y se centrifugó a 10 000g durante 20 minutos a 4(C. El sobrenadante se desechó y el precipitado se lavó con etanol al 70% y se secó a temperatura ambiente para después resuspenderlo en 50(L de tampón TE (EDTA1mM y trisHCl 1mM pH=8). El ARN presente en la muestra se digirió con la adición de RNasa H 10(g/mL incubándose 1 hora a 37(C. Seguidamente se realizó una extracción empleando un volumen de cloroformo-álcohol isoamílico (24 :1). Se centrifugó a 8000g durante 10 minutos. La fase acuosa (sobrenadante) se conservó a -20(C (fracción que contiene el ADN extraído de *T. vaginalis*).

3.5.3 Calidad del ADN purificado.

La calidad del proceso de extracción del ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % en tampón tris-borato EDTA (TBE 0.5x) (tris-borato 0.045 M; EDTA 0.001 M) que contenía bromuro de etidium (0.5mg/mL). La muestra se preparó de la siguiente forma: A cada pozo se le añadió una mezcla de 12 (L compuesta por: 2 (L de bromofenol azul 6x (0.25 % de bromofenol azul, 0.25 % de xylene cyanol y 15 % de ficoll (Type 400), 2 (L de ADN muestra y 8 (L de TE 1x. Una vez añadida la muestra en cada carril se corrió a un voltaje constante de 150 V en la fuente (Pharmacia LKB Multidrive XL). La visualización se realizó en un transiluminador (2011 Macrovue LKB), donde se observaron los productos de la corrida.

3.5.4 Determinación de la concentración espectrofotométrica del ADN genómico aislado.

La cuantificación del ADN obtenido se realizó de forma espectrofotométrica determinando la absorción de la muestra a 260nm diluida en TE 1x.

La cuantificación se realizó teniendo en cuenta el principio que: $1 \text{ U } 260\text{nm} = 50 \text{ (g de ADN doble cadena)}$.

50 x dilución x D.O

Concentración de

ADN (g/L) 1000

Además de la lectura a 260nm se realizó la lectura a 280nm para la misma muestra constituyendo la relación de la absorbancia a 260nm/280 nm un criterio de pureza del ADN genómico. Se consideró muestras puras de ADN cuando la relación D.O. 260nm/280nm = 1,8-2,0 , si hay una contaminación de proteína o fenol la relación que se obtiene será significativamente menor.

3.5.5 Diseño de los cebadores al azar y síntesis de los mismos.

Se diseñaron al azar 10 cebadores de 12 bases (b) teniendo en cuenta algunos elementos importantes en la síntesis y los principios generales en el diseño de cebadores:

- Que no tengan secuencias palindrómicas.
- Contenido de G+C mayor que el 60 %.

Una vez diseñados los cebadores, se sintetizaron en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Ciudad de La Habana.

cebador	Secuencia al azar	PM	Conc cebador.	Ta*
		g/mol.	pmol/(L.	((C)
1	5´ CGC ACT CGG AGT 3´	5884.4	101.9	35
2	5´ TCG GCC GCT ATC 3´	5795.4	163.3	35
3	5´ CCG TGA CAC GCA 3´	5813.4	98	35
4	5´ GGG ACA CTC TGG 3´	5884.4	90	35
5	5´ CCG CTG TAC TCC 3´	5755.4	85.1	35
6	5´ GGG ACC TAC TGC 3´	5844.4	75.2	35
7	5´ GAG TCG CAC AGG 3´	5893.4	69.5	35
8	5´ TCC TCA CCG ACC 3´	5724.4	90.8	35
9	5´ CCC CAG TAC CAG 3´	5755.4	74.7	35
10	5´ AGG GCG TCG GTA 3´	5924.4	82.7	35

*La temperatura de alineamiento, se determinó para cada cebador según la siguiente fórmula:

$$T_m = 2 (A+T) + 4 (G+C) .$$

$$T_a = T_m - 5(C)$$

3.5.6 Optimización de la técnica de RAPD para estudios genéticos de aislamientos de *T. vaginalis*.

Para optimizar la técnica de RAPD, se probaron diferentes concentraciones de cebador sintético, de ADN molde y de Taq ADN polimerasa, manteniendo constante la cantidad de mezcla de dNTPs, el tampón de amplificación y las condiciones en el termociclador. La amplificación del ADN se realizó en un volumen final de 25(L que contenía 2.5(L de tampón de amplificación 10 x (tris-HCl 100 mM pH 8.3, MgCl₂ 15 mM, KCl 500 mM, gelatina 0,01 %) (Boehringer Mannheim, Germany), 200 (M de cada dNTP (Boehringer Mannheim, Germany) y se probaron diferentes cantidades de cebador (5 pmol, 10 pmol, 25 pmol, 50 pmol, 75 pmol) (oligonucleotidos sintéticos), de ADN molde a amplificar (5, 10, 25, 50, 75, 100 ng) y de Taq ADN polimerasa (0.5 U, 1 U, 1.5 U, 2.0 U, 2.5 U) (Boehringer Mannheim, Germany), para estimar las cantidades óptimas. Se incluyó un control negativo en cada ensayo, donde la mezcla de reacción contenía agua destilada estéril en lugar de ADN de *T. vaginalis*, con el objetivo de descartar cualquier contaminación. Posteriormente se procedió a efectuar la reacción, de acuerdo a reportes previos (Vanacova *et al*, 1997), en un termociclador (Perkin Elmer, USA) con el siguiente perfil de amplificación: desnaturalización inicial a 94 (C por 5 min, seguido de 40 ciclos de: desnaturalización a 94 (C por 1 min, hibridización a 35 (C por 1 min y extensión 72 (C por 2 min, con una extensión final después del último ciclo a 72 (C por 15 min. Para la detección del producto se analizaron 20 (L de cada mezcla resultante en electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %, preparado en tampón TBE 0.5 con bromuro de etidio 0,5 mg /mL. La visualización de los productos de amplificación se realizó mediante luz ultravioleta.

3.5.7 Análisis del polimorfismo genético.

Las bandas individuales se definieron como presentes o ausentes (1 ó 0) para cada aislamiento y el inverso del coeficiente de similitud de Jaccard (Sj, modificado por Sneath, 1957) fue usado como se cita a continuación (Sneath, 1957):

$S_j = 1 - a / (a + b + c)$ donde a representa el número de bandas compartidas, b representa el número de bandas presentes y c representa el número de bandas ausentes.

La relación filogenética fue determinada usando la estrategia de agrupaciones mediante el método de UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic averages) (Sneath y Sokal, 1973) usando el paquete de programas SYNTAX 5.0 (Ponadi, 1993). El dendograma se construyó basándonos en el análisis de los datos obtenidos con los diez cebadores (Tv-1 al Tv-10).

4. RESULTADOS

4.1 Frecuencia de la trichomonosis vaginal en el grupo estudiado.

Del total de las 575 adolescentes estudiadas, en 76 casos (13,2%) se encontró la presencia del parásito, de las cuales 18 fueron excluidas del estudio por presentar otros microorganismos en asociación con *T. vaginalis*. De las 58 restantes, 14 fueron clasificadas como asintomáticas, y 44 sintomáticas (13 leves, 15 moderadas y 16 severas).

Se axenizaron un total de 52 aislamientos (12 asintomáticos y 40 sintomáticos de estos 11, 13 y 16 fueron clasificados como leves, moderados y severos respectivamente). Se escogieron al azar 10 aislamientos por cada una de las 4 modalidades de acuerdo a la puntuación obtenida según la clasificación clínica (Ver tabla 1).

Tabla 1. Caracterización de 40 aislamientos de *T. vaginalis* según los hallazgos clínicos.

Código	Puntos	Clasificación Clínica	Presencia e intensidad de síntomas y signos
C91	0	Asintomático	-
C129	0	Asintomático	-
C175	0	Asintomático	-
C237	0	Asintomático	-
C239	0	Asintomático	-
C350	0	Asintomático	-
C353	0	Asintomático	-
C356	0	Asintomático	-
C358	0	Asintomático	-
C361	0	Asintomático	-
A59	5	Leve	Leucorrea blanca leve, eritema vaginal leve
A163	5	Leve	Leucorrea blanca leve, eritema vaginal leve
A170	5	Leve	Leucorrea blanca leve, eritema vaginal leve
A185	6	Leve	Leucorrea blanca leve, disuria moderada
C9	5	Leve	Leucorrea blanca leve, eritema vaginal leve
C12	8	Leve	Leucorrea verde moderada, dispareunia leve.
C15	5	Leve	Leucorrea verde leve
C98	7	Leve	Leucorrea moderada amarilla, eritema vaginal leve.
C334	6	Leve	Leucorrea verde moderada
C344	6	Leve	Leucorrea verde moderada
A5	13	Moderado	Leucorrea verde severa, eritema vulvar moderado y vaginal moderado
A42	14	Moderado	Leucorrea amarilla severa, disuria severa, eritema vulvar leve
A69	16	Moderado	Leucorrea verde severa, dispareunia severa, eritema vulvar leve
C76	10	Moderado	Leucorrea blanca leve, eritema cervical leve, vaginal moderado
C147	10	Moderado	Leucorrea verde leve, prurito leve, eritema vaginal moderado
C190	10	Moderado	Leucorrea verde leve, dispareunia moderada, eritema vaginal leve
C206	12	Moderado	Leucorrea verde leve, disuria leve, dispareunia moderada, eritema vaginal leve
C240	14	Moderado	Leucorrea amarilla leve, disuria severa, dispareunia severa, eritema vaginal leve
C247	12	Moderado	Leucorrea blanca severa, dispareunia moderada, eritema vaginal leve
C187	12	Moderado	Leucorrea blanca severa, dispareunia severa, eritema vaginal leve
A47	20	Severo	Leucorrea verde severa, prurito leve, disuria moderada, eritema vulvar leve
A66	18	Severo	Leucorrea verde severa, prurito leve, disuria severa, eritema vulvar moderado
C173	20	Severo	Leucorrea blanca severa, disuria severa, dispareunia severa, eritema vaginal moderado y vulvar leve
C308	20	Severo	Leucorrea amarilla severa, prurito leve, disuria severa, dispareunia moderada, eritema cervical leve y vaginal leve
C313	20	Severo	Leucorrea blanca leve, prurito leve, disuria severa, eritema vulvar severo y vaginal severo
C348	22	Severo	Leucorrea verde severa, prurito leve, disuria severa, eritema vulvar severo y vulvar leve.
C349	20	Severo	Leucorrea verde severa, dispareunia severa, eritema cervical leve y vulvar moderado
C351	19	Severo	Leucorrea verde severa, disuria severa, dispareunia severa, eritema vaginal leve
C352	20	Severo	Leucorrea amarilla severa, prurito leve, disuria severa, eritema vulvar severo
C355	20	Severo	Leucorrea verde moderada, dispareunia severa, disuria severa, eritema vaginal severo

El mejor procedimiento técnico para el diagnóstico de la trichomonosis vaginal fue el método de cultivo *in vitro*. Se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) entre la proporción de casos positivos diagnosticados por este método en comparación con el frotis directo simple del exudado vaginal (Tabla 2).

Tabla 2. Relación de la positividad a *T. vaginalis* por frotis directo simple del exudado vaginal y el cultivo *in vitro* del total de pacientes examinados (n=575). Total de casos positivos = 76 (13,2%).

Técnica empleada	Positividad	
	No.	%
Frotis directo simple	49	8,52
Cultivo	75	13,04

Se aplicó la prueba de comparación de proporciones, resultando $P < 0,05$.

A pesar de que no hubo diferencia significativa ($P > 0,05$) al aplicar la prueba de comparación de proporciones entre los diferentes tiempos de lectura a que fueron expuestos los cultivos, 48 horas resultó el tiempo ideal porque permitió en un menor tiempo la detección del 100% de los casos positivos (Tabla 3).

Tabla 3. Positividad de los cultivos de acuerdo con los diferentes tiempos de lectura.

	24 H	48 H	72 H
TOTAL POSITIVOS	71 (94,6%)	75 (100%)	75 (100%)
75			

Se aplicó la prueba de comparación de proporciones, resultando $P > 0,05$.

4.2 Resultados de la caracterización *in vivo*

La concentración ideal para lograr que el mayor número de animales llegara vivo y con lesiones cuantificables al día de sacrificio fue 8×10^6 parásitos en un mL. Con la concentración inferior (4×10^6 parásitos en un mL) no se pudo observar diferencias entre las lesiones provocadas por los aislamientos en los ratones en el tiempo establecido para su observación y con la concentración superior (10×10^6 parásitos/mL) los ratones morían en muy breve período de tiempo (Figura 1).

Figura 1. Mortalidad de ratones inoculados con diferentes concentraciones de *T. vaginalis* por vía intraperitoneal. Se inocularon 10 ratones por cada concentración parasitaria. Se utilizó el aislamiento C-76.

En ninguno de los grupos controles estudiados se encontraron alteraciones o cambios relacionados con las diferentes preparaciones inoculadas como controles (Ver figura 2 A).

De un total de 400 ratones inicialmente inoculados, con concentración parasitaria de 8×10^6 parásitos en un mL, 12 murieron (2, 4 y 6 de los grupos de sintomáticos leves, moderados y severos respectivamente) y no pudieron ser analizados por su estado de descomposición, por lo que se estudiaron un total de 388 ratones. Al realizar la disección, se observó una gama de lesiones que fueron desde un absceso en la superficie de las vísceras hasta la destrucción total del parénquima (Figura 2 B). Se encontró la presencia de líquido ascítico (Figura 2 C) en la mayoría de los ratones examinados.

Figura 2. Se muestran los órganos de la cavidad abdominal de los ratones inoculados con diferentes aislamientos de *T. vaginalis*. A) Ratón perteneciente al grupo control. No se observan alteraciones en las visceras. B) Ratón inoculado con aislamiento del grupo sintomático moderado. Se observa aumento de volumen de las asas intestinales y abscesos en el pancreas. C) Presencia de líquido ascítico, lo cual fue encontrado en la mayoría de los ratones inoculados.

En la figura 3 se muestran las medias aritméticas de los valores obtenidos por los aislamientos de acuerdo a las lesiones producidas en cada ratón, teniendo en cuenta los criterios de puntuación empleados para evaluar las alteraciones y daños en cada animal. En todos los parámetros analizados pudo comprobarse la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,0001$) entre las lesiones provocadas en los animales de experimentación de acuerdo al tipo de aislamiento inoculado.

Figura 3. Media aritmética y desviación estandar de la puntuación obtenida por los aislamientos de cada grupo clínico en dependencia del tipo de lesión provocada en los órganos de los ratones inoculados. Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, para comparar las medias aritméticas en cada órgano analizado ($P < 0,0001$).

cvd: cara visceral del diafragma

cpd: cara parietal del diafragma.

Al analizar las medias aritméticas y desviaciones estándares de la puntuación total obtenida en los modelos experimentales de acuerdo a la categoría clínica de los aislamientos, se pudo observar mediante la aplicación de la prueba de Kruskal-Wallis que hubo diferencias significativas ($P < 0.0001$) entre las puntuaciones alcanzadas por cada grupo en dependencia del tipo de aislamiento (Tabla 4).

Tabla 4. Media aritmética y desviación estándar de la puntuación total obtenida por los aislamientos de cada grupo clínico en dependencia del tipo de lesión provocada en los órganos de los ratones inoculados.

Clasificación de los aislamientos	Puntuación obtenida en los modelos experimentales †	
	No. total de ratones examinados	X (± DE)
Asintomáticos	100	5.2 (3.54)
Sintomáticos Leves	98	9.2 (4.54)
Sintomáticos Moderados	96	13.3 (5.90)
Sintomáticos Severos	94	22.1 (6.36)

† Se utilizaron 10 aislamientos por cada categoría clínica y se inocularon 10 ratones por cada aislamiento.

$P < 0.0001$. (Prueba de Kruskal-Wallis aplicada a las medias aritméticas y su DE).

