



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"IZTACALA"

"LA ACTIVIDAD DE PROTEINAS EN LA SUPERFICIE
DE Trichomonas vaginalis COMO FACTOR NECESARIO
PARA EL PROCESO DE ADHESION A CELULAS
EPITELIALES."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O
P R E S E N T A

MARCO AURELIO RODRIGUEZ MONROY



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizo en
el Centro de Investigación de
Ciencias de la Salud de la
Universidad de Texas.

A G R A D E C I M I E N T O S

Al Dr. John F. Alderete, director de esta tesis por brindarme su apoyo y confianza durante la realización de la misma.

Al Depto. de Microbiología del Centro de Investigación de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas, por toda la ayuda, asesoramiento y facilidades que permitieron la realización de este trabajo.

A la Biol. Margarita Canales Martínez, por su ayuda tanto en el curso de la carrera como en el proceso de titulación.

Al Biol. Alberto Arriaga Frías , por las facilidades brindadas para dar fin al proceso de titulación.

A los revisores de este trabajo:

M. en C. Martha Salcedo Alvarez.

M. en C. Héctor Barrera Escorcia.

M. en C. José Suárez Rocha.

Biol. Margarita Canales Martínez

Biol. Jesús Medina Soto.

Dedico este trabajo:

A mis padres: Aurelio Rodríguez Romero

Feliscitas Monroy Sánchez

Por haberme dado todo de ellos para ser lo
que soy y por apoyarme en todo momento para
ir por donde voy.

A mis hermanos: Alicia, Miguel y Raúl.

Con cariño,

A mis compañeros, profesores y todas aquellas personas
que han intervenido de manera directa en mi formación.

De manera muy especial: A mi hermano César, por que su
existencia le da significado a palabras como amistad, hermandad,
honestidad, lealtad, tan obsoletas para aquellos que no tienen un
"hermano".

No hacen falta alas
para hacer un sueño,
basta con las manos,
basta con el pecho,
basta con las piernas y con el empeño.

No hacen falta alas
para ser más bellos,
basta el buen sentido
del amor inmenso.

No hacen falta alas
para alzar el vuelo.

No hacen falta alas

Silvio Rodríguez.

Que lástima me dan
aquellos que solo viven por vivir,
aquellos que no pueden ver
más allá de su propia nariz,
aquellos que lo aceptan todo
siempre y cuando ya este digerido,
aquellos que no pudieron creer
en sí mismos
y ahora tienen que inventarse un "dios",
yo mismo, por tener solo un gran amigo
acaso valdrá la pena tener más de dos ?

Que lástima me dan
aquellos que solo sirven
para estorbar, porque no han podido encontrar
ni su tiempo ni su sentido,
aquellos que han llegado a pensar
que es necesario acumular objetos
o hacerse de un título
para que alguien pueda ser "alguien".

Que lástima me da
escribir esto y que nadie lo entienda,
tener que irme y no dejar semilla
por lo menos dejaré mis versos al amigo
para que los convierta en canción,
en ese canto que siempre llevará consigo.

Marco Rodríguez.

I N D I C E.

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
ANTECEDENTES.....	4
OBJETIVO.....	7
MATERIAL Y METODOS.....	8
RESULTADOS.....	11
DISCUSIONES.....	24
CONCLUSIONES.....	28
BIBLIOGRAFIA.....	29

RESUMEN.

En el presente trabajo se evaluó el papel que juegan las cistein-proteinasas en la adhesión de I. vaginalis NYH286 a células de HeLa y células del epitelio vaginal humano. Únicamente el pretratamiento de las tricomonas y no de las células epiteliales con N-alpha-tosil-L-lisil-clorometil-cetona (TLCK), un inhibidor de las cistein-proteinasas tricomonales, disminuyó de forma considerable la habilidad de I. vaginalis para reconocer y unirse a las células epiteliales. Otros inhibidores de las cistein-proteinasas como la leupeptina y el L-(1-tosilamida-2-fenil)etil-clorometil-cetona (TPCK), también disminuyeron la citoadherencia de I. vaginalis. Las concentraciones de TLCK que inhiben el proceso de la adhesión no alteraron el metabolismo de I. vaginalis; los patrones de proteínas de las tricomonas fueron idénticos en presencia y ausencia de TLCK. La inhibición de la citoadherencia de I. vaginalis es dependiente de la concentración de TLCK. Usando las mismas concentraciones de inhibidores, la leupeptina resultó ser más efectiva que el TLCK.

