

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

Subdirección de Parasitología

Departamento de Parasitología

**Evaluación de la inmunogenicidad y la capacidad protectora de la
proteínasa de 62 kDa de *Trichomonas vaginalis* en la trichomonosis
experimental en ratones.**

**Tesis presentada en opción al Grado Científico de
Doctor en Ciencias de la Salud**

Autor: Lic. Hilda María Hernández Álvarez

Tutor: DrC. Jorge Sarracent Pérez

**Ciudad de La Habana
2008**

**A mis padres,
esposo e hijos**

“La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real. Es un viaje, nunca una llegada”

Kart Popper

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de este trabajo de tesis, pues sin su ayuda no hubiera sido posible la culminación del mismo.

A:

Mi tutor, Jorge Sarracent, por la entrega desinteresada de sus conocimientos, rigor científico y profesionalidad y por haber confiado en mí para la realización de este trabajo de tesis.

Mis amigos Mabel Figueredo por su ayuda técnica, a Ana M. Montalvo, Maria Antonia Palacio y Natividad Hernández por haber recorrido conmigo este camino y muy especialmente, a Ricardo Marcet por su ayuda y apoyo constante.

Los miembros de la comisión científica especializada de Parasitología, especialmente a Luis Fonte, y a todos los que dedicaron su esfuerzo y tiempo en la revisión de este documento de tesis.

Carlos Fernández por sus acertadas recomendaciones y por la crítica revisión de estas páginas.

René Gato y Jorge Fraga por su incondicional ayuda en la edición del documento.

Maité García, Susana Borroto y Yissel Torres por su apoyo en la impresión del documento.

Sonia Xiques por su cooperación en el análisis estadístico, a Agustín Navarro y Yosvania Hevia por su ayuda en el procesamiento de los datos.

Mis compañeros del Departamento de Parasitología, Control de vectores, especialmente a Magdalena Rodríguez y al grupo de investigaciones sociales, Docencia y Economía por su apoyo y por haber sustentado materialmente este documento; especialmente a Lázaro González por sus atenciones y ayuda en la confección del mismo. De esta misma forma también agradecer a Armando Martínez, Rolando González y Maribel Chao por contar siempre con su ayuda.

Finalmente a todos aquellos, que aunque no han sido mencionados sus nombres están en mi memoria.

A todos, muchísimas gracias.

ABREVIATURAS

AcMs.....	anticuerpos monoclonales
AgNO ₃	nitrate de plata
ACF.....	adyuvante completo de Freund
AIF	adyuvante incompleto de Freund
BSA.....	sero albúmina bovina
CpG	oligonucleótido CpG no metilado (del inglés synthetic oligodeoxynucleotides that contain unmethylated CpG motifs)
cpm.....	conteo por minuto
CDF	factor de desprendimiento celular (del inglés Cell Detaching Factor)
D.E	desviación estándar
D.O.....	densidad óptica
EDTA.....	ácido etilendiamino tetracético
ELISA	ensayo inmunoenzimático en fase sólida (del inglés enzyme linked immunosorbent assay)
Ez	enzima
G.....	glutamina
HEPES	ácido 1-etanosulfónico 4-(2-hidroximetilpiperazina)
IFI.....	inmunofluorescencia indirecta
Ig	inmunoglobulina
INF γ	interferón γ
ITS	infecciones de transmisión sexual
L-NMMA.....	N- monometil arginina
LPS.....	lipopolisacárido
LPG.....	lipofosfoglicano

MME.....	medio mínimo esencial
NaIO ₄	metaperiodato de sodio
ONS	óxido nítrico sintasa
PCR.....	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, Polymerase Chain Reaction)
PM.....	peso molecular
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVH	papilomavirus
p-62	proteínasa de peso molecular de 62 kDa
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de duodecil sulfato de sodio (del inglés, sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis)
TCA	ácido tricloacético
TFS.....	tampón fosfato salino
TFS-T	TFS - Tween 20
[³ H]-timidina	timidina tritiada
TLCK.....	Nαp-tosil-lisina clorometilcetona
TC	toxina colérica
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana

SÍNTESIS

Trichomonas vaginalis, el agente etiológico de la trichomonosis humana, es un protozoo parásito que infecta el tracto urogenital produciendo la más común de las enfermedades de transmisión sexual. Estudios previos demostraron que la vacunación subcutánea con varias dosis de extracto total de *T. vaginalis* con adyuvantes completo e incompleto de Freund protege parcialmente contra el reto por vía vaginal. Por otra parte, se ha encontrado respuesta inmune protectora contra otros parásitos utilizando proteinasas nativas o recombinantes. Sin embargo, no existen estudios acerca de la utilización de una proteinasa de *T. vaginalis* como posible inmunógeno. *T. vaginalis* posee altos niveles de actividad proteolítica, fundamentalmente del tipo cisteino-proteinasa. Esta actividad es necesaria para el reconocimiento y adhesión del parásito a la superficie de las células epiteliales del hospedero. Algunos estudios han determinado el papel que tienen las cisteino-proteinasa de 30, 65 y 39 kDa en el establecimiento de la infección, mientras otros autores ya habían sugerido, la posible participación que pudiera tener la proteinasa de 60 kDa en la patogenia producida por el parásito. Con vista a buscar un inmunógeno contra *Trichomonas vaginalis*, se procedió a purificar la proteinasa de 60 kDa descrita por Garber y Lemchuk-Favel, en 1989 utilizando un procedimiento similar al planteado por estos autores, con modificaciones y se obtuvo una proteinasa de peso molecular de 62 kDa. Sobre la base de este conocimiento, nos propusimos determinar si la proteinasa de peso molecular de 62 kDa secretada por el parásito, puede constituir una diana adecuada para evitar la infección por *T. vaginalis* en un modelo experimental.

Los resultados más relevantes obtenidos en este trabajo fueron los siguientes:

- Se demostró por primera vez que la proteinasa de 62 kDa es importante en la citoadherencia del parásito a células epiteliales, paso inicial en el establecimiento de la infección con *T. vaginalis*.
- Los anticuerpos monoclonales 4D8 y 1A8 contra la proteinasa de 62 kDa protegen a ratones BALB/c ante el reto intraperitoneal con *T. vaginalis* por un mecanismo de citotoxicidad facilitado por anticuerpos monoclonales en presencia de macrófagos y mediado por óxido nítrico.
- Los anticuerpos monoclonales 4D8 y 1A8 reconocen epitopos diferentes, ambos de naturaleza proteica y repetitivos sobre la proteinasa de 62 kDa.
- La proteinasa de 62 kDa administrada por vía intranasal utilizando como adyuvantes toxina colérica y CpG (oligonucleótidos CpG no metilados), protege a ratones BALB/c contra un reto intravaginal.
- Los niveles de IgA alcanzados en la vagina de ratones BALB/c, posterior a la inmunización con la proteinasa de 62 kDa con adyuvantes, pueden ser importantes en la respuesta inmune protectora contra *T. vaginalis*.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Hipótesis	4
1.3. Objetivos.....	4
1.3.1. Objetivo general	4
1.3.2. Objetivos específicos	5
1.4. Novedad científica.....	5
1.5. Valor práctico	6
1.6. Eventos científicos donde han sido expuestos los resultados del presente trabajo .	6
1.7. Artículos del autor donde se presentan los resultados.....	7
1.8. Reconocimiento de los resultados	7
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
2.1. <i>Trichomonas vaginalis</i> . Ubicación taxonómica	8
2.2. Aspectos morfológicos	8
2.3. Ciclo biológico	10
2.4. Manifestaciones clínicas.....	11
2.5. Relación entre <i>Trichomonas vaginalis</i> y VIH	13
2.6. <i>Trichomonas vaginalis</i> y su relación con Papilomavirus humano y <i>Mycoplasma hominis</i>	14
2.7. Diagnóstico	15
2.7.1. Técnicas microscópicas y de cultivo.....	15
2.7.2. Técnicas basadas en anticuerpos.....	18
2.7.3. Técnicas de ADN	19
2.8. Epidemiología.....	20
2.9. Tratamiento.....	21
2.10. Modelos experimentales. Vías de inoculación	23
2.11. Patogenia	26
2.11.1. Mecanismos dependientes del contacto	26
2.11.1.1. Adhesión y adhesinas	26
2.11.1.2. Hemólisis	28
2.11.2. Mecanismos independientes del contacto	30
2.11.2.1. Liberación del factor de desprendimiento celular	31
2.11.2.2. Interacción con la microbiota vaginal	32
2.12. Inmunobiología de <i>Trichomonas vaginalis</i>	33
2.12.1. Inmunogenicidad de <i>T. vaginalis</i>	33
2.12.2. Respuesta inmune contra el parásito	33
2.12.3. Evasión del sistema inmune	35
2.13. Vacuna	37

3. MATERIALES Y MÉTODOS..... 39

3.1. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Trichomonas vaginalis</i> . Preparación de antígenos.....	39
3.1.1. Mantenimiento de los parásitos.....	39
3.1.2. Preparación de antígenos secreción de <i>T. vaginalis</i>	39
3.1.3. Cuantificación de proteínas totales.....	40
3.1.4. Ensayo para medir actividad proteolítica.....	40
3.2. Animales de laboratorio.....	40
3.3. Purificación de la proteinasa de 62 kDa a partir de antígenos de secreción de <i>Trichomonas vaginalis</i>	41
3.3.1. Purificación de la proteinasa.....	41
3.3.2. Evaluación del grado de pureza.....	42
3.4. Obtención y selección de hibridomas productores de anticuerpos anti-proteinasa de 62 kDa de <i>Trichomonas vaginalis</i>	42
3.4.1. Obtención de los anticuerpos monoclonales.....	42
3.4.1.1. Inmunización de ratones.....	42
3.4.1.2. Evaluación de los sueros.....	43
3.4.1.3. Fusión celular.....	44
3.4.1.4. Clonaje y reclonaje.....	45
3.4.1.5. Producción de líquido ascítico.....	46
3.4.2. Determinación de clase y subclase de los anticuerpos monoclonales.....	46
3.4.3. Purificación de los anticuerpos.....	47
3.5. Análisis del reconocimiento estructural y molecular de los anticuerpos anti- proteinasa de 62 kDa de <i>Trichomonas vaginalis</i>	47
3.5.1. Reconocimiento de estructuras de los trofozoitos por inmunofluorescencia.....	47
3.5.2. Reconocimiento molecular por inmunotransferencia.....	48
3.6. Ensayo <i>in vitro</i> del efecto de anticuerpos anti- proteinasa de <i>Trichomonas</i> <i>vaginalis</i> sobre los procesos de adhesión de este parásito.....	49
3.6.1. Modelo de células epiteliales vaginales.....	49
3.6.2. Marcaje de los parásitos.....	49
3.6.3. Adhesión del parásito a células epiteliales.....	50
3.7. Evaluación de la protección pasiva de los anticuerpos monoclonales en modelos de ratones inyectados intraperitonealmente con <i>Trichomonas vaginalis</i>	51
3.8. Identificación del posible mecanismo de acción de los anticuerpos anti-proteinasa de <i>Trichomonas vaginalis</i>	52
3.8.1. Efecto de los anticuerpos monoclonales sobre el parásito.....	52
3.8.2. Inhibición de la actividad proteolítica por los anticuerpos monoclonales... ..	52
3.8.3. Determinación de niveles de óxido nítrico en sobrenadantes de cultivo de macrófagos tratados con los anticuerpos anti-proteinasa en presencia del parásito.....	52
3.8.4. Determinación de los niveles de óxido nítrico en el suero de los ratones en estudio.....	53
3.9. Caracterización parcial de los epitopos reconocidos por los anticuerpos anti-proteinasa en antígenos de secreción de <i>Trichomonas vaginalis</i>	54

3.9.1. Determinación de la afinidad de los anticuerpos monoclonales	54
3.9.2. Análisis de la repetitividad de los epitopos sobre la proteinasa de <i>T.</i>	
3.9.3. <i>vaginalis</i>	54
3.9.3.1. Obtención de los conjugados anticuerpo monoclonal-peroxidasa	54
3.9.3.2. ELISA de doble sitio	55
3.9.4. Identificación de las moléculas reconocidas por los anticuerpos	
monoclonales en los antígenos de secreción de <i>T. vaginalis</i>	56
3.9.5. Determinación del efecto que producen los tratamientos con calor,	
químicos y enzimáticos en los antígenos purificados.....	56
3.9.5.1 Purificación de los antígenos por cromatografía de afinidad	56
3.9.5.2 Tratamiento de los antígenos purificados por cromatografía de	
afinidad.....	56
3.9.5.2.1 Tratamiento con calor	57
3.9.5.2.2 Tratamiento con TCA	57
3.9.5.2.3 Tratamiento con pronasa-E.....	57
3.9.5.2.4 Tratamiento con β -mercaptoetanol.....	57
3.9.5.2.5 Tratamiento con neuroaminidasa.....	57
3.9.5.2.6 Tratamiento con metaperiodato de sodio (NaIO ₄).....	58
3.9.5.3 Análisis del reconocimiento de los epitopos por los anticuerpos	
monoclonales	58
3.10 Estudio del efecto protector de la proteinasa de 62 kDa de <i>Trichomonas</i>	
<i>vaginalis</i>	58
3.10.1 Inmunización de ratones hembras BALB/c con la proteinasa de 62 kDa de	
<i>T. vaginalis</i> con TC y CpG.....	58
3.10.2 Modelo de infección vaginal por <i>T. vaginalis</i> y reto en ratones BALB/c.....	59
3.11. Determinación de los niveles de anticuerpos anti-proteinasa p-62 en sueros y	
secreciones vaginales de ratones BALB/c.....	59
3.12. Análisis de los resultados.....	60

4 RESULTADOS 61

4.1 Purificación de la proteinasa de 62 kDa de <i>Trichomonas vaginalis</i> . Evaluación	
del grado de pureza	61
4.2 Anticuerpos monoclonales contra la proteinasa de 62 kDa de <i>Trichomonas</i>	
<i>vaginalis</i>	64
4.3 Efecto de los anticuerpos anti-proteinasa de 62 kDa de <i>Trichomonas vaginalis</i>	
sobre los procesos de adhesión	66
4.4 Protección pasiva brindada por anticuerpos anti-proteinasa de <i>Trichomonas</i>	
<i>vaginalis</i> en un modelo de infección intraperitoneal.....	67
4.5 Algunos elementos del posible mecanismo de acción mediante el cual los	
anticuerpos anti-proteinasa de <i>Trichomonas vaginalis</i> pueden brindar	
protección.	69
4.6 Caracterización parcial de epitopos reconocidos por los anticuerpos	
monoclonales 4D8 y 1A8	71

4.7 Efecto protector de la proteinasa de 62 kDa de secreción de <i>Trichomonas vaginalis</i> en ratones BALB/c	76
5 DISCUSIÓN	80
6 CONCLUSIONES	88
7 RECOMENDACIONES.....	89
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción

Trichomonas vaginalis, el agente etiológico de la trichomonosis humana, es un protozoo parásito que infecta el tracto urogenital produciendo la más común de las enfermedades de transmisión sexual. Esta parasitosis presenta una distribución cosmopolita, identificada en todos los grupos raciales y estratos socioeconómicos en personas entre 15 y 50 años de edad (Petrin *et al*, 1998; Wallace *et al*, 2002).

Es conocido que los programas de control de infecciones por *T. vaginalis* reciben poco apoyo de las entidades de salud rectoras de esta actividad a escala regional y mundial (Schwebke y Burgess, 2004), lo que trae consigo que la prevalencia real se desconozca, aunque, en el mundo, se estiman cifras de hasta 170 millones de casos por año (WHO, 2001).

Este parásito constituye una de las mayores causas de vaginitis, cervicitis y uretritis en mujeres, y en el hombre, puede causar prostatitis, uretritis y síndromes del tracto genito-urinario bajo (Schwebke y Burgess, 2004; Soper, 2004). Su control es importante, teniendo en cuenta la elevada incidencia de infecciones agudas, complicaciones y secuelas, así como su impacto socioeconómico y el papel que puede jugar como cofactor en la transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Prashini *et al*, 2002; Rughooputh y Greenwell, 2005, Guenther *et al*, 2005). Además, se plantea asociación de *T. vaginalis* con otros virus (Sobel, 1997; Rojas *et al*, 1998) y gérmenes causantes de infecciones de transmisión sexual (ITS) (Sobel, 1997; Vancini y Benchimol, 2008).

T. vaginalis ha motivado a los investigadores a polemizar con respecto a sus mecanismos de patogenicidad, pues el hecho de que el parásito haya penetrado en el interior del organismo no significa que esto conduzca obligatoriamente a la génesis de la enfermedad, sino que en muchos casos se limita solo a una infección (Turner, 1992).

El parásito infecta el epitelio escamoso del tracto genital, y el mecanismo exacto por el cual parasita los tejidos y produce la enfermedad no se conoce con exactitud. Sin embargo, algunos autores coinciden en que la adhesión del parásito a las células escamosas epiteliales vaginales constituye el paso inicial de la infección en la mujer (Mendoza-López *et al*, 2000).

La variedad de síntomas y signos que pueden presentarse durante el proceso de infección no debe ser atribuida a un solo mecanismo de patogenicidad. Entre los factores que intervienen en la patogenia se han descrito dos tipos de mecanismos: los dependientes del contacto y los independientes del contacto.

Uno de los mecanismos dependientes del contacto es la adherencia a células epiteliales. En este proceso median 4 proteínas de superficie denominadas adhesinas, con pesos moleculares de 65, 51, 33 y 23 kDa (Alderete *et al*, 1992). La actividad hemolítica (Fiori *et al*, 1993, Carlton *et al*, 2007), la proteolítica (Arroyo y Alderete, 1989; Garber y Lemchuk-Favel, 1994; Mendoza-López *et al*, 2000; Hernández-Gutiérrez *et al*, 2004, Yadav *et al*, 2007a) y la citotoxicidad (Petrin *et al*, 1998) se incluyen dentro de este tipo de mecanismo.

Entre los mecanismos independientes del contacto se citan la excreción del factor de desprendimiento celular (CDF) (Garber *et al*, 1989), la interacción con los miembros de la microbiota vaginal (Petrin *et al*, 1998), así como otros mecanismos del parásito para evadir la respuesta inmune del hospedero (Alderete *et al*, 1995; Provenzano y Alderete, 1995; Engbring *et al*, 1996, Hernández-Gutiérrez *et al*, 2004, Chang *et al*, 2006). La hemólisis (Fiori *et al*, 1996) y la citotoxicidad (Pindak *et al*, 1993) también pueden ser explicadas por este mecanismo.

El descubrimiento reciente del genoma de *T. vaginalis*, ha conllevado al conocimiento de nuevas familias de genes implicados en la patogenia del hospedero (Carlton *et al*, 2007), lo que posibilita nuevas investigaciones que permitan una mejor comprensión de los mecanismos de patogenicidad del parásito.

En 1995, Arroyo y Alderete plantearon que *T. vaginalis* posee altos niveles de actividad proteolítica, identificando 23 cisteino-proteinasas por electroforesis bidimensional (Arroyo y Alderete, 1995). Esta actividad es necesaria para el reconocimiento y adhesión del parásito a la superficie de las células epiteliales del hospedero (Klemba y Goldberg, 2002). Estudios realizados por otros autores determinaron el papel que tienen las cisteino-proteinasas de 30, 65 y 39 kDa en el establecimiento de la infección (Mendoza-López *et al*, 2000; Alvarez-Sánchez *et al*, 2000; Hernández-Gutiérrez *et al*, 2004), mientras Garber y Lemchuk-Favel ya habían sugerido, la posible participación que pudiera tener la proteinasa de 60 kDa en la patogenia producida por el parásito (Garber y Lemchuk-Favel, 1994).

Todo lo anteriormente planteado, unido al importante hecho de la aparición de resistencia al metronidazol (Nanda *et al*, 2006), que es considerado el fármaco de elección para la cura de personas infectadas con este parásito (Young, 2006) y la no existencia de una vacuna efectiva contra *T. vaginalis* trae aparejado la necesidad de la búsqueda de nuevas drogas o la obtención de una vacuna eficaz como alternativas para el tratamiento y prevención de la trichomonosis.

Estudios previos demostraron que la vacunación subcutánea con varias dosis de extracto total de *T. vaginalis* con adyuvantes completo e incompleto de Freund protege parcialmente contra el reto por vía vaginal (Abraham *et al*, 1996). Por otra parte, se ha encontrado respuesta inmune protectora contra otros parásitos utilizando proteinasas nativas o recombinantes (Schnapp *et al*, 2002; Dalton *et al*, 2003; Pollock *et al*, 2003; Kumar *et al*, 2004). Sin embargo, no existen estudios acerca de la utilización de una proteinasa de *T. vaginalis* como posible inmunógeno.

Con vista a buscar un inmunógeno contra *T. vaginalis*, se procedió a purificar la proteinasa de 60 KDa descrita por Garber y Lemchuk-Favel en 1989, utilizando un método similar al planteado por estos autores, con modificaciones, y se obtuvo una proteinasa de peso molecular de 62 kDa (p-62).

Sobre la base de los antecedentes descritos, nos propusimos determinar si la proteinasa de 62 kDa secretada por el parásito, puede constituir una proteína importante capaz de inducir una respuesta inmune eficaz que evitara la infección por *T. vaginalis* en un modelo experimental en ratones y esto nos llevó a formular la siguiente hipótesis.

1.2 Hipótesis

La proteinasa de peso molecular de 62 kDa secretada por *T. vaginalis* estimula una respuesta inmune protectora frente a la infección por este parásito en modelos experimentales en ratones.

1.3 Objetivos.

1.3.1 Objetivo general:

Contribuir al conocimiento de la posible capacidad inmunoprotectora de la proteinasa de 62 kDa secretada por *T. vaginalis*.

1.3.2 Objetivos específicos:

- 1- Obtener anticuerpos monoclonales contra la proteinasa de 62 kDa purificada de antígenos de secreción de *T. vaginalis*.
- 2- Determinar la posible participación de la proteinasa en los procesos de adhesión del parásito a células epiteliales.
- 3- Determinar si los anticuerpos monoclonales anti-proteinasa administrados por vía intraperitoneal son capaces de brindar protección pasiva en un modelo experimental murino.
- 4- Identificar, en el caso de que los anticuerpos monoclonales brinden protección, cual es el posible mecanismo de acción de estos anticuerpos.
- 5- Caracterizar parcialmente los epitopos reconocidos por los anticuerpos monoclonales anti-proteinasa de *T. vaginalis*.
- 6- Evaluar el efecto protector de la inmunización intranasal con la proteinasa de 62 kDa y adyuvantes en un modelo de infección intravaginal con *T. vaginalis* en ratones BALB/c.
- 7- Determinar los niveles de anticuerpos anti-proteinasa de las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 en sueros y de IgG e IgA en lavados vaginales de los ratones inmunizados y posteriormente retados vía intravaginal.

1.4 Novedad científica.

Se demostró y se publicó por primera vez en la literatura internacional la participación de la proteinasa de secreción de 62 kDa de *T. vaginalis* en el proceso de adhesión del parásito a células epiteliales.

Se demostró que los anticuerpos monoclonales (AcMs) dirigidos contra la proteinasa de 62 kDa son capaces de proteger, de forma pasiva, a ratones ante un reto con *T. vaginalis* por vía intraperitoneal.

Por primera vez, se demostró que la proteinasa de 62 kDa de secreción de *T. vaginalis*, administrada por vía intranasal con adyuvantes, induce un alto nivel de protección ante un reto vaginal con este parásito.

Se caracterizaron parcialmente los epitopos protectores reconocidos por los AcMs 4D8 y 1A8.

1.5 Valor práctico.

El valor práctico del trabajo radica en que la trichomonosis es una parasitosis cuyo agente

etiológico causa efectos negativos tanto en mujeres como en hombres, juega un papel importante como cofactor del VIH, se encuentra asociado a otros gérmenes causantes de ITS y en ocasiones manifiesta resistencia al tratamiento de elección, por lo que la identificación de un posible inmunógeno constituye una alternativa alentadora. La demostración de que la proteinasa de 62 kDa de *T. vaginalis*, administrada por vía intranasal con adyuvantes, induce un alto nivel de protección ante un reto vaginal con este parásito en ratones BALB/c, nos permite sugerir que esta molécula podría emplearse como un inmunógeno contra *T. vaginalis*.

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

- XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología. VI Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. III Congreso Cubano de Medicina Tropical. Ciudad de La Habana, 2002.
- XXVI Congreso Latinoamericano de Química. V Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química. Ciudad de La Habana, 2004.
- XI International Congress of Parasitology. Glasgow, 2006.
- XXVII Congreso Latinoamericano de Química. VI Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química. Ciudad de La Habana, 2006.
- XVI Forum de Ciencia y Técnica Municipal y Provincial, 2006.
- XVIII Congreso de la Federación Latinoamericana de Parasitología. Isla Margarita, Venezuela, 2007.
- VIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical. Ciudad de La Habana, 2007.

1.7 Artículos del autor donde se presentan los resultados.

Hernández H, Sario, I Garber G, Delgado D, López O, Sarracent J. Monoclonal antibodies against a 62 kDa proteinase of *Trichomonas vaginalis* decrease parasite cytoadherence to epithelial cells and confer protection in mice. *Parasite Immunology*, 2004, 26:119–125.

Hernández H, Figueredo M, Garrido N, Sánchez L, Sarracent J. Intranasal immunisation with a 62 kDa proteinase combined with cholera toxin or CpG adjuvant protects against *Trichomonas vaginalis* genital tract infections in mice. *International Journal for Parasitology*, 2005, 35:1333-1337.

Hernández H, Figueredo M, Garrido N, Sario, I, Sarracent J. Efecto protector de una proteinasa contra la infección por *Trichomonas vaginalis* en el tracto genital murino. *Biotecnología Aplicada*, 2006, 23:245-247.

Hernández H, Marcet R, Figueredo M, Garrido N, Sarracent J. Comparative study of epitopes recognized by two monoclonal antibodies that protects mice against *Trichomonas vaginalis* challenge. *Experimental Parasitology*, 2008, 118:583-586.

1.8 Reconocimientos de los resultados del presente trabajo.

Trabajo presentado: “Efecto protector de una proteinasa de 62 kDa contra la infección por *Trichomonas vaginalis* en el tracto genital murino”.

- Resultado Relevante Institucional, 2005
- Premio Nacional de la Academia de Ciencias de Cuba, 2005
- XVI Forum de Ciencia y Técnica Municipal (relevante) y Provincial, 2006 (mención).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Trichomonas vaginalis*. Ubicación taxonómica. (Beaver *et al*, 1994, Botero y Restrepo, 2003)

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* (Donné 1836)
Especie: *Trichomonas vaginalis* (Donné, 1836)

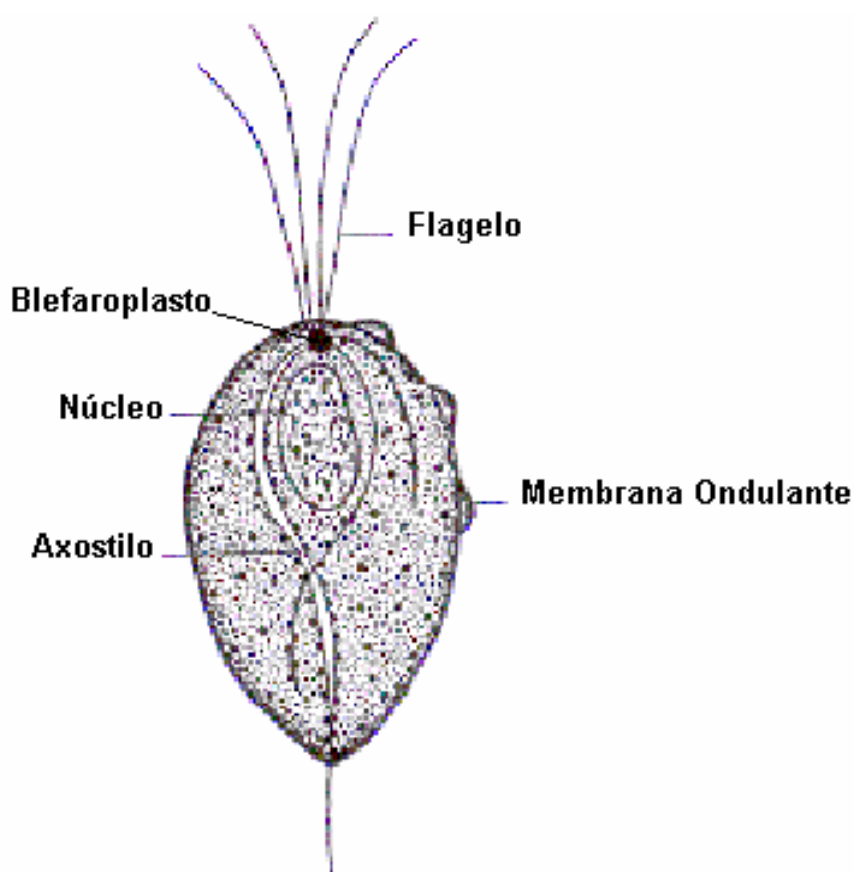
2.2 Aspectos morfológicos

T. vaginalis es un protozoo flagelado que generalmente se describe como piriforme en cultivo axénico. Cuando se adhiere a las células epiteliales vaginales, adquiere forma ameboide con proyecciones citoplasmáticas digitiformes que interactúan con las células dianas (Benchimol, 2004). Este patógeno urogenital varía además en tamaño, alcanzando de 10 a 30 micras de longitud y de 8 a 10 micras de ancho (Botero y Restrepo, 2003).

Posee un aparato locomotor con cinco flagelos, de estos, cuatro son anteriores y emergen de un complejo blefaroplástico, compuesto por un cinetónúcleo y un corpúsculo basal. El quinto flagelo, o flagelo posterior, se ubica sobre el borde libre de una expansión protoplasmática que ocupa los dos tercios anteriores del parásito, la membrana ondulante, cuya designación hace mención al movimiento típico que posee *in vivo* y que le permite desplazarse fácilmente con movimientos de rotación y traslación. En condiciones ambientales desfavorables, el parásito puede internalizar los flagelos adoptando una forma semirredonda, a la cual algunos denominan pseudoquistes (Honigber y Brugerolle, 1990). A

lo largo de la membrana ondulante, reforzando su base, se observa un bastoncillo cromático denominado costa (Petrin *et al*, 1998, Benchimol, 2004).