4.3 Resultados de la caracterización *in vitro*.

4.3.1 Optimización de la técnica ELISA para medir citoadherencia

Las condiciones óptimas seleccionadas para la realización de la técnica ELISA fueron las siguientes: 60 minutos como el tiempo de incubación de la PMT con el FIXDENAT, bloqueo al 5% con la albumina sérica bovina y 120 y 60 minutos como el tiempo de incubación con el conjugado y el sustrato respectivamente.

El tiempo óptimo de incubación para lograr la máxima incorporación de la BrdU a los parásitos fue de 16 horas a 37°C, utilizando la BrdU a concentración final de 10 (M (Figura 4).

Figura 4. Optimización del tiempo de incubación con BrdU para el marcaje de los parásitos.

La curva cuantitativa optimizada para la detección de los parásitos marcados con BrdU se muestra en la figura 5 A. El límite de detección se estimó en 914 parásitos. La repetibilidad fue del 2.65% (0.5%-4.8%) y la reproducibilidad fue de 3.8% (1.3%-6.3%) (Tabla 5). Para los parásitos marcados con [³H]-timidina el límite de detección se estimó en 1247 parásitos (Figura 5 B). La repetibilidad fue del 4.5% (2.2%-6.8%) y la reproducibilidad del 6.15% (2.5%-9.8%) (Tabla 5).

Figura 5. Curvas optimizadas para la cuantificación de los parásitos en los ensayos de adhesión. A: parásitos marcados con BrdU y detectados mediante un ELISA. B: parásitos marcados con $[^3\text{H}]$ -timidina y detectados mediante espectroscopía de centelleo.

Tabla 5. Límite de detección, repetibilidad y reproducibilidad para ambos procedimientos de marcaje.

	BrdU	(^3H) -Timidina
Límite de detección.	914 parásitos	1247 parásitos
Repetibilidad (Coeficiente de Variación)	2.6% (0.5%- 4.8%)	4.5% (2.2%- 6.8%)
Reproducibilidad. (Coeficiente de Variación)	3.8% (1.3%-6.3%)	6.1% (2.5%-9.8%)

En la figura 6 se muestra la correlación entre diferentes concentraciones parasitarias adheridas a células HeLa marcadas indistintamente con BrdU y $[^3\text{H}]$ -timidina: Se observan dos curvas muy similares cuando se utilizan uno u otro marcador arrojando un índice de correlación de 0,97 ($R=0,97$) lo cual habla a favor de la posible utilización de este método.

Figura 6. Correlación entre las curvas patrones obtenidas para la cuantificación de la adhesión de los parásitos a las células HeLa marcados indistintamente con BrdU y $[^3\text{H}]$ -timidina. El coeficiente de correlación calculado fue de 0.97.

Al correlacionar el número de parásitos que permanecen adheridos a las células HeLa, marcados indistintamente con BrdU y con $[^3\text{H}]$ -timidina, para lo cual se emplearon un total de 17 aislamientos de *T. vaginalis*, el coeficiente de correlación obtenido fue de un valor de 0,97 (Figura 7).

Figura 7. Correlación entre el número de parásitos marcados con $[^3\text{H}]$ -timidina, que permanecen unidos a la monocapa de células HeLa y los resultados de los ensayos de adhesión cuando se empleó BrdU para el marcaje (0,97). Se emplearon 17 aislamientos de *T. vaginalis* obtenidos de adolescentes asintomáticas y sintomáticas.

Después de correlacionar los resultados de los ensayos de adhesión empleando parásitos marcados con BrdU con los resultados de los ensayos empleando parásitos marcados con $[^3\text{H}]$ -timidina se pudo comprobar que la BrdU fue incorporada al ADN parasitario.

4.3.2 Resultados obtenidos en el ensayo de adhesión utilizando los 40 aislamientos:

Los valores de densidad óptica obtenidos para cada uno de los aislamientos fueron interpolados en la curva patrón de absorbancia, obteniendo un aproximado de la cantidad de parásitos adheridos a las células HeLa por cada aislamiento. La media resultante de 3 réplicas por aislamiento en 2 experimentos realizados en diferentes momentos permitió obtener una media por grupo clínico lo cual fue comparado con ayuda del paquete estadístico ESTADISTICA y empleando la prueba de Kruskal-Wallis.

Se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) entre la adhesión a células HeLa de los diferentes grupos de aislamientos, demostrando mayor grado de adherencia celular en dependencia del mayor nivel de sintomatología clínica (Figura 8).

Figura 8. Adhesión de los 40 aislamientos de *T. vaginalis* a monocapas de células HeLa después de 30 min de incubación. Se representa el número de parásitos adheridos por cada aislamiento según el grupo clínico. El grupo 1 se corresponde con aislamientos asintomáticos y los grupos 2, 3 y 4 con aislamientos sintomáticos leves, moderados y severos respectivamente.

4.4 Resultados de los ensayos de susceptibilidad *in vitro* al metronidazol

En condiciones anaeróbicas todos los aislamientos mostraron susceptibilidad al metronidazol. En condiciones aeróbicas todos los aislamientos excepto el C-352 y el C-240 resultaron susceptibles al metronidazol. El valor de CIM igual a 50(g/mL para el aislamiento C-352, indica una disminución de la susceptibilidad al metronidazol. El valor de CIM igual a 200(g/mL para el aislamiento C-240, lo identifica como francamente resistente al metronidazol (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados del ensayo de susceptibilidad *in vitro* al metronidazol

Aislamiento	Condiciones Anaeróbicas		Condiciones Aeróbicas	
	CIM* ((g/mL)	CLM** ((g/mL)	CIM* ((g/mL)	CLM** ((g/mL)
o				
A47	6,3-6,3	6,3-6,3	12,5-12,5	12,5-12,5
A66	6,3-6,3	6,3-6,3	12,5-12,5	12,5-12,5
C147	0,8-0,8	0,8-0,8	1,6-1,6	1,6-1,6
C15	3,1-3,1	3,1-3,1	3,1-3,1	3,1-3,1
A69	6,3-12,5	6,3-12,5	12,5-12,5	12,5-12,5
A185	3,1-3,1	3,1-3,1	3,1-3,1	3,1-3,1
C9	1,6-3,1	1,6-3,1	6,3-6,3	3,1-6,3
C76	1,6-3,1	1,6-3,1	6,3-6,3	3,1-6,3
C12	3,1-3,1	3,1-3,1	3,1-3,1	1,6-3,1
C98	0,8-0,8	0,8-0,8	3,1-3,1	1,6-3,1
A5	6,3-6,3	6,3-6,3	12,5-12,5	12,5-12,5
C129	3,1-3,1	3,1-3,1	3,1-3,1	1,6-3,1
C91	0,8-0,8	0,8-0,8	1,6-1,6	1,6-1,6
A170	1,6-1,6	0,8-1,6	3,1-3,1	3,1-3,1
A42	6,3-12,5	6,3-12,5	12,5-12,5	12,5-12,5
C76	3,1-3,1	1,6-3,1	3,1-6,3	3,1-6,3
A59	0,8-0,8	0,8-0,8	1,6-1,6	1,6-1,6
C173	6,3-6,3	6,3-6,3	12,5-12,5	12,5-12,5
C175	3,1-3,1	3,1-3,1	3,1-6,3	3,1-3,1
C187	1,6-1,6	0,8-1,6	3,1-3,1	3,1-3,1
C190	1,6-1,6	1,6-1,6	1,6-1,6	1,6-1,6
C206	3,1-3,1	3,1-3,1	3,1-6,3	3,1-6,3
C237	3,1-3,1	3,1-3,1	3,1-3,1	1,6-3,1
C239	1,6-3,1	1,6-3,1	6,3-6,3	3,1-6,3
C240	6,3-12,5	6,3-12,5	200-200	200-200
C247	1,6-3,1	1,6-3,1	3,1-3,1	3,1-3,1
C308	1,6-1,6	1,6-1,6	1,6-3,1	1,6-3,1
C313	0,8-0,8	0,8-0,8	1,6-1,6	1,6-1,6
C334	6,3-12,5	6,3-12,5	12,5-12,5	12,5-12,5
C344	6,3-12,5	6,3-12,5	6,3-12,5	6,3-12,5
C348	3,1-6,3	3,1-6,3	6,3-6,3	6,3-6,3
C349	3,1-3,1	1,6-3,1	3,1-6,3	3,1-6,3
C350	3,1-12,5	3,1-12,5	12,5-12,5	12,5-12,5
C351	3,1-6,3	3,1-6,3	6,3-6,3	6,3-6,3
C352	3,1-3,1	1,6-3,1	50-50	50-50
C353	3,1-3,1	3,1-3,1	3,1-3,1	1,6-3,1
C355	3,1-6,3	3,1-6,3	3,1-6,3	3,1-6,3
C356	3,1-6,3	3,1-6,3	3,1-6,3	3,1-6,3
C358	3,1-6,3	3,1-6,3	6,3-6,3	3,1-6,3
C361	6,3-12,5	6,3-12,5	12,5-12,5	12,5-12,5

4.5 Resultados de la caracterización genética de aislamientos.

4.5.1 Optimización de la técnica de RAPD.

Las figuras 9, 10 y 11 muestran las variaciones en los patrones de amplificación obtenidos en cada caso utilizando el cebador TV-1 y el aislamiento de *T. vaginalis* A₆₉.

En la figura 9 se muestra que al variar las cantidades del cebador y manteniendo constantes las

concentraciones del resto de los componentes de la reacción, se observa una relación entre la concentración del cebador y la talla del producto. A altas concentraciones de cebador se generan pequeños fragmentos (menos de 500 pb), mientras que a concentraciones más bajas se amplifican fragmentos adicionales más grandes. Por eso establecimos 25 pmol en 25 (L de volumen total de la reacción como la concentración óptima del cebador, para la cual aparece el mayor número de bandas con la mayor intensidad.

1 2 3 4 5 6 7

Figura 9 : Patrones de bandas de RAPD obtenidos de un aislamiento de *T. vaginalis* (A₆₉) al variar la concentración del cebador sintético (TV-1) en presencia de 2.5 U de Taq ADN polimerasa y 10 ng de ADN molde. Carril 1, Marcador de Peso Molecular IV (Boehringer Mannheim, Germany); Carril 2, 5 pmol ; Carril 3, 10 pmol ; Carril 4, 25 pmol ; Carril 5, 50 pmol ; Carril 6, 75 pmol ; Carril 7, Control Negativo.

A una concentración de 5 ng de ADN molde, la cantidad e intensidad de los productos de amplificación fue baja por lo cual se incrementó hasta 10 ng. Esta concentración se estableció como óptima de ADN molde, pues cuando se continuó aumentando por encima de 10 ng, de forma progresiva aparecieron menos productos de amplificación (Figura 10)

1 2 3 4 5 6 7 8

Figura 10. Patrones de bandas de RAPD obtenidos de un aislamiento de *T. vaginalis* (A₆₉) al variar la concentración del ADN molde en presencia de 2.5 U de Taq ADN polimerasa y 25 pmol de cebador TV-1. Carril 1, Marcador de Peso Molecular IV (Boehringer Mannheim, Germany); Carril 2, 5 ng ; Carril 3, 10 ng ; Carril 4, 25 ng; Carril 5, 50 ng ; Carril 6, 75 ng ; Carril 7, 100 ng; Carril 8, Control Negativo.

En cuanto a la concentración de la Taq ADN polimerasa (Figura 11) observamos diferencias en los patrones de amplificación al aumentar su concentración hasta 2 U, valor a partir del cual se mantiene sin modificación dicho patrón. Esta concentración fue seleccionada como concentración óptima de la enzima para el estudio al mostrar el mayor número de bandas con la mayor intensidad y con la menor cantidad de enzima.

1 2 3 4 5 6 7

Figura 11. Patrones de bandas de RAPD obtenidos de un aislamiento de *T. vaginalis* (A₆₉) al variar la concentración de la Taq ADN polimerasa en presencia de 10 ng de ADN molde y 25 pmol de cebador TV-1. Carril 1, Marcador de Peso Molecular IV (Boehringer Mannheim, Germany); Carril 2, 0.5 U; Carril 3, 1.0 U; Carril 4, 1.5 U; Carril 5, 2.0 U; Carril 6, 2.5 U; Carril 7, Control Negativo

En el control negativo, que contiene todos los componentes de la reacción del RAPD excepto el ADN molde, no se observó ninguna banda de amplificación. Esta observación indica que no hubo contaminación en el ensayo.

De la misma forma se comportaron los parámetros analizados anteriormente cuando se utilizaron otros cebadores sintéticos (TV-2 y TV-3) y el aislamiento de *T. vaginalis* A₆₉, aunque, como era de esperar, el patrón de bandas amplificadas a analizar es diferente para cada uno de ellos (datos no mostrados)

La reproducibilidad pudo ser confirmada utilizando las condiciones optimizadas del RAPD con 4 diferentes aislamientos de *T. vaginalis* repetidos tres veces en días diferentes. Como se muestra en la figura 12, los patrones obtenidos por la repetición del RAPD en cada aislamiento utilizando el cebador TV-1 resultaron idénticos, esto demostró la alta reproducibilidad del método optimizado. Resultados similares se obtuvieron al analizar otros cebadores sintéticos (TV-2 y TV-3) (datos no mostrados).

Figura 12. Patrones de bandas de RAPD obtenidos para cuatro aislamientos de *T. vaginalis* repetidos tres veces en diferentes días utilizando las condiciones óptimas. Carril 1, Marcador de Peso Molecular IV (Boehringer Mannheim, Germany); Carril 2-4, Aislamiento A₅₉; Carril 5-7, Aislamiento C₁₄₇; Carril 8-10 Aislamiento C₇₆; Carril 11-13, Aislamiento A₆₉.

Resumen de la condiciones optimizadas.

Taq ADN polimerasa	2.0 U	
(Boehringer Mannheim)		
Buffer de la Taq ADN polimerasa	1x	
Cebador	25 pmoles	
Mezcla dNTPs	200 (M)	

MgCl ₂	1.5 mM	
ADN molde	10 ng	
Volumen final	25 (L	

4.5.2 Caracterización genética de los aislamientos.

Para determinar la variabilidad genética entre los 40 aislamientos de *T. vaginalis* se probaron diez cebadores. Todos los cebadores produjeron patrones distinguibles y reproducibles de fragmentos de ADN amplificados (Figura 13).

pb MM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27
28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41

pb MM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41

pb MM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27
28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41

pb MM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26
27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41

pb MM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41

pb MM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41

pb MM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26
27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41

pb MM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26
27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41

pb MM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27
28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41

pb MM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40

Figura 13. Patrones de ADN polimórfico amplificado al azar generados por los cebadores Tv-1, Tv-2, Tv-3, Tv-5, Tv-6, Tv-7, Tv-8, Tv-9, Tv-10 de 40 aislamientos de *T. vaginalis*. Carril MM: Marcador de Peso Molecular IV (Boehringer Mannheim, Germany), Carril: 1- 40: Aislamientos C91, C129, C175, C237, C239, C350, C353, C358, C356, C361, A59, A163, A170, A185, C9, C12, C15, C98, C334, C344, C76, A69, A42, C240, C206, C187, C247, C190, C147, CA5, A66, C308, C173, C355, C352, C351, C348, C349, C313, A47, Carril 41: Control Negativo.

De las 124 bandas reproducibles generadas por estos diez cebadores, 117 mostraron polimorfismo entre los 40 aislamientos analizados y solo 7 se encontraron presentes en todos los aislamientos. El dendograma basado en la distancia genética de Jaccard fue construido a partir de los datos de RAPD para indicar la relación filogenética entre los aislamientos (Figura 14).

Figura 14. Dendograma obtenido por el análisis de UPGMA según el Coeficiente de Similitud de Jaccard a partir de los datos de RAPD de 40 aislamientos de *T. vaginalis*. Línea discontinua: valor de corte.

En todos los casos se muestra el polimorfismo entre los aislamientos y los marcadores genéticos específicos para cada grupo.