Estos datos muestran por primera vez el papel de las cistein-proteinasas de I. vaginalis en el proceso de adhesión entre parásito y células epiteliales, además de abrir camino a una futura intervención farmacológica para la prevención de la tricomoniasis.

INTRODUCCION.

La tricomoniasis es una de las enfermedades sexuales que presenta un alto número de casos a nivel mundial, siendo el protozoo flagelado Trichomonas vaginalis (miembro del Phylum Sarcomastigophora, Clase Zoomastigophora y Orden Trichomonadida) el agente responsable del padecimiento (Schmidt y Roberts, 1985).

Las mujeres que padecen esta enfermedad, desarrollan un amplio espectro de sintomatología, que van desde portadoras asintomáticas, hasta pacientes con severas inflamaciones de la vagina (vaginitis) con presencia de leve escozor o picazón general muy fuerte y un flujo de olor muy desagradable. Al parecer, en el hombre la presentación es asintomática, aunque recientemente se han reportado algunas manifestaciones clínicas (Ackers, 1982; Coombs, 1982; Hoisingberg, 1978). Los factores o mecanismos inherentes tanto al huésped como al parásito en relación a la resistencia o susceptibilidad a la infección, son aún desconocidos; por ejemplo, el grupo de Alderete (1986) al realizar estudios en cuanto a las diferencias en la virulencia de distintas cepas de T. vaginalis obtuvo resultados contradictorios al utilizar modelos in vivo e in vitro. Al observar el aumento en la morbilidad de este padecimiento se ha hecho evidente la falta de una prueba simple rápida y sensitiva, capaz de detectar este organismo, especialmente entre los portadores asintomáticos, los cuales representan el reservorio

más grande de este parásito (Alderete, 1988). En la actualidad, el metronidazol y otros derivados del imidazol, son empleados para tratar la tricomonirosis en humanos, pero aún distan mucho de llegar a ser el medicamento ideal para tal efecto, sobre todo si se toma en cuenta sus efectos tóxicos colaterales (Muller, 1983).

Por otra parte, actualmente se han realizado estudios (Alderete, 1983; Alderete y Garza, 1985 y 1988; Alderete et al., 1988; Alderete y Neale, 1989; Alderete y Pearman, 1983; Peterson, 1983 y 1984; Peterson y Alderete, 1984) enfocados a comprender las interacciones biomoleculares que existen entre el parásito y las células huésped, principalmente a nivel de membrana plasmática, ya que es aquí donde se llevan a cabo los procesos de reconocimiento y unión para que el protozoario adquiera los nutrientes necesarios tanto de las células como de la matriz extracelular para su sustento y actividades (Libby et al., 1986).

ANTECEDENTES.

Han sido varios los trabajos (Alderete, 1983; Alderete y Garza, 1985 y 1988; Alderete et al., 1988; Alderete y Neale, 1989; Alderete y Pearlman, 1983; Peterson, 1983 y 1984; Peterson y Alderete, 1984) que se han realizado para estudiar la estructura y función de las proteínas tanto de la membrana celular de algunos microorganismos como de las existentes en la matriz extracelular para comprender el mecanismo que lleva a la infección. Estos trabajos se han enfocado a dos tipos de organismos: Trypanosoma cruzi (Piras et al., 1983 y 1985) y Trichomonas vaginalis. En tales investigaciones se han logrado caracterizar algunas proteínas (adhesinas) que parecen estar involucradas en el proceso de citoadherencia (Alderete, 1988), proceso que inicia los eventos biomoleculares de identificación y aceptación entre huésped y parásito.