Figura 1. *Trichomonas vaginalis*.



El citoplasma posee un núcleo ovalado localizado en el extremo anterior del trofozoito con cromatina granular uniformemente distribuida y cariosoma subcentral (Arcelli, 1996). Del núcleo sale una estructura formada por fibrillas denominada axostilo, que recorre la parte media del parásito a modo de varilla rígida. Recientemente, se sugirió la participación de esta estructura en el proceso de división celular (Benchimol, 2004).

Gran variedad de gránulos como son vacuolas digestivas y los hidrogenosomas, denominados así por su relación con la producción de hidrógeno (Muller, 1988), cumplen importantes funciones metabólicas en el citoplasma. Según Dolezal y colaboradores, la identificación de proteínas en *Giardia* y *Trichomonas* relacionadas con un componente de la translocasa de la membrana interna de la mitocondria apoya la hipótesis de que el mitosoma, el hidrogenosoma y la mitocondria representan formas diferentes del mismo organelo, sometidos a distinta presión selectiva (Dolezal *et al*, 2005; Embley y Martín, 2006). El conocimiento de la secuencia genómica de *T. vaginalis* permitió demostrar otras funciones de los hidrogenosomas hasta ahora no conocidas, lo cual confirma el origen común de este organelo con la mitocondria (Carlton *et al*, 2007).

Al microscopio electrónico, la superficie de *T. vaginalis* aparece plegada, imitando una mora con una depresión en forma de cráter y el lado donde se encuentra la membrana ondulante se observa intensamente plegado. Todos los flagelos se hallan reunidos en un solo paquete que emerge desde una depresión anterior poco profunda con un borde prominente. La superficie morulada le sirve para adherirse a la célula huésped, además de incrementar la superficie de absorción, muy importante para el intercambio de nutrientes y factores derivados del parásito. Con la función de nutrición cooperan además la emisión de pseudópodos y la fagocitosis, llevada a cabo por una invaginación profunda que posee en el polo anterior: el citoplasma (Arcelli, 1996).

2.3 Ciclo biológico

T. vaginalis no presenta forma quística o de resistencia, solo existe como trofozoito. Se ha sugerido que los pseudoquistes son una nueva forma en el ciclo celular y no simplemente una forma degenerativa del parásito (Benchimol, 2004). *T. vaginalis* se localiza en la vagina, glándulas prostáticas, vesícula seminal y uretra. Es frágil y se inmoviliza y muere en medio ambiente hostil, con humedad insuficiente y/o pH y temperatura fuera de los límites tolerables (valores óptimos de pH entre 5 - 7,5 y de temperatura entre 35 y 37 °C). En condiciones óptimas, el parásito se multiplica de forma asexual por fisión binaria longitudinal cada 5 a 9 horas, comenzando por el aparato cinetocuclear. Por último, se divide el citoplasma dando origen a dos organismos.

2.4 Manifestaciones clínicas

El período de incubación de la infección por *T. vaginalis* es de 4 a 28 días (Beaver *et al*, 1994), la microbiota de Doderlein se conserva y hay poca o ninguna reacción inflamatoria. A medida que avanza la infección estos parámetros se invierten, es decir, paulatinamente desaparecen los *Lactobacillus acidophilus* (90 % de la microbiota normal de la vagina) (Larcen, 1993) y se reemplazan por una microbiota bacteriana mixta, con aumento del número de leucocitos y de parásitos.

La presencia de síntomas es más frecuente en el sexo femenino; en el hombre generalmente provocan escasa o nula sintomatología (Dragsted *et al*, 2001). No obstante, se ha señalado que entre 25 y 50 % de las mujeres infectadas permanecieron asintomáticas con un pH vaginal entre 3,8 y 4,2 y microbiota vaginal normal. (Spiegel, 1990). Sin embargo, 50 % de estas mujeres desarrollan síntomas clínicos en los posteriores 6 meses. Las variadas formas clínicas de la enfermedad dependen probablemente del número y virulencia del parásito y de la resistencia del hospedero.

La vulvovaginitis de evolución aguda o crónica es una de las manifestaciones clínicas más frecuentes. *T. vaginalis* es la causa de 20 a 25 % de la vulvovaginitis que se presentan en la práctica médica.

Si bien la secreción vaginal es la molestia más común y de frecuente consulta médica, solo entre 10-15 % de las informadas está asociada con trichomonosis. En esta afección, el flujo

vaginal puede ser purulento, de color amarillo, con aspecto espumoso o pasar por distintos matices hasta incoloro, homogéneo, acuoso y no espumoso. Generalmente, suele ser maloliente y el pH elevado entre 5,0 y 7,0. Otros síntomas pueden o no estar presente en la vaginitis por este parásito: edema vulvar, dolor abdominal, eritema vaginal y vulvar, prurito, ardor, irritación, disuria y cistitis, lo que permite clasificar al cuadro como intenso, moderado o leve.

Al examen ginecológico, el cuello uterino puede estar alterado con aspecto edematoso, eritematoso y friable, con áreas puntiformes de color rojo intenso que pueden extenderse además, a la vulva y vagina (Krieger *et al*, 1990; Wendel, 2003; Botero y Restrepo, 2003), éste ha sido considerado 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). Más recientemente, Viikki y colaboradores plantearon que la trichomonosis puede constituir un factor de riesgo para el desarrollo de neoplasia cervical (Viikki *et al*, 2000).

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).

Entre las complicaciones asociadas con la trichomonosis se incluyen las adenitis, piosalpingitis, endometritis, erosión cervical, infertilidad y bajo peso al nacer (Hitti *et al*, 2007). En un estudio realizado, por Cauci y Culhane, detectaron una fuerte inducción de citoquinas proinflamatorias en embarazadas infectadas con *T. vaginalis*, lo que podría contribuir a un incremento en el riesgo de parto prematuro (Cauci y Culhane, 2007).

En el hombre, a pesar de que la infección por *T. vaginalis* aparece como asintomática, se ha sugerido que 19,9 % de todos los casos de uretritis no gonocócica es provocada por este parásito (Schwebke y Hook III, 2003). Los síntomas y signos se presentan en diferente magnitud, entre estos se mencionan: secreción uretral serosa y purulenta; en el glande prurito, edema prepucial, erección dolorosa, eyaculación precoz, ardor miccional, disuria, etc; y las complicaciones incluyen uretritis, prostatitis (Skert *et al*, 2002, Price *et al*, 2003), epididimitis, balanopostitis e infertilidad (Joyner *et al*, 2000). Sutcliffe y colaboradores encontraron asociación entre la presencia de anticuerpos anti-*T. vaginalis* en plasma con la incidencia de cáncer de próstata, en un estudio de caso-control realizado en profesionales de la salud (Sutcliffe *et al*, 2006).

2.5 Relación entre *Trichomonas vaginalis* y VIH.

T. vaginalis es considerado uno de los más importantes cofactores en la transmisión del VIH (Prashini *et al*, 2002; Rughooputh y Greenwell, 2005). El mecanismo para la transmisión puede estar asociado con alteraciones genitales provocadas por varias enzimas (Ezs) hidrolíticas, incluyendo cisteino-proteinasas y glicosidasas secretadas por el parásito. Estas podrían destruir proteínas defensivas del organismo y glicoproteínas, lo que permitiría el acceso al epitelio y la exposición a áreas ulcerosas, facilitando la entrada del virus (Rughooputh y Greenwell, 2005; Guenther *et al*, 2005). Además, este fenómeno también puede verse favorecido por la infiltración leucocitaria (linfocitos T CD4⁺ y macrófagos) provocados por una agresiva respuesta inmune celular local causada por el parásito en presencia de la infección por VIH (Guenther *et al*, 2005).

Magnus y colaboradores plantearon que la trichomonosis vaginal constituye la ITS más común encontrada en mujeres VIH positivas. De un total de 1578 mujeres infectadas con el virus, 30,2 % resultaron ser portadoras de *T. vaginalis* (Magnus *et al*, 2003).

En un trabajo reciente realizado con 1335 prostitutas seronegativas a VIH-1, monitoreadas por un período de 566 días, se encontró que 806 adquirieron *T. vaginalis* y 265 mujeres del total resultaron seropositivas a VIH-1 al final del estudio. Se halló asociación entre la trichomonosis y el incremento en el riesgo de contraer VIH-1 de 1,52 veces (McClelland *et al*, 2007). Sobre la base de esta asociación, algunos autores plantean que cada día se hace más importante el control de la trichomonosis, lo que podría ayudar a prevenir la transmisión del VIH (Chesson *et al*, 2004).

2.6 *Trichomonas vaginalis* y su relación con Papilomavirus humano y *Mycoplasma hominis*.

Actualmente son de gran interés los estudios relacionados con la asociación entre trichomonosis y cambios relacionados con la presencia de Papilomavirus humano (PVH), agente etiológico de los condilomas acuminados de los genitales externos, región perianal y de los condilomas planos del cérvix (Soto, 2001).

De esta misma forma, la asociación entre *T. vaginalis* y lesión neoplásica del cérvix había sido señalada por Bechtold y Reicher quienes sugirieron 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).

Sayed el-Ahl y colaboradores investigaron la presencia de anticuerpos anti- *T. vaginalis* en 48 pacientes con cáncer cervical invasivo y en un grupo control de 100 mujeres sanas seleccionadas aleatoriamente. Aproximadamente, 19 % de las pacientes mostraron anticuerpos específicos anti-*T. vaginalis*, cifra tres veces superior a la encontrada en el grupo control, lo que sugiere una importante asociación entre sufrir el cáncer cervical e infección por *T. vaginalis* (Sayed el-Ahl *et al*, 2002). Otros estudios mostraron también esta asociación (Viikki *et al*, 2000; El-Gayar y Rashwan, 2007).

Estudios realizados por otros autores señalaron que la presencia de PHV es más frecuente en mujeres con trichomonosis por lo que el hecho de presentar una infección por *T. vaginalis* pudiera aumentar la posibilidad de infección por PVH (Sobel, 1997; Rojas *et al*, 1998).

Teóricamente, se plantea que el virus entra en el aparato genital femenino y accede hacia las células germinales y replicativas del epitelio basal facilitado por las lesiones que puede provocar el parásito en la superficie de la mucosa. Sin embargo, otros autores consideran al parásito como elemento transportador de agentes patógenos. En el interior del parásito se identificaron plásmidos y microorganismos (Vancini y Benchimol, 2008) que aunque pueden servir como nutrientes, pudieran de esta forma ser introducidos en las zonas más susceptibles del tracto genital, lo que permitiría una infección más eficiente. Rappelli y

colaboradores comprobaron la transmisión *in vitro* de *Mycoplasma hominis* desde parásitos infectados hacia parásitos y células epiteliales humanas no infectadas, lo que sugirió el papel de *T. vaginalis* en la infección *in vivo* (Rappelli *et al*, 2001); posteriormente, fue demostrada la replicación intracelular de *M. hominis* en *T. vaginalis* (Dessi *et al*, 2005). Resultados recientes muestran que *Trichomonas* pueden ser vistas no solo como nicho de *M. hominis* sino como agente transmisor de infecciones bacterianas al hospedero humano (Dessi *et al*, 2006).

2.7 Diagnóstico

2.7.1 Técnicas microscópicas y de cultivo.

Las manifestaciones clínicas no brindan los elementos necesarios para efectuar el diagnóstico 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.

El diagnóstico de la trichomonosis se realiza tradicionalmente por la observación microscópica de parásitos móviles, principalmente en secreciones vaginales. Esta técnica fue descrita por primera vez por Donné (Donné, 1836). La sensibilidad de este método varía de 36 a 75 % (Wiese *et al*, 2000), si se compara con la técnica de cultivo del parásito. La misma depende, sobre todo, de la experiencia del técnico que realiza el examen, así como si hay pérdida de motilidad del parásito después de tomada la muestra, lo que puede traer confusión. La aplicación de ducha vaginal poco tiempo antes a la toma de la muestra, puede provocar reducción importante de la sensibilidad del diagnóstico. Este método, a pesar de su poca sensibilidad (se requieren aproximadamente mil parásitos por mililitro de secreción para un examen directo positivo), permanece aún como el más ampliamente utilizado para el diagnóstico de la trichomonosis, por ser un procedimiento útil, sencillo, rápido y de bajo costo.

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 de la muestra a baja velocidad.

La técnica de cultivo *in vitro* es considerada la “prueba de oro” para el diagnóstico de la trichomonosis (Vázquez *et al*, 2008), por la interpretación tan simple de sus resultados, además de requerir solo entre 300 y 500 parásitos por mililitro de inóculo (Garber *et al*, 1987) para iniciar el crecimiento en cultivo. Con este método se alcanza una sensibilidad de 98 % (Botero y Restrepo, 2003), por lo que debe ser incluido en la evaluación cuando el examen directo simple de este parásito fracasa. Sin embargo, tiene sus limitaciones, esta técnica es costosa y no está disponible en todas partes, además requiere de hasta 7 días para identificar al parásito en cultivo (Botero y Restrepo, 2003), período en el cual las personas infectadas pueden continuar transmitiendo la infección. Esta técnica ofrece la ventaja de poder diagnosticar situaciones clínicas en las cuales puede haber un bajo número de parásitos, o en estudio 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 contienen medio líquido de cultivo y es utilizado para el examen inmediato de la muestra, además del cultivo del parásito (Draper *et al*, 1993). Levi y colaboradores demostraron que para la detección de *T. vaginalis* el sistema InPouch es menos sensible que el método de cultivo en medio de Diamond (Levi *et al*, 1996); sin embargo, otros autores confirmaron lo contrario (Borchardt *et al*, 1996). Sood y colaboradores recomendaron el empleo del sistema InPouch en el diagnóstico de rutina de infecciones del tracto genital (Sood *et al*, 2007). A pesar de esto, el método de cultivo *in vitro* en medio de Diamond continúa considerándose el procedimiento de elección para el diagnóstico de trichomonosis vaginal.

Algunos autores emplearon diferentes líneas celulares para lograr el aislamiento del parásito a partir de muestras clínicas (Krieger *et al*, 1985). Garber y colaboradores

utilizaron células de McCoy para el cultivo de *T. vaginalis* a partir de exudados vaginales con buenos resultados (Garber *et al*, 1987).

Las tinciones de parásitos fueron introducidas como consecuencia de la lentitud de los métodos de cultivo *in vitro*, así como por la falta de sensibilidad demostrada en preparaciones directas, lo que permitió mejorar la sensibilidad de la microscopia directa. Las tinciones más comunes utilizadas son: naranja de acridina, Leishman, Shiff, Fontana y Papanicolaou (Pap). Esta última es empleada además, para la detección de anomalías citológicas en mujeres mayores de 35 años y en poblaciones con una alta prevalencia de infecciones de transmisión sexual. Perl encontró 48,4 % de error cuando empleó Pap como criterio único para el diagnóstico y seguimiento del tratamiento de *T. vaginalis* (Perl, 1972). Sin embargo, en la actualidad se recomienda su uso en el diagnóstico de esta parasitosis. (Fitzhugh y Heller, 2008).

Las técnicas de tinción tienen limitaciones, pues no siempre *T. vaginalis* aparece en su forma típica de pera con flagelo; en ocasiones aparecen redondeadas similares a leucocitos polimorfonucleares y además, durante el proceso de fijación y tinción pueden perderse las características morfológicas típicas del parásito, lo que hace difícil su identificación.

Cohen y colaboradores recomendaron que el cultivo y la microscopia son necesarios para la detección de *T. vaginalis* (Cohen *et al*, 2006). Más tarde, Clark y colaboradores diagnosticaron 105 mujeres con *T. vaginalis* por el sistema InPouch y de éstas 48 (47,5%), que fueron las que mostraron más signos de infección, resultaron positivas por el diagnóstico directo (Clark *et al*, 2007). No obstante, las limitaciones de los métodos microscópicos y de cultivo para la detección de *T. vaginalis* motivan el avance de métodos más sofisticados con los cuales puedan detectarse antígenos, anticuerpos y ácidos nucleicos propio del parásito en exudados uretrales y vaginales.

2.7.2 Técnicas basadas en anticuerpos.

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 por su importancia, continúan en estudio.

La presencia de anticuerpos anti-*T. vaginalis* en suero de personas infectadas se demostró mediante el empleo de variadas técnicas que incluyen aglutinación, fijación de complemento, hemaglutinación indirecta, difusión en gel, técnicas fluorescentes e inmunoenzimáticas de fase sólida (ELISA) (Burgess, 1998).

En ocasiones, estos métodos tienen desventajas relacionadas con la poca sensibilidad de los mismos para detectar niveles bajos de anticuerpos particularmente porque en el momento de la toma de la muestra no se ha producido aún un incremento en los niveles de anticuerpos.

Adu-Sarkodie y colaboradores, con el empleo de un sistema de aglutinación con latex para la detección de antígenos de *T. vaginalis*, obtuvieron 95 y 98,8 % de sensibilidad y 99 y 92,2 % de especificidad al compararlo con la técnica de cultivo para el diagnóstico de este parásito (Adu-Sarkodie *et al*, 2004).

La detección directa de *T. vaginalis* en muestras clínicas usando AcMs constituye un método rápido para el diagnóstico del parásito. Se han obtenido AcMs contra proteínas de 65 kDa para la detección de *T. vaginalis* en muestras clínicas con resultados muy similares a los obtenidos en preparaciones directas (Lisi *et al*, 1988). El empleo de detección de otros antígenos tales como CDF, y la cisteino-proteinasa de peso molecular de 60 kDa puede constituir una alternativa para estos fines (Garber y Lemchuk-Favel, 1989).

La búsqueda de nuevos métodos de diagnóstico ha conllevado al desarrollo de ensayos inmunocromatográficos para la detección de *T. vaginalis*. Un ensayo basado en un sistema de detección que emplea un AcM mostró un nivel de sensibilidad entre 78,5 y 90 % en muestras vaginales (Miller *et al*, 2003; Kurth *et al*, 2004). Recientemente, otro ensayo

basado en una tira reactiva para la detección rápida del parásito en muestras vaginales, resultó ser un método simple y objetivo. Se espera que éste pueda mejorar el diagnóstico de *T. vaginalis* especialmente en lugares donde no hay disponibilidad de microscopios y donde existan limitaciones para el cultivo del parásito (Huppert *et al*, 2005).

2.7.3 Técnica de ADN.

La técnica de hibridización dot-blot, la cual emplea un fragmento de ADN de 2,3 Kb de *T. vaginalis*, puede detectar ADN de este parásito en exudados vaginales. Sin embargo, debido a la inestabilidad de la sonda y el cuidado especial que se necesita en el manejo del material radioactivo, el empleo de esta técnica tiene desventajas notables (Rubino *et al*, 1991). Estas deficiencias fueron superadas mediante el empleo de esta misma sonda pero marcada con fluoresceína para la identificación de *T. vaginalis* por la técnica de hibridización de ADN *in situ* (Muresu *et al*, 1994).

Con la finalidad de elevar la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la trichomonosis vaginal, también se han empleado las técnicas del ADN recombinante (Black y Stephen, 2000). El empleo de la combinación de los métodos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y ELISA nos permite la detección del parásito en muestras de orina con un nivel de sensibilidad y especificidad de 86,4 y 84,1 %, respectivamente (Kaydos *et al*, 2002). En un estudio realizado por Briselden y Hillier el sistema *Affirm VP* (MicroProbe Corp, Bothwell, Wash.) que emplea oligonucleóticos sintéticos para la detección de *G. vaginalis* y *T. vaginalis* en muestras de exudado vaginal, resultó superior al método de preparaciones directas, no comportándose así, al comparar estos resultados con las técnicas de cultivo *in vitro* (80 % de sensibilidad, sistema *Affirm VP*) (Briselden y Hillier, 1994). El sistema de PCR comercial para la detección de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* adaptado al diagnóstico de *T. vaginalis* resultó más sensible que el diagnóstico microscópico del parásito en muestras vaginales y que el método de cultivo para el diagnóstico en hombres (Van Der Pol *et al*, 2006).

Estudios realizados por Randonjic y colaboradores demostraron, con la técnica de PCR, una buena sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de *T. vaginalis*, sin embargo esta técnica no se mostró superior a la de cultivo. Esto sumado a la poca disponibilidad de la misma, por lo costosa que resulta, les permitió sugerir que el PCR pudiera ser empleado como una alternativa en los laboratorios donde se realiza el diagnóstico por cultivo del parásito. (Randonjic *et al*, 2006).

Hasta el presente, el cultivo *in vitro* de *T. vaginalis* continúa siendo la técnica de elección para el diagnóstico de este parásito por el nivel de sensibilidad de la misma, si se compara con el resto de los métodos establecidos.

2.8 Epidemiología

La trichomonosis es una de las ITS más difundida, se estima que existen más de 170 millones de personas infectadas en el mundo (WHO, 2001). La tasa de incidencia depende 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. Predomina en adultos en el rango de edades de mayor actividad sexual (entre 16 y 35 años). Ocasionalmente, se encuentra en niñas y mujeres de otras edades, por transmisión no venérea (Botero y Restrepo, 2003).

El principal mecanismo de transmisión de la infección por *T. vaginalis* es el contacto sexual, en forma ocasional puede ser contraída en baños de inmersión en piscinas y por uso compartido de ropa interior y toallas. El trofozoito es lábil y se destruye con facilidad en el medio ambiente, especialmente en ausencia de humedad y pH adecuados; sin embargo, pueden sobrevivir en toallas húmedas por varias horas, lográndose obtener cultivos positivos en muestra tomadas de ropas húmedas hasta 24 horas después de contaminada las mismas, lo que indica la posibilidad de transmisión por este mecanismo. Esta forma de transmisión ocurre fundamentalmente en niñas y mujeres vírgenes.

Los recién nacidos, hijos de madres infectadas, pueden adquirir el parásito a través de su paso por el canal del parto (Carter y Whithaus, 2008). De las infecciones en el neonato por *T. vaginalis*, entre 2-17 % tienen lugar por este mecanismo (Petrin *et al*, 1998).

2.9 Tratamiento.

En 1959 se demostró la alta efectividad de un derivado nitroimidazólico de la azomicina, antibiótico aislado de *Streptomyces*, en el tratamiento de la trichomonosis (Cosar y Julou, 1959). Este derivado es el α,β -hidroxietil-2-metil-5-nitroimidazol, comúnmente denominado metronidazol.

El metronidazol penetra a la célula a través del fenómeno de difusión y es activado en los hidrogenosomas del parásito, donde el grupo nitro de la droga es reducido anaeróbicamente por la enzima piruvato-ferredoxina-oxidoreductasa, lo que resulta en radicales citotóxicos (Tocher y Edwards, 1994). La respuesta es rápida, la motilidad y la división cesan una hora después de administrada la droga y 8 horas después de aplicado el medicamento se aprecia la muerte del parásito (Martínez y Caume, 2001; Crossnoe *et al*, 2002).

Hrdý y colaboradores describieron otra vía involucrada en la activación del metronidazol en los hidrogenosomas. Por esta vía, los electrones requeridos para la activación de la droga son liberados del malato por la acción de la enzima málica dependiente de NAD. Niveles altos de resistencia al metronidazol solo se adquieren después de que estas vías de activación de la droga son eliminadas de los hidrogenosomas (Hrdý *et al*, 2005). El parásito puede desarrollar resistencia al metronidazol tanto anaeróbica como aeróbica sin embargo, en la mayoría de los casos, esta última es la que se manifiesta en los pacientes infectados con parásitos resistentes (Upcroft y Upcroft, 2001).

La dosis recomendada actualmente es de 250 mg por vía oral, tres veces al día durante una semana o una dosis única de 2 g. Los cónyuges deben ser tratados, ya sean asintomáticos o

no, para prevenir la reinfección, alcanzándose un grado de efectividad entre 82 y 88 % (Botero y Restrepo, 2003).

El metronidazol al atravesar la barrera placentaria puede provocar malformaciones en el feto por lo que está contraindicado durante el primer trimestre del embarazo (Lossick y Kent, 1991). En algunos modelos experimentales, esta droga, es capaz de inducir tumores (Beard *et al*, 1979). Sin embargo, estos efectos no se asocian directamente con el empleo del mismo, por lo que aún es controversial la relación entre la infección con *T. vaginalis*, la morbilidad durante el embarazo y la terapia con nitroimidazoles (Nanda *et al*, 2006).

En mujeres embarazadas se emplean supositorios de clotrimazol, 100 mg intravaginales por 14 días, alcanzándose una cura de 50 % aproximadamente (Lossick y Kent, 1991); si la sintomatología persiste, puede aplicarse tratamiento con metronidazol en dosis única de 2 g durante el tercer trimestre del embarazo. En mujeres que están lactando también deberá ser aplicada esta dosis de 2 g e interrumpir la lactancia por 24 horas.

Los fallos en el tratamiento casi siempre se relacionan con tratamientos incompletos e inadecuados (Grossman y Galask, 1990), con pobre absorción de la droga (Kane *et al*, 1961), inactivación del medicamento por la microbiota vaginal (Benazet y Gillaume, 1971), con las reinfecciones (Korner y Jensen, 1976) y por la resistencia al medicamento. Estudios de susceptibilidad *in vitro* demostraron que parásitos aislados de pacientes mostraron diferentes niveles de resistencia al metronidazol (Snipes *et al*, 2000, Lo *et al*, 2002; Dunne *et al*, 2003; Schwebke y Barrientes, 2006).

En el tratamiento de la trichomonosis se utilizan otros nitroimidazoles, tinidazol y secnidazol, ambos se deben administrar 2 g en dosis única; y el ornidazol 1,5 g en dosis única para la infección aguda y 1g durante 5 días para casos con las formas crónicas (Botero y Restrepo, 2003). El tratamiento con tinidazol resultó ser efectivo en pacientes que manifestaron resistencia al metronidazol (Soper, 2004; Schwebke y Burgess, 2004; Nanda *et al*, 2006). En un estudio *in vitro* realizado por Schwebke y Barrientes se planteó

un nivel de resistencia al metronidazol y tinidazol de 9,6 y 0,56 %, respectivamente (Schwebke y Barrientes, 2006). Son pocas las alternativas a las terapias con nitroimidazoles y éstas han demostrado una eficacia limitada y una significativa toxicidad (Nanda *et al*, 2006).

Estos fenómenos de resistencia a los nitroimidazoles junto a la poca efectividad de otros tratamientos, traen consigo la necesidad de búsqueda de nuevas drogas potenciales como alternativa para el tratamiento y prevención de la trichomonosis.

2.10 Modelos experimentales. Vías de inoculación.

Aunque existen reportes relacionados con modelos de infección en animales de laboratorio con *T. vaginalis*, no todos contribuyen a una adecuada comprensión de la enfermedad y el parásito. En esto está involucrado, entre otros, el complejo medio ambiente donde habita este protozoo, la vagina humana, los cambios locales producidos por los ciclos hormonales y los mecanismos específicos de escape del parásito.

Se ha experimentado con monos, hámsters, perros (Daly *et al*, 1990), carneros (Corbeil, 1995), ratones y ratas (Hook, 1995). A pesar de que muchos animales son estudiados como modelos de infección por *T. vaginalis*, la disponibilidad de un modelo animal para el estudio de la trichomonosis humana no es un problema resuelto satisfactoriamente (Schwebke y Burgess, 2004). Esto no es posible por la falta de capacidad para mantener la infección y por el costo y las limitaciones en el mantenimiento de algunas de estas especies. La falta de un buen modelo trae consigo limitaciones en las investigaciones sobre transmisión, patogénesis, respuesta inmune y en el desarrollo de drogas y vacunas.

El ratón constituye el modelo de infección más empleado (Kulda, 1990; Nogal-Ruiz *et al*, 1997; Lushbaugh *et al*, 2000; Paintlia *et al*, 2002; Nogal-Ruiz *et al*, 2003; Yadav *et al*, 2005; Malla *et al*, 2007). Sin embargo, de todos los animales utilizados son los monos donde mejores resultados se han alcanzado. Su ciclo menstrual es similar al del humano, sin embargo por las limitaciones en su disponibilidad no se emplea con frecuencia. Patton y

colaboradores obtuvieron 83 % de infección vaginal en un estudio realizado, durante 2 semanas, con 12 monas *Macaca menestrona*, sin previa estrogenización (Patton *et al*, 2006).

La inoculación intravaginal de *T. vaginalis* constituye la vía de infección más real. Este procedimiento presenta dificultades técnicas, lo que limita en ocasiones las investigaciones, pues es necesario crear un microambiente en la vagina del animal lo más cercano posible a lo que ocurre en el sistema genitourinario humano. Se requiere en ocasiones previa estrogenización en el modelo animal, etapa que favorece la infección por este parásito por inducción y reforzamiento de niveles de glucógeno dentro de la vagina (Hook, 1995). Lushbaugh y colaboradores obtuvieron 100 % de infección, entre el segundo y el cuarto día posterior al reto intravaginal con el parásito, empleando ratones estrogenizados pre-tratados con *Lactobacillus rhamnosus* (Lushbaugh *et al*, 2000). Más recientemente, otros autores también emplearon este modelo en el estudio de la respuesta inmune a este parásito (Paintlia *et al*, 2002; Yadav *et al*, 2005; Malla *et al*, 2007).

La inoculación intramuscular es una de las vías sugeridas para ensayos de virulencia de *T. vaginalis* (Gavrilescu, 1962). Sin embargo, Ivey y Hall encontraron que esta vía de inoculación es inadecuada para evaluar la virulencia, debido a la considerable variación en la talla de la lesión y la pobre accesibilidad al sitio de infección (Ivey y Hall, 1984). Las vías ocular, intratorácica y escrotal constituyen otras rutas para inoculaciones del parásito utilizadas con menor frecuencia.

Se han utilizado otras vías de inoculación en ratones: la vía intraperitoneal (Cavier *et al*, 1972) y la vía subcutánea (Honigberg *et al*, 1966). La vía intraperitoneal produce necrosis visceral especialmente hepática y pancreática, además líquido ascítico, cuyo volumen es proporcional al nivel de virulencia de la cepa inoculada, pudiendo hasta ocasionar la muerte (Rojas *et al*, 2004 a). Los ratones se han empleado en estudios de patogenicidad, inmunológicos y terapéuticos. Nogal-Ruiz y colaboradores demostraron la utilidad de este

modelo experimental en un estudio de la actividad inmunomoduladora de drogas naturales y sintéticas (Nogal-Ruiz *et al*, 2003).