Cuatro grupos genéticamente distinguibles fueron obtenidos: Uno de ellos agrupa a todos los aislamientos de pacientes asintomáticos referidos según la clínica. Los otros tres se corresponden con los aislamientos de pacientes sintomáticos que quedaron distribuidos en 3 grupos genéticamente distinguibles. Se muestra una correlación con la clasificación clínica realizada a las pacientes teniendo en cuenta los síntomas y signos que permitieron la separación

de los aislamientos de pacientes en 4 grupos (asintomáticos y sintomáticos leves, moderados y severos) (Tabla 7).

Tabla 7. Marcadores genéticos de RAPD obtenidos en la caracterización de los aislamientos, según el grupo clínico de las pacientes.

No. de aislamiento según grupo clínico	Análisis RAPD	Marcadores genéticos de RAPD	
Grupo asintomático	Grupo 1		
C91	C91		
C129	C129		
C175	C175	702 pb	Tv-1
C237	C237	421 pb	Tv-3
C239	C239	3027 pb	Tv-3
C350	C350	1400 pb	Tv-9
C353	C353		
C358	C358		
C356	C356		
C361	C361		
Grupo leve	Grupo 2		
C15	C15	1724 pb	Tv-3
C334	C334	700 pb	Tv-4

C344	C344	963 pb	Tv-1	
C98	C98	389 pb	Tv-6	
C12	C12	421 pb	Tv-6	
C9	C9	480 pb	Tv-6	
A59	A59	1723 pb	Tv-7	
A170	A170	2630 pb	Tv-7	
A163	A163	605 pb	Tv-9	490
A185	A185			pb
				Tv-5
Grupo Moderado	Grupo 3			
A5	A5	2418 pb	Tv-3	
C147	C147	516 pb	Tv-4	
C190	C190	811pb	Tv-4	
C247	C247	1000 pb	Tv-4	
C187	C187	628 pb	Tv-6	
C206	C206	1685 pb	Tv-6	
C240	C240	2690 pb	Tv-6	
C76	C76	754 pb	Tv-7	
A42	A42	1489 pb	Tv-8	
A69	A69			
Grupo Severo	Grupo 4	1231 pb	1489 pb	
A47	A47	Tv-2	Tv-8	
C313	C313	534 pb	2320 pb	
C349	C349	Tv-3	Tv-8	
A66	A66	1360 pb	2690 pb	
C348	C348	Tv-3	Tv-8	
C351	C351	421 pb	720 pb	
C352	C352	Tv-4	Tv-9	
C355	C355	773 pb	925 pb	
C173	C173	Tv-4	Tv-9	
C308	C308	495 pb	1020 pb	
		Tv-6	Tv-9	
		690 pb	1493 pb	
		Tv-7	Tv-10	
		895 pb	1587.3 pb	
		Tv-6	Tv-10	
		2915 pb		
		Tv-7		

Marcadores genéticos específicos de RAPD aparecieron en cada uno de los 4 grupos obtenidos, estos se observan en todos los aislamientos de un mismo grupo y no se encuentran en el resto de los aislamientos analizados. Los aislamientos agrupados genéticamente que se correlacionan con el grupo de aislamientos asintomáticos presentaron 4 marcadores genéticos específicos, 9 en cada uno de los grupos sintomáticos leves y sintomáticos moderados y 17 en el grupo de sintomáticos severos como se observa en la Tabla 7.

La amplificación de productos de RAPD con el cebador Tv-5, mostró una banda específica de 490pb que aparece en todos los aislamientos sintomáticos y no se amplifica en ninguno de los aislamientos asintomáticos.

5. DISCUSION

Las ITS, diferentes al VIH/SIDA representan también un serio problema de salud pública. La situación específica de infecciones producidas por *T.vaginalis* no ha sido estudiada con profundidad en nuestro medio y los resultados que aportan las publicaciones internacionales muestran que no se ha logrado un concreto y completo estudio del comportamiento epidemiológico de la trichomonosis en la sociedad en general. Cuando se analizan las tasas de prevalencia de las ITS de acuerdo a los diferentes grupos de edades, los adolescentes ocupan los más altos índices de riesgo de contraer estos tipos de infecciones. Estas enfermedades en los Estados Unidos representan un significativo problema de salud en este grupo poblacional y se consideran una importante causa de morbi-mortalidad. Anualmente a nivel mundial 2,5 millones de adolescentes contraen ITS entre las cuales la trichomonosis vaginal ocupa un importante lugar (Krowchuk, 1998).

Consideramos que el asesoramiento de los jóvenes en temas relacionados con las ITS debe estar dirigido fundamentalmente a insistir en lo importante que resulta disminuir la exposición y reducir la eficacia de la transmisión de estas infecciones. Estos dos factores son considerados de primer orden a tener en cuenta en la prevención de estas enfermedades.

Para nosotros resultó importante conocer que en el grupo de adolescentes estudiadas se encontrara una frecuencia de trichomonosis de un 13,2%. Esta cifra es muy parecida a la reportada por Krowchuk en 1998, quien en una revisión sobre agentes etiológicos de las ITS, informó tasas de infección entre 8 y 16% para *T. vaginalis* en adolescentes femeninas sexualmente activas (Krowchuk, 1998). Coincide además con el reporte realizado por Ohlemeyer *et al.*, en ese mismo año, quienes encontraron que en 467 adolescentes estudiadas, el 15,6% resultaron positivas a infección por *T. vaginalis* (Ohlemeyer *et al.*, 1998).

El método más común para el diagnóstico de la trichomonosis vaginal se basa en la observación microscópica del protozoo por frotis directo simple del exudado vaginal. Este método es el más conveniente desde el punto de vista del costo- efectividad diagnóstica, pero está lejos de ser el procedimiento óptimo en términos de confiabilidad debido a su baja sensibilidad. El método de cultivo *in vitro* está considerado como la "regla de oro" para estos fines, lo que fue confirmado por nuestros resultados pues a través de este procedimiento se detectó el mayor número de casos positivos a *T. vaginalis*.

El método utilizado para la clasificación clínica de aislamientos del parásito propuesto por Garber y Lemchuk-Favel (Garber y Lemchuk-Favel, 1990) y modificado por nuestro grupo de trabajo, demostró ser útil, aportando un análisis integral de la sintomatología de la infección. Este procedimiento pudiera ser utilizado en estudios futuros donde se requiera este tipo de análisis.

Con la finalidad de medir la virulencia *in vivo* de aislamiento de *T. vaginalis* se ha utilizado la infección experimental en ratones por inoculación extravaginal del parásito, utilizando las vías subcutáneas e intraperitoneal. Los resultados en cuanto a cual de las dos vías es la más útil son controversiales. En nuestro estudio escogimos la vía intraperitoneal teniendo en consideración que aporta un mayor grado de información relacionada con las lesiones de órganos y cavidades adyacentes, en lugar de una inoculación más superficial en la piel (vía subcutánea), que solo aporta información muy localizada (Cavier *et al.*, 1972; Toyos, 1974; Escario *et al.*, 1995; Nogal *et al.*, 1997; Gómez-Barrio *et al.*, 2002).

El hecho de no haber encontrado alteraciones o cambios en los grupos controles habla a favor de que las alteraciones y daños encontrados en la cavidad abdominal de los ratones inoculados fueron resultado de la acción directa del parásito, que fue capaz de colonizar y sobrevivir en la cavidad; lo que fue confirmado por la observación microscópica del parásito en las lesiones. La inyección de parásitos utilizando medio sin suero fue para facilitar la acción de las proteasas que desenmascaran las adhesinas localizadas sobre la superficie de los mismos, las cuales le

permiten unirse a las células del huésped (Arroyo y Alderete, 1989).

La concentración parasitaria ideal fue del orden de 8×10^6 parásitos/mL, con lo que logramos que el mayor número de animales llegara vivo al día del sacrificio. Cavier *et al.*, emplearon inóculos del orden de 1×10^6 con el gran inconveniente de tener que extender sus ensayos hasta tres semanas después de haber iniciado el mismo (Cavier *et al.*, 1972). Gold, en sus experimentos utiliza inóculos con un número de parásitos del orden de 10×10^6 , y también sacrifica los animales al séptimo día (Gold, 1993). En nuestra experiencia, esta concentración parasitaria por inóculo no resultó útil debido a la gran cantidad de animales que mueren antes del día designado para el sacrificio.

El curso de la infección provocada en el animal de experimentación después de la inoculación intraperitoneal de *T. vaginalis* puede variar con la virulencia de la cepa parasitaria empleada y con la susceptibilidad del modelo animal. Algunas veces la infección no es fatal, en otras ocasiones los animales pueden morir antes que la lesión esté completamente desarrollada, otras veces las lesiones están limitadas o no se extienden demasiado, ni tampoco aparecen en varios órganos al mismo tiempo (Kulda, 1990).

Los cambios histopatológicos que acompañan una infección intraperitoneal por *T. vaginalis* en ratones pueden ser básicamente divididos en tres tipos, reflejando la virulencia de la cepa utilizada. Según Kulda (Kulda, 1990), en los ratones inoculados con cepas altamente virulentas, predominan los cambios inflamatorios exudativos, la invasión de órganos abdominales se presentará con necrosis y la delimitación de las lesiones resultará muy pobre haciéndose extensiva e invadiendo zonas en contacto con los tejidos del huésped. Los cambios patológicos provocados por cepas de moderada virulencia, están asociados con una producción de exudado fibrinopurulento, los órganos abdominales son invadidos, pero la extensión de las lesiones estará limitada, la peritonitis puede ser la causa de muerte. Las infecciones con cepas de baja virulencia, son caracterizadas por una exudación mínima, puede existir invasión a órganos pero cuando aparece, es mínima. El autor sugiere que en este tipo de infección los parásitos pueden persistir encapsulados en la lesión por algunas semanas.

En nuestros experimentos encontramos resultados muy parecidos a los planteados por Kulda (Kulda, 1990), pues aunque en magnitudes diferentes en los cuatro grupos de ratones fue posible encontrar algún tipo de lesión en los órganos de la cavidad abdominal provocada por la inoculación de aislamientos de los parásitos. La intensidad de las lesiones provocadas en el animal parecen estar relacionadas con la virulencia de cada aislamiento. Estos resultados también coinciden con los obtenidos recientemente por Gómez-Barrio *et al.*, quienes encontraron una amplia variabilidad de lesiones provocadas en las vísceras abdominales en los ratones de experimentación. Ellos también encontraron relación entre la magnitud de la lesión y la posible virulencia de los aislamientos inoculados (Gómez-Barrio *et al.*, 2002); aunque ambos utilizaron un menor número de aislamientos que nosotros.

Nuestros resultados demuestran una buena correlación entre el daño producido por los aislamientos de *T. vaginalis* en los ratones, de acuerdo a la clasificación clínica de las pacientes de las cuales fueron obtenidos los aislamientos.

Trichomonas vaginalis infecta el epitelio escamoso del tractus genital. El mecanismo exacto por el cual parásito los tejidos y produce enfermedad no se conoce con exactitud. Algunos autores coinciden en que la adhesión del parásito a las células epiteliales vaginales constituye el paso inicial y prácticamente un requisito indispensable para el desarrollo de la infección (Heat, 1981; Alderete y Pearlman, 1984; Alderete y Garza, 1985; Krieger *et al.*, 1985; González *et al.*, 1995; Alderete y Garza, 1998).

Beachey en 1990 planteó que la adhesión es un proceso esencial para la colonización y persistencia del patógeno (Beachey, 1990). Ese mismo año, fue demostrado que la adhesión facilita importantes funciones como la citotoxicidad y que además provee una superficie para la realización de la división celular (Honigber, 1990).

Se ha planteado que líneas celulares como HeLa, MDCK y cultivos de células humanas del epitelio vaginal pueden ser parasitadas por trofozoitos de *T. vaginalis*, lo cual ha permitido utilizarlas en ensayos para medir interacción con los parásitos (Alderete *et al.*, 1998).

Alderete *et al.*, demostraron que el parásito reconoce y se une a las células HeLa, de un modo similar o idéntico al que se ha descrito con cultivos primarios de células epiteliales vaginales (CEV). Desde entonces, el modelo de la unión de *T. vaginalis* a las células HeLa ha sido ampliamente empleado por los investigadores y ha permitido conocer y profundizar en los mecanismos de unión del parásito a las células hospederas (Alderete *et al.*, 1998). En todos los casos se sugirió que el efecto patogénico del parásito sobre cultivos celulares puede ser por contacto directo o por la liberación de ciertos componentes como son las proteasas y glicosilasas encontradas en extractos del parásito y que juegan un papel importante en la modulación de la interacción de *Trichomonas* con las células epiteliales. La adición de inhibidores de proteasas al medio de incubación reduce la destrucción de las células epiteliales por *T. vaginalis*, lo que demuestra la importancia de las proteasas en este proceso. Esta interacción también depende del tiempo, de la temperatura y del pH (Arroyo *et al.*, 1992).

En los ensayos *in vitro* para medir citoadhesión, se hace necesario el marcaje de los parásitos, para diferenciarlos del tipo celular empleado. Generalmente, se utiliza el marcaje radioactivo de los parásitos con ^3H -timidina (Alderete y Garza, 1985) o con ^{35}S -metionina (Krieger *et al.*, 1990). El empleo de este tipo de marcaje posee algunas desventajas, como por ejemplo, los problemas inherentes a la manipulación de radioisótopos, el requerimiento de equipamiento especializado y el elevado costo económico. Estos problemas, nos llevaron a la búsqueda de alternativas no radioactivas que nos permitieran realizar estos ensayos.

Varios autores han demostrado que *T. vaginalis*, para su crecimiento necesita uridina, además de otros nucleótidos (Linstead, 1981; Heyworth *et al.*, 1984).

Posteriormente Harris *et al.*, postularon que *T. vaginalis* contiene dos transportadores diferentes para los nucleótidos: Un transportador que se cree que acomoda adenosina y nucleósidos de pirimidina, mientras el otro muestra alta afinidad por la uridina y posee un sitio separado para el transporte de guanosina (Harris *et al.*, 1988). Todo esto nos hizo pensar en la posibilidad de poder utilizar la BrdU para el marcaje de *T. vaginalis* en ensayos de adhesión, la cual quedaría incorporada a las células en proliferación durante la síntesis de ADN y nos permitiría estudiar la citoadhesión sin necesidad de utilizar isotopos radioactivos.

Nuestros resultados demuestran que la BrdU fue incorporada por *T. vaginalis* y esto permitió la detección y cuantificación de los parásitos que permanecen adheridos a la monocapa de células HeLa. Una vez optimizado el marcaje con 5-bromo-2'-deoxiuridina y la detección posterior de los parásitos unidos a células HeLa, mediante la realización de un ensayo inmunoenzimático sobre fase sólida (ELISA) cuantitativo, se procedió a estudiar si existía relación entre los resultados de los ensayos de adhesión y la presentación clínica de los 40 aislamientos del parásito.

Alderete *et al.*, no encontraron interrelación entre la adhesión de los parásitos a CEV con la leucorrea y el grado de inflamación pélvica presente en 8 de las 60 pacientes analizadas. Estos ensayos se llevaron a cabo contando los parásitos unidos a células epiteliales vaginales por campos microscópicos, lo cual resulta poco confiable por el grado de subjetividad que incluye esta forma de conteo visual de los parásitos adheridos a células. (Alderete, 1988).

Posteriormente, Krieger *et al.*, tampoco detectaron interrelación entre el grado de adhesión de los parásitos y las manifestaciones clínicas, empleando parásitos marcados con ^{35}S -metionina y células HeLa como modelo de CEV. En este trabajo solo se valoraron como síntomas clínicos, la presencia de leucorrea o de eritema en un pequeño número de aislamientos (Krieger *et al.*, 1990).

Gilber *et al.*, demostraron que los aislamientos de *T. vaginalis* provenientes de pacientes

asintomáticos o con vaginitis fueron capaces de destruir las CEV. Ellos consideraron que en mayor o menor grado esta acción es favorecida no solo por una producción diferencial de las adhesinas sino también por la presencia en los parásitos de otros factores que pudieran modular los eventos de reconocimiento, adhesión y lisis de las células (Gilbert *et al*, 2000).