T. vaginalis, posee niveles muy altos de actividad proteolítica (Coombs, 1982; North, 1982), ya que han sido identificadas alrededor de once cistein-proteinasas para las tricomonas patógenas de los humanos. Las diferencias básicas entre estas proteínas varían de acuerdo a su estimulación con ditiotreitol, peso molecular, pH óptimo y su sensibilidad relativa a ciertos inhibidores; por ejemplo, las proteínas tricomonales no parecen ser afectadas por pepstatina, un inhibidor aspártico-proteinasas, tampoco por inhibidores del tipo

serina-proteinasas tales como el fluoruro de fenil-metil-sulfonilo. Sin embargo, sus actividades se ven inhibidas por el N-alfa-tosil-L-lisil-clorometil-cetona (TLCK), el L-(1-tosilamida-2-fenil) etil-clorometil-cetona (TPCK), ácido iodacético, leupeptina, quimostatina y antipafina, cada uno de los cuales ha mostrado inactivar varias, pero no todas las cistein-proteinasas tricomonales (Coombs y North, 1983; Lockwood et al., 1987).

Recientemente Alderete y Neale (1989), han reportado que existe una alta actividad proteolítica en *I. vaginalis* a nivel de superficie en la mayoría de las cepas de este parásito, lo que parece indicar que la actividad de algunas moléculas tricomonales, puede ser común entre las diferentes cepas del protozoario durante crecimiento normal y que la o las proteinasas pueden estar ubicadas en la superficie de *I. vaginalis* (Alderete, Brown y Kasamala, 1986).

Considerando lo anterior, la participación de una o más cistein-proteinasas de *I. vaginalis* durante la infección y patogénesis de la enfermedad que produce, aún permanece indefinida. Durante experimentos de identificación de las proteínas de *I. vaginalis* que participan en la citoadherencia, utilizando las técnicas de electroforesis y autorradiografía se han obtenido resultados insuficientes para identificar con precisión las adhesinas involucradas en este proceso (Alderete y Garza, 1988). Al parecer, las proteinasas tricomonales pueden en parte ser las responsables de la inexactitud en los estudios

mencionados, ya que existe la posibilidad de que estas moléculas degraden a las adhesinas y a otras proteínas existentes.

OBJETIVO.

Evidenciar la actividad de proteinasas de Trichomonas vaginalis en los eventos de reconocimiento y unión a las células epiteliales.

MATERIAL Y METODOS.

Las cepas de *T. vaginalis* que se utilizaron para este experimento fueron NYH286, IR7B y RJ375, que han sido las más utilizadas en recientes trabajos (Alderete, 1983; Alderete y Garza, 1985, 1988; Alderete et al., 1988; Alderete y Neale, 1989; Alderete y Pearlman, 1983; Peterson, 1983, 1984; Peterson y Alderete, 1984). Los parásitos fueron cambiados diariamente a un medio fresco de tripticasa y levadura con extracto de maltosa (TYM) suplementado con suero de caballo inactivado térmicamente a 56 °C (Hazleton Research Product, Inc. Lenexa, Kan.) (Alderete, 1983; Diamond, 1957). Para todos los experimentos se usaron organismos que se encontraban en el intervalo medio de la fase logarítmica de crecimiento (Alderete y Garza, 1985). El radiomarcaje de *T. vaginalis* para la determinación de proteínas totales se realizó agregando 2 ul. de (S)-metionina (act. esp. 1134 Ci/mmol; New England Nuclear Research Products, Wilmington, DE.) a un volumen de 100 ul de medio TYM con una densidad de 4×10^5 parásitos, durante un periodo de dos horas a 37 °C. Después de esto las tricomonas se lavaron con solución PBS (NaCl, 137 mM; KCl, 2.7 mM; NaHPO₄, 4.6 mM; KH₂PO₄, 1.5 mM) a 4 °C, para eliminar el excedente de material radioactivo; mientras que el precipitado de las proteínas totales se obtuvo agregando ácido tricloroacético al 10 % e incubando a 4 °C por un lapso de 4 horas. El material precipitado se lavó dos veces con solución PBS fría y

se disolvió en 200 ul de buffer solubilizante (tris-hidrocloruro 60.5 mM; beta-mercaptoetanol 2 % ; glicerol 10 %; dodecilsulfato de sodio 2%; pH 6.8). Posteriormente los residuos insolubles fueron removidos por centrifugación y las proteínas radiomarcadas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio (Laemmli, 1970). Después de agregar azul brillante de Coomassie, los geles se analizaron por fluorografía (Peterson, 1982).