Las inoculaciones subcutáneas de *T. vaginalis* en ratones, desarrollan abscesos localizados en el sitio de la inyección. El desarrollo de la lesión depende de la capacidad del parásito para multiplicarse en el área de inoculación y con el tamaño de la misma puede estimarse el nivel de virulencia de la cepa en estudio. El tipo de lesión se corresponde con abscesos compactos y purulentos. En relación con este modelo, Kulda encontró correlación entre los ensayos de virulencia y la infección clínica (Kulda, 1990). Sin embargo, en ese mismo año Garber y Lemchuk-Favel plantearon que los ensayos subcutáneos son más utilizados para diferenciar parásitos virulentos de avirulentos, pero su correlación con la clínica es muy pobre (Garber y Lemchuk-Favel, 1990). Esta contradicción permite sugerir que los resultados obtenidos con las inoculaciones más comunes (subcutánea e intraperitoneal) que exponen al parásito a sitios de localización no naturales, deben ser interpretados cuidadosamente, tratando de evitar conclusiones erróneas.

2.11 Patogenia

En la actualidad se desconoce el mecanismo exacto por el cual el parásito causa daño. Algunas de 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, los dependientes del contacto y los independientes de éste.

2.11.1 Mecanismos dependientes del contacto.

2.11.1.1 Adhesión y adhesinas.

La adhesión de *Trichomonas* a las células epiteliales en la vagina es una etapa crítica en la patogénesis del parásito (Engbring y Alderete, 1998). *In vitro*, *T. vaginalis* tiene más afinidad por las células epiteliales vaginales de línea que por otras células. Esto no es sorprendente, pues las células epiteliales son el principal tipo de célula sobre la que actúa el

parásito *in vivo* (Alderete y Garza, 1984). La superficie del parásito es un mosaico de adhesinas y receptores de proteínas y carbohidratos de la matriz extracelular del hospedero, los cuales proporcionan la base para la unión ligando - receptor (Bonilha *et al*, 1995; Engbring y Alderete, 1998).

La adhesión del parásito a células epiteliales está mediada por cuatro proteínas: AP65, AP51, AP33 y AP23 (Arroyo *et al*, 1992). Un incremento en la síntesis de estas adhesinas fue reportado por García y colaboradores, después del contacto del parásito con células epiteliales vaginales (García *et al*, 2003). Este fenómeno de adhesión causa alteraciones en el complejo funcional de las células del hospedero tales como, decrecimiento en la resistencia eléctrica trans-epitelial, alteraciones en el modelo de distribución de las proteínas del complejo funcional y alargamiento del espacio entre células epiteliales. Estas alteraciones dependen del grado de virulencia del parásito, de la concentración de hierro en el medio de cultivo en el sistema *in vitro* y de la expresión de las proteínas de adhesión (Madeiro de Costa *et al*, 2005). Mundodi y colaboradores confirmaron el papel de la AP33 como proteína de adhesión en *T. vaginalis* (Mundodi *et al*, 2007).

Experimentos *in vitro* muestran formas ameboides y ovoides del parásito, con un reconocimiento y unión a células altamente específicas. Una posible razón del cambio a esta morfología ameboide, es la necesidad de maximizar el contacto célula a célula para obtener un parasitismo más estable y eficiente. La adhesión requiere también la presencia de cisteino-proteinasas para activar las moléculas de adhesión en la superficie del protozoo (García *et al*, 2005).

Recientemente, fue planteada la expresión de genes reguladores en células epiteliales vaginales (Kucknoor *et al*, 2005 a) y en *T. vaginalis* (Kucknoor *et al*, 2005 b) después del contacto del parásito con dichas células.

La laminina es una glucoproteína especializada de las células vaginales que tiene propiedades quimiotácticas, localizada en la membrana basal del epitelio y promueve la

adhesión, diferenciación, la forma y motilidad de las células epiteliales (Costa e Silva-Filho *et al*, 1988). *T. vaginalis* se observaron 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). Además, receptores para esta glucoproteína se encuentran en macrófagos, bacterias y en células cancerígenas (Lopes *et al*, 1988) pero su papel en la patogénesis de *T. vaginalis* no está definido aunque hay evidencias que indican que puede ser una diana para la adhesión del parásito (Silva-Filho *et al*, 2002).

La fibronectina es otra proteína que se expresa en la membrana basal y es secretada al suero por el parásito y posee receptores que se encuentran en las células epiteliales. El parásito puede encontrarse unido a fibronectina del hospedero y a otras proteínas del suero (Peterson y Alderete, 1982), pero no está claro si la función del receptor para esta molécula está relacionado con la adquisición de nutrientes (Peterson y Alderete, 1984), con la adhesión (Alderete *et al*, 1994) o con la combinación de ambas funciones (Gold y Ofek, 1992). Alderete y colaboradores señalaron que la afinidad del parásito por la molécula de fibronectina está influenciada por la concentración de hierro y de calcio en el medio (Alderete *et al*, 2002).

Los carbohidratos (D-lactosa y N-acetil- β -D-glucosamina) presentes en la superficie del parásito y el posible papel de estas moléculas en el fenómeno de adhesión fueron descritos por Wantor y Honigberg en 1983. La presencia de carbohidratos parece estar correlacionada con la virulencia (Kon *et al*, 1988), se piensa que algunas de estas moléculas pudieran estar involucradas en la hemólisis del eritrocito (De Carli *et al*, 1994), en la fagocitosis de células dianas (Benchimol y de Souza, 1995) y asociadas al fenómeno de susceptibilidad a drogas (Dias Filho *et al*, 1992). Gilbert y colaboradores demostraron la participación de grupos carbohidratos funcionales en el proceso de adhesión del parásito a células epiteliales (Gilbert *et al*, 2000). Además, el parásito está recubierto por un glicocalix cuyo principal componente es lipofosfoglucono (LPG), un polisacárido anclado en la membrana plasmática. Estudios realizados con mutantes de LPG demostraron que la adhesión del parásito a células epiteliales está mediada por este liposacárido y que una

alteración en su producción reduce la adherencia y citotoxicidad de este parásito (Bastida-Corcuera *et al*, 2005). Recientemente, Fichorova y colaboradores señalaron que los LPG de *T. vaginalis* inducen una regulación selectiva de citoquinas quimiotácticas en células epiteliales vaginales humanas, endocervicales y ectocervicales (Fichorova *et al*, 2006). Carlton y colaboradores identificaron genes que codifican Ezs que parecen ser requeridas para la síntesis de LPG. De particular importancia son los genes necesarios para la síntesis de un azúcar-nucleotídico, no usual, encontrado en LPG de *T. vaginalis*, el monosacárido ramnosa, el cual está ausente en el hospedero humano, constituyendo un potencial blanco para drogas (Carlton *et al*, 2007).

2.11.1.2 Hemólisis.

La mucosa vaginal constituye un pobre entorno nutricional para los parásitos. Los lípidos y el hierro son importantes nutrientes de *T. vaginalis* y deben adquirirse a través de la lisis de los eritrocitos (Levi *et al*, 1996).

La presencia de parásitos metabólicamente activos es necesaria para la lisis de eritrocitos. Este fenómeno es afectado grandemente por la presencia de inhibidores de cisteino-proteinasas, lo cual sugiere que estas enzimas pueden ser un factor lítico involucrado en la hemólisis (Dailey *et al*, 1990; Fiori, *et al* 1997). Vargas-Villarreal y colaboradores identificaron actividad de fosfolipasas A1 y A2 asociadas a la membrana del parásito, con un efecto hemolítico (Vargas-Villarreal *et al*, 2005).

La lisis parece estar mediada por receptores presentes en la superficie del eritrocito y el parásito (Fiori *et al*, 1993), existen estudios que sugieren que proteínas perforinas pueden estar involucradas en este proceso. Carlton y colaboradores identificaron 12 genes (TvSaplip 1 a TvSaplip 12) que contienen dominios formadores de poros en *T. vaginalis*. Estos son similares a las porinas secretadas por *Entamoeba histolytica* que también tienen efecto citolítico (Carlton *et al*, 2007). La hemólisis ocurre en tres etapas: la adhesión del parásito al eritrocito, favorecido por una interacción ligando-receptor específica; la liberación de la proteína perforina (posiblemente cisteino-proteinasas) por el parásito, la

cual forma poros en la membrana del eritrocito y finalmente, se produce la lisis del eritrocito.

Ensayos realizados por Krieger y colaboradores demostraron que la actividad hemolítica está correlacionada con la virulencia (Krieger *et al*, 1983). Más tarde, Valadkhan y colaboradores determinaron que la liberación de hemoglobina fue significativamente más alta en aislamientos sintomáticos al compararlos con los asintomáticos (Valadkhan *et al*, 2003). Además, se demostró que el grupo hemo del hierro incrementa los niveles de la adhesina AP65, que media en la adherencia del parásito a las células epiteliales del hospedero (Alderete *et al*, 2004).

Las proteinasas también están relacionadas con otros mecanismos de virulencia, por ejemplo invasión del mucus (Lehker y Sweeney, 1999), citotoxicidad (Arroyo y Alderete 1995; Min *et al*, 1997; Alvarez-Sánchez *et al*, 2000), en la degradación de inmunoglobulinas (Igs) (Min *et al*, 1998; Hernández-Gutiérrez, *et al*, 2004) y de componentes del complemento (Alderete *et al*, 1995) y en la destrucción del citoesqueleto del glóbulo rojo (Fiori *et al*, 1997).

Observaciones recientes muestran variaciones en la expresión de proteinasas dependiendo de las condiciones de crecimiento *in vitro* del parásito, especialmente de la concentración de Fe en el medio (León-Sicarios *et al*, 2004).

El pre-tratamiento del parásito con N α -p-tosil-lisina-clorometilcetona HCL (TLCK), potente inhibidor de cisteino-proteinasa, causa una considerable disminución en su capacidad de adherirse a células epiteliales. Además, con la adición de cisteino-proteinasa a células en cultivo tratadas, con TLCK, se recupera la capacidad del parásito de adherirse a estas células, lo que indica esta observación que la acción de proteinasas sobre la superficie del parásito es pre-requisito en el proceso de adhesión (Arroyo y Alderete, 1989).

Garber y Lemchuk-Favel purificaron y caracterizaron proteinasas de secreción de *T. vaginalis* de 30 y 60 kDa utilizando como sustrato *hide powder azure* y caseína para la medición de la actividad proteinasa. Estos autores propusieron que en trabajos futuros debería demostrarse la importancia que pudiera tener la proteinasa de 60 kDa en la patogénesis de la enfermedad (Garber y Lemchuk-Favel, 1989).

Recientemente, Sommer y colaboradores identificaron cisteino-proteinasa de *T. vaginalis* que inducen apoptosis en células epiteliales vaginales humanas (Sommer *et al*, 2005).

2.11.2 Mecanismo independientes del contacto.

Este tipo de mecanismo, causante también de efecto citopático, lo reportó por primera vez Hogue en 1943. El efecto citotóxico (Pindak *et al*, 1993) y la hemólisis (Fiori *et al*, 1996; Vargas-Villarreal *et al*, 2005) no ocurren solamente por mecanismos dependientes del contacto, sino también ocurren en ausencia del contacto célula - célula. Los cambios de pH producidos por los metabolitos ácidos como el ácido láctico y el ácido acético del metabolismo de la glucosa, son parcialmente responsables de la hemólisis (Fiori *et al*, 1996).

El parásito produce también otros factores que causan efecto citopático como el CDF.

2.11.2.1 Liberación del factor de desprendimiento celular, CDF.

Los productos de excreción de *T. vaginalis* y el CDF, causan efecto citopático en cultivo de células. Cuando este factor extracelular, se pone en contacto con monocapas de células de cultivo *in vitro*, provoca el desprendimiento de estas células. Este fenómeno es análogo al que ocurre con las células epiteliales de la vagina durante las infecciones agudas. (Pindak *et al*, 1986; Garber *et al*, 1989). La actividad del CDF es un efecto asociado a la patogénesis, no detectándose hasta el momento, en especie no patógena, como *Pentatrichomonas hominis* (Garber *et al*, 1989).

La concentración del CDF que se obtiene cuando se mantiene *T. vaginalis* en condiciones de cultivo, varía por tres factores fundamentales: el tiempo que se demoran en crecer los parásitos, previo a la preparación del filtrado, el tamaño del inóculo inicial, y el pH del medio. Esta molécula es una glucoproteína de 200 kDa que es inmunogénica en el hombre y purificada es activa en un rango de pH entre 5,0-8,5 con una actividad óptima a pH 6,5. Esta observación es importante desde el punto de vista clínico, pues el pH de la vagina se eleva de 4,5, su valor normal, a cifras superiores a 5,0 durante la trichomonosis (Garber *et al*, 1989).

Los niveles del CDF se correlacionan con la severidad de los síntomas clínicos producidos en el curso de la trichomonosis, observándose un incremento en la producción de CDF asociado con un incremento de estos síntomas, por lo que se considera que puede ser un importante marcador de virulencia de este parásito (Garber y Lemchuk-Favel, 1990). Garber y colaboradores encontraron que la actividad de CDF puede ser inhibida en presencia de un suero anti-*T. vaginalis* humano (Garber *et al*, 1989); y más tarde, este mismo grupo demostró una disminución del efecto de este factor en presencia de anticuerpos en la vagina (Garber y Lemchuk-Favel, 1990).

La regulación de la producción del CDF no está clara, pues se desconoce si es la concentración, la actividad o la combinación de ambas, la responsable de la severidad de los síntomas clínicos. La producción de CDF puede verse influenciada también por la concentración de estrógeno en la vagina, observación que explica algunos aspectos de la etiología de esta enfermedad. Por ejemplo, durante los períodos menstruales cuando los niveles de estrógenos disminuyen, la sintomatología aumenta (Garber *et al*, 1991).

2.11.2.2 Interacción con la microbiota vaginal.

La interacción de *T. vaginalis* con algunos miembros de la microbiota residentes en la vagina puede ser un factor importante para evadir el sistema inmune del hospedero. La flora microbiana vaginal humana, está condicionada por la presencia de los bacilos de Döderlein. Éstos actúan sobre la glucosa-6-fosfato, proveniente del glucógeno liberado en las células, transformándola en ácido láctico, lo que favorece el mantenimiento del pH vaginal normal, que oscila entre 3,8 a 4,5. *T. vaginalis* sustrae el glucógeno de las células epiteliales, compitiendo activamente con la microbiota de Döderlein, lo que impide el mecanismo anterior y con ello provoca una alcalinización del pH vaginal. Este fenómeno favorece el desarrollo del parásito y de otros patógenos (Petrin *et al*, 1998).

La elevación del pH de la vagina, conjuntamente con la reducción de *L. acidophilus* y el incremento en la proporción de bacterias anaeróbicas, pueden ser considerados marcadores de la enfermedad. El parásito tiene un efecto supresivo sobre *L. acidophilus* (McGrory *et al*, 1994), el cual se puede ejercer por dos mecanismos: la fagocitosis de las bacterias (Rendon-Maldonado *et al*, 1998) y por la destrucción de lactobacilos por proteinasas secretadas por el propio parásito (McGrory y Garber, 1992).

El parásito desarrolla otros mecanismos que le permiten la evasión de la respuesta inmune.

Estos mecanismos, al permitir una mayor resistencia del parásito al entorno, hacen que estos se multipliquen y devienen en factores de patogenia. A ello nos referiremos en el acápite siguiente, en que abordamos la inmunobiología de la infección por *T. vaginalis*

2.12 Inmunobiología de *Trichomonas vaginalis*.

2.12.1 Inmunogenicidad de *T. vaginalis*.

Estudios realizados por Garber y colaboradores demostraron la presencia de bandas de proteínas, entre 30–150 kDa, por electroforesis, en todos los aislamientos estudiados. Además, se identificaron proteínas inmunogénicas de *T. vaginalis* por inmunotransferencia. Una banda de proteínas de peso molecular aproximado de 100 kDa fue detectada en todos los aislamientos estudiados, cuando éstos fueron enfrentados a sueros de pacientes reactivos por ELISA. La banda de proteína de 60 kDa, a pesar de que fue identificada por electroforesis, también en todos los aislamientos, solo fue reconocida por algunos de los sueros evaluados. Estos autores plantearon que la heterogeneidad antigénica de *T. vaginalis* demostrada por inmunotransferencia, podría deberse a las variaciones individuales de este complejo organismo. (Garber *et al*, 1986).

Otras moléculas como P230 (Alderete, 1987), CDF (Garber *et al*, 1989), P270 (Alderete *et al*, 1992) y más recientemente, las proteinasas de 65 kDa (Alvarez-Sánchez *et al*, 2000), 30

kDa (Mendoza-López *et al*, 2000) y 39 kDa (Hernández-Gutiérrez *et al*, 2004) se identificaron como inmunogénicas. A pesar de que se identificaron varias moléculas inmunogénicas en *T. vaginalis*, la naturaleza protectora de éstas no se ha demostrado hasta el presente.

2.12.2 Respuesta inmune contra el parásito.

En el humano, la reinfección con *T. vaginalis* ocurre con frecuencia, lo que sugiere que este parásito induce una respuesta inmune protectora pobre (Ackers, 1990). Algunos autores encontraron anticuerpos en suero y en el tracto reproductivo de personas infectadas (Yadav *et al*, 2007 b). Por otra parte, hay evidencias de respuesta inmune mediada por células, cuando linfocitos obtenidos de estos pacientes mostraron incorporación de timidina al ser estimulados con antígenos de *T. vaginalis* (Yano *et al*, 1983). Sin embargo, no se ha demostrado que esta respuesta sea protectora.

El análisis *in vitro* del efecto de anticuerpos derivados del suero de pacientes infectados y de AcMs contra antígenos de superficie del parásito, permitió la identificación de anticuerpos antiadhesinas que bloquean la adhesión del parásito a células epiteliales. (Alderete *et al*, 1995). Arroyo y colaboradores encontraron que anticuerpos contra estas moléculas, protegen a células dianas de un efecto citotóxico mediado por el parásito, lo que les permitió sugerir que la respuesta inmune antiadhesina, podría ser importante en la protección *in vivo* contra el efecto patogénico de *T. vaginalis* (Arroyo *et al*, 1992).

Anticuerpos específicos contra moléculas solubles del parásito tales como, proteinasas y factores líticos (fosfolipasas) (Lubick y Burgess, 2004) podrían también ser protectores. Sin embargo, la prueba de la naturaleza protectora de los anticuerpos en la eliminación de la infección o disminución de la patogénesis *in vivo*, se ha visto limitada parcialmente por la dificultad en el establecimiento de un modelo cercano a lo que ocurre en el humano (Schwebke y Burgess, 2004). A pesar de esto, con el empleo de un modelo de infección intravaginal, se sugirió que anticuerpos IgA específicos, pueden ayudar a proteger a

individuos asintomáticos de infecciones severas y además, que linfocitos T CD4⁺, podrían jugar una importante función en la disminución de la infección (Paintlia *et al*, 2002).

Recientemente, Malla y colaboradores encontraron una respuesta Th1 (IL-2 e interferón γ [IFN γ]) en ratones infectados intravaginalmente con aislamientos asintomáticos al compararlos con los sintomáticos, lo que sugiere que citoquinas Th1, podrían jugar un papel en el mantenimiento de un nivel bajo de infección (Malla *et al*, 2007). En un estudio realizado por Simhan y colaboradores, estos autores detectaron que la trichomonosis en mujeres embarazadas asintomáticas, está acompañada de un proceso de activación de neutrófilos y producción de IL-8 (Simhan *et al*, 2007) y Cauci y Culhane encontraron también, una fuerte inducción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-8) y neutrófilos en embarazadas infectadas con *T. vaginalis* (Cauci y Culhane, 2007).

A pesar de los estudios realizados, aún no está claro si la respuesta inmune adquirida es necesaria para la protección o su papel en detener o eliminar la infección. Por una parte, se hallaron evidencias de que la inmunización subcutánea con extractos de *T. vaginalis* con adyuvante, protege parcialmente a ratones contra el reto por vía vaginal (Abraham *et al*, 1996). Sin embargo, como se señaló, en el hospedero humano, las infecciones a repetición producidas por el parásito, no causan inmunidad protectora. En un estudio que incluyó pacientes infectados con *T. vaginalis* y VIH, no se evidenciaron incrementos en la durabilidad de la infección por este parásito al compararlos con pacientes negativos a la infección por VIH y positivos a *T. vaginalis* (Cu-Uvin *et al*, 2002). Esta observación les sugirió que la inmunidad innata puede ser más importante que la inmunidad adquirida, en el control de la infección por *T. vaginalis*.

De lo anterior se desprende que hay poca claridad acerca de cómo es en realidad la respuesta inmune protectora en *T. vaginalis*, por lo que otros estudios son necesarios para esclarecer esta interrogante.

2.12.3 Evasión del sistema inmune.

En determinadas situaciones, *T. vaginalis* puede sobrevivir gracias a la capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero, lo que lleva a la cronicidad de la infección. Desde hace mucho tiempo se conoce que *T. vaginalis* activa la vía alternativa del complemento (Gillin y Sher, 1981). El mucus cervical es deficiente en complemento (Alderete *et al*, 1995) a diferencia de la sangre menstrual que representa la única fuente disponible del mismo en la vagina. Aunque la sangre menstrual tiene la mitad de la actividad del complemento que la circulante, tiene actividad citotóxica contra *T. vaginalis*; observándose una reducción en la presencia del parásito durante el período de desprendimiento del endometrio, sin embargo existe sobrevivencia de una cantidad de parásitos que garantiza la persistencia de la infección (Demes *et al*, 1988, a). A pesar de la disminución del número de parásitos en la vagina durante la menstruación, se produce una exacerbación de los síntomas, producto de la acción del hierro, ya comentada, sobre la virulencia de los mismos (Alderete *et al*, 2004).

Demes y colaboradores encontraron que aislamientos frescos de *T. vaginalis* difieren en la susceptibilidad o resistencia a la lisis mediada por el complemento del suero. Los parásitos resistentes a este evento, se convierten en susceptibles después de cultivos *in vitro* prolongados (Demes *et al*, 1988, b), lo cual apoya la hipótesis de que la variación fenotípica, más frecuente *in vivo*, permite al parásito evitar la lisis (Alderete *et al*, 1995).

Como muchos otros protozoos, *T. vaginalis* despliega una variación fenotípica como un mecanismo de evasión inmune. Alderete y colaboradores encontraron que dos clases de marcadores se expresan alternativamente en la superficie del organismo: la glucoproteína altamente inmunogénica (P270) y las adhesinas (Ap65, Ap51, Ap33, y Ap23) (Alderete *et al*, 1992). Todos los aislamientos presentan la glucoproteína P270, algunos organismos la expresan en la superficie de la célula (A^+) y otros en el citoplasma (B^+). Así, los fenotipos se describen como A^+B^- (P270 positivo) y un A^-B^+ (P270 negativo). A los organismos de fenotipos positivo les faltan las adhesinas y no pueden citoadherirse o parasitar células del hospedero. Solo los organismos del fenotipo negativo para P270, que son los que expresan

las adhesinas, tienen la capacidad de citoadherirse. Después de un tiempo prolongado de cultivo *in vitro*, los parásitos cambian hacia el fenotipo P270 positivo (Alderete, 1988).

Se encontró en ensayos *in vitro*, que algunos organismos que llevan el antígeno P270 sobre la superficie de la célula son susceptibles a la lisis mediada por anticuerpos e independiente del complemento, (Alderete y Kasmala, 1986). La falta de expresión de P270 en la superficie, permite a los organismos del fenotipo negativo sobrevivir al ataque de los anticuerpos (Musatovova y Alderete, 1998) ya que las adhesinas presentes en la superficie parecen imitar la estructura de la enzima málica de las células vaginales, lo que se presupone sea la causa de la baja inmunogenicidad de los parásitos P270 negativos (Alderete *et al*, 1995; Engbring *et al*, 1996). Este mimetismo molecular es otro ejemplo de como los parásitos pueden escapar al sistema inmune del hospedero (Engbring *et al*, 1996).

P230 es otro inmunógeno de peso molecular alto que está presente en la superficie del parásito, y que sufre cambios conformacionales que se ha sugerido le permiten evadir los anticuerpos (Alderete, 1987). Además, la IgG vaginal que reconoce la proteína P230 de *T. vaginalis*, no produce ningún efecto citolítico, incluso en presencia de complemento (Alderete *et al*, 1991) y la respuesta del anticuerpo se limitó a pocos epitopos de la proteína de 230 kDa (Alderete *et al*, 1991), permitiendo al organismo evadir los mecanismos de la inmunidad.

T. vaginalis presenta otros mecanismos para evadir el sistema inmune. Algunos autores señalaron que numerosas cisteino-proteinasas secretadas por *T. vaginalis* degradan los anticuerpos de los isotipos IgG, IgM e IgA, lo cual permite al organismo sobrevivir a la respuesta inmune (Provenzano y Alderete, 1995, Hernández-Gutiérrez *et al*, 2004). Este parásito también secreta grandes cantidades de antígenos solubles, altamente inmunogénicos (Alderete y Garza, 1984), una liberación continua de estos antígenos podría neutralizar a los anticuerpos y de esta manera interrumpir los mecanismos de defensa específicos del sistema inmune contra *T. vaginalis*. También, este parásito puede cubrirse

con proteínas del plasma del hospedero lo que no permite al sistema inmune reconocerlo como extraño (Peterson y Alderete, 1982).

Por otra parte, la apoptosis de macrófagos inducida por *T. vaginalis* a través de la fosforilación del mitógeno p-38 en estas células efectoras, constituye otro mecanismo de escape del parásito (Chang *et al*, 2006).

2.13 Vacuna.

La vacuna Trichovac es la única producida contra *T. vaginalis*, y se compone de lactobacilos inactivos (Gombosoba *et al*, 1986). La utilización de *L. acidophilus* como vacuna contra *T. vaginalis* fue sugerida por varios autores (Alderete, 1988; Mayer y Pelak, 1990) con ella se alcanzó, en los experimentos iniciales, desde un 84 hasta un 100 % de protección. En un principio, se pensaba que el éxito de la inmunización era debido a la generación de anticuerpos que reconocen determinantes comunes a antígenos de lactobacilos y *Trichomonas*, pero esta relación antigénica no se demostró por métodos más sensibles, por lo que se sugiere que este fenómeno pudiera estar dado por mecanismos no específicos (Alderete, 1988). Estudios realizados con posterioridad indican la poca eficacia de esta vacuna (Malla *et al*, 2001) por lo que se dejó de recomendar el empleo de la misma (Vázquez *et al*, 2001).

Abraham y colaboradores, utilizando ratones BALB/c como modelo animal, refieren haber alcanzado cierta respuesta contra la infección vaginal después de inoculaciones subcutáneas de homogeneizados del parásito (Abraham *et al*, 1996).

La protección hasta ahora alcanzada, en los estudios realizados, no es del todo efectiva, de ahí la importancia de la búsqueda de nuevas moléculas con capacidad protectora contra *T. vaginalis*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Cultivo *in vitro* de *Trichomonas vaginalis*. Preparación de antígenos.

3.1.1 Mantenimiento de los parásitos.

El cultivo axénico de *T. vaginalis* (C173) se obtuvo a partir del exudado vaginal de una adolescente sintomática, atendida en el hospital ginecobstétrico “Eusebio Hernández” de Ciudad de La Habana (Rojas *et al*, 2004 b). Los parásitos se mantuvieron a 37°C en medio TYI-S-33 al 10 % de suero bovino (Sigma, EE UU) inactivado suplementado con estreptomicina-penicilina a 50 µg/mL, siguiendo la metodología descrita por Diamond y colaboradores (Diamond *et al*, 1978).

3.1.2 Preparación de antígenos de secreción de *T. vaginalis*.

Los parásitos mantenidos en cultivo se colectaron y lavaron tres veces con TFS (Tampón Fosfato Salina, compuesto por NaCl a 136 mmol/L, Na₂PO₄ a 8,1 mmol/L, K₂PO₄ a 1,46 mmol/L y KCl a 3,48 mmol/L), pH 7,2 por centrifugación a 650 g durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en medio TYI-S-33 libre de suero a una concentración final aproximada 1x10⁶ parásitos/mL en frascos de cultivo de 75 cm². Posteriormente, los parásitos se incubaron a 37°C durante 21 horas. Transcurrido este tiempo, el medio se colectó por centrifugación a 1000 g durante 30 minutos (Garber *et al*, 1987). A 100 mL de sobrenadante, se le adicionó 1 mL de una mezcla de inhibidores de proteinasas (Sigma, EEUU) compuesta por fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a 10 mmol/L, leupeptin a 1000 µmol/L, pestatin a 100 µmol/L y ácido etilendiaminotetracético (EDTA) a 100 mmol/L, se filtró por membrana de 0,2 µm y fue congelado a - 20 °C hasta su utilización.

3.1.3 Cuantificación de proteínas totales.

La concentración de proteínas totales se determinó por la reacción del ácido bicinonínico (BCA) (Smith, 1986) según el protocolo establecido para microplacas (Redinbaugh y Turley, 1986).

3.1.4 Ensayo para medir actividad proteolítica.

Los ensayos de actividad proteolítica se realizaron incubando 50 µL del sobrenadante de cultivo de *T. vaginalis* o de sus fracciones con 75 µL de mezcla de reacción compuesta por 50 µL tampón citrato-fosfato pH 7,0 conteniendo 10 mM de L-cisteína y 6 mM de EDTA y 25 µL de azocaseína al 6 % como sustrato. Se incluyó un control negativo al que se le adicionaron 50 µL de TFS, pH 7,2 y 75 µL de la mezcla de reacción. Las mezclas de ensayo fueron incubadas durante 3 horas a 37° C. La reacción se detuvo con 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 3 % a 4°C y se centrifugó por 15 minutos a 1000 g. Al sobrenadante se le determinó la absorbancia a 366 nm en un espectrofotómetro (WPA lightwave, Inglaterra). La absorbancia se convirtió en unidades de actividad enzimática equivalente a mg de azocaseína/ hora/ mL de extracto enzimático (Schwartz y Barret, 1980).