En nuestros experimentos se utilizó un elevado número de aislamientos y se analizó la presentación clínica como un todo, pues cada paciente presentaba varios síntomas y signos a la vez y todos compatibles con una infección por *T. vaginalis*. Además el procedimiento para cuantificar los parásitos adheridos a células HeLa se realizó de forma automatizada lo cual excluye elementos subjetivos en la lectura e interpretación de los resultados. Este tipo de análisis probablemente haya contribuido a que encontráramos una relación estadísticamente significativa entre el grado de adhesión a las células HeLa en dependencia de las características clínicas de procedencia del aislamiento.

Nuestros resultados confirman que la adhesión de los parásitos a las células HeLa constituye una posible medida del grado de virulencia, refleja lo que ocurre en la paciente con trichomonosis y sugiere que el amplio espectro en la sintomatología puede deberse a factores intrínsecos del parásito sin dejar de pensar en factores del hospedero como los relacionados con su inmunidad.

Continuamente se reportan nuevos hallazgos relacionados con la adhesión, por ejemplo el hecho de que el tratamiento con peryodato impida la unión de *T. vaginalis* a las células, sugiere la participación de glicoconjugados en la adhesión del parásito a las células del hospedero (Gilbert *et al*, 2000). Estudios adicionales son necesarios para descubrir todos los elementos del parásito y de las células del huésped que participan en el reconocimiento y en la unión.

El metronidazol es el medicamento de elección y el más ampliamente utilizado en el tratamiento de la trichomonosis. A pesar de esto, existen evidencias de que *T. vaginalis*, ciertas bacterias y otros parásitos, pueden desarrollar resistencia contra este medicamento (Muller, 1992; Liu *et al*, 2000; Rasoloson *et al*, 2001; Jenks y Edwards, 2002). Los mecanismos por los cuales se desarrolla resistencia al metronidazol, no son bien conocidos (Dunne *et al*, 2003).

El primer reporte de fallo del tratamiento de la trichomonosis urogenital utilizando metronidazol fue realizado en 1979 por Meingassner *et al.*, (Meingassner *et al*, 1979). Posteriormente, se ha continuado reportando respuestas inadecuadas al tratamiento.

En la literatura no existe ningún esquema ampliamente aceptado para realizar los ensayos de susceptibilidad y la interpretación de la CIM y la CLM es controversial. En nuestro caso empleamos la metodología de Meingassner y Thurner (Meingassner y Thurner, 1979) una de las más difundidas, y la observación al microscopio invertido de los cultivos *in vitro* que proporcionan la evidencia de la presencia o ausencia de parásitos viables (Meingassner *et al*, 1978; Upcroft y Upcroft, 2001).

El límite fijado para la CLM para diferenciar entre aislamientos obtenidos de pacientes con trichomonosis curable con metronidazol o resistente a este tratamiento es variado. Algunos autores plantean que cuando el valor para la CLM excede los 25 (g/mL indica una reducción de la sensibilidad del parásito (Cerkasovova *et al*, 1986). Sin embargo, la mayoría coincide en que los aislamientos derivados de casos con fallos de tratamiento casi siempre muestran CLM (100 (g/mL en condiciones de aerobiosis, lo cual han considerado como una resistencia parcial , pues en condiciones de anaerobiosis se han mostrado susceptibles (Meingassner, 1983 ; Muller *et al*, 1988; Land *et al*, 2002; Dunne *et al*, 2003). En nuestro caso, el aislamiento Tv-240 que pertenece al grupo de aislamientos procedentes de paciente clasificadas como sintomáticas moderadas, resultó francamente resistente *in vitro*. En esta paciente se logró la curación desde el punto de vista clínico y de laboratorio, después de un segundo ciclo de tratamiento con metronidazol pero con la dosis duplicada. La paciente de la cual se obtuvo el aislamiento Tv-352 curó después de un segundo tratamiento con dosis normal de metronidazol. Este aislamiento era del grupo de pacientes sintomáticas severas.

Se ha planteado que la aparición de cepas de *T. vaginalis*, resistentes al metronidazol no alcanza proporciones epidémicas, tal vez porque con la aparición de la resistencia el parásito se debilita y se dificulta su transferencia y contaminación de otras personas (Upcroft y Upcroft, 2001). Es importante destacar que la gran mayoría de los aislamientos estudiados resultaron sensibles al metronidazol, lo cual habla a favor de que continúa siendo el medicamento de elección para el tratamiento de esta parasitosis y que la resistencia se presenta en casos aislados. No obstante los resultados de este estudio realizado por primera vez en Cuba, indican la presencia de aislamientos de *T. vaginalis* resistentes al metronidazol en nuestro país, lo cual señala la necesidad de profundizar en las causas de fallos de tratamiento en los pacientes, para diferenciar la presencia de un aislamiento resistente e imponer el tratamiento adecuado.

El polimorfismo genético de aislamientos de *T. vaginalis* ha sido demostrado utilizando diferentes procedimientos: Hibridización molecular (Ryu *et al*, 1998), la secuenciación del gen ribosomal (Snipes *et al*, 2000) y la técnica de RAPD (Vanacova *et al*, 1997; Snipes *et al*, 2000 ; Hampl *et al*, 2001). Esta última ofrece ventajas para la rápida caracterización genética de los aislamientos y las cepas, pues no necesita información de la secuenciación del ADN, además de tener una gran sensibilidad si se compara con otros métodos moleculares empleados en la caracterización genómica. (Van Belkum *et al*, 1993; Papp *et al*, 1997; Lin, 1998). Otra de las ventajas es que se compara el polimorfismo en múltiples sitios del genoma en lugar del polimorfismo en un solo sitio o locus. El resultado del estudio en un solo locus puede conducir a un error ya que la filogénesis de un gen puede diferir de la filogenia de la especie .

El RAPD es un método suficientemente sensible para detectar el polimorfismo genético del ADN genómico producto de inserciones nucleotídicas simples o múltiples, deleciones o sustituciones. Sin embargo, la optimización de determinados reactantes de la reacción de amplificación tales como la concentración del cebador, de ADN molde, de la Taq ADN polimerasa y de magnesio, son necesarias para que exista una reproducibilidad de los productos amplificados, que se traduce en obtener los verdaderos patrones de amplificación. Existen otros dos factores que afectan dicha reproducibilidad y que se tuvieron en cuenta en este estudio: la temperatura de hibridización y el número de ciclos termales (Dias-Neto *et al*, 1993; Meunier y Grimont, 1993 ; Penner *et al*, 1993). Cuando se incrementó la concentración del cebador, la intensidad de las bandas de larga talla decrecieron y aumentó la intensidad de las bandas pequeñas. Tales diferencias en la amplificación ocurren porque al existir más cebador disponible, este se une a más sitios en el ADN, de ahí que los fragmentos pequeños se favorezcan aumentando el número de bandas y los grandes disminuyan. Cuando se utilizan bajas concentraciones de cebador, este puede agotarse antes que la reacción se complete, de ahí que se obtenga un menor número de bandas amplificadas (Steffen *et al*, 1999). Estas variaciones hacen necesario determinar la concentración óptima del cebador, constituyendo este un importante elemento a tener en cuenta para la obtención de patrones con el mayor número de bandas reales y reproducibles.

La cantidad y la calidad del ADN son factores de los cuales también depende la reproducibilidad de la técnica del RAPD. Este ensayo sigue el principio de que cualquier cebador puede amplificar el ADN de cualquier organismo y para ello requiere cantidades muy pequeñas, de ahí la importancia del control estricto sobre la pureza del ADN, lo que permite obtener patrones claros y discriminatorios. En nuestro trabajo utilizando el método de extracción con fenol-cloroformo obtuvimos muestras de ADN libre de contaminación (datos no mostrados) y patrones de RAPD de una alta calidad. Para la mayoría de los organismos entre 10 y 100 ng de ADN purificado es suficiente para obtener patrones de RAPD complejos y reproducibles (Dias-Neto *et al*, 1993). Elevadas cantidades de ADN usualmente inhiben la amplificación al existir una competencia del

cebador por el ADN molde (Micheli *et al*, 1994), por lo que se deben probar diferentes cantidades cuando se usan organismos que no han sido previamente investigados, no solo para asegurar el mayor número de bandas, sino también para confirmar la fidelidad de las condiciones del PCR. Al analizar diferentes concentraciones de ADN entre esos valores descritos, observamos una disminución de la intensidad de las bandas y un menor número de productos de amplificación a partir de 10 ng por lo que seleccionamos este valor para nuestros experimentos.

Otro de los factores que afecta la reproducibilidad de los patrones de RAPD es la calidad de la Taq ADN polimerasa. Se ha descrito la presencia de productos de amplificación en los controles negativos (Meunier y Grimont, 1993 ; Carlton *et al*, 1995; Howard *et al*, 1996) como resultado de la amplificación de ADN de *T. aquaticus* que contaminan la Taq ADN polimerasa utilizada en la reacción (Bottger, 1990). En nuestro estudio, en los controles negativos, no se observaron bandas de amplificación lo que indicó la calidad de la Taq ADN polimerasa utilizada y la no contaminación durante los ensayos. Tuvimos en cuenta además la optimización de la concentración de la enzima utilizada. La intensidad de las bandas de amplificación se incrementó al aumentar la concentración de la enzima hasta 2 U; valor a partir del cual los patrones de bandas se hacen independientes de la concentración de la enzima. El valor máximo probado fue 2,5 U, ya que concentraciones superiores provocan la disminución de la especificidad (Steffen *et al*, 1999). Park y Kohel en 1994, demostraron que ocurrían cambios en los patrones de RAPD obtenidos al variar la concentración de MgCl₂ de la mezcla de reacción y encontraron como rango óptimo el de 1.5 mM a 4.5 mM después de analizar 200 cebadores. A partir de este estudio se utiliza mayormente 1.5 mM (Park y Kohel, 1994). En nuestro experimento empleamos un tampón de amplificación que contenía MgCl₂ a una concentración de 1.5 mM.

La temperatura de hibridización y el número de ciclos termales fueron otros de los parámetros que se evaluaron en el estudio. Se utilizó una temperatura de hibridización de 35 (C que corresponde a la temperatura de disociación de los cebadores utilizados. Temperaturas más altas impiden la amplificación de cebadores de 10 bases (Williams *et al.*, 1990), de ahí que se utilice en el RAPD temperaturas de hibridización bajas (34(C-36(C) para asegurar el número máximo de cebadores en el evento de unión y la generación del mayor número de fragmentos de amplificación del ADN (Atienzar *et al*, 2000). El número de ciclos termales utilizados corresponde a estudios realizados anteriormente (Vanacova *et al*, 1997). Un incremento del número de ciclos puede producir acumulación de productos no específicos (Steffen *et al*, 1999).

Como el método del RAPD alcanza una alta aplicación en estudios de variaciones genéticas en poblaciones naturales, la presencia de bandas falsas llevaría a la sobrestimación de los niveles de variación y serían interpretadas como variaciones reales.

Varios son los factores que se han tenido en cuenta para establecer o no correlación con el polimorfismo o diferencias genéticas entre cepas y aislamientos de *T. vaginalis* y para lo cual se ha utilizado la técnica de RAPD. Entre estos factores se citan la ubicación y el origen geográfico de los aislamientos, el grado de susceptibilidad al metronidazol, la presencia de ARN viral dentro de *T. vaginalis* y con menor relevancia se ha mencionado la presencia de Mycoplasma dentro del parásito (Hampl *et al*, 2001).

La presencia de virus dentro del parásito fue identificada por primera vez por Wang y Wang en 1985 (Wang y Wang, 1985). Similares hallazgos han sido reportados en cepas de *Giardia lamblia* (Miller *et al*, 1988), *Babesia spp.* (Hotzel *et al*, 1995) y *Leishmania spp.* (Widner y Dooley, 1995).

Vanacova *et al.*, utilizaron la técnica de RAPD para la caracterización de especies y cepas de *T. vaginalis*. Estos autores encontraron correlación genética entre cepas de *T vaginalis* de diferentes orígenes geográficos además de significativa concordancia entre los hallazgos clínicos y los cambios histopatológicos encontrados en las biopsias ectocervicales de las pacientes, así como

entre la genética y la resistencia al metronidazol. Sin embargo, no encontraron concordancia entre la relación genética y la presencia o ausencia del ARN viral dentro del parásito ni tampoco entre la genética y la virulencia de las cepas. A pesar de estas observaciones, estos autores reconocen que la cantidad de muestras examinadas fue muy pequeña e indican que el RAPD puede ser exitosamente utilizado en estudios epidemiológicos integrales, donde se incluyan todas estas variables al mismo tiempo (Vanacova *et al*, 1997).

Snipes *et al.*, en sus estudios sobre la epidemiología molecular de aislamientos clínicos de *T. vaginalis* resistentes al metronidazol, encuentran correlación entre las agrupaciones genéticas y el origen de los aislamientos (diferentes continentes) y también con la resistencia al metronidazol. En ese estudio también se reporta correlación con la presencia de ARN viral dentro del parásito. No reportaron correlación entre la variabilidad genética y las manifestaciones clínicas (Snipes *et al*, 2000).

Más recientemente, Hampl *et al.*, también auxiliándose del RAPD, estudian un total de 20 cepas de *T. vaginalis* procedentes de 8 países diferentes. En sus resultados reportan gran correlación entre el origen geográfico de las cepas y la intensidad de las manifestaciones clínicas de las pacientes portadores de la parasitosis y su respuesta al tratamiento habitual con metronidazol. Sin embargo, no reflejan correlación con la virulencia la cual miden con procedimientos similares a los realizados por nosotros para conocer el comportamiento *in vivo* de aislamientos del parásito utilizando el ratón como modelo biológico. Tampoco reportan correlación con la presencia de ARN viral dentro del parásito (Hampl *et al*, 2001).

Los trabajos mencionados con anterioridad, son los únicos resultados de investigaciones que se reportan en la literatura a nivel internacional, que incursionan en la posible correlación genética de aislamientos y cepas de *T. vaginalis* con diferentes parámetros y condicionales biológicas que se presentan en el curso de la trichomonosis vaginal y que pueden determinarse utilizando la técnica de RAPD.

En nuestra investigación incluimos un número de aislamientos mucho mayor que en las investigaciones citadas anteriormente, además está el significativo hecho de que todos los aislamientos utilizados tenían un mismo origen geográfico. Nosotros encontramos una correlación entre los resultados de la caracterización genética obtenidos por RAPD y la clasificación según las manifestaciones clínicas en los 40 aislamientos analizados. Estos resultados apuntan hacia la utilidad de este tipo de estudio molecular en el hallazgo de marcadores genéticos de *T. vaginalis*. En este sentido, en nuestro estudio se encontró una banda de 490 pb hallada solamente en los aislamientos procedentes de pacientes sintomáticas, constituyendo el primer reporte de un posible marcador genético de patogenicidad de la infección por *T. vaginalis*. Al denominar esta banda de 490 pb como posible marcador genético lo hacemos de forma conservadora y no categórica pues consideramos que sería bueno buscarla en otros grupos poblacionales, así como en otras zonas de nuestro país e incluso en poblaciones de otras latitudes geográficas, teniendo en cuenta que se han encontrado variaciones genéticas entre aislamientos de *T. vaginalis* de diferentes partes del mundo (Vanacova *et al*, 1997).

Consideramos que estudios futuros son necesarios para dilucidar la importancia de este marcador genético u otros encontrados en los diferentes grupos, para de esta forma aportar nuevos datos al conocimiento de la patogénesis de esta enfermedad.

El comportamiento de los 40 aislamientos del parásito empleados en este estudio arrojaron una estrecha correlación entre los resultados obtenidos en función de la caracterización biológica y las manifestaciones clínicas que presentaron las pacientes de las cuales fueron obtenidos los aislamientos. Estos resultados guardan relación con los obtenidos en la caracterización genética

pues se pudo apreciar un polimorfismo genético que permitió agrupar los aislamientos en cuatro grupos genéticamente bien distinguibles también en función de las manifestaciones clínicas. Todo esto puede estar evidenciando el papel del parásito como un importante factor a tener en cuenta en la relación huésped-parásito, responsable de gran parte de las manifestaciones clínicas en el curso de una infección por *T. vaginalis* sin dejar de restarle importancia al huésped humano.