Para los ensayos de citoadherencia se utilizaron células epiteliales de HeLa, las cuales fueron obtenidas de ATCC (American Type Culture Collection; Rockville, Maryland) y mantenidas en un medio Dulbecco con modificaciones esenciales mínimas (DMEM) suplementado con suero fetal de bovino al 10 % (Hazleton Research Products), 100 U de penicilina por mililitro y 100 ug de estreptomina por mililitro. Los cultivos se conservaron en una atmósfera de 7% de CO₂ a 37 °C. Las células fueron sembradas a una densidad de 4×10^4 células por cada pozo en plato Costar de cultivo de 96 pozos de 15 mm de diámetro cada uno (Bellco, Glass, Inc. Vineland, N.J.) e incubadas toda la noche para lograr un adecuado crecimiento en monocapa. A continuación, a 100 ul conteniendo 4×10^5 protozoarios (previamente marcados la noche anterior con 1 uCi de (³H)-timidina (42 Ci/mmol; Schwartz-Mann, Cambridge, Mass.) por ml), son resuspendidos en una mezcla de medios 2:1 (DMEM:TYM), y agregados a las células de HeLa previamente lavadas con DMEM tibio. Después de un periodo de

contacto de 30 minutos a 37 ° C y una atmósfera de 7 % de CO₂, los pozos con tricomonas adheridas a las células se lavaron tres veces con DMEM tibio para remover los parásitos libres. Después de secar, la cantidad de radioactividad adherente se determinó usando un contador de centelleo (Packard).

Las tricomonas fueron lavadas y resuspendidas en solución PBS o medio TYM y fueron tratadas con inhibidores de proteinasas por 20 minutos a 37 ° C. Se volvieron a lavar con PBS para remover el excedente de los inhibidores y poder ser agregadas a las células. Los inhibidores que se utilizaron fueron TLCK, TPCK y leupeptina, todos ellos de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. Las tricomonas control se trataron de la misma forma, con excepción de los inhibidores. Para cada experimento la motilidad del parásito en presencia de los inhibidores se evaluó cualitativamente por observación microscópica para determinar su integridad y fue comparada con el control. Todos los experimentos se repitieron tres o cuatro veces por ensayo, realizándose por lo menos 5 ensayos.

RESULTADOS.

Disminución de la citoadherencia de *I. vaginalis* mediante el uso de inhibidores de las cistein-proteinasas tricomonales. El TLCK, a una concentración de 1 mM, fue reportado como el inhibidor de la mayoría de las proteinasas tricomonales (Coombs y North, 1983; Lockwood et al., 1987), por lo que esta concentración fue usada inicialmente.

La tabla 1 presenta tres experimentos representativos en los que se muestra que la citoadherencia de *I. vaginalis* a las células de HeLa en presencia de TLCK fue dramáticamente reducida si se compara con el control. En la mayoría de los casos se presentó más de un 90 % de inhibición de la citoadherencia. El mismo efecto se registró para células del epitelio vaginal*. En los experimentos 2 y 3 se utilizaron otros inhibidores de las cistein-proteinasas tricomonales, tales como el TPCK y leupeptina, los cuales mostraron ser efectivos inhibidores de la citoadherencia aunque no tan drásticos como el TLCK. Dichos experimentos fueron repetidos 20 veces y en todos los casos, tales inhibidores redujeron la actividad citoadherente entre un 50 y un 90 %.

Estos resultados iniciales sugieren que una o varias proteinasas ya sean del parásito o de la célula huésped están

* Obtenidas de una mujer sana de 25 años de edad.

Tabla 1. Efecto de los inhibidores de cistein-proteinasas sobre el proceso de citoadherencia de la cepa NYH286 de *T. vaginalis* a las células epiteliales.