3.2 Animales de laboratorio.

El modelo biológico se desarrolló en ratones BALB/c procedentes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba). Se utilizaron ratones de ambos sexos, de 6-8 semanas de edad y 20 ± 2 g de peso corporal al inicio de los experimentos. El manejo de los animales se realizó según la guía para el mantenimiento y uso de los animales de experimentación del Laboratorio Bioterio del IPK de acuerdo a las normas establecidas por organizaciones internacionales (Guía para el cuidado y empleo de los animales de experimentación, 1996). Los animales permanecieron bajo condiciones controladas de temperatura (21-24 °C), humedad (20-25 %), ciclo alternativo de luz / oscuridad de 12 horas, y recibieron alimentación y agua acidulada con HCl a un pH entre 2,5 y 2,8 *ad libitum*. Para todos los experimentos, los animales se distribuyeron de forma aleatoria en grupos individuales de 10 y 20 animales.

3.3 Purificación de la proteinasa de 62 kDa a partir de antígenos de secreción de *Trichomonas vaginalis*.

3.3.1 Purificación de la proteinasa.

Al filtrado libre de parásitos se le adicionaron dos volúmenes de etanol a -20 °C, se procedió a mezclar inmediatamente, a continuación, la mezcla se mantuvo en hielo durante 2 horas. El precipitado resultante se centrifugó a 6500 g por 30 minutos y se disolvió en tampón HEPES (ácido 1- etanosulfónico 4-(2- hidroximetil piperazina) 10 mmol/L, pH 5,0 conteniendo NaCl a 10 mmol/L. A esta solución se le adicionó sulfato de amonio reactivo a 176 g/L y se agitó por una hora a 4 °C. La solución se centrifugó a las mismas condiciones descritas y al sobrenadante obtenido se le adicionó, nuevamente, sulfato de amonio reactivo a 235 g/L. Se repitió la centrifugación y el sobrenadante fue dializado contra tampón HEPES a 4 °C, con tres cambios del tampón y posteriormente se concentró por ultrafiltración, a un volumen final aproximado de 20 mL (Garber y Lemchuk-Favel, 1989).

El sobrenadante concentrado se purificó por cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de filtración en gel, mediante la tecnología FPLC (Cromatografía líquida de alta resolución para proteínas). La columna K16 x 20 conteniendo dietilaminoetil sefacel (Amersham-Biosciences, EE UU), fue equilibrada con tampón de equilibrio (tampón HEPES, 10 mmol/L, pH 5,0 conteniendo NaCl a 10 mmol/L) y la muestra se aplicó a la columna a una velocidad de flujo de 0,7 mL/minutos. La elución se realizó con un gradiente de 10-500 mmol/L de NaCl. Se evaluaron las fracciones por el ensayo enzimático con azocaseína como sustrato (ver acápite 3.1.3). Las positivas se mezclaron, según el perfil cromatográfico, se dializaron contra tampón HEPES y se concentraron por ultrafiltración con membrana YM-10 (AMICON). Posteriormente, se aplicaron a una columna de filtración en gel (Superosa 6) (Amersham-Biosciences, EE UU) previamente equilibrada con tampón HEPES a un flujo lineal de 0,5 mL/minutos. Las fracciones se evaluaron por el ensayo enzimático (acápites 3.1.4). El peso molecular (PM) de las

fracciones con actividad enzimática se determinó por interpolación lineal a partir de las proteínas patrones (340, 118, 67, 43, 25 kDa).

3.3.2 Evaluación del grado de pureza.

El grado de pureza de la fracción purificada de antígenos de secreción de *T. vaginalis* se verificó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % en presencia de duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Las muestras y el patrón, en un rango de PM entre 14 y 94 kDa (Pharmacia - LKB Biotechnology, Suecia), fueron mezclados 1:1 con la siguiente solución: Tris-HCl a 0,5 mol/L, pH 6,8; bromofenol azul y SDS al 0,1 %; glicerol al 1,5 %, e incubados a 100 °C durante 3 minutos. Posteriormente, se aplicaron 20 µL de las mezclas al sistema de geles. La corrida se efectuó bajo condiciones desnaturalizantes en mini-cámaras (BioRAD, EE UU) a razón de 15 mA/gel con tampón Tris (0,5 mol/L), glicina (0,192 mol/L), SDS (0,1 %), pH 8,3. Al finalizar la corrida electroforética, se realizó la tinción del gel separador con solución de nitrato de plata (AgNO₃) para lo cual se empleó el juego de reactivos de tinción con AgNO₃ (Silver Stain Plus, BioRad, EE UU). El PM de la proteinasa purificada, se estimó mediante el uso de una curva de calibración previamente confeccionada a partir de las movilidades relativas de cada proteína patrón con respecto al logaritmo de su peso molecular.

3.4 Obtención y selección de hibridomas productores de anticuerpos anti-proteinasa de 62 kDa de *Trichomonas vaginalis*.

3.4.1 Obtención de los anticuerpos monoclonales.

3.4.1.1 Inmunización de ratones.

Se utilizaron 5 ratones BALB/c hembras. Se realizaron 4 inmunizaciones por vía intraperitoneal con intervalos de 15 días entre una y otra. La primera se realizó con la proteinasa (50 µg), previamente purificada, disuelta en TFS, pH 7,2 y emulsificada con Adyuvante Completo de Freund (ACF) (Sigma, EE UU), 0.3 mL proporción 1:1 (v/v); la segunda con 50 µg de la proteinasa en TFS mezclado con Adyuvante Incompleto de Freund

(AIF) (Sigma, EE UU) 1:1 (v/v), las dos últimas inmunizaciones con 30 µg también en AIF. Una vez completado el esquema y transcurridos 15 días se extrajo sangre del plexo retroorbital para evaluar el título de anticuerpos anti-proteinasa de *T. vaginalis* en los sueros. La sangre extraída se mantuvo una hora a 37 °C y luego de 30 minutos a 4 °C se centrifugó a 1000 g durante 15 minutos.

3.4.1.2 Evaluación de los sueros.

Los sueros fueron evaluados por un ELISA indirecto, utilizando como soporte placas de microtitulación (Maxisorp, Nunc, Dinamarca). Previamente, se determinaron las condiciones óptimas de trabajo a partir de diferentes concentraciones de proteinasa y conjugado, seleccionándose aquellas condiciones que permitieran una buena discriminación entre los sueros positivos y negativos. La placa se recubrió con la proteinasa purificada (20 µg/mL) disuelta en tampón carbonato-bicarbonato 0,05 mol/L, pH 9,6 (tampón de recubrimiento) (100 µL/pozo) y se incubó a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, la placa fue lavada seis veces con TFS-Tween 20 (TFS-T) al 0,05 %, luego se bloqueó con solución conteniendo soro albúmina bovina (BSA) (Sigma, EE UU) al 5% disuelta en tampón de recubrimiento y se incubó una hora en cámara húmeda a 37 °C. El suero de los ratones fue evaluado a diferentes diluciones: 1/5000, 1/10 000, 1/20 000 y 1/40 000 incubando a 37 °C durante una hora. Como control negativo, se utilizó el suero de un ratón no inmunizado a las mismas diluciones que el suero de los ratones inmunizados. Se lavó la placa y luego se incubó una hora en cámara húmeda a 37 °C con 100 µL/pozo de un conjugado anti-IgG de ratón - peroxidasa, diluido 1/1000. Se repitió el paso de lavado y la reacción se reveló con una solución de sustrato (5µl de H₂O₂ al 30 % y 5 mg de ortofenilen-diamina (Sigma, EE UU)) disuelto en 12,5 mL de tampón fosfato-citrato 0,1 mol/L, pH 5,0. Pasados 20 minutos, la reacción se detuvo con 50 µL/pozo de H₂SO₄ al 12,5 % y se leyó a una longitud de onda de 492 nm en un lector de micro ELISA (DYNEX - Technologies, EE UU). Se seleccionaron como positivos los ratones cuyos sueros mostraron por ELISA una densidad óptica (DO) que resultó ser el doble de la media de las densidades ópticas de los animales inmunizados con adyuvantes sin proteinasa, a la misma dilución.

3.4.1.3 Fusión celular.

El ratón cuyo suero mostró el mayor título de anticuerpos anti-proteinasa de *T. vaginalis* fue seleccionado para la fusión y tres días antes se reinmunizó con una dosis de 50 µg de la proteinasa purificada (25 µg inoculados por vía intraperitoneal y 25 µg por vía intravenosa). Posteriormente, se sacrificó en atmósfera de éter y se extrajo el bazo. La liberación de los linfocitos se realizó por perfusión del órgano, en placa Petri, con medio de lavado que contenía RPMI-1640 suplementado con L-glutamina (2 mmol/L), piruvato de sodio 1 mmol/L, HEPES (15 mmol/L), bicarbonato de sodio (17 mmol/L) y 2x de antibiótico-antimicótico, 100 x (10 000 unidades de penicilina, estreptomina (10 mg) y anfotericina B (25 µg) disuelto en 0,9 % de cloruro de sodio). La suspensión celular, se transfirió a un tubo de centrifuga de 50 mL y se completó con medio de lavado. Se centrifugó a 350 g durante 10 minutos a 4 °C. El precipitado se resuspendió en 5 mL de tampón de lisis para eritrocitos (cloruro de amonio 8 g; EDTA 37,2 mg; bicarbonato de sodio 1 g, para un litro de agua bidestilada, pH 7,2-7,4), con agitación durante 5 minutos. Posteriormente, se completó a 50 mL con medio de lavado y se centrifugó en las condiciones anteriormente descritas. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se lavó tres veces con medio de lavado.

Se utilizó como pareja de fusión, células de mieloma de ratón SP2/O-Ag14. Las células fueron cosechadas de cultivos en crecimiento en fase exponencial y colectadas en tubos de centrifuga. La suspensión celular se centrifugó a 350 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en 20 mL de medio de lavado.

Los linfocitos y las células del mieloma, después de contados en cámara de Neubauer, se mezclaron en proporción 10:1 en un tubo de centrifuga y se completó hasta 50 mL con medio de lavado. Se centrifugó a 350 g durante 10 minutos a 4 °C, se decantó el sobrenadante y el precipitado celular se disgregó completamente. A la mezcla de células se le añadió, lentamente por las paredes del tubo, 0,3 mL de polietilenglicol PM1400 (Sigma, EE UU) al 50 %, como agente de fusión. Después de 3 minutos en reposo, se centrifugó a 350 g durante 5 minutos a 4 °C y se agregaron 30 mL de medio de lavado por las paredes del tubo sin resuspender el precipitado. Posteriormente, se resuspendió el botón celular y se

centrifugó en las condiciones ya descritas. Se descartó el sobrenadante y al precipitado se le añadió medio selectivo HAT (10 mmol/L de hipoxantina, 0,04 mol/L de aminopterina y 1,6 mmol/L de timidina) disuelto en medio de lavado con 20 % de suero. El botón celular se resuspendió y se sembraron las células a razón de 10×10^6 células/placa (200 μ L/pozo en 6 placas de cultivo de 96 pozos). Se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda con CO₂ al 5 %. A partir del décimo día, después de la fusión, se eliminó el medio HAT y se cambió por medio HT (hipoxantina-timidina).

Los híbridos crecidos que cubrían las dos terceras partes o más del área de cultivo se evaluaron por un sistema de ELISA indirecto, empleado en la titulación de los sueros de los ratones inmunizados (ver acápite 3.4.1.2). Se empleó como control positivo el suero del ratón seleccionado para la fusión a la dilución 1/1000 en TFS-T y como control negativo el suero de un ratón no inmunizado, a la misma dilución.

Los hibridomas que resultaron positivos en el pesquiasaje primario se expandieron a placas de cultivo de 24 pozos. Una vez crecidos se evaluaron nuevamente, por ELISA, para la detección de anticuerpos anti-proteinasa de *T. vaginalis*.

3.4.1.4 Clonaje y reclonaje.

Los hibridomas crecidos en placas de 24 pozos que resultaron positivos en el ELISA fueron clonados por el método de dilución limitante. Para realizar los clonajes los hibridomas se resuspendieron en los pozos de cultivo y se estimó la concentración celular por conteo en cámara de Neubauer. A partir de la suspensión original se prepararon dos diluciones en medio HT para una concentración final de 5 células por pozo para las dos primeras filas de la placa y una célula por pozo para el resto de los pocillos. Una vez que las colonias de hibridomas crecieron hasta más de la mitad del pozo, fueron evaluadas por ELISA y algunas de las que resultaron positivas se reclonaron por el mismo método. Después, los clones positivos se expandieron a placas de cultivo de 24 pozos y más tarde a frascos de 25 cm².

Las células se cosecharon de los frascos de 25 cm² bajo condiciones de esterilidad. La suspensión celular se centrifugó a 350 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se colectó para ensayos posteriores y el precipitado fue resuspendido en medio de congelación (40 % de medio RPMI-1640, 50 % de suero fetal bovino, 10% de dimetilsulfóxido). Las células se almacenaron en viales de congelación de 2 mL y se guardaron a -70°C. Transcurrida una semana los viales se conservaron en nitrógeno líquido.

3.4.1.5 Producción de líquido ascítico.

Los hibridomas productores de AcMs contra la proteinasa de 62 kDa de *T. vaginalis*, se mantuvieron en cultivo antes de ser inoculados. Las células se cosecharon y lavaron por centrifugación a 350 g durante 10 minutos a 4 °C en medio de lavado. Se preparó una suspensión celular a una concentración de 1 x 10⁶ células/mL. Se utilizaron ratones BALB/c, machos, de 6-8 semanas, cuyo peritoneo se estimuló previamente con 0,3 mL de Pristane (2, 6, 10, 14-tetrametilpentadecano) (Sigma, EE UU). Se inoculó 1 mL de suspensión celular / ratón. El líquido ascítico producido por cada uno de los ratones se obtuvo por punción intraperitoneal y se centrifugó a 1000 g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se conservó a -70°C.

Para la obtención de estos AcMs se emplearon los procedimientos generales de la tecnología de obtención de hibridomas (Köhler y Milstein, 1975; Godin, 1996).

3.4.2 Determinación de clase y subclase de los anticuerpos monoclonales.

La clase y subclase de los anticuerpos obtenidos se determinó mediante un ELISA indirecto empleando un juego comercial de inmunoglobulinas (Ig), (anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3, anti-IgA y anti-IgM) y un conjugado anti-inmunoglobulina de ratón-peroxidasa según las instrucciones del fabricante. (ISO-2, Sigma, EE UU).

3.4.3 Purificación de los anticuerpos.

El AcM presente en cada fluido ascítico se purificó por cromatografía de afinidad. La columna con matriz proteína G – sefarosa (Amersham-Biosciences, EE UU) fue equilibrada con TFS, pH 7,2. Se aplicaron 50 mL de líquido ascítico diluido a razón de 1/3 en el tampón de equilibrio, a una velocidad de flujo de 1 mL/minuto. La elución se llevó a cabo con tampón de elución glicina 0,1 mol/L, pH 2,7. La fracción de AcM fue concentrada por ultrafiltración con membrana YM-100 (AMICON) hasta un volumen de 5 mL y se aplicó a una columna Sefadex G-25 equilibrada previamente con TFS para ser desalinizada, a una velocidad de flujo lineal de 5 mL/minuto. La solución de anticuerpo se filtró por membrana de 0.22 µm y se determinó la concentración de proteínas por la reacción del ácido bicinónico.

3.5 Análisis del reconocimiento estructural y molecular de los anticuerpos anti-proteinasa de 62 kDa de *Trichomonas vaginalis*.

3.5.1 Reconocimiento de estructuras de trofozoitos por inmunofluorescencia (IFI).

Los parásitos colectados del cultivo *in vitro* de *T. vaginalis* fueron lavados tres veces con TFS por centrifugación a 1000 g por 10 minutos. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los parásitos en TFS. En las láminas portaobjetos se colocaron 10 µL conteniendo 50 parásitos y se dejaron secar a temperatura ambiente. Estas preparaciones se envolvieron en papel metálico, y selladas en sobre de plástico se conservaron a -20 °C hasta su utilización. Diez microlitros de cada AcM antiproteinasa a concentraciones de 10 y 20 µg/mL fueron depositados sobre las láminas portaobjetos para su evaluación. Como control positivo de la técnica fue empleado un suero de ratón inmunizado con la proteinasa de *T. vaginalis* diluido 1/50 y como control negativo un suero de ratón no inmunizado a la misma dilución. Las láminas se incubaron una hora a 37 °C en cámara húmeda y seguidamente fueron lavadas 3 veces en TFS durante 5 minutos. La dilución del conjugado anti-IgG de ratón marcado con fluoresceína (Sigma, EE UU) fue de 1/25 en solución de azul de Evans 1/1000 en TFS. Cada área de reacción se recubrió con 10 µL del conjugado y las láminas fueron incubadas en cámara húmeda a 37 °C durante una hora. Transcurrido este tiempo, las mismas se lavaron tres veces en TFS durante 5 minutos. Las preparaciones se dejaron

secar al aire en cámara oscura y se le aplicó glicerina fosfatada. La lectura fue realizada en un microscopio de fluorescencia Leitz modelo Dialux con un ocular de 20 X. Se contaron 30 parásitos por área de reacción y se consideró fluorescencia alta (+++) cuando más de 70 % de los parásitos estaban marcados, fluorescencia media (++) cuando entre 40 y 70 % de los parásitos fluorescían, baja cuando entre 10 y 40 % (+) mostraban reacción y no reconocimiento cuando menos de 10 % fluorescían.

3.5.2 Reconocimiento molecular por inmunotransferencia.

La electroforesis (SDS-PAGE) fue realizada según el procedimiento de Laemmli (Laemmli, 1970) descrito en el acápite 3.3.2. Las proteinasas de 60 (donada por el Dr Garber, Hospital de Ottawa, Canadá), 62 kDa (purificada en nuestro laboratorio), cada una a la concentración de 1 mg/mL, y la mezcla de proteínas patrones, en un rango de peso molecular entre 53 y 212 kDa (Pharmacia LKB Biotechnology, Suecia), fueron mezclados con el tampón muestra y aplicados sobre dos geles de poliacrilamida. Una vez finalizada la corrida, uno de los geles fue teñido con azul de Coomassie 0,25 % disuelto en una mezcla de metanol-ácido acético- agua (5:1:5), durante 30 minutos y decolorado posteriormente en esta mezcla. El otro gel fue lavado durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación constante con una solución compuesta por Tris 0,025 mol/L-glicina 0,1 mol/L-metanol 20 % pH 8,3. Posteriormente, este último, fue colocado en un equipo de inmunotransferencia (LKB 2117- 250 Novablot electroforetic transfer kit, Suecia) y el patrón electroforético fue transferido a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm según el procedimiento descrito por Tsang y colaboradores (Tsang *et al*, 1986).

Una vez concluida la transferencia, la membrana de nitrocelulosa fue lavada con TFS durante 10 minutos y luego sumergida durante una hora a temperatura ambiente en una solución al 5 % de leche descremada disuelta en TFS. Posteriormente, la nitrocelulosa fue cortada en tiras las cuales se sumergieron en una solución de 500 µg/mL de cada AcM anti-proteinasa de 62 kDa y se incubaron toda la noche a 4 °C con agitación constante. Luego de tres lavados de 10 minutos cada uno con TFS-T, las tiras se incubaron durante 2 horas a

temperatura ambiente con una solución 1/1000 del conjugado (anti-IgG de ratón conjugada con peroxidasa (Sigma, EE UU) disuelto en TFS). Seguidamente, se sumergieron en una solución de sustrato (4 mg de 3,3'- diaminobenzidina, 10 µL H₂O₂ y 10 mL de TFS) y una vez visible las bandas, la reacción fue detenida sumergiendo las tiras en agua destilada.

3.6 Ensayo *in vitro* del efecto de anticuerpos anti- proteinasa de *Trichomonas vaginalis* sobre los procesos de adhesión de este parásito.

3.6.1 Modelo de células epiteliales vaginales.

La línea de células epiteliales humanas HeLa de carcinoma humano (ATCC CCL2) se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Rockville, Maryland, EE UU). Las células se mantuvieron en una mezcla de Medio Mínimo Esencial (MME) (Gibco BRL, EE UU), glutamina (G) al 1 %, suplementado con suero fetal bovino (Bio Whitaker, EE UU) al 10 % y sulfato de neomicina a 50 µg/mL. La placa de microtitulación (Nunc, Dinamarca) que contenía las células se incubó en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37°C. La monocapa se lavó tres veces antes de realizar el ensayo de citoadherencia con una mezcla de medios sin suero, en proporción 2:1 (v/v) y MME + G – TYI-S-33, apropiada para el mantenimiento de las células y del parásito.

3.6.2 Marcaje de los parásitos.

Los parásitos fueron marcados con 1µCi/mL de timidina tritiada ([³H]-timidina), TRK 637, 40 µCi/mmol (Amersham, Inglaterra) durante toda la noche. El 85 % de la radioactividad se precipitó con TCA al 5 %, lo que indicó la incorporación de [³H]-timidina a macromoléculas del parásito. Seguidamente, los parásitos marcados se lavaron tres veces con el medio TYI-S-33 y fueron contados en cámara de Neubauer.

3.6.3 Adhesión del parásito a células epiteliales.

El ensayo para cuantificar la adhesión de *T. vaginalis* a las células epiteliales se realizó como describieron Arroyo y Alderete (1989).

Siete millones de parásitos marcados con [³H]-timidina suspendidos en medio TYI-S-33 se trataron por 30 minutos a 4°C con 1 mg/mL de los AcMs anti-proteinasa de *T. vaginalis*. Simultáneamente, parásitos marcados se trataron también con un AcM no relacionado de clase IgG₁ (anti P-30 de *Toxoplasma gondii*) obtenido en los laboratorios del IPK, (Castaño *et al*, 2001) a igual concentración como control negativo. Los parásitos tratados con los anticuerpos fueron lavados con TFS y resuspendidos en la mezcla MME + G – TYI-S-33 (2:1, v/v) sin suero. Posteriormente, fueron adicionados a la monocapa de células HeLa (4x10⁴ células por pocillo) en proporción 5:1 (parásitos-células hospederas) e incubados por 30 minutos a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂. La placa se lavó tres veces con la mezcla de medios sin suero a 37 °C para eliminar los parásitos no adheridos. Los lavados fueron realizados con cuidado para evitar el desprendimiento de la monocapa. Posteriormente, se cosechó el contenido de los pozos de la placa en membrana de fibra de vidrio con una cosechadora de células (SKATROM, Instruments, Noruega) y la emisión fue determinada por conteo por minutos (cpm), en un contador de centelleo líquido, con el empleo de SCINTRAN (BDH, Inglaterra) como líquido de centelleo. La radioactividad (cpm) asociada con las células HeLa fue utilizada como medida de la citoadherencia de *Trichomonas*.

El experimento se organizó de la siguiente forma:

- control de células HeLa.
- control de células HeLa incubadas con 1mg/mL de los AcMs anti-proteinasa de *T. vaginalis*.
- control de células HeLa y trofozoitos de *T. vaginalis* marcados con [³H]-timidina.
- control de células HeLa y trofozoitos de *T. vaginalis* marcados con [³H]-timidina y preincubado por 30 minutos a 37 °C con 1 mg/mL del AcM anti-P30 de *Toxoplasma gondii* (3G9).

- control de células HeLa, trofozoitos de *T. vaginalis* marcados con [³H]-timidina y AcM anti P-30 de *T. gondii* adicionado en el momento del experimento.
- células HeLa y trofozoitos de *T. vaginalis* marcados con [³H]-timidina y preincubados por 30 minutos a 37° C con 1 mg/ml de los AcMs anti-proteinasa de *T. vaginalis*.
- célula HeLa, trofozoitos de *T. vaginalis* marcados con [³H]-timidina y AcMs anti-proteinasa de *T. vaginalis* adicionados en el momento del experimento.

Este experimento se repitió dos veces en iguales condiciones y cada determinación fue realizada 5 veces.

3.7 Evaluación de la protección pasiva de los anticuerpos monoclonales en modelos de ratones inyectados intraperitonealmente con *Trichomonas vaginalis*.

Grupos de 20 ratones BALB/c hembras fueron inoculados por vía intraperitoneal con 2 mg/mL de los AcMs. anti-proteinasa de *T. vaginalis*. Se incluyó en el estudio un grupo control con el AcM anti P-30 de *T. gondii*.

Transcurridas 24 horas se inocularon intraperitonealmente 8×10^6 parásitos por ratón a cada grupo en estudio. Al séptimo día, a los animales sobrevivientes se les tomó muestra de sangre, para posteriormente determinar los niveles de óxido nítrico en suero (ver acápite 3.8.3 y 3.8.4), y seguidamente se sacrificaron mediante la administración de una dosis letal de anestésico (éter). Posteriormente, se procedió a la disección de los ratones para la observación y descripción del estado de sus órganos internos (peritoneo, hígado, páncreas y riñones). Las lesiones macroscópicas encontradas en los órganos se corroboraron desde el punto de vista histopatológico en el Dpto de Anatomía Patológica del Instituto “Pedro Kouri”. Este experimento se realizó dos veces en iguales condiciones.

3.8 Identificación del posible mecanismo de acción de los anticuerpos anti-proteinasa de *Trichomonas vaginalis*.

3.8.1 Efecto de los anticuerpos monoclonales sobre el parásito.

Los parásitos se cultivaron en placas de microtitulación (Nunc, Dinamarca) a razón de 4×10^4 parásitos por pozo en medio TYI-S-33 al 10 % de suero bovino sin descomplementar y sin cisteína. Cantidades crecientes de los AcMs anti-proteinasa y anti- P-30 de *T. gondii* (125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$) fueron adicionadas a los parásitos en cultivo e incubados en atmósfera de nitrógeno por 48 horas. Transcurrido este tiempo, se determinó la viabilidad de los parásitos mediante la determinación de la enzima lactato deshidrogenasa en el sobrenadante de cultivo mediante el empleo del juego de reactivos para la detección de citotoxicidad (Roche Diagnostic, Alemania), según la técnica descrita por el fabricante.

3.8.2 Inhibición de la actividad proteolítica por los anticuerpos monoclonales

Se mezclaron 100 μL de la proteinasa de 62 kDa (0,5 mg/mL) e igual volumen de los AcMs anti-proteinasa (0,5 mg/mL). Las mezclas fueron incubadas a 37°C por 2 horas. El ensayo de actividad proteolítica con azocaseína como sustrato fue realizado según fue descrito (ver acápite 3.1.4).

3.8.3 Determinación de óxido nítrico en cultivo de macrófagos tratados con los anticuerpos anti-proteinasa en presencia del parásito.

Se realizó la obtención de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones no estimulados por lavados de esta zona con TFS pH 7,2. El número de células fue determinado por conteo en cámara de Neubauer y fue ajustado a 3×10^5 células/mL de medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino. La suspensión fue depositada en placas de 24 pozos (Nunc, Dinamarca) a razón de un mililitro por pozo. Dos horas más tarde se eliminó el medio y se adicionó 1 mL de medio RPMI-1640–TYI-S-33 (1:1 v/v) conteniendo 6×10^4 parásitos y 1 mg de los AcMs. Se incluyeron en el estudio un control con el AcM anti p-30 y otro en presencia de un AcM anti-proteinasa más N-monometil arginina (L-NMMA) (10 μ mol/L), utilizado, éste último, como inhibidor de la producción de óxido nítrico. Dos horas más tarde, se estimularon los macrófagos con lipopolisacárido (LPS) serotipo 055, B₅ de *Escherichia coli* (Sigma, EE UU) a 50 unidades/mL e IFN γ a 10 ng/mL. El cultivo fue incubado a 37 °C por 18 horas en atmósfera de CO₂. El experimento se repitió dos veces y cada determinación se realizó 5 veces. El óxido nítrico es oxidado rápidamente a nitrito en medio de cultivo y la concentración de nitrito es un indicador de la producción de óxido nítrico.

El sobrenadante de cultivo libre de células fue mezclado en placas de microtitulación con igual cantidad de reactivo Griess (sulfanilamida al 1 %, naftiletilendiamida al 0,1 % en 2,5 % de ácido fosfórico). Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. La absorbancia fue medida a 550 nm en un lector de microplacas (DYNEX-Technologies, EE UU). Por último, la concentración de nitrito fue calculada con el empleo de una curva estándar de nitrito de sodio (3-500 μ mol/L) (Rockett *et al*, 1992).

3.8.4 Determinación de los niveles de óxido nítrico en el suero de los ratones en estudio.

Se determinó la cantidad de nitrato/nitrito en los sueros desproteinizados (los ratones sometidos al experimento de protección pasiva con los AcMs (acápite 3.7), mediante la reacción de Griess (Rockets *et al*, 1992), después de la reducción de nitrato a nitrito por acción de la enzima nitrato reductasa. Las muestras fueron mezcladas con igual cantidad de reactivo Griess y el procedimiento siguiente fue similar al descrito en el acápite 3. 8. 3.

3.9 Caracterización parcial de los epitopos reconocidos por los anticuerpos anti-proteinasa en antígenos de secreción de *Trichomonas vaginalis*.

3.9.1 Determinación de la afinidad de los anticuerpos monoclonales.

La afinidad de los AcMs se determinó en un equipo Biacore X (Biacore, Suecia). Los anticuerpos se capturaron en un sensor CM5 con anti-Fc de IgG previamente inmovilizado. La proteinasa se inyectó, sobre el anticuerpo capturado (210-250 RU), a la concentración de 100 nmol/L diluida en TFS pH 7,4 con Tween-20 al 0,05 % y EDTA 3 mmol/L a un flujo de 20 µL/minutos. Se registraron 5 minutos de asociación y 3 minutos de disociación. La regeneración se realizó con tampón glicina 0,1 M, pH 1,5 a 20 µL/minuto. Un control correspondiente a la inyección del AcM sin adicionar en ningún momento el antígeno permitió eliminar del análisis el efecto de la cinética de disociación del anticuerpo de la superficie del sensor. La señal específica se obtuvo como la sustracción de la señal obtenida en el canal negativo (sin anticuerpo capturado) a la señal obtenida por la interacción de la proteinasa con el anticuerpo capturado. El cálculo de las constantes de disociación se efectuó con el programa BIAevaluation 2.0 (Biacore, Suecia).