6. CONCLUSIONES

1. Se demostró la presencia de *Trichomonas vaginalis* en un elevado porcentaje (13,2%) de las adolescentes estudiadas, cuyo diagnóstico fue realizado por el método de cultivo *in vitro*.
2. La evaluación de la intensidad de las lesiones provocadas en ratones NMRI, inoculados por vía intraperitoneal con aislamientos de *Trichomonas vaginalis*, permitió encontrar una elevada correlación con la severidad de las manifestaciones clínicas presentadas por las pacientes portadoras de la infección.
3. Por primera vez en la literatura se demostró que *T. vaginalis* es capaz de incorporar BrdU en su ADN y esto permitió la utilización de un procedimiento no radioactivo para medir adherencia celular
4. El grado de citoadherencia de aislamientos de *T. vaginalis* a las células epiteliales en un modelo experimental está en estrecha correlación con la severidad de las manifestaciones clínicas que presentan las pacientes de las cuales fueron obtenidos.
5. Se demostró, por primera vez en nuestro medio, la existencia de aislamientos de *Trichomonas vaginalis* resistentes al metronidazol.
6. Mediante la prueba de RAPD se encontró, un posible marcador genético de patogenicidad en aislamientos de *Trichomonas vaginalis*, lo cual constituye el primer reporte a nivel internacional.
7. El conjunto de ensayos experimentales realizados por primera vez en nuestro país nos ayudó a determinar diferencias entre el grado de virulencia de cuatro grupos de aislamientos de *Trichomonas vaginalis* realizados en función de la sintomatología y clasificación clínica de las pacientes de las cuales fueron aislados los parásitos.

7. RECOMENDACIONES

1. Alertar a nuestro personal médico y paramédico en la necesidad de búsqueda de *Trichomonas vaginalis* en las pacientes adolescentes, tratando de realizar una detección precoz e imponer tratamiento oportuno para evitar consecuencias posteriores .
2. Informar a través de las autoridades del MINSAP a nuestro personal médico y paramédico de la existencia de aislamientos de *T. vaginalis* resistentes al metronidazol.
3. Continuar los estudios relacionados con la caracterización de la banda de 490 pares de bases como posible marcador genético de patogenicidad.
4. Estudiar si este posible marcador genético tiene alguna relación con la expresión de moléculas de adhesión en el parásito.

8.BIBLIOGRAFIA.

- > Abraham MC, Desjardins M, Filion LG, Garber GE. Inducible immunity to *Trichomonas vaginalis* in a mouse model of vaginal infection. *Infect Immun* 1996; 64:3571-75.
- > Ackers JP. Immunologic aspects of human trichomoniasis. En Honigberg BM, editor. *Trichomonads parasitic in humans*. New York: Springer-Verlag; 1990. p.36-52
- > Alderete JF. Alternating phenotypic expression of two classes of *Trichomonas vaginalis* surface markers. *Rev Infect Dis* 10(Suppl. 2)1988; S408-S412.
- > Alderete JF, Arroyo DC, Dailey J, Engbring MA, Khoshnan L, Lehker MW. Molecular analysis of *Trichomonas vaginalis* surface protein repertoires. *Mol Cell Biol* 1992; 1:173-202.
- > Alderete JF, Demés P, Gombosova A, Valente M, Fabusova M, Janoska A, et al. Specific parasitism of purified vaginal epithelial cells by *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 1998; 56: 2558-62.
- > Alderete JF, Garza GE. Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence. *Infect Immun* 1998; 56: 28-33.
- > Alderete JF, Arroyo R, Lehker M. Identification of fibronectin as a receptor for bacterial cytoadherence. *Methods Enzymol* 1994; 236: 318-33.
- > Alderete JF, Garza GE. Soluble *Trichomonas vaginalis* antigens in cell-free culture supernatants. *Mol Biochem Parasitol* 1984; 13: 147-58.
- > Alderete JF, Garza GE. Specific nature of *Trichomonas vaginalis* parasitism of host cell surfaces. *Infect Immun* 1985; 50: 701-8.
- > Alderete JF, Newton E, Dennis C, Engbring J, Neale K. Vaginal antibody of patients with trichomoniasis is to a prominent surface immunogen of *Trichomonas vaginalis*. *Genitourin Med* 1991; 67:220-25.
- > Alderete JF, Pearlman E. Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers. *Br J Vener Dis* 1984; 60: 99-105.
- > Alderete JF, Provenzano D, Lehker W. Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. *Microb Pathog* 1995; 19: 93-103.
- > Arroyo R, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infect Immun* 1989; 57: 2991-97.
- > Arroyo R, Engbring J, Alderete JF. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol* 1992; 6: 853-62.
- > Arroyo RA, Gonzalez-Robles A, Martinez-Palomo, Alderete JF. Signalling of *Trichomonas*

vaginalis for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. Mol Microbiol 1993; 7:299-309.

- > Atias A. Parasitología clínica. 3 ed. España: Publicaciones Técnicas Mediterraneo; 1994. p. 367-373.
 - > Atienzar F, Evenden A, Jha A, Savva D, Depledge M. Optimized RAPD analysis generates high quality genomic DNA profiles at high annealing temperature. Biotechniques 2000; 28: 52-54.
 - > Aure JC, Gjonnaess H. Metronidazole treatment of trichomonal vaginitis. A comparison of cure rates in 1961 and 1967. Acta Obstet Gynecol Scand 1969; 48:440-45
 - > Beachey EH. Molecular mechanisms of microbial adhesion (Switalski L. Hook M and Beachey E, Eds.), 1990 pp 1-4, Springer -Verlag.
 - > Beard CM, Noller KL, O'Fallon WM, Kurland LT, Dockerty MB. Lack of evidence for cancer due to use of metronidazole. N Engl J Med 1979; 301:519-22.
 - > Beaver P, Jung RC, Cupp WC. Parasitología clínica. 2 ed. España: Salvat; 1994.
 - > Bechtold E, Reicher NB. The relationship of *Trichomonas vaginalis* infections to false diagnosis of squamous cell carcinoma of the cervix. Cancer 1991; 442-47.
 - > Benazet F, Gillaume L. Induction of *in vivo* resistance of *Trichomonas vaginalis* to nitrimidazine. Lancet 1971; 2: 982-3.
 - > Benchimol M, Batista C, de Souza W. Fibronectin- and laminin-mediated endocytic activity in the parasitic protozoa *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas foetus*. J Submicrosc Cytol Pathol 1990; 22:39-45.
 - > Benchimol M, De Souza W. Carbohydrate involvement in the association of a prokaryotic cell with *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas foetus*. Parasitol Res 1995; 81:459-64.
 - > Black CM, Stephen AM. The use of molecular techniques for the diagnosis and epidemiologic study of sexually transmitted infections. Curr Infect Dis Rep 2000; 2:31-43.
 - > Borchardt KA, Smith RF. An evaluation of an in pouch TV culture method for diagnosis *Trichomonas vaginalis* infection. Genitourin Med 1991; 67(2):149-52.
 - > Borchardt K, Zhang M, Shing H. A comparison of the sensitivity of the Inpouch Diamond's and Trichosel media for the detection of *Trichomonas vaginalis*. Abstracts of the 96th General Meeting of the American Society for Microbiology 1996. Washington, DC. ASM; 1996.
- Bottger EC. Frequent contamination of Taq polimerase with DNA . Clin Chem 1990; 36: 1258-59.

- > Brasseur P, Savel J. Evaluation of the virulence of *Trichomonas vaginalis* strains by the study of their cytopathogenic effect on cultured cells. C R Soc Biol (Paris) 1982; 176: 849-860.
- > Briselden AM, Hillier SL. Evaluation of affirm VP microbial identification test for *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 1994; 32:148-52.
- > Caetano-Anolles G. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. PCR-Methods Appl 1993;3(2): 85-94.
- > Caetano-Anolles G, Bassem BJ, Geresshoff PM. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Biotechnology 1991; 9: 553-57.
- > Cameron DW, Padian NS. Sexual transmission of HIV and the epidemiology of other sexually transmitted diseases. AIDS 1990; 4(Suppl. 1):S99-S103.
- > Carey JC, Klebanoff MA. Bacterial vaginosis and other asymptomatic vaginal infections in pregnancy, Curr Women Health Rep 2001; 1(1): 14-9.
- > Carlton JMR, Howarrd J, Jense JB, Walliker D. A rapid technique for the detection of DNA polymorphisms in *Plasmodium*. Exp Parasitol 1995; 80: 163-6.
- > Cavier RE, Gobert JG, Savel J. Application d'une methode d'infestation intraperitoneale de la souris par *Trichomonas vaginalis* a l'etude pharmacologique des trichomonacides. Ann Pharm Fr 1972; 30: 637-42.
- > Cerkasovova A, Cerkasov J, Kulda J. Resistance of trichomonads to metronidazol. Acta Univ Carol (Biol) 1986; 30: 485-503.
- > Costa e Silva Filho F, de Souza W, Lopes JD. Presence of laminin-binding proteins in Trichomonads and their role in adhesion. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:8042-6.
- > Cotch MF, Pastorek JG, Nugent RP, Hillier SL, Gibbs RS, Martin DH, et al. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. Sex Transm Dis 1997; 24: 1-8.
- > Crossnoe CR, Germanas JP, Le Magueres P, Mustata G, Krause KL. The crystal structure of *Trichomonas vaginalis* ferredoxin provides in sight into metronidazole activation. J Mol Biol 2002; 318(2): 503-17.
- > Cu-Uvin S, Ko H, Jamieson DJ. Prevalence, incidence and persistence or recurrence of trichomoniasis among human immunodeficiency virus (HIV)-positive women and among HIV-negative women at high risk for HIV infection. Clin Infect Dis 2002; 34: 1406-11.
- > Dailey D, Chang T, Alderete JF. Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis. Parasitology 1990; 101: 171-75.
- > Daly JJ, Sherman JK, Green L, Hostetler TL. Survival of *Trichomonas vaginalis* in human

semen. Genitourin Med 1999; 65:106-8.

- > Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, et al. Epi Info Version 6: A Word Processing, Database, and Statistics Program for Epidemiology on Microcomputers. Atlanta, GA: Centers for Disease Control 1994.
 - > De Carli GA, Brasseur P, Rott M, da Silva A, Wendorff A. Hemolytic activity of various strains and clones of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas suis*. Rev Latinoam Microbiol 1994; 36:207-11.
 - > Diamond LS, Harlow OR, Cunnick CC. A new medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1978; 72: 431-34.
 - > Dias Filho BP, Andrade AF, de Souza W, Esteves MJ, Angluster J. Cell surface saccharide differences in drug-susceptible and drug-resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. Microbios 1992; 71:55-64.
- Dias-Neto E, Pereira de Souza C, Rollinson D, Katz N, Pena SDJ, Simpson AJG. Arbitrarily primed PCR allows the identification of strains and species of schistosome. Mol Biochem Parasitol 1993; 57: 83-8.
- > Diddle AW. *Trichomonas vaginalis*: resistance to metronidazole. Am J Obstet Gynecol 1969; 98:583-85
 - > Donné DIE. Animacules observes dans les matieres purulents et le produit des secretions des organes genitaux de l'homme et de la femme. C R Acad Sci 1836; 3:385-86.
 - > Dragsted D, Farholt S, Lind I. Occurrence of trichomoniasis in women. Sex Transm Dis 2001; 28(3): 326-9.
 - > Draper D, Parker R, Patterson E, Jones W, Beutz M, French J, et al. Detection of *Trichomonas vaginalis* in pregnant women with the InPouch TV culture system. J Clin Microbiol 1993; 31:1016-8.
 - > Dunne RL, Dunn LA, Upcroft PO, Donoghue PJ, Upcroft JA. Drug resistance in the sexually transmitted protozoa *Trichomonas vaginalis*. Cell Res 2003; 13: 239-49.
 - > Ellsworth DL, Rittenhouse KD, Honeycutt RL. Artifactual variation in Randomly Amplified Polymorphic DNA banding patterns. Biotechniques 1993; 14: 214-17.
 - > Engbring JA, O'Brien JL, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* adhesins display molecular mimicry to metabolic enzymes. Adv Exp Med Biol 1996; 408:207-23.
 - > Escario JA, Gómez Barrio A, Martinez Fernández AR. The relationship of experimental pathogenicity *in vivo* with *in vitro* cytoadherence and cytotoxicity of 6 different isolates of *T. vaginalis*. Int J Parasitol 1995; 25: 999-1000.

- > Felsenstein J. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Syst Zool* 1978; 27:401-10.
- > Fiori P, Rappelli P, Rocchigiani A, Cappuccinelli V. *Trichomonas vaginalis* haemolysis: evidence of functional pores formation on red cell membranes. *FEMS Microbiol Lett* 1993; 109:13-8.
- > Garber GE, Proctor EM, Bowie WR. Immunogenic proteins of *Trichomonas vaginalis* as demonstrated by the immunoblot technique. *Infect Immun* 1986; 51:250-53.
- > Garber GE, Sibau L, Ma R, Proctor EM, Shaw CE, Bowie WR. Cell culture compared with broth for detection of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1987; 25:1275-79.
- > Garber GE, Lemchuk-Favel L Characterization and purification of extracellular proteases of *Trichomonas vaginalis*. *Can J Microbiol* 1989; 35: 903-09.
- > Garber GE, Lemchuk-Favel L. Association of Production of Cell Detaching Factor With the Clinical Presentation of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1990; 28 (11): 2415-17.
- > Garber GE, Lemchuk-Favel L. Analysis of the extracellular proteases of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol Res* 1994; 80:361-5.
- > Garber GE, Lemchuk-Favel L, Bowie W. Isolation of a cell-detaching factor of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1548-53.
- > Garber GE, Lemchuk-Favel L, Rousseau R. Effect of beta-estradiol on production of the cell-detaching factor of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1991;29:1847-9.
- > Garber GE, Bowie WR. The effect of *Trichomonas vaginalis* and the role of pH on cell culture monolayer viability. *Clin Invest Med* 1990; 13:71-6.
- > Gavrilescu M. Results of experimental intramuscular inoculation of *Trichomonas vaginalis*. *Microbiol Parasitol Epidemiol* 1962; 7: 349-56.
- > Gilbert RO, Elia G, Beach DH, Klaessig S, Singh BN. Cytopathogenic effect of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultured *in vitro*. *Infect Immun* 2000; 68:4200-6.
- > Gillin FD, Sher A. Activation of the alternative complement pathway by *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 1991; 34:268-73.
- > Gold D, Ofek I. Adhesion of *Trichomonas vaginalis* to plastic surfaces requirement for energy and serum constituents. *Parasitology* 1992;105:55-62.
- > Gold T. *T. vaginalis*: strain differences in adhesion to plastic and virulence *in vitro* and *in vivo*. *Parasitol Res* 1993; 79: 309-15.