3.9.2 Anál isis de la repetitividad de los epit opos sobre la proteinasa de *T. vaginalis*.

3.9.2.1 Obtención de los conjugados anticuerpo monoclonal-peroxidasa.

Los AcMs fueron marcados con peroxidasa de rábano (Tipo IV, Sigma, EE UU) según la metodología descrita por Gavilondo (1995). Para ello, 4 mg de peroxidasa se disolvieron en un mililitro de agua destilada, se mezclaron con 0,5 mL de periodato de sodio 0,1 mol/L en agitación lenta por 20 minutos y posteriormente, la mezcla se dializó contra acetato 1 mmol/L por 16 horas. Se adicionaron 20 µL de tampón carbonato 0,2 mol/L inmediatamente antes de proceder a la adición de 8 mg de los AcMs en 1 mL de tampón carbonato 0,01 mol/L. Las mezclas fueron incubadas por 2 horas a temperatura ambiente y dializadas contra TFS por 16 horas. Seguidamente, los conjugados se precipitaron con el mismo volumen de una solución de sulfato de amonio saturada. Se dejaron por 2 horas en reposo a 4° C y posteriormente, fueron centrifugados a 650 g durante 10 minutos. Una vez eliminado el sobrenadante se procedió a lavar dos veces el precipitado con sulfato de amonio al 50 %. El precipitado se disolvió en 2 mL de TFS y se dializó contra el mismo tampón durante 16 horas. Por último, se le adicionó BSA al 1 % e igual volumen de glicerol para su conservación.

3.9.2.2 ELISA de doble sitio.

Para determinar si los epit opos reconocidos por los AcMs son repetitivos sobre la proteinasa, se procedió a la realización de un ELISA de doble sitio en el cual los conjugados utilizados fueron los propios AcMs marcados con peroxidasa. Previamente se seleccionaron las condiciones óptimas de trabajo, a partir de diferentes concentraciones de AcMs, proteinasa y diluciones de los conjugados.

Como fase sólida se empleó una placa de microtitulación (Nunc, Dinamarca) la cual se recubrió con los AcMs anti-proteinasa de *T. vaginalis* y anti P-30 de *T. gondii* (Castaño *et al*, 2001) a concentraciones de 20 µg/mL preparados en tampón de recubrimiento. La placa se incubó durante 16 horas a 4 °C, y posteriormente, se procedió al lavado de la misma tres veces con TFS-T. Los sitios libres de anticuerpos, en la placa, fueron bloqueados con

solución de BSA en TFS al 2,5 %, por una hora a 37 °C. Luego de eliminada la solución de bloqueo, se añadió la proteinasa purificada a una concentración de 5 µg/mL la cual se incubó por una hora a 37 °C. Al finalizar la incubación, se realizaron seis lavados con TFS-T y se añadieron los conjugados AcMs anti-proteinasa marcados con peroxidasa a la dilución de 1/1000 preparados en TFS-T. Para el AcM anti P-30 como recubrimiento se utilizó como conjugado una mezcla de los AcMs anti-proteinasa. Después de una hora de incubación a 37°C y de seis lavados con TFS-T se adicionó el sustrato (ver detalles en el acápite 3.4.1.2) con el cual se incubó por 15 minutos en la oscuridad. La reacción fue detenida con ácido sulfúrico al 12,5% y la absorbancia obtenida se leyó a 492 nm.

3.9.3 Identificación de las moléculas reconocidas por los anticuerpos monoclonales en los antígenos de secreción de *T. vaginalis*.

Para identificar los componentes polipeptídicos que reconocen los AcMs en los antígenos de secreción de *T. vaginalis*, se utilizó una combinación de electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunotransferencia. El procedimiento seguido fue descrito en el acápite 3.3.2 y 3.5.2. Se utilizó una mezcla de proteínas patrones en un rango entre 53 y 212 kDa (Pharmacia LKB Biotechnology, Suecia).

3.9.4 Determinación del efecto que producen los tratamientos con calor, químicos y enzimáticos en los antígenos purificados.

3.9.4.1 Purificación de los antígenos por cromatografía de afinidad.

Se procedió a purificar los antígenos de secreción de *T. vaginalis* reconocidos por uno de los AcM anti- *T. vaginalis* empleando para ello la cromatografía de afinidad. Dos gramos de Sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno fueron hidratados con HCl 1 mmol/L, según las recomendaciones del fabricante (Amersham-Biosciences, EE UU), antes de proceder al acoplamiento covalente del AcM a la matriz, en una proporción de 3-4 mg del anticuerpo por mililitro de gel. Luego del acoplamiento y de bloquearse los sitios libres, se procedió a eliminar el anticuerpo que no quedó acoplado a la matriz y a equilibrar la

columna, para finalmente proceder a la aplicación de los antígenos de secreción del parásito. Las moléculas no retenidas a la matriz fueron eluidas con TFS a una velocidad de flujo de 1 mL/minuto, mientras que las que quedaron retenidas fueron eluidas a esa misma velocidad de flujo con una solución de tiocianato de sodio 3 mol/L. La fracción específica fue desalinizada frente a TFS mediante diálisis y finalmente, concentrada por ultrafiltración.

3.9.4.2 Tratamiento de los antígenos purificados por cromatografía de afinidad.

Estos ensayos se realizaron según los procedimientos descritos por Díaz y colaboradores (Díaz *et al*, 1998).

3.9.4.2.1 Tratamiento con calor.

Se incubaron los antígenos (20 µg/mL) a temperaturas de 37, 55, 65, 80 y 100 °C, en un rango de tiempo que osciló desde 30 minutos a 48 horas.

3.9.4.2.2 Tratamiento con TCA.

Los antígenos purificados previamente preparados a la concentración de 20 µg/mL fueron mezclados en partes iguales con soluciones de TCA al 1,25; 2,5; 5,0 y 10 % en TFS y las mezclas se incubaron en baño de hielo durante 30 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 1000 g durante 15 minutos a 4° C, y se colectaron los sobrenadantes. Cada precipitado fue lavado dos veces con etanol y se resuspendió finalmente en 500 µL de TFS. Ambos, sobrenadantes y precipitados, fueron analizados en su reconocimiento por los AcMs anti-proteinasa.

3.9.4.2.3 Tratamiento con pronasa-E.

Los antígenos fueron preparados a concentraciones de 1,25; 2,5 y 5 µg/mL y mezclados con una solución de pronasa-E (Merck, Alemania) a razón de 60 µg de enzima por mililitro de antígeno. Cada mezcla fue incubada durante 24 horas a 37° C. La reacción se detuvo por la adición de PMSF a 8 mmol/L con el propósito de inhibir la actividad de la pronasa-E.

3.9.4.2.4 Tratamiento con β-mercaptoetanol.

Los antígenos purificados fueron diluidos a una concentración de 200 µg/mL y mezclados a partes iguales con β-mercaptoetanol a 20, 60, 100, 140, 180 mmol/L. Las mezclas de ensayo se incubaron una hora a 37° C y posteriormente fueron evaluadas.

3.9.4.2.5 Tratamiento con neuroaminidasa.

Para este experimento los antígenos fueron mezclados con neuroaminidasa de *Vibrio cholera* (Tipo II, Sigma, EE UU) diluida en tampón acetato de sodio 0,05 mol/L, pH 5,5 hasta lograr una proporción de 0,07 U de enzima por mL de antígeno. Posteriormente, la mezcla fue incubada a 37° C durante 3 horas y luego neutralizada con Tris 1 mol/L con el propósito de inhibir la actividad de la enzima.

3.9.4.2.6 Tratamiento con periodato de sodio.

Los antígenos (20 µg/mL) fueron mezclados a partes iguales con 20, 40, 60, 80, 100 mmol/L de periodato diluido en tampón acetato de sodio 200 mmol/L pH 4,7 e incubados en oscuridad durante una hora a 37° C. Posteriormente, las mezclas fueron incubadas 30 minutos a temperatura ambiente con borohidruro de sodio 150 mmol/L y finalmente dializado contra TFS.

Los experimentos se repitieron dos veces y se realizaron tres ensayos por tratamiento.

3.9.4.3 Análisis del reconocimiento de los epitopos sobre los antígenos purificados y tratados.

Se seleccionaron previamente las condiciones óptimas para el ELISA utilizando los antígenos purificados sin tratar.

Por otra parte, los antígenos tratados y no tratados (20 µg/mL) fueron añadidos sobre placas de microtitulación (Covalink NH module, Nunc, Dinamarca) siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguidamente, las placas fueron incubadas por 16 horas a 4 °C. Posteriormente, se realizaron los lavados con TFS-T y se bloquearon durante una hora a 37° C con BSA al 2,5 % en TFS. Después se procedió a añadir los AcMs anti-proteinasa a la concentración de 5 µg/mL. Las placas fueron incubadas por una hora a 37 °C y el ensayo se continuó siguiendo el procedimiento de ELISA indirecto descrito en el acápite 3.4.1.2.

3.10 Estudio del efecto protector de la proteinasa 62 kDa de *Trichomonas vaginalis*.

3.10.1 Inmunización de ratones BALB/c con la proteinasa de 62 kDa de *T. vaginalis* con TC y CpG, como adyuvantes.

Se inmunizaron 6 grupos de 10 ratones hembras BALB/c, uno de ellos con 20 µg de la proteinasa de 62 kDa (p-62) con 5 µg de TC (toxina colérica, Sigma, EE UU), otro con 20 µg de la proteinasa con 10 µg de CpG (oligonucleótido CpG no metilado, QUIAGEN, Operón, Alemania), otros dos grupos solo con cada uno de los adyuvantes en TFS (TC y CpG) a la misma concentración y un quinto y un sexto grupo con la proteinasa sola y TFS, respectivamente. Todos los ratones fueron inmunizados por vía intranasal dos veces, a intervalo de dos semanas. El experimento fue realizado por duplicado.

3.10.2 Modelo de infección vaginal por *T. vaginalis* y reto en ratones BALB/c.

Diez días después de la última inmunización se procedió a establecer el “estro” en cada ratón en estudio. Implantes conteniendo 5 µg de 17 β-estradiol fueron colocados por incisión en la región dorso anterior del ratón y posterior sutura de la misma. Posteriormente, se procedió al pretratamiento de los ratones con 10^{10} unidades formadoras de colonias de *L. rhamnosus* por ratón (15 µL). Los microorganismos fueron inoculados al ratón intravaginalmente (Lushbaugh *et al*, 2000). Una vez garantizadas estas condiciones, se procedió 5 días más tarde, a inocular intravaginalmente a cada ratón con 8×10^5 parásitos. Transcurrida una semana, se procedió al lavado de la vagina de cada ratón con 30 µL de medio TYI-S-33 al 10 % de suero bovino inactivado suplementado con estreptomicina-penicilina a 100 µg/mL. Las muestras tomadas del lavado vaginal se adicionaron a este medio y se mantuvieron a 37 °C por una semana. La presencia o no del parásito se chequeó diariamente mediante el microscopio óptico invertido.

3.10.3 Determinación de los niveles de anticuerpos anti-proteinasa p-62 en sueros y secreciones vaginales de ratones BALB/c.

Previo a la inmunización, diez días después de la última inmunización y ocho días posterior al reto con *T. vaginalis* se les extrajo sangre y se les realizaron lavados vaginales a los ratones, para determinar los niveles de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 en sueros y de IgG e IgA en secreciones vaginales por ELISA.

Brevemente, las placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc, Dinamarca) fueron recubiertas con 100 µL por pozo de la proteinasa de *T. vaginalis* (20 µg/mL diluida en tampón de recubrimiento) e incubadas a 4 °C en cámara húmeda por 16 horas, se continuó según fue descrito en el acápite 3.4.1.2. Previamente, se seleccionaron las condiciones óptimas de trabajo. Los sueros y lavados vaginales fueron utilizados a la dilución de 1/5000 y 1/3 en TFS pH 7,4 conteniendo BSA al 1 %, respectivamente. Se utilizaron los conjugados anti-IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 de ratón – peroxidasa para la evaluación de los sueros y anti-IgG e IgA de ratón – peroxidasa para los exudados vaginales, todos a la dilución de 1/5000.

3.11 Análisis de los resultados.

Para determinar el efecto producido por los AcMs sobre la adhesión del parásito a células epiteliales, se compararon los porcentos de inhibición obtenidos con cada uno de ellos. Para determinar el AcM que más protegió, se compararon los porcentos de protección de los grupos en estudio. En ambos ensayos, se aplicó la prueba de “Comparación de proporciones” empleando los paquetes de programas para análisis estadísticos Statistica 6.0.

Las concentraciones de nitrito se compararon tanto en el sobrenadante del cultivo de macrófagos como en el suero de ratones, ambos tratados con los AcMs en presencia del parásito, además se compararon los resultados de la inmunización intranasal de ratones BALB/c con la proteinasa-62 y los adyuvantes y los controles. En todos los casos se aplicó

la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba Student-Newman-Keuls (SNK) empleando el paquete de programa para análisis estadísticos Tonystat (Sigarroa, 1987).

En el estudio del reconocimiento de los AcMs por los antígenos tratados y sus controles y en el análisis de los niveles de anticuerpos anti-proteinasa específica en sueros y secreciones vaginales, se aplicó la prueba de Mann–Whitney empleando los paquetes de programas para análisis estadísticos Epi Info versión 6.04 (Dean *et al* 1994).

4. Resultados

4.1 Purificación de la proteinasa de 62 kDa de *Trichomonas vaginalis*.

Evaluación del grado de pureza.

Con el propósito de obtener AcMs antiproteinasa de 62 kDa de *T. vaginalis* fue necesario primeramente purificar esta proteinasa de productos de secreción del parásito. Como resultado de la combinación de la precipitación con etanol y el fraccionamiento con sulfato de amonio, se eliminaron el 82,16 % de las proteínas contaminantes y se incrementó la actividad específica cinco veces en la fracción que contenía la proteinasa de 62 kDa (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros del proceso de purificación de la proteinasa de 62 kDa de secreción de *T. vaginalis*.

Etapas del proceso de purificación	Proteínas totales (mg/mL)	Actividad mg azocaseína/h./ml Ez	Actividad específica mg azocaseína/h/mL Ez / mg proteína	Rendimiento %
Muestra (antígenos de secreción)	53,51	19,84	0,37	-
Precipitación con etanol	35,57	22,50	0,63	100
Fraccionamiento con sulfato de amonio	9,55	17,41	1,87	79,11
Cromatografía de intercambio iónico	5,43	16,55	3,05	73,4
Filtración en gel	2,88	9,43	3,27	41,81

De la columna de intercambio iónico, eluyeron fracciones con actividad enzimática (Figura 2). Las fracciones se unieron según el perfil obtenido en tres mezclas y a su vez fueron purificadas por filtración en gel. Durante este paso, no se observó un incremento apreciable de la actividad específica, y la actividad enzimática disminuyó a la mitad de la obtenida hasta esa etapa. Se obtuvieron fracciones activas que correspondieron a pesos moleculares de 62, 40 y 29 kDa (datos no mostrados). En la figura 3 aparece solo reflejado el perfil de actividad enzimática de la proteinasa de 62 kDa por filtración en gel.

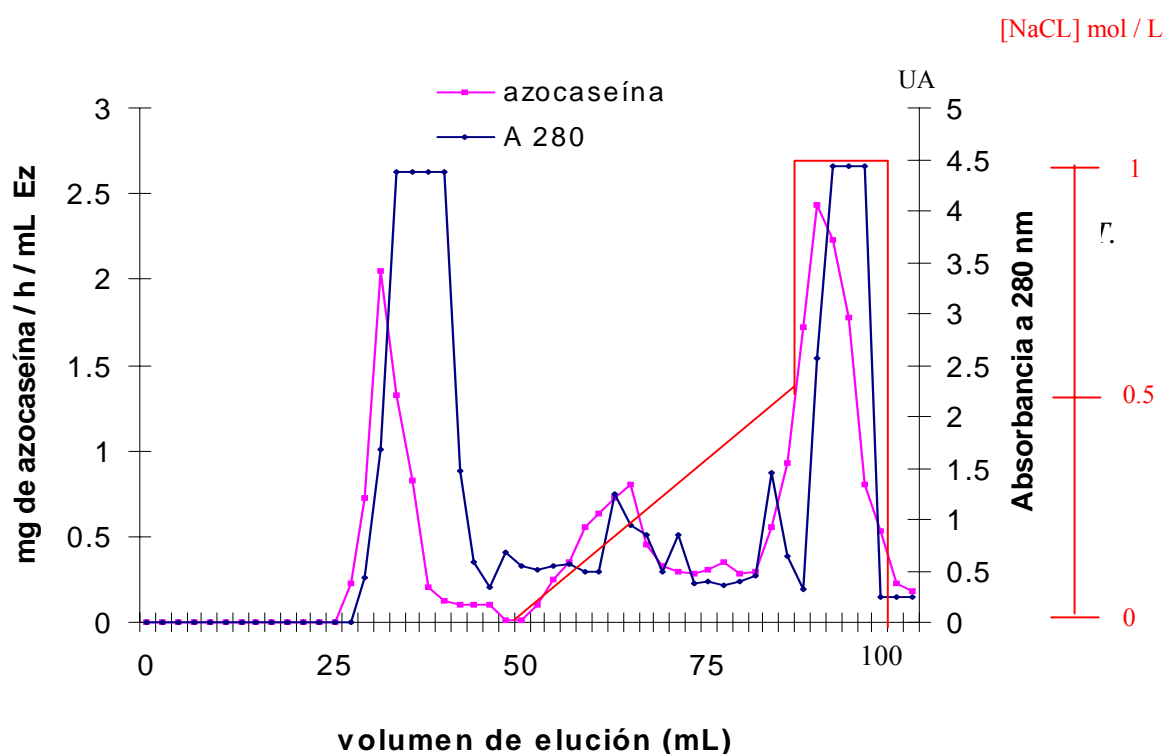


Figura 2. Perfil de actividad enzimática de antígenos de secreción de *I. vaginalis* después de realizada la cromatografía de intercambio iónico (gradiente lineal 10-500 mmol/L de NaCl).

Los ensayos enzimáticos de las fracciones se realizaron a pH 7,0 con el sustrato azocaseína, las mezclas de reacción se incubaron a 37 °C por 3 horas.

UA. Unidades arbitrarias.

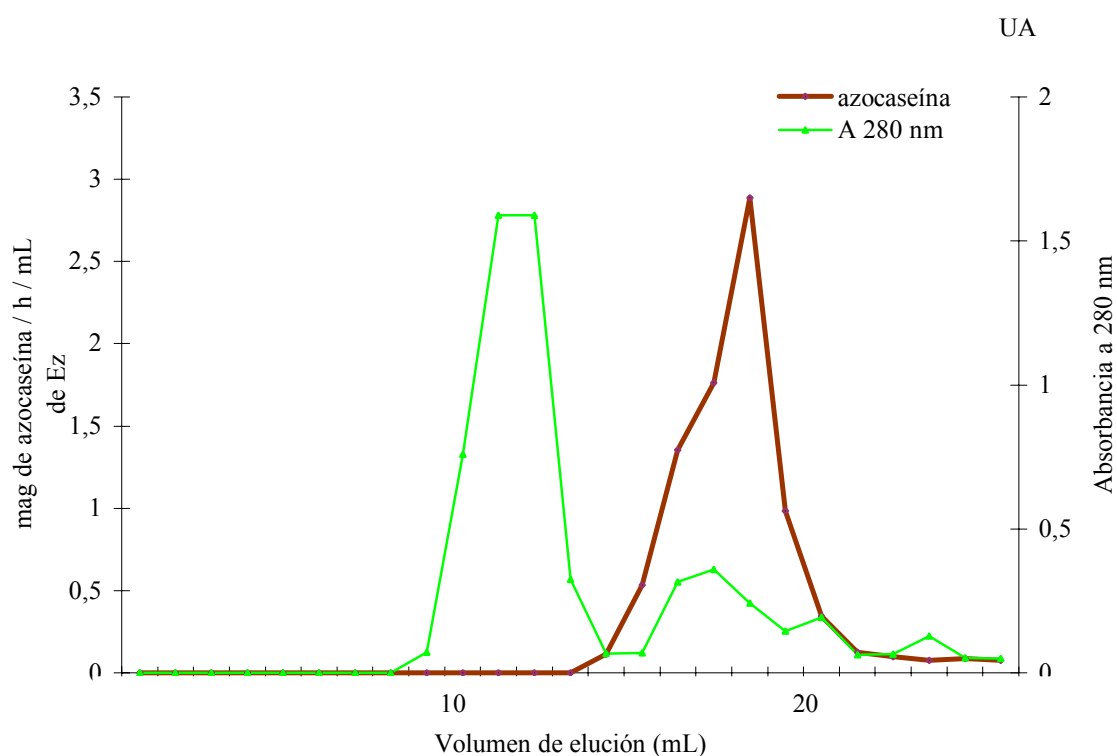


Figura 3. Perfil de actividad enzimática de la proteinasa de 62 kDa purificada utilizando la matriz Superosa 6.

Los ensayos enzimáticos de las fracciones se realizaron a pH 7,0 con el sustrato azocaseína, las mezclas de reacción se incubaron a 37 °C por 3 horas y las lecturas se realizaron a 366 nm. UA. Unidades arbitrarias.

Se verificó el grado de pureza de la proteinasa de 62 kDa (PM por filtración en gel) por electroforesis en geles de poliacrilamida obteniéndose una sola banda con un PM aproximado de 64 kDa (Figura 4) calculado por interpolación lineal a partir de proteínas patrones.

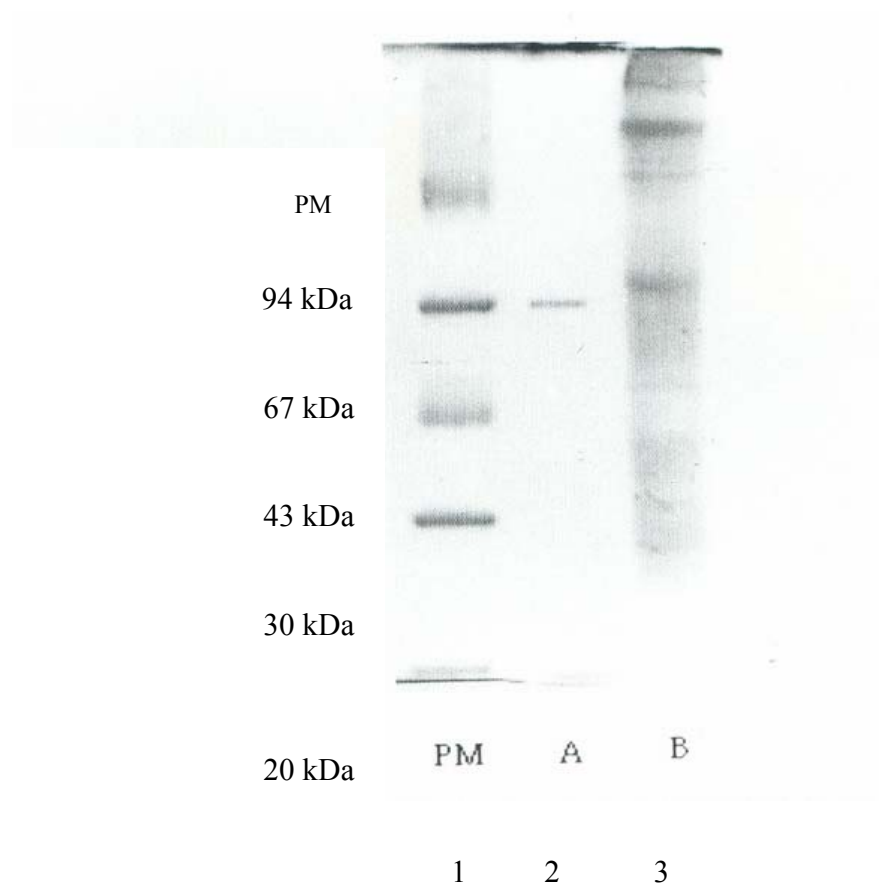


Figura 4. Evaluación del grado de pureza de la proteinasa de 62 kDa de *T. vaginalis* por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

La corrida se efectuó bajo condiciones desnaturizantes en mini-cámara a razón de 15 mA/gel con tampón Tris-glicina-SDS, pH 7,3. 1) Marcadores de peso molecular entre 20 y 94 kDa. 2) Proteinasa purificada. 3) Proteínas totales del extracto de antígenos de secreción de *T. vaginalis*.

4.2 Producción de anticuerpos monoclonales contra la proteinasa de 62 kDa de *Trichomonas vaginalis*.

Una vez obtenida la proteinasa de 62 kDa se procedió a la obtención de los anticuerpos monoclonales antiproteinasa. Todos los ratones que fueron inmunizados con la proteinasa de 62 kDa de *T. vaginalis* desarrollaron anticuerpos superiores a 1/5000. La fusión de células de mieloma murino Sp2/O-Ag14 con linfocitos del bazo del ratón inmunizado y con más alto título (1/20 000) de anticuerpos anti-proteinasa de 62 kDa de *T. vaginalis* generó híbridos estables que crecieron en medio selectivo con aminopterina. Algunos de estos híbridos mostraron anticuerpos anti-proteinasa de 62 kDa de *T. vaginalis* en sus sobrenadantes. Después del clonaje se obtuvieron 3 híbridos estables (4D8, 1A8 y 3C11) positivos por ELISA. De éstos, 2 mostraron reconocimiento por IFI, el 4D8 alto (+++), y el 1A8 medio (++) (Figura 5). El 3C11 no mostró reconocimiento (resultado no mostrado).

El estudio de las clases y subclases reveló que los tres clones obtenidos produjeron anticuerpos de la subclase IgG1 (4D8, 1A8 y 3C11).

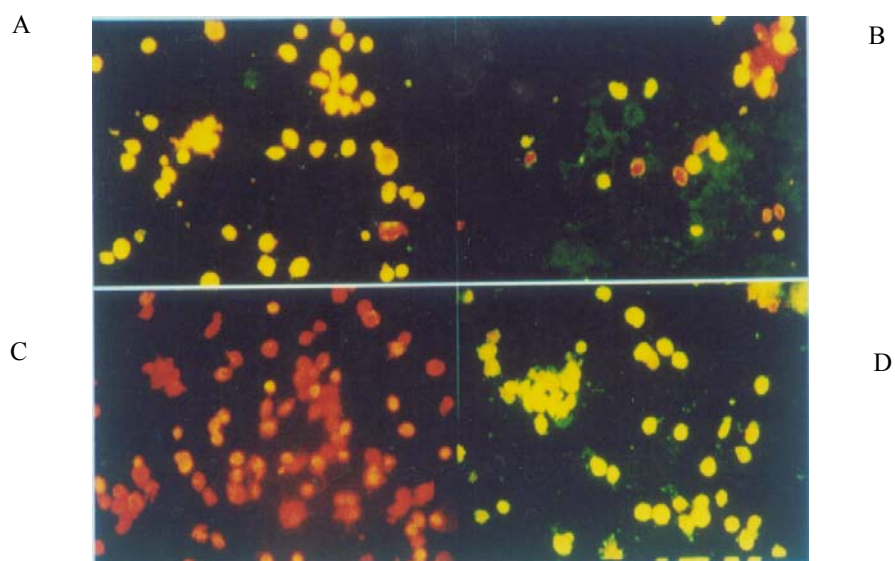


Figura 5. Reconocimiento de *T. vaginalis* por los AcMs y el suero de los ratones.

En la inmunofluorescencia representada en la figura los AcMs fueron utilizados a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ y el suero de los ratones a la dilución de 1/50. La lectura se realizó en un microscopio de fluorescencia Leitz modelo Dialux con un ocular 20 X. A) Fluorescencia específica del parásito con el AcM 4D8, B) Fluorescencia específica del parásito con el AcM 1A8. C) No fluorescencia. Suero de ratón no inmunizado. D) Fluorescencia específica del parásito con el suero de ratón inmunizado con la proteinasa de 62 kDa de *T. vaginalis*.

Los AcMs anti-proteinasa de 62 kDa de *T. vaginalis*, 4D8, 1A8 y 3C11, y el suero del ratón inmune fueron enfrentados a la proteinasa de 60 kDa (purificada y donada gentilmente por el Dr Gary Garber) por inmunotransferencia y todos fueron capaces de reconocer a la molécula de 60 kDa (resultado no mostrado).

4.3 Efecto de los AcMs anti-proteinasa de 62 kDa de *Trichomonas vaginalis* sobre los procesos de adhesión.

Para evaluar la efectividad de los AcMs obtenidos sobre la adhesión celular, se incubaron previamente trofozoitos de *T. vaginalis* marcados con [^3H]-timidina con los AcMs anti-proteinasa de 62 kDa del parásito (4D8, 1A8, 3C11), antes de ponerlos en contacto con las células HeLa. Los resultados muestran una diferencia estadísticamente significativa en la adhesión de los trofozoitos a las células HeLa al compararlos con los trofozoitos incubados con el AcM anti-*T. gondii* empleado como AcM no relacionado (Figura 6). Este experimento se realizó dos veces, en iguales condiciones, con resultados similares.

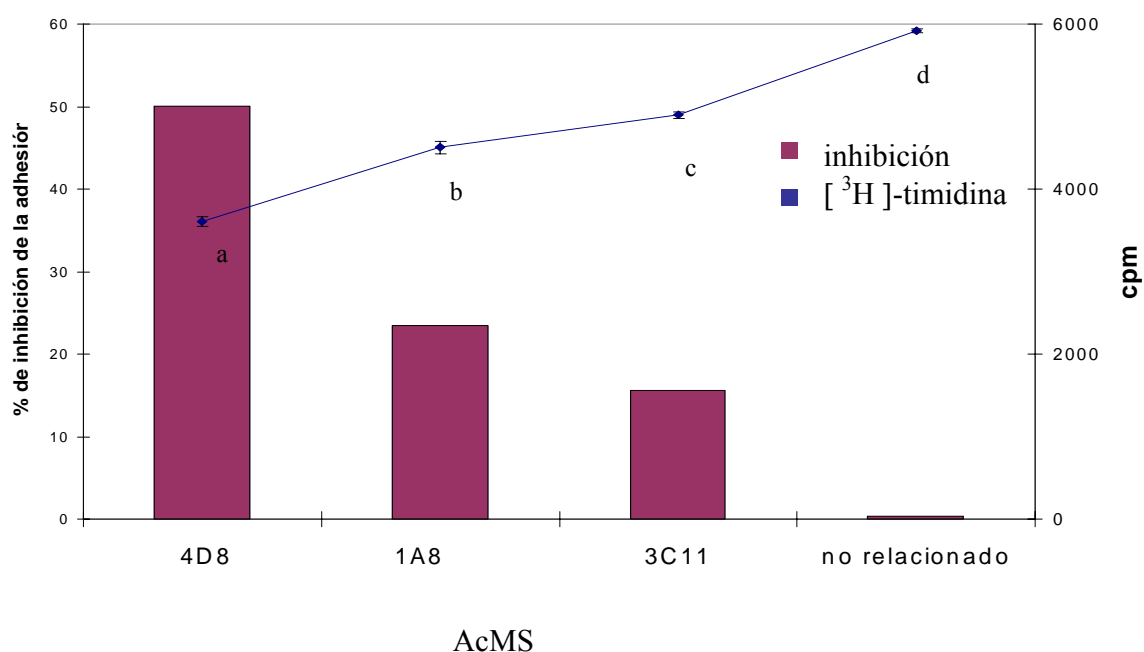


Figura 6. Efecto producido por los AcMs anti-proteinasa de 62 kDa, sobre la adhesión del parásito a las células HeLa en cultivo.