- > Gombosova A, Demes P, Valent M. Immunotherapeutic effect of the *Lactobacillus* vaccine, Solco Trichovac, in trichomoniasis is not mediated by antibodies cross reacting with *Trichomonas vaginalis*. Genitourin Med 1986; 62:107-10.
- > Gómez-Barrio A, Nogal J, Montero D, Rodríguez E, Romero E, Escario J. Biological variability in clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97(6):893-6.
- > Gomez RF, Macelo AM, Melo NM, Pena SDJ. *Leishmania (viannia) braziliensis*: genetic relationships between strain isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. Exp Parasitol 1995; 80; 681-7.
- > González A, Lázaro A, Espinosa M, Anaya F, Martínez A. *Trichomonas vaginalis*: Ultrastructural bases of the cytopathic effect. J Eukaryot Microbiol 1995; 42: 641-51.
- > Gram IT, Macaluso M, Churchill J, Stalsberg H. *Trichomonas vaginalis* and *Human papillomavirus* Infection and Incidence of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade III. Cancer Causes Control 1992; 3:231-36.
- > Grodstein F, Goldman MB, Cramer DW. Relation of tubal infertility to a history of sexually transmitted diseases. Am J Epidemiol 1993; 137:577-584.
- > Grossman JH, Galask RP. Persistent vaginitis caused by metronidazole-resistant trichomonas. Obstet Gynecol 1990; 76: 521-2.
- > Hager WD, Brown ST, Kraus SJ, Kleris GS, Perkins GS, Henderson M. Metronidazole for vaginal trichomoniasis: seven day vs. single-dose regimen. JAMA 1980; 244:1219-20.
- > Hampl V, Vanacova S, Kulda J, Flegr J. Concordance between genetic relatedness and phenotypic similarities of *Trichomonas vaginalis*. BMC Evol Biol 2001; 48:1- 11.
- > Harris DI, Beechey RB, Linstead D, Barret J. Nucleoside uptake by *Trichomonas vaginalis*. Mol Biochem Parasitol 1988;9: 105-16.
- > Heat JP. Behaviour and pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* in epithelial cell cultures: a study by light and scanning electron microscopy Br J Vener Dis 1981; 57: 106-17.
- > Heine P, McGregor JA. *Trichomonas vaginalis*: a reemerging pathogen. Clin Obstet Gynecol 1993; 36:137-44.
- > Heyworth PG, Gutteridge WE, Ginger CD. Pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. FEBS Lett 1984; 141:55-60.
- > Hobbs MM, Kazembe P, Reed AW. *Trichomonas vaginalis* as a cause of urethritis in Malawian men. Sex Transm Dis 1999; 26(1):381-7.

- > Honigberg BM. Trichomonads of importance in human medicine. En: Kreiger JP, editor. Parasitic protozoa. New York: Academic Press; 1978. p. 275-454.
- > Honigberg, BM. In "Trichomonads parasitic in humans" (B. M. Honigberg, Ed.), pp. 115. Springer -Verlag, New York, NY 1990.
- > Honigberg BM, Brugerolle G. Structure. En: Honigberg BM, editor. Trichomonads parasitic in humans. New York: Springer-Verlag; 1990. p. 5-35.
- > Hotzel I, Kabakoff R, Ozaki LS. Small extrachromosomal nucleic acid segments in protozoan parasites. Vet Parasitol 1995; 57:57-60.
- > Howard J, Carlon JMR, Walliker D, Jensen JB. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique in inheritance studies of *Plasmodium falciparum*. J Parasitol 1996; 82(6): 941-6.
- > Hynie J, Peter R, Vesely K. Pseudo cervical blockade by trichomonosis. Int J Fertil 1960; 5:66-70.
- > Ivey MH, Hall DG. Virulence of different strain of *Trichomonas vaginalis* in the mouse. Am J Trop Med Hyg 1984; 13: 16-9.
- > Jarecki-Black JC, Lushbaugh WB, Golosov I. *Trichomonas vaginalis*. Preliminary characterization of a sperm motility inhibiting factor. Ann Clin Lab Sc 1998; 18:484-6.
- > Jaminson JH, Kaplan DW, Eagar R, Douglas JR. Spectrum of genital human papillomavirus infection in female adolescent population. Sex Transm Dis 1995; 22:236-43.
- > Jenks PJ, Edwards DI. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. Int J Antimicrob Agents 2002;19:1-7.
- > Joyner JL, Douglas JM, Raysdale S, Forter M, Judson FM. Comparative prevalence of infection with *Trichomonas vaginalis* among men attending a sexually transmitted diseases. Sex Transm Dis 2000; 27(5):236-40.
- > Kane PO, McFadzean JA, Squires S. Absorption and excretion of metronidazole. Part II. Studies on primary failures. Br J Vener Dis 1961; 37: 276-7.
- > Kharsany AB, Hoosen AA, Moodley J, Bagaratee J, Gouws E. The association between sexually transmitted pathogens and cervical intra-epithelial neoplasia in a developing community. Genitourin Med 1993; 69:357-60.
- > Khoshnan A, Alderete JF. Characterization of double-stranded RNA satellites associated with the *Trichomonas vaginalis* virus. J Virol 1995; 69:6892-7.
- > Khoshnan A, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* with a double-stranded RNA virus has

- upregulated levels of phenotypically variable immunogen mRNA. *J Virol* 1994; 68:4035-8.
- > Kon VB, Papadimitriou JM, Robertson TA, Warton A. Quantitation of concanavalin A and wheat germ agglutinin binding by two strains of *Trichomonas vaginalis* of differing pathogenicity using gold particle-conjugated lectins. *Parasitol Res* 1988;75:7-13.
 - > Korner B, Jensen HK. Sensitivity of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole, tinidazole and nifuratel *in vitro*. *Br J Vener Dis* 1976; 52: 404.
 - > Krieger JN. Prostatitis syndromes: pathophysiology, differential diagnosis, and treatment. *Sex Transm Dis* 1984; 11:100-12.
 - > Krieger JN. Trichomoniasis in men: old issues and new data. *Sex Transm Dis* 1995; 22:83-96.
 - > Krieger JN, Poisson MA, Rein MF. Beta-hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* correlates with virulence. *Infect Immun* 1983; 41:1291-5.
 - > Krieger JN, Ravdin JL, Rein MF. Contact-dependant cytopathogenicity mechanisms of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 1985; 50: 778-86.
 - > Krieger JN, Wolner-Hanssen P, Stevens C, Holmes KK. Characteristics of *Trichomonas vaginalis* isolates from women with and without colpitis macularis. *J Infect Dis* 1990; 161: 307- 11.
 - > Krowchuk DP. Sexually transmitted diseases in adolescents: what's new? *South Med J* 1998; 91: 124-31.
 - > Kulda J. Employment of experimental animals in studies of *T. vaginalis* infection. En: Honigberg BM, editor. *Trichomonads parasitic in humans*. New York: Springer-Verlag; 1990. p. 112-54.
 - > Kulda J. Experimental animals in studies of *T. vaginalis* infection. En Honigberg BM, editor. *Trichomonads parasitic in humans*. New York: Springer-Verlag; 1990.p. 112-53.
 - > Kulda J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *Int J Parasitol* 1999; 29:199-212.
 - > Kulda J, Tachezy J, Cekasovova A. An *in vitro* induced anaerobic resistance to metronidazole in *T. vaginalis*. *J Eukaryot Microbiol* 1993; 40:262-9.
 - > Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: molecular evolutionary genetic analysis. Pennsylvania: Pennsylvania State University; 1993.
 - > Kurnatowska A. Metronidazole resistance of *Trichomonas vaginalis* Donne. *Wiad Parazytol* 1969;15:399-401

- > Laga M, Alary M, Nzila N, Manoka AT, Tuliza M, Behets F, et al. Condom promotion, sexually transmitted disease treatment, and declining incidence of HIV-1 infection in female Zairian sex workers. *Lancet* 1994; 344:246-8.
- > Laga M, Nzila N, Goeman J. The interrelationship of sexually transmitted diseases and HIV infection: implications for the control of both epidemics in Africa. *AIDS* 1991; 5 (Suppl 1): S55-S63.
- > Laga M, Manoka A, Kivuvu M, Malele B, Tuliza M, Nzila N, et al. Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factor for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS* 1993; 7:95-102.
- > Land KM, Delgadillo MG, Johnson PJ. In vivo expression of ferredoxin in a drug resistant trichomonad increases metronidazole susceptibility. *Mol Biochem Parasitol* 2002; 121:153-7.
- > Levi MH, Torres J, Wiston A, Pina C, Klein RS. Comparison of the InPouch System [IP] to Diamonds modified medium [DMM] for the isolation of *Trichomonas vaginalis* [Tv]. Abstracts of the 96 th General Meeting of the American Society for Microbiology. Washington, DC: ASM; 1996. p. 20.
- > Lin AW. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. *J. Clin. Microbiol* 1998; 34: 870- 6.
- > Linstead D. New defined and semi-defined media for cultivation of the flagellate *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology* 1981; 83, 125-37.
- > Liu SM, Brown DM, O'Donoghue P, Upcroft P, Upcroft JA. Ferredoxin involvement in metronidazole resistance of *Giardia duodenalis*. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 108: 137-40.
- > Lloyd D, Yarlett N, Yarlett NC, Pedersen JZ, Kristensen B. Metronidazol-resistant clinical isolates of *Trichomonas vaginalis* maintain low intracellular metronidazole radical anion levels as a consequence of defective oxygen scavenging. *Acta Univ Carol (Biol)* 1988; 30: 521-8.
- > Lo M, Reid M, Brokenshine M. Resistance of *Trichomonas vaginalis* infections to metronidazole in Auckland sexual health clinics: report of two cases. *Med J* 2002; 115 (1160):147.
- > Lossick JG, Kent HL. Trichomoniasis: trends in diagnosis and management. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:1217-22.
- > Lossick JG, Muller M, Gorrell TE. In vitro drug susceptibility and doses of metronidazole required for cure in cases of refractory vaginal trichomoniasis. *J Infect Dis* 1986; 153:948-55.
- > Magnus M, Clark R, Myers L, Farley T, Kissinger PJ. *Trichomonas vaginalis* among HIV-infected women: are immune status or protease inhibitor use associated with subsequent *T.*

vaginalis positivity ?. Sex Transm Dis 2003; 30(11): 839-43.

- > Martin RD, Kaufman RH, Burns M. *Trichomonas vaginalis*: a statistical evaluation of diagnostic methods. Am J Obstet Gynecol 1967; 87:1024-7.
- > Martinez V, Caume E. Metronidazole: Pharmacology. Ann Dermatol Venereol 2001; 28(89): 903-9.
- > Mayer Z, Pelak Z. Personal experience with Solco Trichovac. Cesk Gynekol 1990; 55:590-3.
- > Mc Cann JS. Comparison of direct microscopy and culture in the diagnosis of trichomoniasis. Br J Vener Dis 1974; 50:450-2.
- > McGrory T, Garber GE. Mouse intravaginal infection with *Trichomonas vaginalis* and role of *Lactobacillus acidophilus* in sustaining infection. Infect Immun 1992; 60:2375-9.
- > McGrory T, Meysick KC, Lemchuk-Favel LT, Garber GE. The interaction of *Lactobacillus acidophilus* and *Trichomonas vaginalis* *in vitro*. J Parasitol 1994; 80:50-4.
- > Meingassner JG. Metronidazol resistance in trichomonads. Wiad Parazytol 1983; 29: 151-4.
- > Meingassner JG, Havelec L, Mieth H. Studies on strain sensitivity of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole. Br J Vener Dis 1979; 54: 72-6.
- > Meingassner JG, Mieth H, Czok R, Lindmark DG, Muller M. Assay conditions and the demonstration of nitroimidazole resistance in *Trichomonas foetus*. Antimicrob Agents Chemother 1978; 13: 1-3.
- > Meingassner JG, Thurner J. Strain of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole and other 5-nitroimidazole. Antimicrob Agents Chemother 1979;15:254-57.
- > Mendoza M, Becerril C, Fattel L, Avila L, Ruiz M, Ortega J, Arroyo R. CP30, a cystein proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. Infect Immun. 2000; 68(9): 4907-12.
- > Menéndez del Dago H. Problemas de la adolescencia. 100 preguntas y respuestas. Ciudad de La Habana: Editorial Academia; 1996.
- > Meri T, Jokiranta T, Suhonen L, Meri S. Resistance of *Trichomonas vaginalis* to Metronidazole: report of the first three cases from Finland and optimization of *in vitro* susceptibility testing under various oxygen concentrations. J Clin Microbiol 2000; 38: 763-7.
- > Meunier JR, Grimont PAD. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. Res Microbiol 1993; 144: 373-9.
- > Micheli MR, Bova R, Pascale E, D'Ambrosio E. Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. Nucleic Acids Res 1994; 22(10): 1921-2
- > Miller RL, Wang AL, Wang CC. Purification and characterization of the *Giardia*

lamblia double-stranded RNA virus. Mol Biochem Parasitol 1988; 28:189-96.

- > Minkoff H, Grunebaum AN, Schwarz RH, Feldman J, Cummings M, Crumbleholm W, et al. Risk factors for prematurity and premature rupture of membrane: a prospective study of the vaginal flora in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1984; 150: 965-72.
- > Moldwin RM. Sexually transmitted protozoal infections: *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. Urol Clin North Am 1992; 19:93-101.
- > Muller M. Reductive activation of nitroimidazoles in aerobic microorganisms. Biochem Pharmacol 1986; 35:37-41.
- > Muller M. Hydrogenosomes of trichomonad flagellates. Acta Univ Carol (Biol) 1987; 30:249-60.
- > Muller M. Resistance to 5-nitroimidazoles in pathogenic microorganisms. En: Breccia A, Cavalleri B, Adams GE, editores. Nitroimidazoles. New York: Plenum; 1992: 133-48.
- > Muller M, Lossick JG, Gorrell TE. *In vitro* susceptibility of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole and treatment outcome in vaginal trichomoniasis. Sex Transm Dis 1988; 15: 17-24.
- > Musatovova O, Alderete JF. Molecular analysis of the gene encoding the immunodominant phenotypically varying P270 protein of *Trichomonas vaginalis*. Microb Pathog 1988; 24:223-39.
- > Narcisi EM, Secor WE. *In vitro* effect of tinidazole and furazolidone on metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. Antimicrob. Agents Chemother 1996; 40:1121-5.
- > Nogal Ruiz JJ, Escario JA, Martinez Diaz RA, Gomez Barrio A. Evaluation of murine model of experimental trichomoniasis. Parasite 1997; 2: 127-32.
- > Ohlemeyer CL, Hornberger LL, Lynch DA, Swierkosz EM. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* in Adolescent Females: In pouch TV culture versus wet-mount microscopy. J Adolesc Health 1998; 22: 205-8.
- > Pace J, Urbankova V, Urbanek P. Cloning and characterization of a repetitive DNA sequence specific for *Trichomonas vaginalis*. Mol Biochem Parasitol 1992; 54: 247- 56.
- > Papp T, Vágvolgyi C, Kerényi Z, Nagy A, Micharlides TJ. DNA amplification polymorphisms of *Mucor piriformis*. Antonie Van Leeuwenhoek 1997; 72: 167-73.
- > Park YH, Kohel RJ. Effect of MgCl₂ on random amplified DNA polymorphism. Biotechniques 1994; 16(4): 652-6.
- > Pena SDJ, Nunes AC. DNA-POP and DNA-PATER two simple computer programs for

population studies and paternity analysis with DNA fingerprinter News 1991; 2:146-52.

- > Penner GA, Bush A, Wise R, Kim W, Domier L, Kasha K. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. PCR Methods Appl 1993; 2(4) : 341-5
- > Peterson KM, Alderete JF. Host plasma proteins on the surface of pathogenic *Trichomonas vaginalis*. Infect Immun 1982; 37:755-62.
- > Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 300-17.
- > Pindak FF, Mora de Pindak M, Hide BM, Gardner JR. Acquisition and retention of viruses by *T. vaginalis*. Genitouri Med 1998; 3:336-71.
- > Ponadi J. *SYN-TAX*. Computer programs from multivariate data analysis in ecology and systematics (programa de computadora). version 5.0. Budapest: Scientific Publishing; 1993.
- > Prashini M, Wilkinson D, Connolly C, Moody J, Willen A. *Trichomonas vaginalis* is associated with pelvic inflammatory diseases in women infected with HIV. Clin Infect Dis 2002; 34(4):519-22.
- > Price M, Zimba D, Hoffman IF. Addition of treatment for trichomoniasis to syndromic management of urethritis in Malawi: a randomized clinical trial. Sex Transm Dis 2003; 30:516-22.
- > Provenzano D, Alderete JF. Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. Infect Immun 1995; 63:3388-95.
- > Quon DV, D'Olivera CE, Johnson PJ. Reduced transcription of the ferredoxin gene in metronidazole-resistant *T. vaginalis*. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:4402-6.
- > Rasoloson D, Tomkova E, Cammack R, Kulda J, Tachezy J. Metronidazole-resistant strains of *Trichomonas vaginalis* display increased susceptibility to oxygen. Parasitology 2001; 123: 45-56.
- > Rendon-Maldonado JG, Espinosa-Castellano M, González-Robles A, Martínez-Palomo A. *Trichomonas vaginalis* in vitro pathogenesis of Lactobacillus vaginal epithelial cells, leukocytes and erythrocytes. Exp parasitol 1998; 89:241-50.
- > Roigas E, Teras J, Ridala V, Tompel H. Pathomorphological reaction of testicles of white rats and Guinea pigs infected with *Trichomonas vaginalis*. Wiad Parazytol 1969; 15:315-17.
- > Rojas L, Rodríguez ME, Sarría I, Sarría C. Trichomonosis vaginal y pacientes VIH. Rev Cubana Med Trop 2000; 52 (3):230-2.
- > Rojas L, Rodríguez ME, Sarría C, Sarría I, Fraga J. Frecuencia de infección por *Trichomonas vaginalis* en parejas con trastornos de la fertilidad. Rev Cubana Med Trop 2002;

54(2):85-90.