Los parásitos marcados con timidina y tratados previamente con el AcM fueron adicionados a las células HeLa e incubados por 30 min. Los resultados que aparecen en la figura representan la media y la desviación estándar de 5 pozos (línea). Letras diferentes indican significación estadística según prueba de comparación de proporciones. ($p < 0,05$). Se determinó el % de inhibición, considerando como máxima adhesión (100 %) al control de células HeLa incubados con trofozoitos de *T. vaginalis* marcados (barras).

Como se observa en la figura 6 el AcM 4D8 fue el más efectivo en inducir la inhibición de la adhesión del parásito a las células HeLa, seguido del 1A8 y posteriormente del 3C11, quien resultó ser el menos efectivo.

No se observó inhibición de la citoadherencia cuando a las células HeLa, se le adicionaron en el momento del experimento, los trofozoitos de *T. vaginalis* marcados con [³H]-timidina y los AcMs anti-proteinasa de *T. vaginalis* y anti-P-30.

4.4 Protección pasiva de los AcMs anti-proteinasa de *Trichomonas vaginalis* en un modelo de infección intraperitoneal.

Una vez obtenidos tres AcMs anti-proteinasa de *T. vaginalis*, capaces de inhibir la adhesión del parásito a células en cultivo, se evaluó el potencial de estos AcMs de proteger *in vivo* a ratones infectados por este parásito.

Las lesiones fundamentales encontradas en los animales no protegidos fueron necrosis y abscesos en peritoneo, hígado, páncreas, riñón y bazo, toma del diafragma y presencia de líquido ascítico en el peritoneo del ratón. El hígado fue el órgano que se encontró dañado con mayor frecuencia. Se ilustra en la figura 7, A y B un órgano considerado sin lesión (A) y con lesión (B).

En la tabla 2 aparecen representados los resultados de la suma de los dos experimentos realizados.

En el grupo de ratones inoculados con el AcM 4D8 no se aprecian lesiones en 37 de los 40 ratones estudiados. Sin embargo, en los tres restantes, se observó en dos de ellos un pequeño absceso hepático y otro, aún más pequeño, en la pared externa del hígado.

En el grupo de ratones inoculados con el AcM 1A8 se observaron lesiones poco severas (pequeños abscesos hepáticos) en 16 de los 40 ratones estudiados.

Por otra parte, al analizar los resultados del grupo de ratones inoculados con el AcM 3C11, se observó una gran variedad de lesiones que van desde un absceso en la superficie del órgano (hígado, páncreas, riñón, o bazo) hasta la toma total del diafragma, en 38 de los ratones estudiados. Los dos ratones restantes murieron antes de finalizar el experimento.

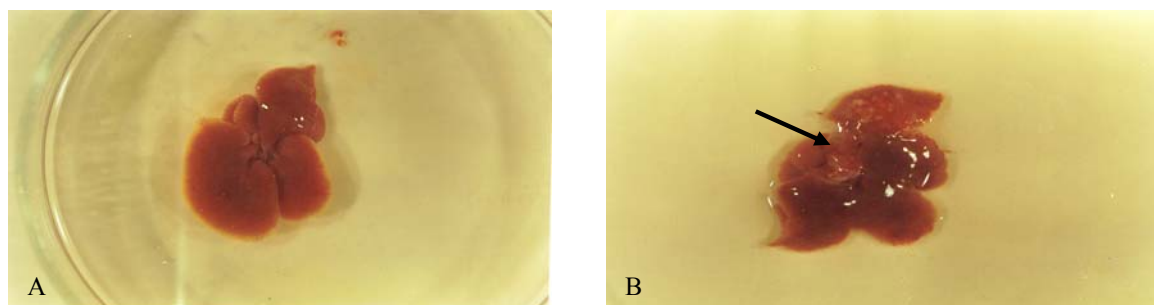
En el grupo control, con el AcM anti-*T. gondii*, se observaron daños muy semejantes a los apreciados en el grupo tratado con el AcM 3C11. En todos los casos se encontró al parásito en las lesiones o en el líquido ascítico obtenido por aspiración.

Los resultados demuestran que los AcMs anti-proteinasa de 62 kDa de *T. vaginalis* 4D8 y 1A8 fueron capaces de proteger a los ratones de los daños provocados por la infección de este parásito en la cavidad peritoneal.

Tabla 2. Protección pasiva de los AcMs contra la proteinasa de 62 kDa en un modelo de ratones inoculados por vía intraperitoneal con *T. vaginalis*.

Animales n=40	Anticuerpos monoclonales			
	4D8	1A8	3C11	3G9, no relacionado
Lesionados	3	16	38	40
No lesionados	37	24	0	0
% de protección	92 ^a	60 ^b	0	0

Grupos de 20 ratones fueron inoculados con 2 mg/ml de cada AcM por vía intraperitoneal (i.p.). Después de 24 h los animales fueron infectados con 8×10^6 parásitos por i.p. Siete días más tarde los animales fueron sacrificados y sus órganos internos fueron estudiados. Los datos presentados son resultado de la suma de los dos experimentos realizados (n=40). Se aplicó la prueba de comparación de proporciones. Letras diferentes indican significación estadística ($p < 0,05$).



Indica zona necrosada del hígado

Figura 7. Hígado de ratones BALB/c tratados con AcMs y retados con el parásito por vía intraperitoneal.

A- animal tratado con el AcM 4D8, anti-proteinasa de 62 kDa de *T. vaginalis* (no lesionado). B- animal tratado con el AcM 3G9, anti-*T. gondii* (lesionado).

4.5 Algunos elementos del posible mecanismo de acción mediante el cual los AcMs anti-proteinasa de *Trichomonas vaginalis* brindan protección.

Con el propósito de conocer el mecanismo de acción que media en la protección contra *T. vaginalis* observada en el experimento de inmunidad pasiva, se adicionaron los AcMs estudiados a parásitos en cultivo *in vitro* en presencia de suero fetal al 10 % sin descomplementar y no se evidenció un efecto citotóxico directo de los anticuerpos contra el parásito, lo que se evaluó por la liberación o no de la lactato deshidrogenasa del parásito a las concentraciones de los anticuerpos utilizadas en el estudio. Las concentraciones de AcMs utilizadas en el estudio fueron de 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$

En otro ensayo se observó que los AcMs al ponerse en contacto con la proteinasa de 62 kDa purificada, no fueron capaces de inhibir la actividad cisteino-proteinasa lo que sugiere que esta unión no se realiza por el centro activo de la enzima o por un sitio cercano al mismo.

También fue de interés conocer el papel que podrían tener los macrófagos en el mecanismo de protección observado, así cuando los trofozoitos de *T. vaginalis* se incubaron con los AcMs anti-proteinasa de 62 kDa (4D8 y 1A8) en presencia de macrófagos activados, se observó un incremento significativo en los niveles de óxido nítrico en los sobrenadantes de los cultivos, si se comparaban con los del AcM no relacionado o cuando se adicionaba L-NMMA. Con el AcM 3C11 no se observó este efecto (Tabla 3).

Tabla 3. Niveles de óxido nítrico en sobrenadantes de los cultivos de macrófagos tratados con los AcMs en presencia del parásito.

Mezcla de ensayo	Nitrito (μM) Media \pm DE
4D8 + LPS + IFN γ	676,75 \pm 26,52 ^a
1A8 + LPS + IFN γ	590,01 \pm 32,53 ^a
3C11+ LPS + IFN γ	81,09 \pm 5.49 ^b
4D8 + LPS +IFN γ + LNMMA	96,41 \pm 7,60 ^b

AcM no relacionado + LPS +IFN γ	83,20 \pm 4,27 ^b
--	-------------------------------

Se cultivaron 3×10^5 macrófagos por pozo. Posteriormente se adicionaron 6×10^4 parásitos por pozo, los AcMs y 2 horas después el LPS e interferón γ y L-NMMA. Los sobrenadantes fueron colectados 18 h más tarde y fueron mezclados con el reactivo de Griess para la determinación de óxido nítrico. Los valores representan la media y la DE de 5 pozos (n=5). Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba SNK. Letras diferentes indican significación estadística ($p < 0,01$).

Para conocer si este efecto también se observa *in vivo*, se determinaron los niveles de óxido nítrico en sueros de ratones tratados con los AcMs 4D8, 1A8, 3C11 y el no relacionado, del experimento de protección pasiva (ver resultados 4.4). En los sueros de los ratones tratados con los AcMs 4D8 y 1A8 se obtuvieron niveles significativos de óxido nítrico al compararlos con los sueros de los ratones controles ($p < 0,01$) (Tabla 4).

Tabla 4. Niveles de óxido nítrico en sueros de ratones inoculados con los AcMs y retados con el parásito.

AcMs inoculados a grupos de ratones	Nitrito (μ M) Media \pm DE
4D8	165,82 \pm 65,58 ^a
1A8	139,90 \pm 39,77 ^a
3C11	80,09 \pm 24,03 ^b
3G9 (control)	83,20 \pm 21,40 ^b

Cuatro grupos de animales fueron inoculados por vía i.p. con 2 mg/mL de cada AcM. Transcurrido 24 horas los animales fueron infectados con 8×10^6 parásitos por ratón por vía i.p. Al séptimo día, se les tomó muestra de sangre y se midieron los niveles de nitritos en suero mediante la reacción de Griess. Los valores representan la media y la DE de 5 pozos (n=5). Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba SNK. Letras diferentes indican significación estadística ($p < 0,01$).

El AcM 3C11 mostró la menor inhibición en el experimento de adhesión *in vitro* y un efecto protector no significativo en el modelo de infección intraperitoneal, así como no indujo la producción de óxido nítrico como efector tóxico en los animales de experimentación, por lo que se decidió retirar este AcM del estudio.

4.6 Caracterización parcial de epitopos reconocidos por los AcMs 4D8 y 1A8.

Primero se procedió a evaluar la afinidad de los AcMs 4D8 y 1A8 y para ello se utilizó el equipo Biacore. La constante de disociación estimada para los AcMs fue de $6,6 \times 10^{-8}$ y $8,8 \times 10^{-8}$ M, respectivamente. Los altos niveles de afinidad demostraron que los AcMs resultaron de una respuesta de anticuerpos madura.

Con el propósito de determinar la presencia de epitopos repetitivos sobre la proteinasa de 62 kDa de *T. vaginalis* se utilizó un ELISA de doble sitio. En este ensayo fue posible el empleo del mismo AcM (4D8 o 1A8) como recubrimiento y como conjugado lo que sugiere la naturaleza repetitiva, de al menos dos veces, de los epitopos reconocidos por los AcMs 4D8 y 1A8 sobre la molécula de 62 kDa (Figura 8).

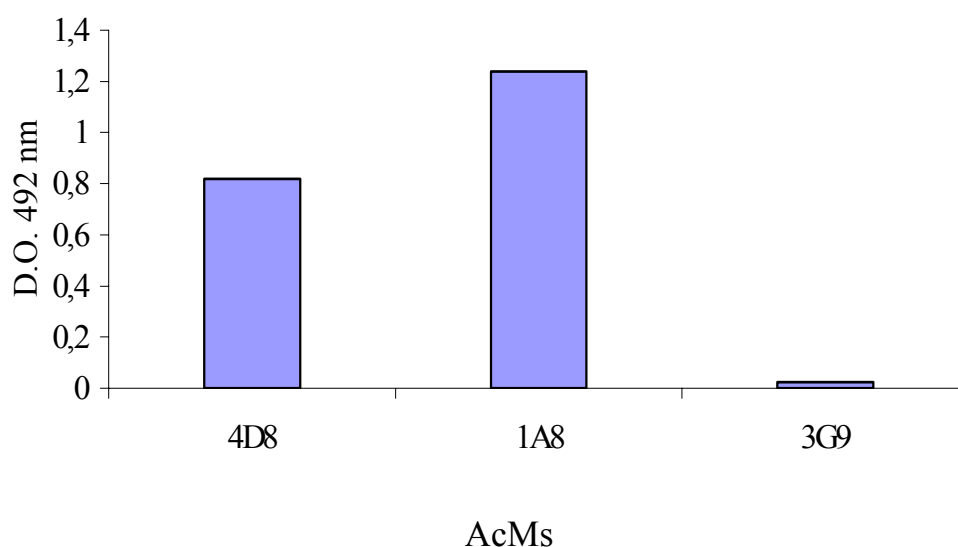


Figura 8. Determinación de la presencia de epitopos repetitivos sobre la proteinasa de 62 kDa purificada de antígenos de secreción de *T. vaginalis* empleando un ELISA de doble anticuerpo.

La placa fue recubierta con 20 µg/ml. de los AcMs 4D8, 1A8 y 3G9 (anti-*T. gondii*). La proteinasa purificada fue adicionada a la concentración de 5 µg/ml y como conjugados se emplearon los propios AcMs 4D8, 1A8 con peroxidasa a la dilución de 1/ 1000 y para el recubrimiento con el AcM 3G9 se empleó una mezcla de los AcMs 4D8 y 1A8 con peroxidasa a la misma dilución. La línea discontinua representa el valor de corte que fue determinado como $D O \geq 0,2$.

Con el interés de conocer las moléculas que son reconocidos por estos AcMs se realizó una inmunotransferencia, se identificaron fundamentalmente, 4 proteínas en un rango de peso molecular entre 62 y 108 kDa. Las mismas mostraron un PM de 62, 72, 102, 108 kDa (Figura 9).

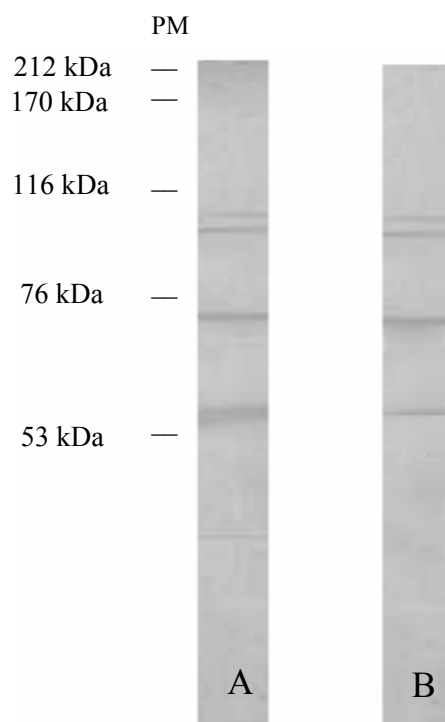


Figura 9. Moléculas identificadas por los AcMs 4D8 y 1A8 en antígenos de secreción de *T. vaginalis*.

El análisis fue realizado por inmunotransferencia. Se utilizaron marcadores de peso molecular en el rango de 53 y 212 kDa. Los AcMs fueron utilizados a la concentración de 500 µg/mL. A) representa al AcM 4D8 y B) al AcM 1A8. El conjugado anti-IgG de ratón-peroxidasa se utilizó a la dilución de 1/1000.

Con el propósito de hacer el estudio de los epitopos reconocidos por los AcMs, a partir de antígenos de secreción de *T. vaginalis* se purificaron las moléculas reconocidas por el AcM 4D8 por cromatografía de afinidad utilizando como ligando el propio AcM.

EL tratamiento con calor de estos antígenos purificados provocó un cambio significativo en el reconocimiento de los epitopos por los AcMs 4D8 y 1A8. A la temperatura de 37 °C se observó una ligera disminución en los valores de absorbancia en la primera hora de incubación. Sin embargo, un decrecimiento brusco fue observado a las temperaturas de 65 y 80° C con 30 minutos de incubación, lo que sugiere la naturaleza peptídica de estos epitopos y la existencia de una conformación que se pierde con la exposición al calor (Figura 10).

Resultados similares fueron observados, luego del tratamiento con TCA de los antígenos purificados ya que para ninguno de los porcentajes de TCA utilizados, hubo el máximo de reacción positiva entre los AcMs y los antígenos lo que sugiere que el tratamiento afectó las interacciones antígeno-anticuerpo apoyando la idea de la naturaleza proteica del antígeno (Figura 10).

La pronasa-E también provocó un efecto inhibitorio significativo en el reconocimiento de ambos anticuerpos por sus epitopos. Es conocido que las enzimas actúan cortando cadenas peptídicas por lo que nuestros resultados confirman la naturaleza proteica de los epitopos que reconocen ambos anticuerpos (Figura 10).

Posteriormente, al tratar los antígenos de secreción purificados con concentraciones crecientes de β -mercaptoetanol se obtuvo una disminución de un 50 % en el reconocimiento del AcM 1A8 por su epitopo, a concentraciones del agente reductor de 20 mM. El comportamiento con el AcM 4D8 fue diferente, pues la presencia del agente reductor no afectó la unión al antígeno. Estos resultados indican la existencia de al menos un puente disulfuro en la estructura que determina el reconocimiento del antígeno por el AcM 1A8. (Figura 10).

El tratamiento de los antígenos con neuraminidasa no tuvo efecto inhibitorio, por lo que es posible sugerir que el ácido siálico no está en su estructura o al menos este no tiene ningún papel en el reconocimiento del AcM. Por otro lado, los resultados obtenidos al tratar el antígeno con diferentes concentraciones de periodato tampoco resultaron afectar las actividades lo que nos indica la no existencia de estructura de carbohidratos involucradas en la configuración de los epitopos.

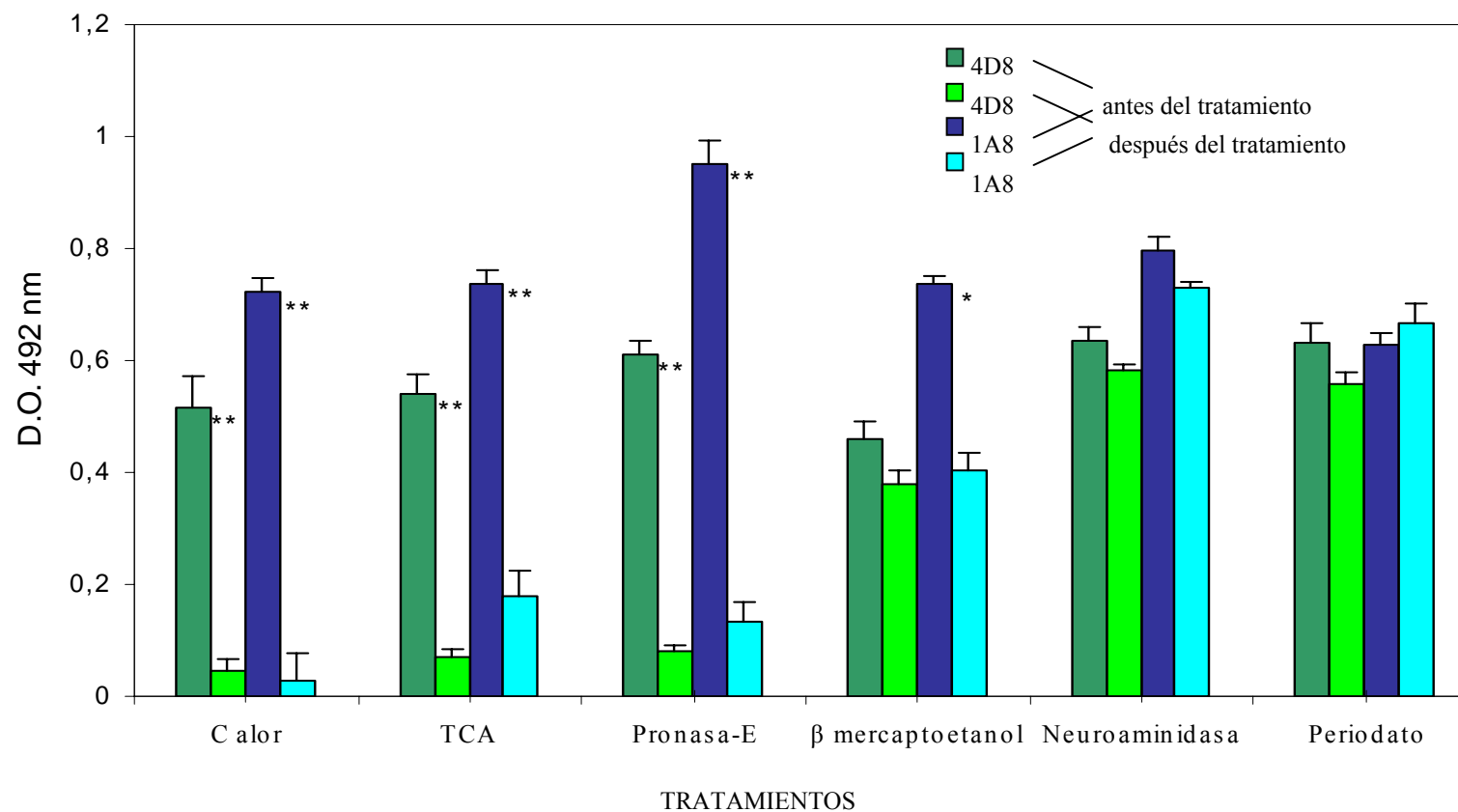


Figura 10. Efecto de varios tratamientos sobre los epitopos de antígenos de secreción de *T. vaginalis* reconocidos por los AcMs.

Antígenos de secreción de *T. vaginalis* fueron purificados por cromatografía de afinidad utilizando como ligando al AcM anti-proteinasa 4D8. Los antígenos purificados fueron sometidos a diferentes tratamientos y el efecto de los mismos fue determinado mediante un ELISA. Los resultados son expresados como la media y la desviación estándar de tres réplicas por tratamiento. Los datos fueron analizados por la prueba de Mann-Whitney. Diferencias significativas entre antígenos tratados y sus controles * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.7 Efecto protector de la inmunización intranasal de la proteinasa de 62 kDa de secreción de *Trichomonas. vaginalis* en ratones BALB/c.

En la tabla 5 aparecen reflejados los resultados obtenidos al inmunizar intranasalmente grupos de ratones con la proteinasa combinados con TC y CpG con sus correspondientes controles y posterior reto con el parásito.

Los grupos p-62 - TC y p-62 - CpG se infectaron entre 5 y 15 % mientras que los grupos controles tuvieron una infectación entre 80 y 90% respectivamente, mostrándose, mediante la aplicación de la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba SNK., diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los grupos.

Tabla 5. Efecto protector de la inmunización intranasal de ratones BALB/c con la proteinasa p-62 y TC y CpG como adyuvantes, en la prevención a la infección con *T. vaginalis*.

Pre-tratamiento	Número de ratones infectados con <i>T. vaginalis</i> / grupo		Total	
	A	B	Ratones infectados / total del grupo	% de protección
p-62	8/10	10/10	18/20 ^a	10
p-62 + TC	0/10	1/10	1/20 ^b	95
p-62 + CpG	1/10	2/10	3/20 ^b	85
TC	10/10	8/10	18/20 ^a	10

CpG	8/10	8/10	16/20 ^a	20
Salina	9/10	9/10	18/20 ^a	10

Se inmunizaron 6 grupos de 10 ratones hembras BALB/c por vía intranasal dos veces, a intervalo de dos semanas. Uno de ellos con 20 µg de p-62 con 5 µg de TC, otro con 20 µg de la proteinasa con 10 µg de CpG, otros dos grupos solo con cada uno de los adyuvantes en TFS (TC y CpG) a la misma concentración y un quinto y un sexto grupo con la proteinasa sola y TFS, respectivamente. Posteriormente, los ratones recibieron un reto intravaginal con 8×10^5 *T. vaginalis*. A y B representan 2 experimentos por separado. Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba SNK. $p < 0,05$. Letras diferentes indican significación estadística.

Para determinar si la inmunización fue capaz de estimular la respuesta inmune sistémica y mucosal se estudiaron los niveles de anticuerpos anti-proteinasa de 62 kDa en sueros y secreciones vaginales de ratones mediante ELISA. Se tomaron muestras previo a la inmunización, diez días después de la última inmunización y 8 días después del reto con el parásito. En ratones previo a la inmunización no se encontraron anticuerpos específicos a la proteinasa de 62 kDa en ninguno de los fluidos biológicos estudiados. Resultados similares fueron observados en los grupos de ratones inmunizados con TC, CpG, salina y la proteinasa sin adyuvante. Sin embargo, en sueros de ratones inmunizados con la proteinasa y TC, posterior al reto, se observaron niveles significativos ($p < 0,05$) de anticuerpos circulantes específicos de las subclases IgG1, IgG2a, e IgG3, mientras que en el grupo de ratones que recibieron la proteinasa combinada con CpG, y posterior reto con el parásito se obtuvieron niveles significativos ($p < 0,05$) de anticuerpos anti-proteinasa de 62 kDa de las subclases IgG2a, IgG2b e IgG3 (Figura 11).

En las secreciones vaginales de cada grupo de ratones en estudio, fueron determinados los niveles de anticuerpos anti-proteinasa específicos, de las clases IgG e IgA. Se obtuvo respuesta significativa ($p < 0,05$) de anticuerpos IgG e IgA, posterior al reto con el parásito para los grupos que recibieron la proteinasa con TC y CpG. La respuesta de anticuerpos IgA fue más significativa ($p < 0,01$) en el grupo de ratones inmunizados con la proteinasa y TC como adyuvante (Figura 12).

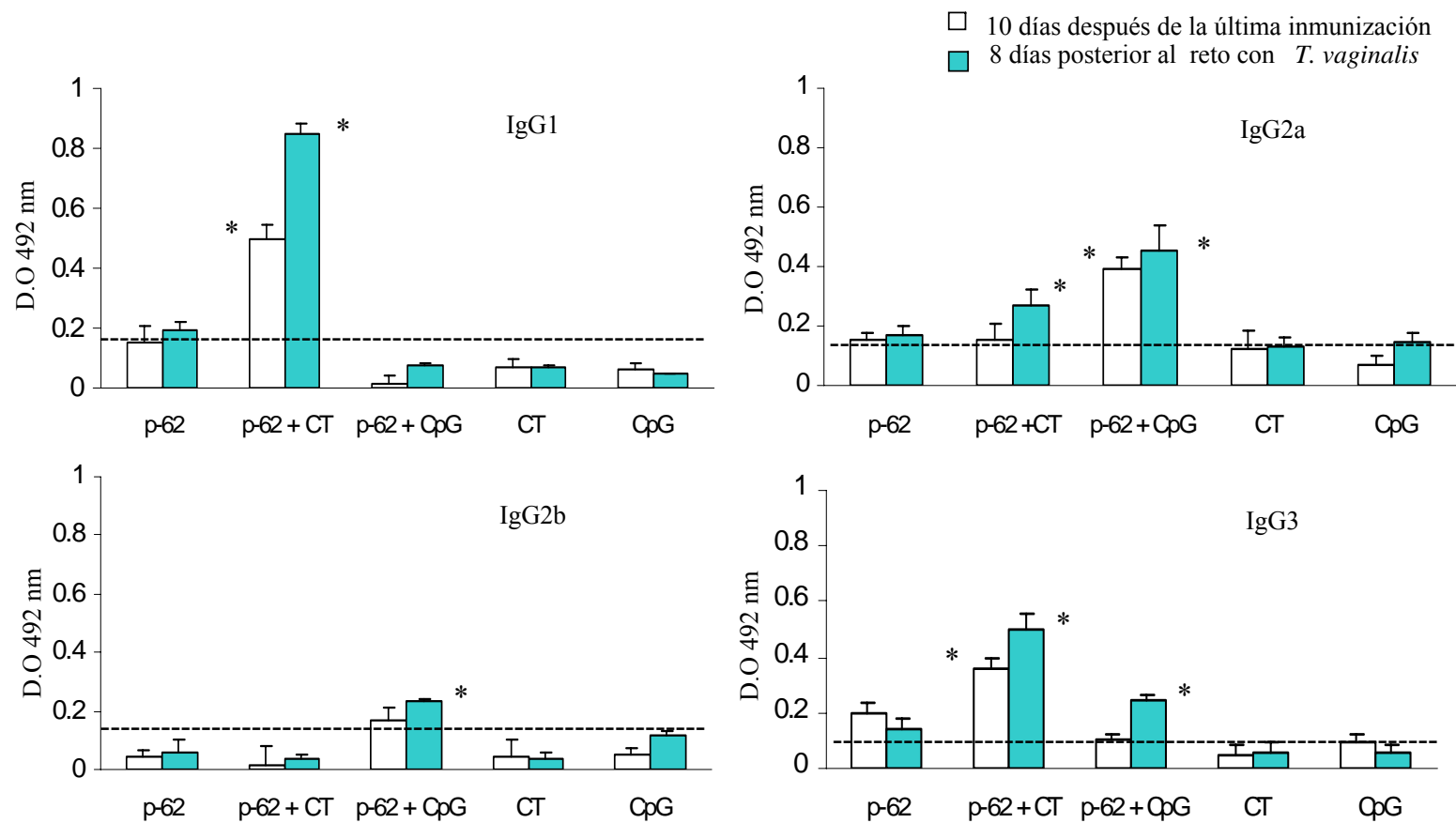


Figura 11: Niveles de anticuerpos anti-p-62 en sueros de ratones inmunizados intranasalmente con p-62, p-62 + CpG, p-62 + CT, CT y CpG.