Rojas L, Sarria C, Sariago I, Goicolea A, Morales E. Trichomonosis en pacientes con patologia de cuello uterino. Rev Mex Patol Clin 1998; 45(3): 177-80.

- > Rojas L, Solano R, Sariago I. Frecuencia de Trichomonosis vaginal en mujeres supuestamente sanas. Rev Cubana Hig Epidemiol 1999; 37(3): 66-70.
- > Rosa FW, Baum C, Shaw M. Pregnancy outcomes after first- trimester vaginitis drug therapy. Obstet Gynecol 1987; 69:751-5.
- > Rubino S, Muresu R, Rappelli P, Fiori L, Rizzu P, Erre G. Molecular probe for identification of *Trichomonas vaginalis* DNA. J Clin Microbiol 1991; 29:702-6.
- > Ryu JS, Min DY, Shin MH, Cho YH. Genetic variance of *Trichomonas vaginalis* isolates by Southern hybridization. Korean J Parasitol 1998; 36: 207- 11.
- > Saurina GR, McCormack WM. Trichomoniasis in pregnancy. Sex Transm Dis 1997; 24: 361-2.
- > Schmid G, Marcisi E, Mosure D, Secor WE, Higgins J, Moreno H. Prevalence of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* in a gynecology clinic. J Reprod Med 2001; 46(6):545-9.
- > Schnitzer RJ, Kelly DR, Leiwant B. Experimental studies in trichomoniasis. 1. The pathogenicity of trichomonad species for mice. J Parasitol 1950; 36: 343-49.
- > Shaio MF, Lin PR, Lee CS. Killing of *Trichomonas vaginalis* by complement-mediated lysis is not associated with the presence of *Trichomonas vaginalis virus*. Int J Parasitol 1993; 23:675-80.
- > Skerk V, Schonwald S, Krhen I. Aetiology of chronic prostatitis. Int J Antimicrob Agents 2002; 19: 471-4.
- > Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. Int J Parasitol 1997; 27: 1135-45.
- > Smith LM, Wang M, Zangwaill K, Yeh S. *Trichomonas vaginalis* infection in a premature newborn. J Perinatol 2002; 22(6) 502-3.
- > Sneath PHA. Some thoughts on bacterial classification. Journal of General Microbiology 1957; 17: 201-26.
- > Sneath PHA, Sokal RR. Numerical taxonomy. San Francisco: W. H. Freeman; 1973.
- > Snipes LJ, Gamard PM, Narcisi EM, Beard CB, Lehmann T, Secor WE. Molecular epidemiology of metronidazole resistance in a population of *Trichomonas vaginalis* clinical

- isoaltes. J Clin Microbiol 2000; 38: 3004-9.
- > Sobel JD. Vaginitis. N Engl J Med 1997; 337: 1896-1903.
 - > Sorvillo F, Smith L, Kerndt P, Ash L. *Trichomonas vaginalis*, HIV and African-Americans. Emerg Infect Dis 2001;7:927-32.
 - > Steffen C, Ankenbauer W, Poauer-Hofmann R, Bye S, Eeisen D, Frey B, *et al.* En : Steffens C, ed. PCR applications manual 2 ed. Mannheim: Roche; 1999. p. 10-48.
 - > Stiles JK, Shah PH, Xue L, Meade JC, Lushbaugh WB, Cleary JD, Finley RW. Molecular typing of *Trichomonas vaginalis* isolates by HSP 70 Restriction fragment length polymorphism. Am J Trop Med Hyg 2000; 62(4): 441-5.
 - > Steindel M, Dias Neto E, Meneses CLP, Romanha AJ, Simpson AJG. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. Mol Biochem Parasitol 1993; 60: 71-80.
 - > Su HM, Tai JH. Genomic organization and sequence conservation in type 1 *Trichomonas vaginalis* viruses. Virology 1996; 222:470-73.
 - > Susan Cu-uvín, Heye Jin KO, Denise J, Jamenson A, Joseph W, Shuman P, *et al.* Prevalence, incidence and persistence or recurrence of trichomoniasis among HIV-negative women at high risk for HIV infection. AIDS 2000; 4(2):80-90.
 - > Ter Meulen J, Eberhardt HC, Luande J. *Human papillomavirus* (HPV) infection, HIV infection and cervical cancer in Tanzania. East Africa Int J Cancer 1992; 51: 515-21.
 - > Tocher JH, Edwards DI. Evidence for the direct interaction of reduced metronidazole derivatives with DNA bases. Biochem Pharmacol 1994; 48:1089-94.
 - > Toyos JM. Patogenia experimental de *T. vaginalis* Donné 1836 en el ratón *Mus musculus*. Anales de la Facultad de Veterinaria de León 1974; 20:35-90.
 - > Upcroft JA, Upcroft P. Drug susceptibility testing of anaerobic protozoa. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45:1810-4.
 - > Upcroft P, Upcroft JA. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 150-64.
 - > Vanacova S, Tachezy J, Kulda J, Flegr J. Characterization of trichomonad species and strains by fingerprinting. J Eukaryot Microbiol 1997; 44: 545-52.
 - > Van Belkum A, Homan W, Limper L, Quint WG. Genotyping isolates y clones of *Giardia duodenalis* by polymerase chain reaction: implications for the detection of genetic variation among protozoan parasite species. Mol Biochem Parasitol 1993; 61: 69-77.

- > Van-der Weiden RMF, Van-der Meijden WI. Treatment failure in trichomoniasis and persistence of the parasite after Lactobacillus immunotherapy; two cases reports. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1990; 34:171-8.
- > Viikki M, Pukkala E, Hakama M. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncol* 2000; 39:71-5.
- > Wallace RM, Hale RB, Utz CG, Olson EP, Earlat CK. Sexually transmitted diseases. *Clin Inf Dis* 2002; 34 (15):5-10.
- > Wang AL, Wang CC. A linear double-stranded RNA in *Trichomonas vaginalis*. *J Biol Chem* 1985; 260:3697-702.
- > Wang AL, Wang CC. Viruses of the protozoa. *Ann Rev Microbiol* 1991; 45:251-63.
- > Wantor A, Honigberg BM. Analysis of surface saccharides in *Trichomonas vaginalis* strains with various pathogenicity levels by fluorescein-conjugated plant lectins. *Z Parasitenkd* 1983; 69:149-59.
- > Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18:7213-8.
- > Wendel KA. Trichomoniasis: what's new? *Curr Infect Dis* 2003; 5(2): 129-34.
- > Widmer G, Dooley S. Phylogenetic analysis of Leishmania RNA virus and *Leishmania* suggests ancient virus-parasite association. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 54-9.
- > Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 6531-5.
- > World Health Organization. Global Program of AIDS. Geneva: WHO; 1997.
- > Yano A, Yui K, Aosai F, Kojima S, Kawana T, Ovary Z. Immune response to *Trichomonas vaginalis*. IV. Immunochemical and immunobiological analyses of *T. vaginalis* antigen. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1983; 72:150-7.
- > Zhang ZF, Beng CB. Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies. *Int J Epidemiol* 1994; 23: 682-90.

9. ANEXOS

Anexo 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Él (la) que suscribe: _____

He sido informado (a) de que:

El Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", está realizando una investigación acerca del comportamiento de la trichomonosis vaginal (enfermedad transmitida por un parásito conocido con el nombre de *Trichomonas vaginalis*) en un grupo de adolescentes procedentes de las consultas infanto-juvenil, de interrupción de embarazo y de ITS de los Hospitales Ginecobstetricos Docentes "Ramón González Coro" y "Eusebio Hernández", con el objetivo de conocer los factores que influyen en la ocurrencia de esta parasitosis cuyo mecanismo fundamental de transmisión es la vía sexual.

En nuestro país desconocemos con exactitud cual es la frecuencia con la cual se presenta esta parasitosis en nuestra población. La localización temprana de los enfermos y la administración de tratamientos adecuados a ambos integrantes de la pareja sexual puede garantizar la no aparición de posibles complicaciones posteriores. Los resultados de esta investigación contribuirán a profundizar en los conocimientos de esta parasitosis y estarán en función del bienestar y salud de toda nuestra población. La toma de muestra que se realizará no constituye riesgo para la salud humana, lejos de eso es un procedimiento directo y certero, necesario para saber si se tiene o no el parásito y solamente el médico de consulta tendrá conocimiento de los resultados de este examen e indicará el tratamiento adecuado en caso que sea necesario.

De este modo y por este medio hago constar mi disposición y consentimiento informado para participar en el estudio: **"Frecuencia de la trichomonosis vaginal en un grupo de adolescentes"**.

Declaro que he sido informado (a) del objetivo del estudio, así como la importancia de los resultados de la investigación para la adopción de medidas que conduzcan a un mejor control de las enfermedades de transmisión sexual.

Para constancia de lo expuesto con anterioridad firmamos este documento a los _____ días del mes de _____ del año 2001.

Firma de la paciente : _____

Firma del padre o tutor: _____

Anexo 2

Encuesta aplicada a todas la pacientes adolescentes atendidas en las consultas infanto-juvenil, de interrupción de embarazo y de ITS de los Hospitales Ginecobstetricos Docentes "Ramón González Coro" y "Eusebio Hernández"

No. _____

Fecha: _____ Hospital: _____

Nombre y apellidos de la paciente: _____

Edad: _____ Estado civil: _____

Edad de las primeras relaciones sexuales: _____ Uso de anticonceptivos: ____

Tipo: _____

Embarazos anteriores: Si ____ No ____ Partos: ____ Abortos: Si ____ No ____

Expontáneo _____ Provocado _____

Número de parejas sexuales en los últimos 5 años: ____

Motivo de consulta: _____

Sintomas y signos:

Prurito vulvar: Si ____ No ____ Intensidad: Leve ____ Moderada ____ Severa ____

Leucorrea: Si ____ No ____ Color : Blanco ____ Amarillo ____ Verde ____

Intensidad: Leve ____ Moderada ____ Severa ____

Dolor en bajo vientre: Si ____ No ____ Intensidad: Leve ____ Moderada ____ Severa ____

Dispareunia: Si ____ No ____ Intensidad: Leve ____ Moderada ____ Severa ____

Disuria: Si ____ No ____ Intensidad: Leve ____ Moderada ____ Severa ____

Eritema vulvar: Si ____ No ____ Intensidad: Leve ____ Moderada ____ Severa ____

Eritema vaginal : Si ____ No ____ Intensidad: Leve ____ Moderada ____ Severa ____

Eritema cervical: Si ____ No ____ Intensidad: Leve ____ Moderada ____ Severa ____

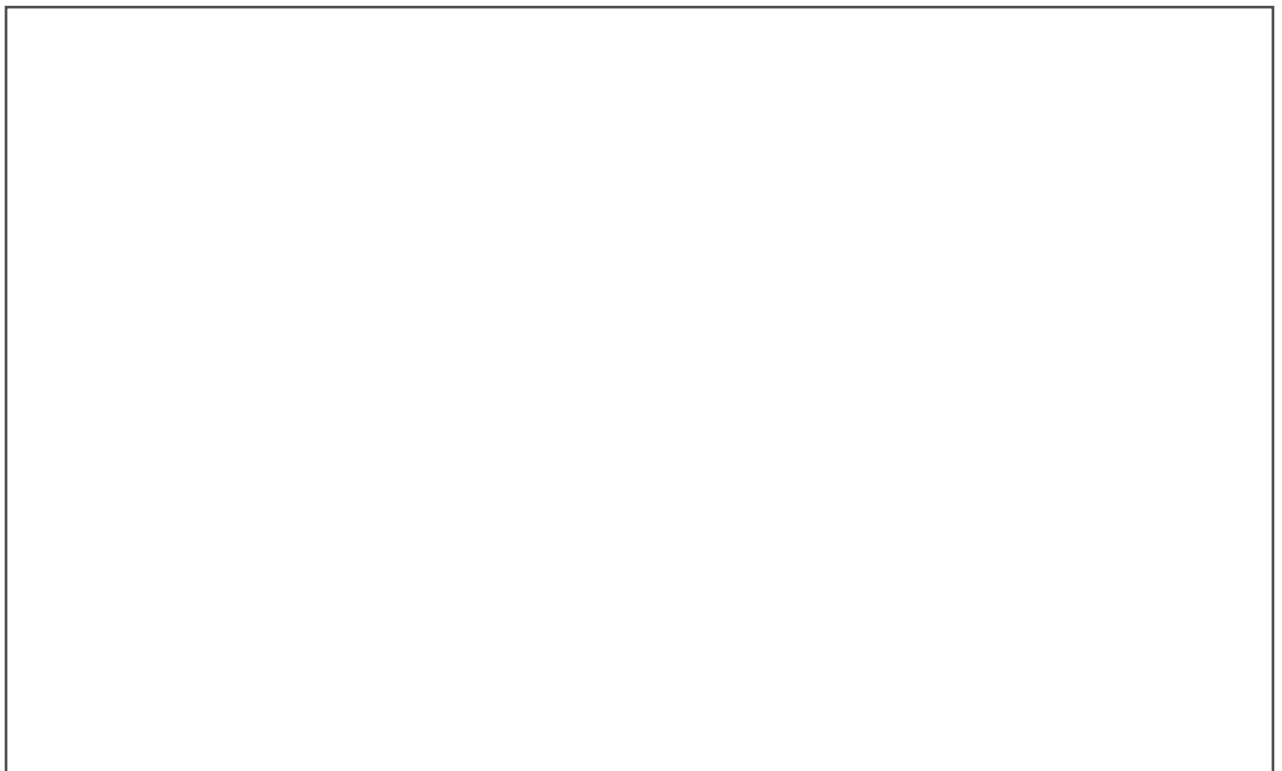
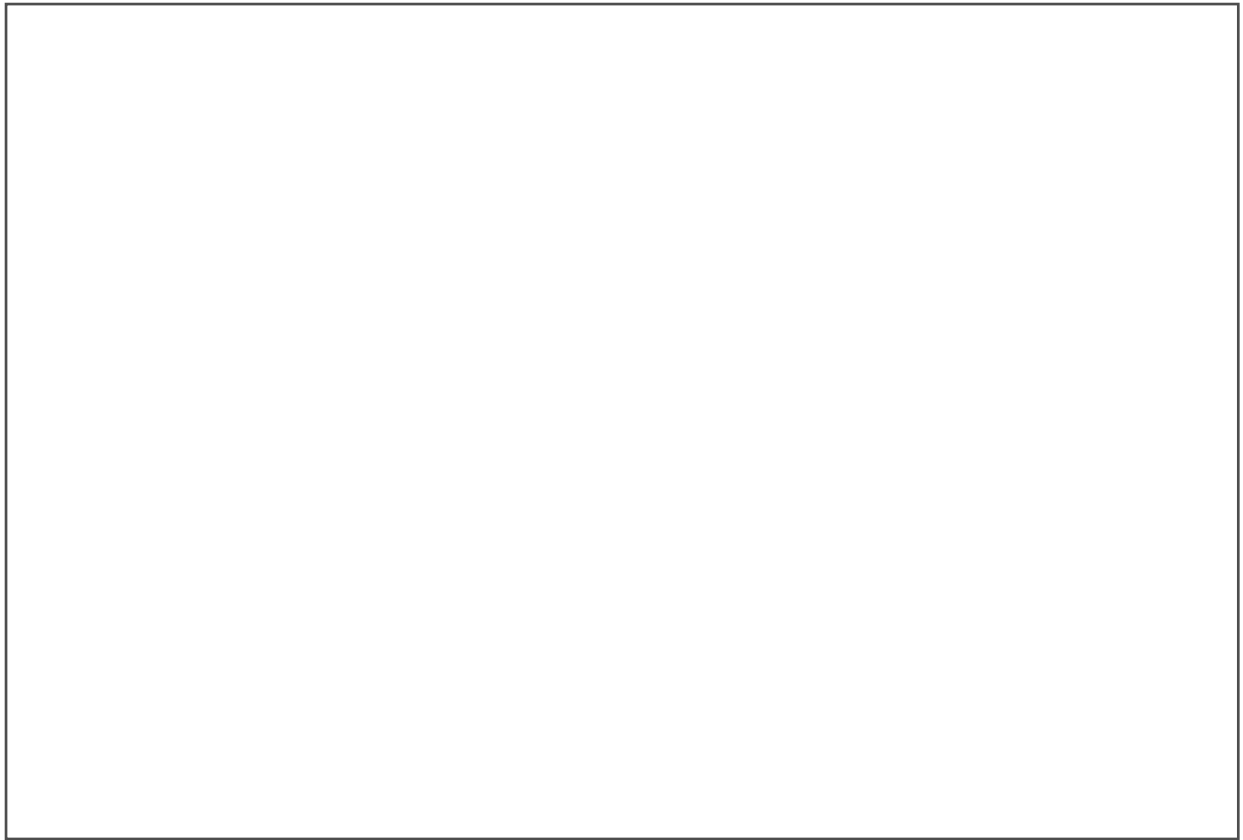
Ha presentado Trichomonosis vaginal en otras ocasiones: Si ___ No ___ Fecha: _____