Los ratones fueron inmunizados 2 veces, a intervalos de dos semanas. Las muestras fueron colectadas 10 días después de la última inmunización y 8 días posterior al reto con *T. vaginalis* y evaluadas por ELISA. La línea discontinua indica la media de las densidades ópticas a 492 nm del grupo que

recibió TFS, el cual representa el valor de corte entre positivos y negativos. Los resultados se expresan como la media \pm la DE de 10 ratones por grupo. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Mann-Whitney. * Diferencias significativas con relación a su control. $p < 0,05$.

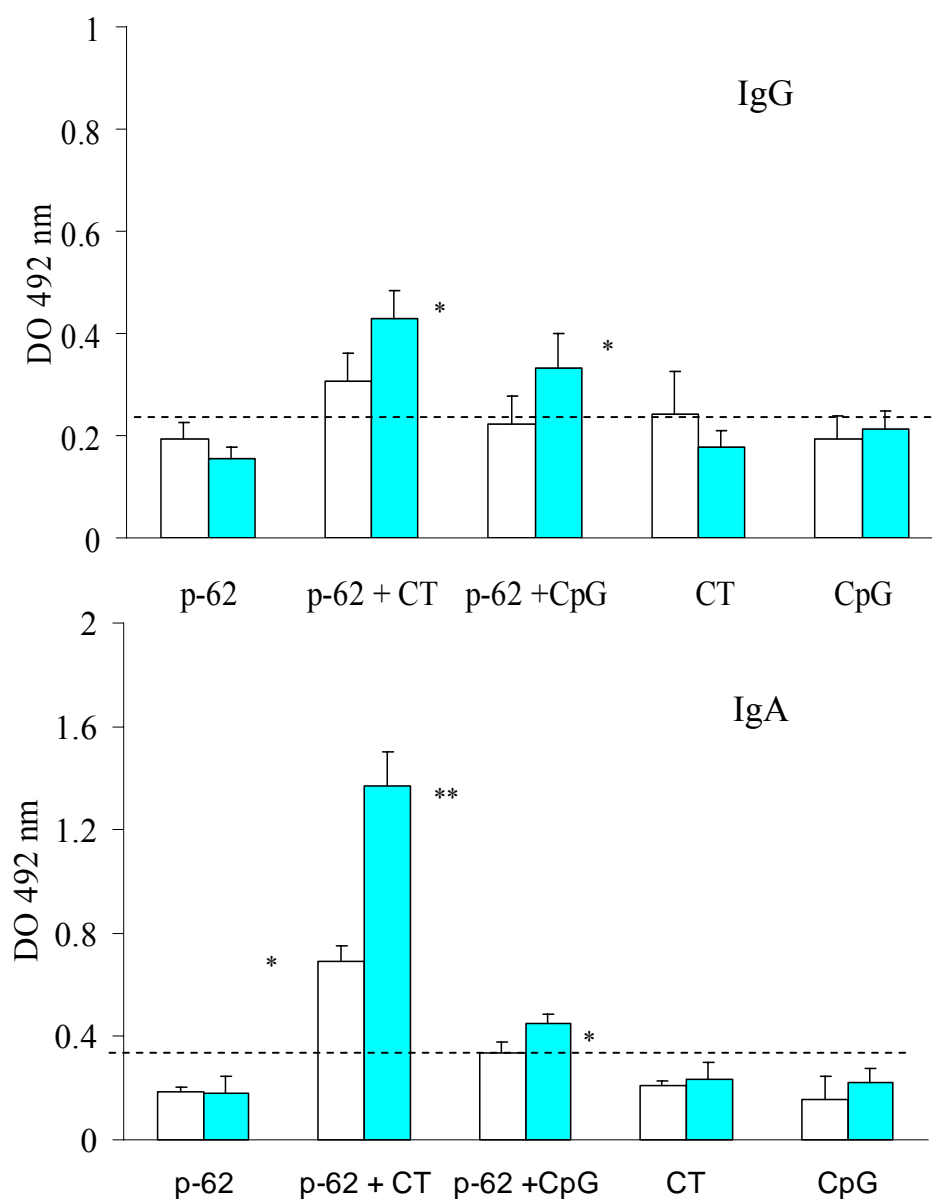


Figura 12. Niveles de anticuerpos anti-p-62 en secreciones vaginales de ratones inmunizados intranasalmente con p-62, p-62 + CpG, p-62 + CT, CT y CpG.

Los ratones fueron inmunizados 2 veces, a intervalos de dos semanas. Las muestras fueron colectadas 10 días después de la última inmunización y 8 días posterior al reto con *T. vaginalis* y evaluadas por ELISA. La línea horizontal indica la media de las densidades ópticas a 492 nm del grupo que recibió TFS, el cual representa el valor de corte entre positivos y negativos. Los resultados se expresan como la media \pm la DE de 10 ratones por grupo. Diferencias significativas con relación a su control. Prueba de Mann-Whitney, * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

5- DISCUSIÓN

Los mecanismos involucrados en la patogenia de *T. vaginalis* no están totalmente esclarecidos. Las investigaciones actuales están dirigidas a los eventos iniciales que se requieren para el establecimiento de la infección.

Algunos autores demostraron la participación de la proteinasa de 30 kDa en los procesos de adhesión del parásito a células epiteliales (Mendoza-López *et al*, 2000). Sin embargo, previo al presente estudio, el papel de la proteinasa de 60 kDa secretada por *T. vaginalis* en estos eventos era desconocido. Garber y Lemchuk-Favel sugirieron que esta cisteino-proteinasa pudiera participar en la patogenia de *T. vaginalis* (Garber y Lemchuk-Favel, 1994), pero no profundizaron en ello. Teniendo en cuenta estos antecedentes, y conociendo la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas y de vacunación, se decidió estudiar si esta proteinasa de 60 kDa tenía realmente alguna participación en el proceso de adhesión del parásito.

Durante el proceso de purificación, se obtuvieron 3 fracciones de peso molecular de 62, 40 y 29 kDa por filtración en gel. Como se comentó anteriormente, Garber y Lemchuk-Favel purificaron y caracterizaron dos proteinasas de 30 y 60 kDa y sugirieron que las fracciones de 23 y 43 kDa podrían ser el producto de la hidrólisis de la molécula de 60 kDa. Este fenómeno ellos lo demostraron por reacción cruzada de un suero de conejo específico de la fracción de 23 kDa con las bandas de 43 y 60 kDa (Garber y Lemchuk-Favel, 1989). Sus observaciones sobre la hidrólisis podrían explicar la aparición de la banda de 40 kDa. Las variaciones de peso molecular encontradas cuando se comparan nuestros resultados, con los obtenidos por estos autores, pueden explicarse por los cambios realizados en el proceso de purificación. (sustitución de la matriz Sefacril S 300 por Superosa 6)

La proteinasa purificada por nosotros resultó ser un buen inmunógeno, pues se obtuvieron títulos de anticuerpos elevados cuando se inmunizaron ratones BALB/c con ella, empleando en el esquema de inmunización ACF y AIF. Tres AcMs (4D8, 1A8 y 3C11)

fueron producidos contra la proteinasa purificada. Estos anticuerpos, así como el suero de los ratones inmunizados con la proteinasa de 62 kDa fueron capaces de reconocer, por inmunotransferencia, a la proteinasa de 60 kDa (donada gentilmente por el Dr. Garber), sugiriendo este resultado que ambas proteinasas pudieran ser la misma o siendo otra de peso molecular similar tenga regiones conservadas que pueden ser reconocidas por los AcMs; lo que pudiera ser confirmado a través del conocimiento de la estructura primaria de ambas proteínas.

El empleo de la técnica de IFI permitió verificar que los epitopos reconocidos por los monoclonales 4D8 y 1A8 en la proteinasa de secreción, se encuentran también sobre *T. vaginalis*, sin dejar de tener en cuenta la posibilidad de que la Ez una vez secretada, pudiera adherirse a la superficie de *T. vaginalis*.

Mendoza-López y colaboradores demostraron que la proteinasa de 30 kDa es importante en el proceso de citoadherencia del parásito (Mendoza-López *et al*, 2000). Esta observación coincide con los resultados obtenidos en nuestro estudio en el cual se demuestra que los tres AcMs anti-proteinasa de 62 kDa son capaces de inhibir este proceso. Resultados similares fueron alcanzados con los AcMs contra la proteína 33 de adhesión de *T. vaginalis* (Huang *et al*, 2007).

Los anticuerpos 4D8 y 1A8 que marcan a la proteinasa del parásito por IFI son también los que más inhiben la citoadherencia en el modelo con células HeLa. Sin embargo, el AcM 3C11 que reconoce a la proteinasa y no al parásito por IFI, solo disminuye en un 17,3 % la citoadherencia. Esto nos lleva a pensar que la proteinasa secretada por el parásito, actúa sobre la superficie de la célula epitelial y/o sobre el parásito, modificando de alguna forma la interacción huésped-parásito. La formación de inmunocomplejos entre los AcMs 4D8 y 1A8 y la proteinasa hace que ésta se inactive y disminuya la concentración necesaria para un mecanismo efectivo de citoadherencia.

El ratón constituye el modelo experimental de infección por *T. vaginalis* más ampliamente utilizado. La inyección intraperitoneal de parásitos produce necrosis visceral (especialmente en páncreas e hígado) pudiendo ocasionar la muerte del ratón (Petrin *et al*, 1998). Este modelo ha sido utilizado para estudiar la virulencia del parásito (Kulda, 1990), a pesar de que tiene algunas limitaciones. Según algunos autores, este modelo no representa la infección que de manera natural ocurre en la mucosa de la vagina y no tiene en cuenta algunos mecanismos efectores presentes a ese nivel. A pesar de esto, se continúa utilizando y algunos autores demostraron con este modelo una buena correlación entre la sintomatología de los pacientes y la virulencia de las cepas (Kulda, 1990; Gold, 1993; Vanacova *et al*, 1997; Rojas *et al*, 2004 b)

El AcM 4D8 administrado 24 horas antes del reto intraperitoneal, fue capaz de proteger al 92 % de los ratones estudiados. Paralelamente, llama la atención que éste es el anticuerpo que mostró mayor inhibición de la adhesión *in vitro*. El AcM que le siguió en orden, en cuanto a su efecto inhibidor, fue el 1A8, sugiriendo que los epitopos reconocidos por los AcMs 4D8 y 1A8 son importantes en los mecanismos de citoadherencia de *T. vaginalis*.

Ahora bien, si ciertos AcMs contra esta proteinasa pueden brindar un elevado grado de protección, ¿por qué la infección con este parásito no produce una respuesta protectora en el tiempo? Se conoce que una persona puede reinfectarse con *T. vaginalis* varias veces (Ackers, 1990) y que no se adquiere una inmunidad contra el parásito, por lo que al parecer, determinadas moléculas no son inmunogénicas en el contexto de una infección natural a lo cual se agregan los mecanismos de escape que desarrolla este parásito.

Garber y Lemchuk-Favel encontraron respuesta de anticuerpos contra la proteinasa de 60 kDa solo en el suero de algunos pacientes infectados. Sin embargo, la inoculación de conejos con una fracción de esta proteinasa (23 kDa) combinado con adyuvantes produjo respuesta de anticuerpos a la proteinasa de 60 kDa y su subunidad, en el suero (Garber y Lemchuk-Favel, 1989).

Se realizaron algunas determinaciones para tratar de explicar por qué los ratones que previamente se les administran los AcMs son capaces de protegerse ante un reto por vía intraperitoneal. Es conocido que los anticuerpos ejercen un efecto anti-infeccioso ya sea por inhibición de funciones, a través de un efecto citotóxico directo mediado por complemento o indirecto por células efectoras. Nuestros resultados demuestran que estos anticuerpos no inhiben la actividad de la enzima y no ejercen efecto citotóxico directo sobre el parásito.

El óxido nítrico se produce a partir de la L-arginina en presencia de la enzima óxido nítrico sintasa (ONS), la que puede encontrarse de dos formas diferentes, las constitutivas o las inducida. La ONSi es estimulada por IFN- γ , TNF- α y LPS en el endotelio, leucocitos, hepatocitos y macrófagos (Bogdan, 2001). Esta molécula parece jugar una función importante como molécula efectora citotóxica en células tumorales (Hibbs *et al*, 1987) y en ciertos parásitos (Yadav *et al*, 2006, Nahrevanian, 2006; Ramos *et al*, 2007; Alonso-Trujillo *et al*, 2007).

Estudios realizados por Yadav y colaboradores demostraron, por inmunotransferencia, la presencia de la enzima ONS en sobrenadantes de leucocitos aislados de muestra de sangre de pacientes sintomáticos y asintomáticos estimulados con *T. vaginalis* y en lavados vaginales de estos pacientes. La intensidad de la banda, así como, la concentración de intermediarios nitrogenados, fue más alta en pacientes asintomáticos. Estos resultados sugirieron que los radicales nitrogenados juegan un papel importante en la limitación de la infección por *T. vaginalis* en mujeres asintomáticas (Yadav *et al*, 2006).

Los elevados niveles de óxido nítrico (nitritos) encontrados en el suero de los ratones tratados con los AcMs 4D8 y 1A8, así como las determinaciones de óxido nítrico en el experimento *in vitro* permite sugerir la citotoxicidad facilitada por los AcMs en presencia de macrófagos y mediada por el óxido nítrico. Resultados similares obtuvieron Piedrahita y colaboradores cuando a ratas a las que se habían sometido a un reto con metacercarias de *Fasciola hepatica* se les transfirió, vía intraperitoneal, suero de otras ratas infectadas

(Piedrafita *et al*, 2001). En *Trichomonas foetus*, parásito responsable de la trichomonosis en bovina, fue demostrado que altos niveles de nitrito pueden inactivar probablemente a las proteínas dependientes de FeS y limitan la producción de hidrógeno de los hidrogenosomas provocando afectaciones y en algunos casos la muerte del parásito (Lloyd *et al*, 2002).

Otro mecanismo posible por el cual pudiera explicarse la protección alcanzada en el modelo *in vivo* es la eliminación de los inmunocomplejos formados entre la proteinasa y los anticuerpos por parte de las células presentadoras de antígenos, lo que impediría que las proteinasas puedan liberar las adhesinas del parásito, disminuyendo de esta forma la citoadherencia a las células del huésped. Arroyo y Alderete demostraron que la acción de las proteinasas es sobre el parásito y no sobre las células del hospedero, incrementándose el fenómeno de adherencia (Arroyo y Alderete, 1989). Más recientemente, García y colaboradores sugirieron que las proteinasas son requeridas para liberar a las adhesinas del parásito (García *et al*, 2005).

Es conocido que la afinidad de un anticuerpo pudiera estar directamente relacionado con su nivel de protección (Macura *et al*, 2007). Las constantes de afinidad con que los AcMs 4D8 y 1A8 se unen a la proteinasa son de igual magnitud lo que permite concluir que la diferencia en los niveles de protección alcanzada por la administración profiláctica de estos AcMs, no es atribuible a la afinidad de los mismos.

El hecho de que sea posible revelar la unión proteinasa de 62 kDa /anticuerpo (4D8 y 1A8) por la adición del propio AcM (4D8 y 1A8) conjugado con peroxidasa permitió concluir, que los epitopos reconocidos por estos monoclonales son repetitivos sobre la molécula.

Nuestros resultados revelan algunas de las características de los epitopos reconocidos por los AcMs 4D8 y 1A8. Estos anticuerpos reaccionan con moléculas en un rango de peso molecular entre 62-108 kDa. Es posible que algunas de estas moléculas reconocidas por los anticuerpos sean producto de la agregación de la misma molécula de 62 kDa o de esta proteinasa con fragmentos de ella.

El reconocimiento de los anticuerpos 4D8 y 1A8 por sus epitopos disminuyó después del tratamiento de los antígenos purificados con calor, posiblemente por cambios en la estructura tridimensional de los mismos, lo que sugiere la naturaleza proteica de los epitopos.

La existencia de estructuras de naturaleza proteica en los epitopos reconocidos por los AcMs 4D8 y 1A8 fue además confirmada por los tratamientos con TCA (agente desnaturalizante), y con pronasa, enzima que tiene una alta actividad catalítica sobre estructuras peptídicas.

Los resultados obtenidos luego del tratamiento de los antígenos con β -mercaptoetanol indican que el reconocimiento del epitopo reactivo al AcM 1A8 se pierde en la medida que se incrementa el agente reductor. Esto confirma que al menos un puente disulfuro puede estar involucrado en mantener la estructura del sitio de reconocimiento, pudiendo verse afectada la estructura tridimensional de la molécula después del tratamiento. Sin embargo, la no disminución de la reactividad del AcM 4D8 por su epitopo después de tratado el antígeno con el agente reductor sugiere la linealidad del epitopo. Estos resultados apuntan a que los epitopos reconocidos por los AcMs 4D8 y 1A8 son diferentes.

La ruptura del ácido siálico sobre la superficie de las células epiteliales puede ser importante en el proceso de adhesión del parásito (Bonilha *et al.*, 1995; Meysick *et al.*, 1996). Sin embargo, no se ha demostrado la participación del ácido siálico presente en la superficie de *T. vaginalis* en este proceso (Bonilha *et al.*, 1995). Nuestros resultados que muestran la ausencia de estructuras carbohidráticas en los sitios de reconocimiento de los anticuerpos 4D8 y 1A8, empleando neuroaminidasa y periodato, apoyan esta última observación.

En resumen, podemos plantear que los AcMs 4D8 y 1A8 reaccionan con epitopos proteicos diferentes, lo que permiten explicar el grado de protección diferente encontrado para cada uno de estos anticuerpos en el estudio de protección pasiva.

Los ratones y otros animales de laboratorio son resistentes a la infección vaginal con *T. vaginalis*. A pesar de esta desventaja, las infecciones experimentales en ratones estrogenizados por inoculación intravaginal de parásitos y *Lactobacillus* ofrece un modelo potencial para estudios de inmunidad a nivel de mucosa (Paintlia, *et al*, 2002; Yadav *et al*, 2005; Malla *et al*, 2007).

La inmunidad protectora contra patógenos transmitidos sexualmente se asocia con la producción local de IgG específicas e IgA secretoria (Mielcarek *et al*, 2000). Además, anticuerpos sistémicos contra infecciones transmitidas sexualmente podrían ayudar, también, al control de la diseminación de estas infecciones. Basados en esto, una simple dosis de vacuna, que podría ser administrada por ruta mucosal, capaz de inducir la producción local de anticuerpos específicos de clase IgA e IgG en el tracto genital y en el suero, podría ser promisorio para prevenir las enfermedades de transmisión sexual. Sin embargo, la producción de anticuerpos específicos es difícil de alcanzar en el tracto genital (Mielcarek *et al*, 2000).

La inmunización intranasal tiene el potencial de estimular tanto la inmunidad sistémica como la mucosal. Esta última, permite que la respuesta inmune protectora inducida en un sitio mucosal pueda ser expresada en otro (Holmgren y Czerkinsky, 2005). Sin embargo, uno de los mayores impedimentos de esta vacunación es la búsqueda de un adyuvante apropiado capaz de desarrollar una buena estimulación. Estudios anteriores han demostrado que la TC empleada como adyuvante induce predominantemente anticuerpos de isotipo IgG1 en suero de ratones, indicativo de una respuesta Th2 mientras que CpG produce un incremento significativo de IgG2a sugiriendo una respuesta Th1 (Isaka *et al*, 2001; Holmgren *et al*, 2005). La inducción de una u otra respuesta o ambas parece depender también de las propiedades del antígeno co-administrado.

La respuesta de IgA en la vagina de los ratones se incrementó en los grupos que recibieron la proteinasa con cualquiera de los dos adyuvantes (TC y CpG), sin embargo, el incremento fue altamente significativo para el grupo de ratones que recibieron la proteinasa con TC. La

presencia de anticuerpos IgA está asociada con una respuesta Th2; sin embargo, altos títulos de anticuerpos IgA se han detectado también, cuando se ha administrado CpG como adyuvante (McCluskie y Davis, 1999; Horner y Raz, 2000).

Según reportes de Cong y colaboradores en el 2007, la inmunización intranasal de una proteína de *Chlamidia muridarum* (CPAF) y CpG como adyuvante en un modelo animal induce una fuerte respuesta Th1 (IFN γ), elevados niveles de anticuerpo en suero y producción de IgA vaginal, mostrando una acelerada disminución de la infección por esta bacteria en el tracto genital (Cong *et al*, 2007). Otros autores plantearon que la transferrina recombinante de *N. gonorrhoeae* unida a las proteínas A y B del mismo gonococo y conjugada a la subunidad B de TC, induce anticuerpos IgA e IgG, antígenos específicos sistémico y en el tracto genital, cuando es administrada intranasalmente (Price *et al*, 2005). Estos resultados indican que la inmunización intranasal, con independencia del efecto polarizante del adyuvante, lleva a la producción de IgA en la superficie de mucosa y, en consecuencia, al efecto protector descrito.

Paintlia y colaboradores, en un estudio realizado en un modelo de trichomonosis vaginal, obtuvieron altos niveles de anticuerpos anti-IgA en secreciones vaginales y sueros de ratones infectados y además una reducción significativa de la infección fue observada en el grupo de ratones en los que se detectó un mayor título de anticuerpos anti-IgA (Paintlia *et al*, 2002).

Nuestros resultados muestran que la inmunización intranasal de la proteinasa de 62 kDa con CpG y TC no solo induce altos niveles de anticuerpos específicos anti-p-62 en suero y vagina, sino también induce protección para los grupos de ratones retados con *T. vaginalis*, mostrando claramente la efectividad de la ruta de inmunización con ambos tipos de adyuvantes y sugiriendo que altos niveles de IgA secretora, son importantes en la respuesta inmune protectora contra *T. vaginalis*.

6- CONCLUSIONES

- 1- La proteinasa de secreción de 62 kDa de *T. vaginalis* participa en el proceso de adhesión del parásito a células epiteliales.
- 2- Los AcMs 4 D8 y 1A8 contra la proteinasa de 62 kDa protegen a ratones ante un reto intraperitoneal con *T. vaginalis* por un mecanismo de citotoxicidad facilitada por anticuerpos y mediada por óxido nítrico.
- 3- Los AcMs 4D8 y 1A8 reconocen epitopos diferentes, ambos de naturaleza proteica y repetitivos sobre la proteinasa de 62 kDa.
- 4- La proteinasa de 62 kDa administrada por vía intranasal con adyuvantes como TC y CpG induce una respuesta inmune cuyos efectores protegen a ratones BALB/c contra un reto por vía intravaginal con *T. vaginalis*.
- 5- Los niveles de IgA alcanzados en la vagina de ratones BALB/c, posterior a la inmunización con la proteinasa de 62 kDa con adyuvantes, pueden ser importantes en la respuesta inmune protectora contra *T. vaginalis*.

7- RECOMENDACIONES

- 1- Estudiar la respuesta celular en un modelo de infección intravaginal posterior a la administración intranasal de la proteinasa p-62 con CpG y TC como adyuvantes.
- 2- Expresar la proteinasa p-62 de *T. vaginalis* en forma recombinante y realizar los estudios de protección en modelos experimentales.
- 3- Realizar estudios de inmunogenicidad en modelos animales utilizando lactobacilos que expresen el gen de la subunidad B de la toxina colérica fusionado al de la proteinasa de 62 kDa de *T. vaginalis*.

8-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham MC, Desjardins M, Filion LG, Garber GE. Inducible immunity to *Trichomonas vaginalis* in a mouse model of vaginal infection. *Infect. Immun* 1996;64:3571–5.
- Ackers JP. Immunologic aspects of human trichomonosis. En: Honigberg BM, editor. *Trichomonads parasitic in humans*. New York: Springer-Verlag 1990. p.36-52.
- Adu-Sarcadie Y, Opoku BK, Danso KA, Weiss HA, Marbey D. Comparison of latex agglutination, wet preparation, and culture for the detection of *Trichomonas vaginalis*. *Sex Transm Infect* 2004;80:201-3.
- Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* NYHU286 phenotypic variation may be coordinated for a repertoire of trichomonad surface immunogens. *Infect Immun* 1987;55:1957-62.
- Alderete JF. Does lactobacillus vaccine for trichomoniasis, Solco Trichovac, induce antibody reactive with *Trichomonas vaginalis*? *Genitourin Med* 1988;64:118-23.
- Alderete JF, Arroyo R, Dailey DC, Engbring J, Khoshnan MA, Lehker MW. Molecular analysis of *Trichomonas vaginalis* surface protein repertoires. *Mol Cell Biol Hum Dis Ser* 1992;1:173-202
- Alderete JF, Arroyo R, Lehker MW. Identification of fibronectin as a receptor for bacterial cytoadherence. *Methods Enzymol* 1994;236:318-33.
- Alderete JF, Benchimol M, Lehker MW, Crouch ML. The complex fibronectin-*Trichomonas vaginalis* interaction and trichomonosis. *Parasitol Int* 2002;51:285-92.
- Alderete JF, Garza GE. Soluble *Trichomonas vaginalis* antigens in cell-free culture supernatants. *Mol Biochem Parasitol* 1984;13:147-58.
- Alderete JF, Kasmala L. Monoclonal antibody to a major glycoprotein immunogen mediates differential complement-independent lysis of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 1986;53:697-9.
- Alderete JF, Newton E, Dennis C, Engbring J, Neale KA. Vaginal antibody of patients with trichomoniasis is to a prominent surface immunogen of *Trichomonas vaginalis*. *Genitourin* 1991;67:220-5.
- Alderete JF, Nguyen J, Mundodi V, Lehker MW. Heme-iron increases levels of AP65-mediated adherence by *Trichomonas vaginalis*. *Microb Pathog* 2004; 36:263-71.
- Alderete JF, O'Brien JL, Arroyo R, Engbring JA, Musatovova O, Lopez O, *et al*. Cloning and molecular characterization of two genes encoding adhesion proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Mol Microbiol* 1995;17:69-83.

Alonso-Trujillo J, Rivera-Montoya I, Rodriguez-Sosa M, Terrazas LI. Nitric oxide contributes to host resistance against experimental *Taenia crassiceps* cisticercosis. *Parasitol Res* 2007;100:1341-50.

Alvarez-Sánchez ME, Avila-González L, Becerril-García C, Fattel-Facenda LV, Ortega-López J, Arroyo R. A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microb Pathol* 2000;28:193-202.

Arcelli SM. *Trichomonas*. En: Basualdo JA, Celia E. de Torres RA, editores. Microbiología biomédica: Bacteriología-Micología-Virología-Parasitología-Inmunología. 2a. ed. México: Editorial Médica Panamericana S.A de CV; 1996.p.608-9.

Arroyo R, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infect Immun* 1989;57:2991-7.

Arroyo R, Alderete JF. Two *Trichomonas vaginalis* surface proteinases bind to host epithelial cells and are related to levels of cytoadherence and cytotoxicity. *Arch. Med Res* 1995;26:279-85.

Arroyo R, Engbring J, Alderete JF. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Microbiol* 1992;6:853-62.

Atias A. Parasitología clínica. 3 ed España.: Publicaciones técnicas Mediterráneo; 1994. p. 367-73.

Bastida-Corcuera FD, Okumura CY, Colocoussi A, Johnson PJ. *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan mutants have reduced adherence and cytotoxicity to human ectocervical cells. *Eukaryot cell* 2005, 4:1951-8.

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 carcinoma of the cervix. *Cancer* 1991;5:442-57.

Benazet F, Gillaume L. Induction of *in vivo* resistance of *Trichomonas vaginalis* to nitrimidazine. *Lancet* 1971; 2:982-3.

Benchimol M. Trichomonads under Microscopy. *Microsc Microanal* 2004;10:528-50.

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.

Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. Nature Immunol 2001;10:907-16.

Bonilha VL, Ciavaglia M, de Souza W, Costa e Silva Filho F. The involvement of terminal carbohydrates of the mammalian cell surface in the cytoadhesion of trichomonads. Parasitol Res 1995;81:121-6.

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*, abstr C-120. In Abstracts of the 96 th General Meeting of the American Society for Microbiology 1996. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Botero D, Restrepo M. Parasitosis tisulares por trematodos. En: Botero D, editor. Parasitosis humana 4ta ed. Medellin: CIB; 2003.p.294-7.

Briselden AM, Hillier SL. Evaluation of affirm VP microbial identification test for *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 1994;32:148-52.

Burgess DE. Trichomonads and intestinal flagellates. En: Cox F, Krier JP, Wakelin D, editores. Topley and Wilson's microbiology and microbial infections, 9 th ed. University Press, New York, NY; 1998.p.203-14.

Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, *et al.* Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. Science 2007;315: 207-12.

Carter JE, Whithaus KC. Neonatal Respiratory Tract Involvement by *Trichomonas vaginalis*: A Case Report and Review of the Literature. Am J Trop Med Hyg 2008;78:57-9.

Castaño JC, Marcet R, Cox R, Sarracent S. Inhibición de la invasión y multiplicación de *Toxoplasma gondii* en células epiteliales de colon humano por un anticuerpo monoclonal contra la proteína SAG2. Rev Cub Med Trop 2001;53:161-9.

Cauci S, Culhane JF. Modulation of vaginal immune response among pregnant women with bacterial vaginosis by *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and yeast. Am J Obstet Gynecol 2007;196:133.e 1-7.

Cavier RE, Gobert JG, Savel J. Application of a method of intraperitoneal infection of the mouse with *Trichomonas vaginalis* for the pharmacological study of trichomonacides. Ann Pharm Fr 1972;30:637-42.

Chang JH, Kim SK, Choi IH, Lee SK, Morio T, Chang EJ. Apoptosis of macrophages induces by *Trichomonas vaginalis* through the phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase that locates at downstream of mitochondria-dependent caspase activations. Int J Biochem Cell Biol 2006;38:638-47.

Chesson HW, Blandford JM, Pinkerton SD. Estimates of the annual number and cost of new HIV infections among women attributable to trichomonosis in the United States. Sex Transm Dis 2004;31:547-51.

Clark RA, Theall K, Kissinger PJ. Reply to: microscopy and culture for *Trichomonas vaginalis*: are both required? Int J STD AIDS 2007;18:220.

Cohen CD, Gilmour C, Mandalia S, Mclean KA. Microscopy and culture for *Trichomonas vaginalis* are both required? Int J STD AIDS 2006;17:418-20.

Cong Y, Jupelli M, Guentzel MN, Zhong G, Murthy AK, Arulanandam BP. Intranasal immunization with chlamidial protease-like activity factor and CpG deoxynucleotides enhances protective immunity against genital *Chlamydia muridarum* infection. Vaccine 2007;25:3773-80.

Corbeil LB. Use of an animal model of trichomoniasis as a basis for understanding this disease in women. Clin Infect Dis 1995;21 (suppl 2):S158-61.

Cosar C, Julou L. Activity of 1-(2'-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (8823 RP) against experimental *Trichomonas vaginalis* infection. Ann Inst Pasteur 1959;96:238-41.

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.

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;318:503-17.

Cu-Uvin S, Ko H, Jamieson DL. Prevalence, incidence and persistence or recurrence of trichomonosis 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 DC, Chang TH, Alderete JF. Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis. Parasitology 1990;101:171-5.

Daly JJ, Sherman JK, Haley T, Hostetler TL. Difference in effect of dog seminal fluid and human seminal fluid and semen on *in vitro* survival of *Trichomonas vaginalis*. Sex Transm Dis 1990;17:106-9.

Dalton JP, Brindley PJ, Knox DP, Brady, CP, Hotez PJ, Donnelly S, O'Neill SM, Mulcahy G, Loukas A. Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. *Int J Parasitol* 2003;33:621–40.

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.

Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Buton AH *et al.* Epi Info version 6: A Word Processing. Database and Statistic Program for Epidemiology on Microcomputers. Atlanta, GA: Centers for Disease Control, 1994.

Demes P, Gombosova A, Valent M, Fabusova H, Janoska A. Fever *Trichomonas vaginalis* organisms in vaginas of infected women during menstruation. *Genitourin Med* 1988 a; 64:22-4.

Demes P, Gombosova A, Valent M, Janoska A, Fabusova H, Petrenko M. Differential susceptibility of fresh *Trichomonas vaginalis* isolates to complement in menstrual blood and cervical mucus. *Genitourin Med* 1988 b; 64:176-9.

Dessi D, Delogu G, Emonte E, Catania MR, Fiori PL, Rappelli P. Long-term survival and intracellular replication of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* cells: potential role of the protozoon in transmitting bacterial infection. *Infect Immun* 2005;73:1180-6.

Dessi D, Rappelli P, Diaz N, Cappuccinelli P, Fiori PL. *Mycoplasma hominis* and *Trichomonas vaginalis*: a unique case of symbiotic relationship between two obligate human parasites. *Front Biosci* 2006;1:2028-34.

Diamond LS, Harlow DH, Cunnick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978;72:431-2.

Dias Filho BP, Andrade AF, de Souza W, Estevez MJ, Angluster J. Cell surface saccharide differences in drug-susceptible and drug-resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. *Microbios* 1992;71:55-64.

Diaz A, Espino AM, Marcet R, Otero O, Torres D, Finlay CM, Sarracent J. Partial characterization of the epitope on excretion-secretion products of *Fasciola hepatica* recognized by monoclonal antibody ES78. *J Parasitol* 1998;84:55-65.

Dodezal P, Smid O, Rada P, Zubacobá Z, Bursac D, Suták R, *et al.* *Giardia* mitochondria and *trichomonad* hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102:10924-9.

Donné MA. Animacules observes dans les matieres purulentes et le produit des secretions des organes genitaux de l'homme et de la femme. *C R Acad Sci* 1836;3:385-6.

Dragsted D, Farholt S, Lind I. Occurrence of trichomoniasis in women. *Sex Transm Dis* 2001;28:326-9.

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 P, O'Donoghue PJ, Upcroft JA. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. Cell. Research. 2003;13:239–40.

El-Gayar EK, Rashwan MF. Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and *Trichomonas vaginalis* infection as revealed by polymerase chain reaction. J Egypt Soc Parasitol. 2007;37:623-30.

Embley TW, Martín W. Eukaryotic evolution, changes and challenges. Nature 2006;440: 623-30.

Engbring JA, Alderete JF. Characterization of *Trichomonas vaginalis* AP33 adhesin and cell surface interactive domains. Microbiology 1998;144:3011–8.

Engbring JA, O'Brien JL, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* adhesins display molecular mimicry to metabolic enzymes. Adv Exp Med Biol 1996;408:207-23.

Fichorova RN, Trifonova RT, Gilbert RO, Costello CK, Hayes GR, Lucas JJ, Singh NB. *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan triggers a selective upregulation of cytokines by human female reproductive tract epithelial cells. Infect Immun 2006; 74:5773-9.

Fiori PL, Rappelli P, Addis MF, Mannu F, Cappuccinelli P. Contact-dependent disruption of the host cell membrane skeleton induce by *Trichomonas vaginalis*. Infect Immun 1997;65:5142-8.

Fiori PL, Rappelli P, Addis MF, Sechi A, Cappuccinelli P. *Trichomonas vaginalis* haemolysis: pH regulates a contact-independent mechanism based on pore-forming proteins. Microbiol Pathog. 1996;20:109-18.

Fiori PL, Rappelli P, Rocchigiani AM, Cappuccinelli P. *Trichomonas vaginalis* haemolysis: evidence of functional pores formation on red cell membranes. FEMS Microbiol Lett 1993;109:13-18.

Fitzhugh VA, Heller DS. Significance of a diagnosis of microorganisms on pap smear. J Low Genital Tract Dis 2008, 12:40-51.

Garber GE, Lemchuk-Favel LT. Characterization and purification of extracellular proteases of *Trichomonas vaginalis*. Can J Microbiol 1989; 35:903-9.

Garber GE, Lemchuk-Favel LT. Association of production of cell-detaching factor with the clinical presentation of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 1990;28:2415-17.

Garber GE, Lemchuk-Favel LT. Analysis of the extracellular proteases of *Trichomonas vaginalis*. Parasitol Res 1994;80:361-5.

- Garber GE, Lemchuk-Favel LT, Bowie WR. Isolation of a cell-detaching factor of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 1989;27:1548-53.
- Garber GE, Lemchuk-Favel LT, 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, Proctor EM, Bowie WR. Immunogenic proteins of *Trichomonas vaginalis* as demonstrated by the immunoblot technique. Infect Immun 1986;51:250-3.
- 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;25:1275-9.
- García AF, Benchimol M, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* poliamine metabolism is linked to host cell adherence and cytotoxicity. Infect Immun 2005;73:2602-10.
- García AF, Chang TH, Benchimol M; Klumpp DJ, Lehker MW, Aldedete JF. Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. Mol Microbiol 2003, 47:1207-24.
- Gavilondo J. Anticuerpos monoclonales. La Habana: Elfos;1995.p.9.
- Gavrilescu M. Results of experimental intramuscular inoculation of *Trichomonas vaginalis*. Microbiol Parasitol Epidemiol 1962;7:349-56.
- Gilbert RO, Elias 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 1981;34:268-73.
- Godin JW. Monoclonal antibodies: Principles and Practice. 3th ed. San Diego: Academic Press Inc; 1996.
- Gold D. *T. vaginalis*: strains differences in adhesion to plastic and virulence *in vitro* and *in vivo*. Parasitol Res 1993;79:309-15.
- Gold D, Ofek I. Adhesion of *Trichomonas vaginalis* to plastic surfaces requirement for energy and serum constituents. Parasitology 1992;105:55-62.
- Gombosoba A, Demes P, Valent M. Immunotherapeutic effect of the *lactobacillus* vaccine, Solvo Trichovac, in trichomoniasis is not mediated by antibodies cross reacting with *Trichomonas vaginalis*. Genitorium Med 1986;62:309-15.
- Grossman JH, Galask RP. Persistent vaginitis caused by metronidazole-resistant trichomonas. Obstet Gynecol 1990;76:521-2.

Guenther PC, Secor WE, Dezzutti CS. *Trichomonas vaginalis*-induced epithelial monolayer disruption and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication: implications for the sexual transmission of HIV-1. *Infect Immun* 2005; 73:4155-60.

Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. México: Academia Nacional de Medicina. Copyright National Academy Press, Washington, DC. 1996.p.1-10.

Hernández-Gutiérrez R, Avila-González L, Ortega-López J, Cruz-Talonia F, Gómez-Gutiérrez G, Arroyo R. *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39 kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Exp Parasitol* 2004;107:125-35.

Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*. 1987;235:473-6.

Hitti J, Nugent R, Boutain D, Gardella C, Hillier SL, Eschenbach DA. Racial disparity in risk of preterm birth associated with lower genital tract infection. *Pediatr Perinat Epidemiol*. 2007;21:330-7.

Hogue MJ. The effect of *Trichomonas vaginalis* on tissue culture cells. *Am J Hyg* 1943;37:142-52.

Holmgren J, Adamsson J, Anjuerec F, Clemens J, Czerkinsky C, Eriksson K *et al*. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. *Immunol Lett* 2005; 97:181–8.

Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med*. 2005;4:S45-53.

Honigberg BM, Brugerolle G. Structure. En: Honigberg BM, editor. *Trichomonads parasitic in humans*. New York: Springer-Verlag; 1990. p.5-35.

Honigberg BM, Livingston MC, Frost JK. Pathogenicity of fresh isolates of *Trichomonas vaginalis*. “The mouse assay” versus clinical and pathologic findings. *Acta Cytol* 1966;10:353-61.

Hook Jr, RR, St Claire MC, Riley LK, Franklin CL, Besch-Williford CL. *Trichomonas foetus*: Comparison of isolated virulence in an estrogenized mouse model. *Exp. Parasitol*. 1995; 81: 202–7.

Horner AA, Raz E. Immunostimulatory - sequence oligodeoxynucleotide: a novel mucosal adjuvant. *Clin. Immunol* 2000;95: S19–29.

Hrdý I, Cammack R, Stopka P, Kulda J, Tachezy J. Alternative pathway of metronidazole activation in *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:5033-6.

Huang HC, YU SF, Cai M, Tan F, Zheng XY, Pan CW. Preparation of monoclonal antibodies against the adhesion protein 33 of *Trichomonas vaginalis*. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 2007; 25:97-100.

Huppert JS, Batteiger BE, Braslins P, Feldman JA, Hobbs MM, Sankey HZ, *et al.* Use of a immunochromatographic assays for rapid detection of *Trichomonas vaginalis* specimens. J Clin Microbiol 2005;43:684-7.

Isaka M, Yasuda Y, Mizokami M, Kozuka S, Taniguchi T, Matano K, *et al.* Mucosal immunization against hepatitis B virus by intranasal co-administration of recombinant hepatitis B surface antigen and recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. Vaccine 2001;19:1460-6.

Ivey MH, Hall DG. Virulence of different strain of *Trichomonas vaginalis* in the mouse. Am J Trop Med Hyg 1984;13:16-9.

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;27:236-40.

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.

Kaydos SC, Swygard H, Wise SL, Sena AC, Leone PA, Miller WC, Cohen MD, Hobbs MM. Development and validation of a PCR-based enzyme-linked immunosorbent assay with urine in clinical research settings to detect *Trichomonas vaginalis* in women. J Clin Microbiol 2002;40:89-95.

Klemba M, Goldberg DE. Biological roles of proteinases in parasitic protozoa. Ann Rev Biochem 2002;71, 275-305.

Köhler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975;256:495-7.

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, Holmes KK, Spence MR, Rein MF, McCormack WM, Tam MR. Geographic variation among isolates of *Trichomonas vaginalis*: demonstration of antigenic heterogeneity by using monoclonal antibodies and the indirect immunofluorescence technique. J Infect Dis 1985;152:979-84.

Krieger JN, Poisson MA, Rein MF. Beta-hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* correlates with virulence. Infect Immun 1983;41: 1291-5.

Krieger JN, Wolner-Hanssen P, Steves C, Holmes KK. Characteristic of *Trichomonas vaginalis* isolates from women with and without colpitis macularis. J Infect Dis 1990;161:307-11

Kucknoor A, Mundodi V, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* adherence mediates differential gene expression in human vaginal epithelial cells. Cell Microbiol 2005 a;7:887-97.

Kucknoor A, Mundodi V, Alderete JF. Adherence to human vaginal epithelial cells signals for increase expression of *Trichomonas vaginalis* genes. Infect Immun 2005 b;73:6472-8.

Kulda J. Experimental animals in studies of *T. vaginalis* infections. En: Honigberg BM, editor. Trichomonads parasitic in humans. New York: Springer-Verlag; 1990. p. 112-53.

Kumar S, Jones TR, Oakley MS, Zheng H, Kuppusamy SP, Taye A *et al.* CpG oligodeoxynucleotide and Montanide ISA 51 adjuvant combination enhanced the protective efficacy of a subunit malaria vaccine. Infect Immun 2004;72:949-57.

Kurth A, Whittington ML, Golden MR, Thomas KK, Holmes KK, Schwebke JR. Performance of a new, rapid assays for detection of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 2004;42:2940-3.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680–5.

Larcen B. Vaginal flora in health and disease. Clin Obstet Gynecol 1993;36:107-21.

Lehker MW, Sweeney D. Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. Sex Transm Infect 1999;75: 231-8.

León-Sicarios CR, León-Felix J, Arroyo R. *Tvcp 12*: a novel *Trichomonas vaginalis* cathesin L-like cysteine proteinases gene. Microbiology 2004;150:1131-8.

Levi MH, Torres J, Winston A, Pina C, Klein RS. Comparison of the InPouch System [IP] to Diamonds modified medium [DMM] for the isolation of *Trichomonas vaginalis* [Tv]. In Abstracts of the 96 th General Meeting of the American Society for Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1996. abstr. C-110, p.20.

Lisi PJ, Dondero RS, Kwiatkoski D, Spence MR, Rein MF, Alderete JF. Monoclonal-antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol, 1988;26:1684-6.

Lloyd D, Williams AS, James CJ. Nitrite inhibits hydrogen production and kills the cattle *Trichomonas foetus*. J Appl Microb 2002; 93: 492–6.

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;115:147.

Lopes JD, Da-Mota GF, Carneiro CR, Gomes L, Costa e Silva Filho F. Evolutionary conservation of laminin-binding proteins. *Braz J Med Biol Res* 1988; 21:1269-73.

Lossick JG, Kent HL. Trichomoniasis: trends in diagnosis and management. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:1217-22.

Lubick KJ, Burgess DE. Purification and analysis of a phospholipase A2-like lytic factor of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 2004;72:1284-90.

Lushbaugh WB, Blossom AC, Shah PH, Banga AK, Jaynes JM, Cleary JD, Finley RW. Use of intravaginal microbicides to prevent acquisition of *Trichomonas vaginalis* infection in *Lactobacillus* pretreated, estrogenized young mice. *Am J Trop Med Hyg* 2000;63, 284–9.

Macura N, Zhang T, Casadevall A. Dependence of macrophage phagocytic efficacy on antibody concentration. *Infect Immun* 2007;75:1909-15.

Madeiro da Costa RF, de Souza W, Benchimol M, Alderete JF, Morgado-Díaz JA. *Trichomonas vaginalis* perturbs the junctional complex in epithelial cells. *Cell Research* 2005;15:704-16.

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;30:839-43.

Malla N, Gupta I, Mahaja RC. Human trichomonosis. *Ind J Med Microb.* 2001;19:26-43.

Malla N, Yadav M, Gupta I. Kinetic of serum and local cytokine profile in experimental intravaginal trichomonosis induced with *Trichomonas vaginalis* isolates from symptomatic and asymptomatic women. *Parasite Immunol* 2007;29:101-5.

Martinez V, Caume E. Metronidazole: Pharmacology. *Ann Dermatol Venereol* 2001;28:903-9.

Mayer Z, Pelak Z. Personal experience with SolcoTrichovac. *Cesk Gynecol* 1990;55:590-3.

McClelland RS, Sangare L, Hassan WM, Lavreys L, Mandaliya K, Kiarie J, *et al.* Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *J Infect Dis* 2007;195:698-702.

McCluskie MJ, Davis HL. CpG DNA as mucosal adjuvant. *Vaccine* 1999;18:231–7.

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.

Mendoza-López MR, Becerril-García C, Fattel-Facenda LV, Avila-González L, Ruíz-Tachiquín ME, Ortega Lopez J, Arroyo R. CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. Infect Immun 2000;68:4907-12.

Meysick KC, Dimork K, Garber G. Molecular characterization and expression of a N-acetylneuraminate lyase gene from *Trichomonas vaginalis*. Mol Biochem Parasitol 1996;76:289-92.

Mielcarek N, Nordström I, Menozzi FD, Loch C, Holmgren J. Genital antibody responses in mice after intranasal infection with an attenuated candidate vector strain of *Bordetella pertussis*. Infect Immun 2000;68:485–91.

Miller GA, Klausner TJ, Coates RM, Gaydos CA, Hardick, Leon S, Caceres CF. Assessment of a rapid antigens detection system for *Trichomonas vaginalis* infection. Clin Diagn Lab Immunol 2003;10:1157-58.

Min DY, Hyun KM, Ryu JS, Ahn MH, Cho MH. Degradation of human immunoglobulin s and hemoglobin by a 60 kDa cysteine proteinase of *Trichomonas vaginalis*. Korean J Parasitol 1998;36: 261-8.

Min DY, Ryu JS, PakSY, Shin MH, Cho WY. Degradation of human immunoglobulins and cytotoxicity on HeLa cells by live *Trichomonas vaginalis*. Korean J Parasitol 1997;35:39-46.

Muller M, Lossick JF, Gorrell TE. *In vitro* susceptibility of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole and treatment outcome in vaginal trichomoniasis. Sex Transm Dis 1988;15:17-24.

Mundodi V, Kucknoor A, Alderete J. Antisense RNA decreases AP33 gene expression and cytoadherence by *Trichomonas vaginalis* BMC Microbiol 2007;7:64.

Muresu R, Rubino S, Rizzu P, Baldini A, Colombo M, Cappuccinelli P. A new method for identification of *Trichomonas vaginalis* by fluorescent DNA in situ hybridization. J Clin Microbiol 1994;32:1018-22.

Musatovova O, Alderete JF. Molecular analysis of the gene encoding the immunodominant Phenotypically varying P270 protein of *Trichomonas vaginalis*. Microb Pathog 1998;24: 223-39.

Nahrevanian H. Immune effector mechanism of the nitric oxide pathway in malaria: cytotoxicity versus cytoprotection. Braz J Infect Dis 2006;10:283-92.

Nanda N, Michel RC, Kurdgelashvili G, Wendel KA. Trichomoniasis and its treatment. Expert Rev Anti Infect Ther 2006;4:125-35.

Nogal-Ruiz JJ, Escario JA, Martinez-Díaz RA, Gómez-Barrio A. Evaluation of murine model of experimental trichomoniasis. Parasite 1997;2:127-32.

Nogal-Ruiz JJ, Gomez-Barrio A, Escario JA, Fernandez AR. Effect of Anapsos in a murine model of experimental trichomoniasis. *Parasite* 2003;10:303-8.

Paintlia Mk, Kaur S, Gupta I, Ganguly NK, Mahajan RC, Malla N. Specific IgA response, T-cell subtype and cytokine profile in experimental intravaginal trichomonosis. *Parasitol Res* 2002;88:338-43.

Patton DL, Sweeney YT, Agnew KJ, Balkus JE, Rabe LK, Hillier SL. Development of a nonhuman primate model for *Trichomonas vaginalis* infection. *Sex Transm Dis* 2006;33:743-6.

Perl G. Errors in the diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infections as observed among 1199 patients. *Obstet Gynecol* 1972;39:7-9.

Peterson KM, Alderete JF. Host plasma proteins on the surface of pathogenic *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 1982;37:755-62.

Peterson KM, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* is depend on uptake and degradation of human low density lipoproteins. *J Exp Med* 1984;160:261-72.

Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:300-17.

Piedrafita O, Parsons JC, Sandeman RM, Wood PR, Estuningsih SE, Partoutomo S, Spithill TW. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to newly excysted juvenile *Fasciola hepatica* *in vitro* is mediated by reactive nitrogen intermediates. *Parasite Immunol* 2001;23:473-82.

Pindak FF, Garger WA Jr, Mora de Pindak M. Growth and cytopathogenicity of *Trichomonas vaginalis* in tissue cultures. *J Clin Microbiol*. 1986;4:672-8.

Pindak FF 1993, Mora de Pindak KM, Gardner WAJr. Contact-independent cytotoxicity of *Trichomonas vaginalis*. *Genitorium Med* 1993;69:35-40.

Pollock KGJ, McNeil KS, Mottram JC, Lyons RE, Brewer JM, Scott P, Coombs GH, Alexander J. The *Leishmania mexicana* cysteine protease, CPB2.8, induces potent Th2 responses. *J Immunol* 2003;170:1746–53.

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;34:519-22.

Price GA, Rusell MW, Cornelissen CN. Intranasal of recombinant *Neisseria gonorrhoeae* transferrin binding proteins A and B conjugated to the cholera toxin B induces systemic and vaginal antibodies in mice. *Infect Immun* 2005;73:3945-53.

Price M, Zimba D, Hoffman IF. Addition of treatment for trichomonosis 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.

Ramos E, Olivos-García A, Nequiz M, Saavedra E, Tello E, Saralegui A. *Entamoeba histolytica*: Apoptosis induced *in vitro* by nitric oxide species. *Exp Parasitol* 2007;116:257-65.

Radonjic IV, Dzamic AM, Mitrovic SM, Arsic VS, Popadic DM, Kranjcic IF. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection: The sensitivities and specificities of microscopy, culture and PCR assay. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006;126:116-20.

Rappelli P, Carta F, Delogu G, Addis MF, Dessi D, Cappuccinelli P, Fiori Pl. *Mycoplasma hominis* and *Trichomonas vaginalis* symbiosis: multiplicity of infection and transmissibility of *M. hominis* to human cells. *Arch Microbiol* 2001;175:70-4.

Redinbaugh MG, Turley R B. Adaptation of the bicinchoninic acid protein assay for the use with microtiter plates and sucrose gradient fractions. *Anal Biochem* 1986;153:267-71.

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.

Rockett KA, Awburn MM, Aggarwal BB. *In vivo* induction of nitrite/nitrate by tumor necrosis factor, lymphotoxin and interleukin-1 implies a role for nitric oxide in cytokine-induced malarial cell mediated immunity and pathology. *Infect Immun* 1992;60:3725-30.

Rojas L, Sarría I, Sarría C, Fraga J. Comportamiento *in vivo* de aislamientos de *Trichomonas vaginalis*, utilizando ratones NMRI como modelo experimental. *Rev Chilena Infectol* 2004 a;93:332-7.

Rojas L, Fraga J, Sarría I. Genetic variability between *Trichomonas vaginalis* isolates and correlation with clinical presentation. *J Mol Epidem Evolutionary Gene Infec Dis* 2004 b; 4:53-8.

Rojas L, Sarría C, Sarría I, Goicolea A, Morales E. Trichomonosis en pacientes con patología de cuello uterino. *Rev Mex Patol Clin* 1998;45:177-80.

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.

Rughooputh S, Greenwell P. *Trichomonas vaginalis*: paradigm of a successful sexually transmitted organism. *Br J Biom Sci* 2005;62:193-200.

Sayed el-Ahl SA, el-Wakll HS, Kamel NM, Mahmoud MS. A preliminary study on the relationship between *Trichomonas vaginalis* and cervical cancer in Egyptian women. J Egypt Soc Parasitol 2002;32:167-78.

Schnapp AR, Eickhoff CS, Sizemore D, Curtiss III. R, Hoft DF. Cruzipain induces both mucosal and systemic protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. Infect Immun 2002;70:5065-74.

Schwartz WN, Barret AJ. Human cathepsin H. Biochem J 1980; 191:487-97.

Schwebke JR, Barrientes FJ. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:4209-10.

Schwebke JR, Burgess D. Trichomoniasis. Clin. Microbiol. Rev 2004;17:794-803.

Schwebke JR, Hook III EW. High rates of *Trichomonas vaginalis* among men attending a sexually transmitted diseases clinic: implications for screening and urethritis management. J Infect Dis 2003;188:465-8.

Sigarroa A. Programa estadístico computarizado "Tonystart". Facultad de Biología. Universidad de La Habana, 1986, p. 100.

Silva-Filho FC, Kasai S, Nomiza M, Lopez LB, Melo-Braga MB, Rocha-Azebedo B, et al. How laminin-1 can be recognized by the protozoan parasite *Trichomonas foetus*: possible role played by the extracellular matrix glycoprotein in both cytoadherence and cytotoxicity exerted by the parasite. Parasitol Int 2002;51:305-7.

Skerk V, Schonwald S, Krhen I. Aetiology of chronic prostatitis. Int J Antimicrobiol Agents 2002;19:471-4.

Simhan HN, Anderson BL, Krohn MA, Heine RP, Martínez de Tejada B, Landers DV, Hillier SL. Host immune consequences of asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 2007; 196:59.e1-5.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 1986;150:76-85.

Snipes LJ, Gamard PM, Narcisi EM, Beard B, Lehmann T, Secor WE. Molecular epidemiology of metronidazole resistance in a population of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 2000;38:3004-9.

Sobel JD. Vaginitis. N Engl J Med 1997;337:1896-903.

Sommer Ulf, Costello Ca, Hayes GR, Beach DH, Gilbert RO, Lucas JJ, Singh BN. Identification of *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases that induce apoptosis in human vaginal epithelial cells. J Biol Chem 2005;280:23853-60.

Sood S, Mohanty S, Kapil A, Tolosa J, Mittal S. InPouch TV culture for detection of *Trichomonas vaginalis*. Indian J Med Res. 2007;125:567-71.

Soper D. Trichomoniasis: Under control or undercontrolled? Am J Obstet Gynecol 2004; 190:281-90.

Soto Y. Papovavirus. En, Llop A, Valdés-Dapena MM, Zuazo JL, editores. Microbiología y Parasitología médica. Tomo II. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2001.p. 109-42.

Spiegel CA. Microflora associated with *Trichomonas vaginalis* and vaccination against vaginal trichomoniasis. In Honigberg BM, editor. Trichomonads parasitic in human. New York: Springer-Verlag, 1990.p.213-24.

Sutcliffe S, Giovannucci E, Alderete JF, Chang TH, Gaydos CA Zenilman JM, *et al.* Plasma antibodies against *Trichomonas vaginalis* and subsequent risk of prostate cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006;15:939-45.

Tocher JH, Edwards DI. Evidence for the direct interaction of reduced metronidazole derivatives with DNA bases. Biochem Pharmacol 1994;48:1089-94.

Tsang VCW, Noack K, Wilson M, Parmer DF, Whately SD, McDougal JS, Kennedy S. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot technique (Western blot) for human t-lymphotropic virus type III\ lymphadenopathy associated virus (HTLV-III\LAV) antibodies. Immunology Series No 15. Procedural Guide, Centers for Diseases Control, Atlanta, 1986.

Turner ML. Cell adhesion molecules: a unifying approach to topographic biology. Biol Rev Camb Philos Soc 1992;67:359-77.

Upcroft P, Upcroft JA. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. Clin Microbiol Rev 2001;14:150-64.

Valadkhan Z, Sharna S, Harjal K, Gupta I, Malla N. *In vitro* comparative kinetics of adhesive and hemolytic potential of *T. vaginalis* isolates from asymptomatic and asymptomatic females. Indian J Pathol Microbiol 2003;46:693-9.

Van Der Pol B, Kraft CS, Williams JA. Use of an adaptation of a commercially available PCR assays aimed at diagnosis of *Chlamydia* and *Gonorrhea* to detect *Trichomonas vaginalis* in urogenital specimens. J Clin Microbiol 2006;44:366-73.

Vanacova S, Tachezy J, Kulda J, Flegr J. Characterization of trichomonad species and strain by fingerprinting. J Euk Microbiol 1997;44:545-52.

Vancini RG, Benchimol M. Entry and intracellular location of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis*. Arch Microbiol. 2008;189:7-18.

Vargas-Villarreal J, Mata-Cardenas BD, Palacios-Corona R, Gonzalez-Salazar F, Cortes-Gutiérrez EI, Martinez-Rodriguez HG, Said-Fernandez S. *Trichomonas vaginalis*: identification of soluble and membrane-associated phospholipase A1 and A2 activities with direct and indirect hemolytic effects. J Parasitol 2005;91:5-11.

Vázquez F, García MJ, Pérez F, Palacio V. *Trichomonas vaginalis*: tratamiento y resistencia a nitroimidazole. Enferm Infecc Microbiol Clin 2001;19:114-24.

Vázquez F, Lepe JA, Otero I, Blanco MA, Aznar J. [Microbiological diagnosis of sexually-Transmitted infection (2007)]. Enferm Infecc Microbiol Clin 2008;26:32-7.

Viikki M, Pukkala E, Hakama M. Gynecological 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 Infect Dis 2002;34:5-10.

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.

Wendel KA. Trichomoniasis: What's new? Curr Infect Dis Rep 2003;5:129–34.

WHO (World Health Organization). Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infection Geneva, 2001. www.who.int/docstore/hiv/GRSTI/006.htm.

Wiese W, Pate SR, Patel SC, Ohl CA, Estrada CA. A meta-analysis of the Papanicolaou smear and wet mount for the diagnosis of vaginal trichomoniasis. Am J Med 2000;108:301-8.

Yadav M, Dubey ML, Gupta I, Malla N. Nitric oxide radicals leucocytes and vaginal washes of *Trichomonas vaginalis* infected symptomatic and asymptomatic women. Parasitology 2006; 132:339-43.

Yadav M, Dubey ML, Gupta I, Malla N. Cystein proteinase 30 in clinical isolates of *T. vaginalis* from symptomatic and asymptomatic infected women. Exp Parasitol. 2007 a;116:399-406.

Yadav M, Dubey ML, Gupta I, Malla N. Cystein proteinase 30 (CP 30) and antibody response to CP30 in serum and vaginal washes of symptomatic and asymptomatic *Trichomonas vaginalis*-infected women. Parasite Immunol 2007 b;29:359-65.

Yadav M, Gupta I, Malla N. Kinetic of immunoglobulin G, M, A and IgG subclass responses in experimental intravaginal trichomonosis: prominence of IgG1 response. Parasite Immun 2005;27:461-7.

Yano A, Yui K, Aosai F, Kojima S, Kawana T, Ovary Z. Immune response to *Trichomonas vaginalis*. IV. Immunochemical and immunobiological analyses of *Trichomonas vaginalis* antigen. Int Arth Allergy Appl Immunol 1983;72:150-7.

Young F. Dealing with trichomonosis. J Fam Health Care 2006;16:153-5.