Tratamientos Recibidos: _____ Curó Si ___ No ___

Otros Microorganismos: _____

Fecha: _____

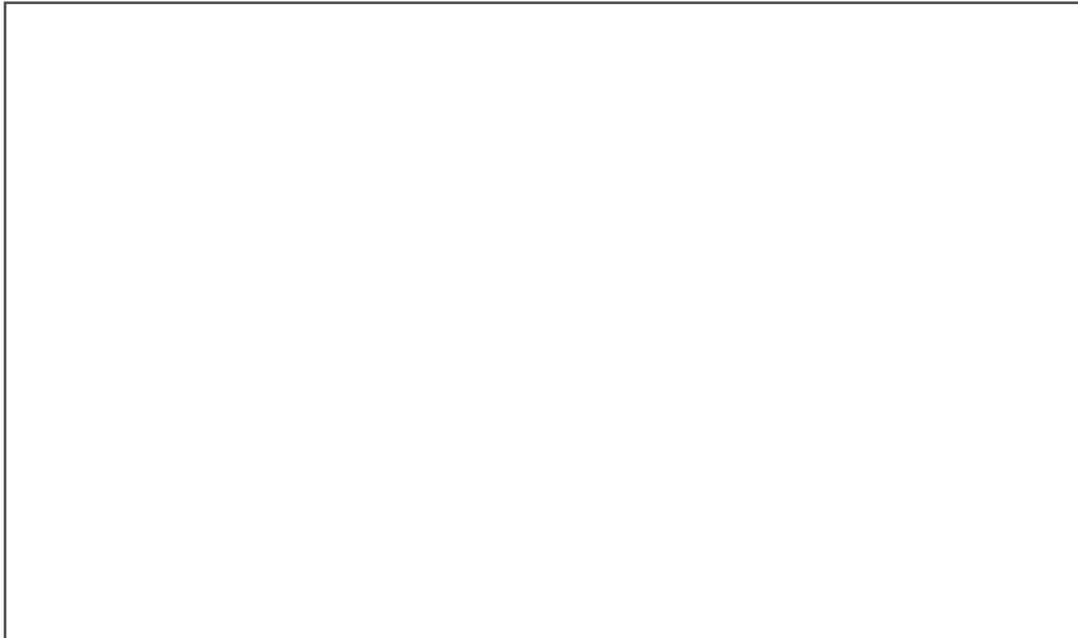
Resultados: _____

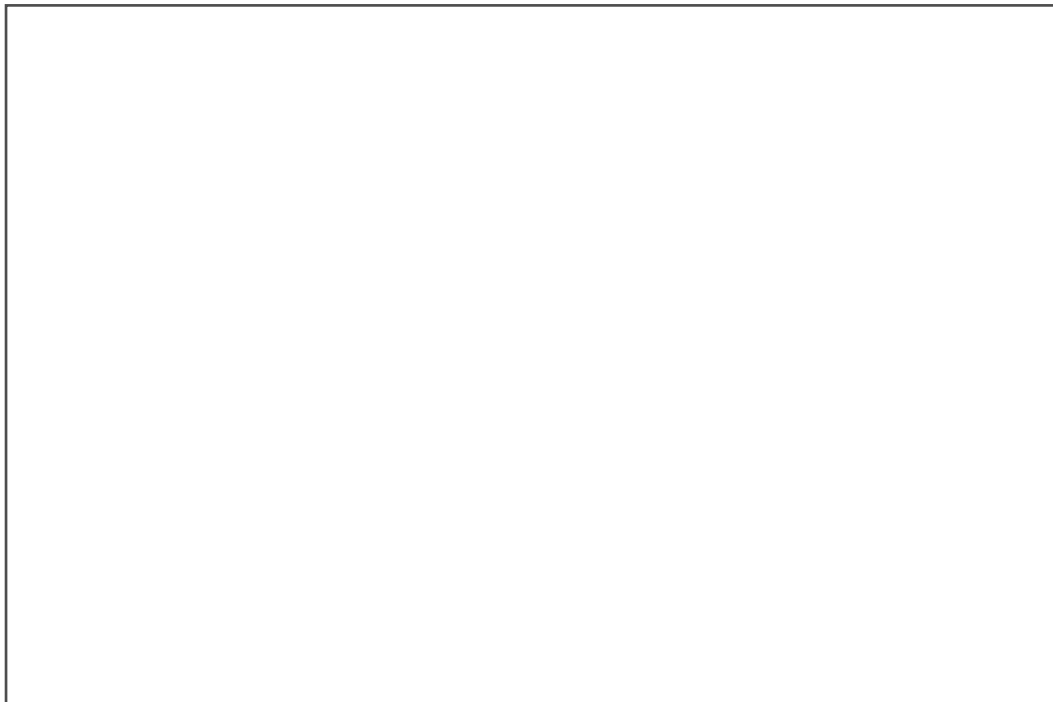
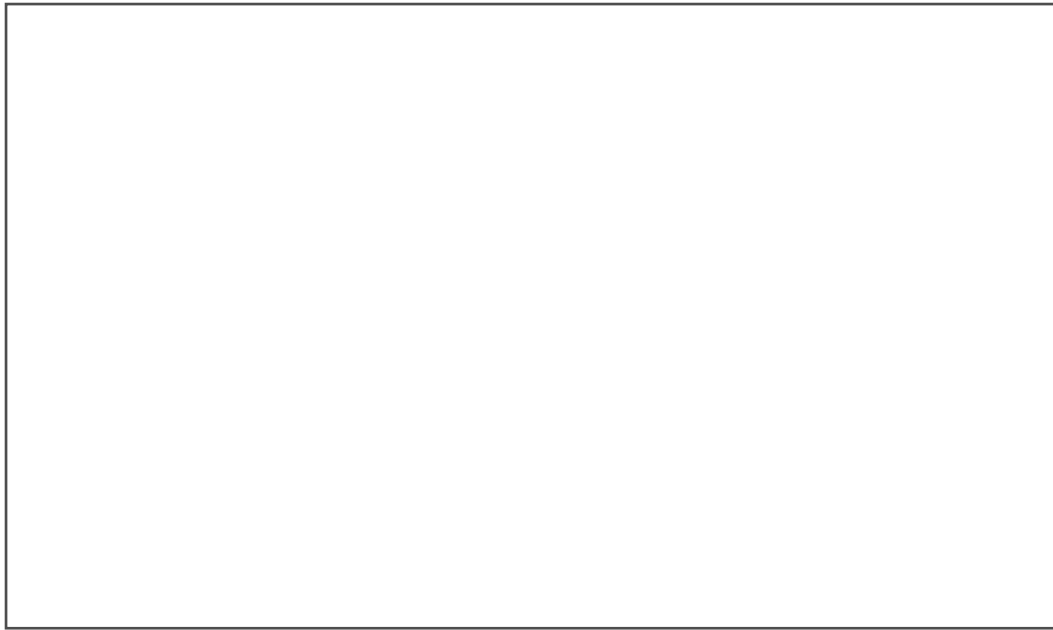


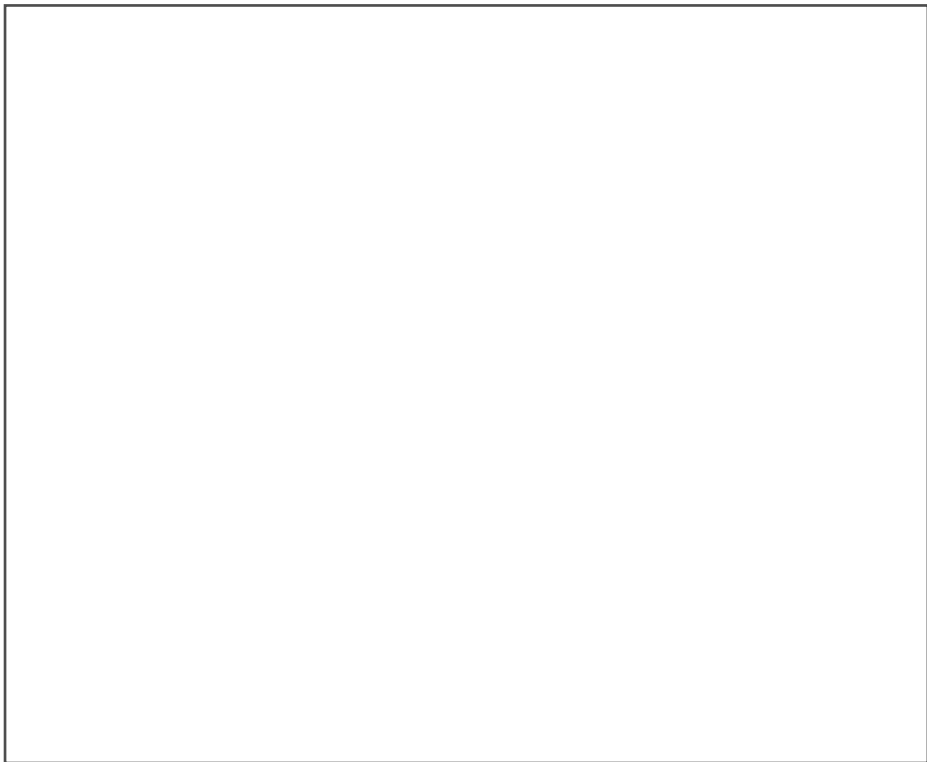
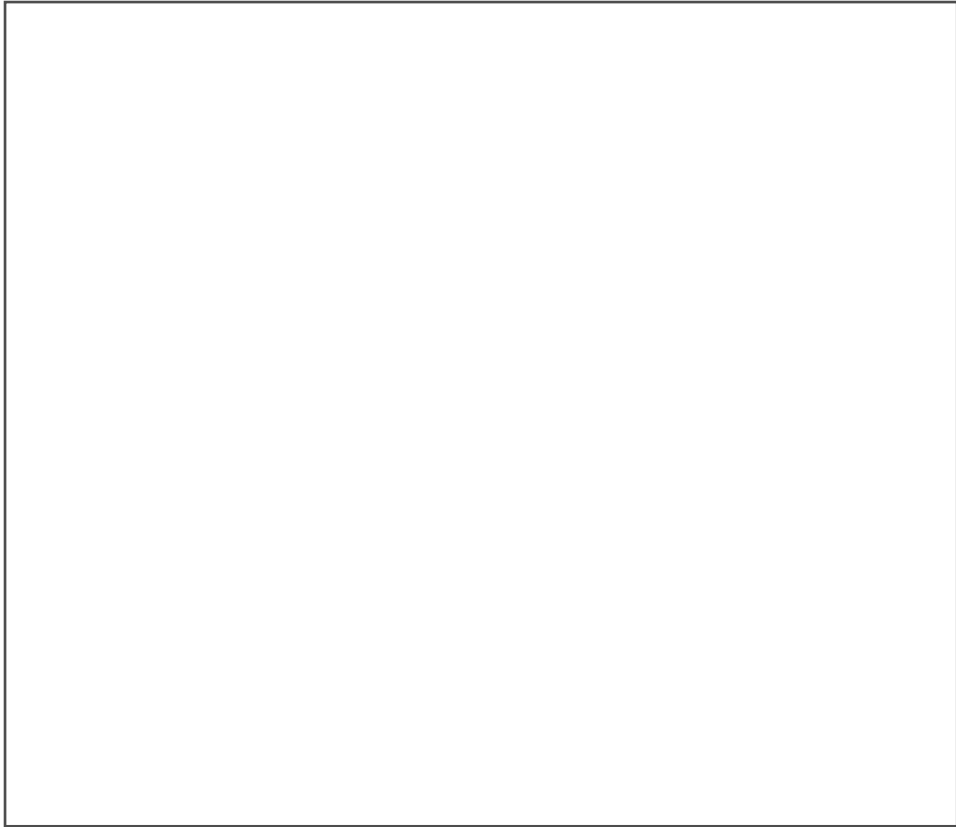


B

A







pb

1882

2690

4254

421

697

925

1150

1489

2320

3140

5526

7743

19329

2320

5526

3140

19329

1489

1150

925

697

7743

4254

2690

1882

421

pb

7743

19329

4254

5526

3140

2690

2320

1882

1489

1150

925

697

pb

19329

7743

2320

2690

3140

4254

5526

1882

1489

1150

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

421

697

925

Tv-1

1489

1150

697

925

Tv-2

1882

1489

1150

925

697

Tv-3

3140

2690

1489

2320

1150

1882

697

925

421

Tv-4

3140

421

2690

1489

925

697

2320

1882

1150

Marcador Genético Grupo Asintomatico

Marcador Genético Grupo Leve

Marcador Genético Grupo Moderado

Marcador Genético Grupo Severo

Marcador Genético de patogenidad.

Marcador Genético Grupos Asintomático y Leve

Tv-5

421

697

925

1150

1489

A

Tv-6

3140

2690

1489

1150

2320

925

697

421

Tv-7

2650

3140

2320

1882

1489

1150

925

697

421

Tv-8

2320

1489

1882

1150

925

697

421

Tv-9

1489

1150

925

697

421

Tv-10

1882

1489

925

1150

697

Distancia de Jaccard

C91

C175

C350

C353

C358

C129

C356

C361

C239

C237

A59

A163

C98

C12

C15

A170

A185

C9

C334

C344

A5

A42

C147
C76

A69

C187
C206

C240
C190

C247

A47

A66
C308
C313

C173

C348

C349
C355

C351

C352

0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 1.0

4 x 10⁶

8 x 10⁶

10 x 10⁶

C

B

C

* Concentración Inhibitoria Mínima, determinada por la motilidad de los parásitos visualizado con ayuda del microscopio invertido luego de incubación de los parásitos durante 48 h con la droga.

** Concentración Letal Mínima, se corresponde con la menor concentración de la droga que no permitió el crecimiento parasitario en medio de cultivo, después de 48 horas de exposición con la droga.