Experimento	Células huésped	Inhibidor	% de parasitos adheridos
1	HeLa	----	100.0 +/- 8.2
	HeLa	TLCK	6.1 +/- 0.4
	VEC	----	100.0 +/- 0.7
	VEC	TLCK	7.8 +/- 1.2
2	HeLa	----	100.0 +/- 8.2
	HeLa	TLCK	7.4 +/- 0.5
	HeLa	TPCK	57.0 +/- 2.3
	HeLa	leupeptina	45.1 +/- 2.4
3	HeLa	----	100.0 +/- 5.1
	HeLa	TLCK	4.0 +/- 0.3
	HeLa	TPCK	56.6 +/- 6.0
	HeLa	leupeptina	33.1 +/- 3.6
	HeLa	inhibidor de tripsina	86.2 +/- 7.0

Las células epiteliales en estos experimentos fueron células HeLa cultivadas como se especifica en material y metodos.

Las células del epitelio vaginal (VEC) fueron obtenidas de una mujer sana de 25 años de edad.

(continuación tabla 1)

Aproximadamente dos millones de organismos fueron lavados y resuspendidos en solución PBS (experimento 1) o en medio TYM (experimento 2 y 3) para ser tratados y co-incubados con las células huésped. La concentración del inhibidor utilizado fue de 1 μ M para TLCK, TPCK, leupeptina y el inhibidor de tripsina.

El porcentaje de citoadherencia fue obtenido al tomar el conteo de radioactividad del grupo control como el 100 % del nivel de adherencia. Los números representados por +/-, significan la desviación estándar de los experimentos por triplicado.

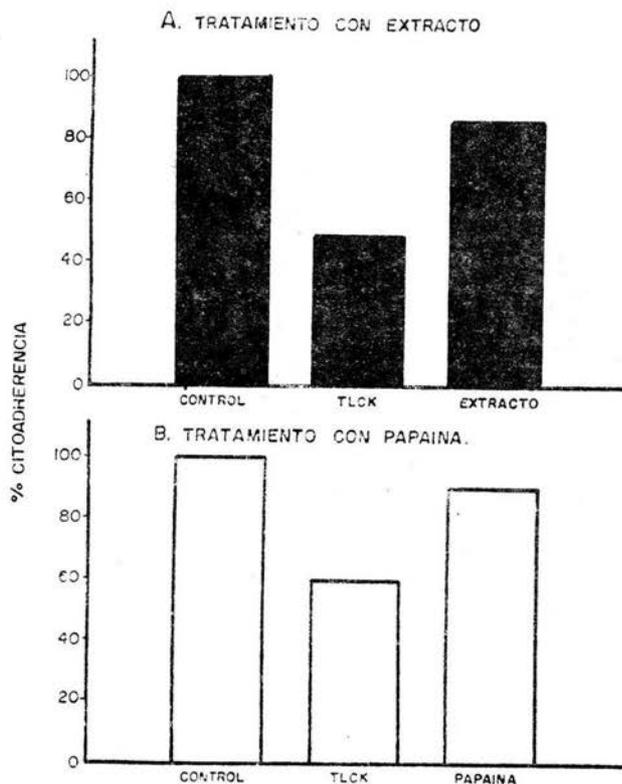


Figura 1. Un experimento representativo para mostrar la restauración de la citoadherencia de la cepa de *I. vaginalis* NYH286 tratada con TLCK a las células de HeLa después de una incubación con un extracto de detergente tricomonal (A) y papaína (B).

involucradas en los eventos de reconocimiento y adhesión entre las superficies del parásito y células epiteliales.

Los siguientes experimentos fueron realizados para determinar el origen de la o las proteinasas relacionadas en la citoadherencia tricomonal.

La tabla 2 muestra que la inhibición de la unión fue obtenida solo con *I. vaginalis* previamente tratadas con TLCK (ensayo 2) y no con células de HeLa (ensayo 3). En el ensayo 4, organismos tratados con TLCK, fueron sometidos a un lavado exhaustivo antes de entrar en contacto con las células. Para tal caso, se encontró que no hubo disminución del efecto inhibitor. Estos datos sugieren que las proteinasas pueden estar ubicadas en la superficie del parásito.

Para probar que la o las proteinasas tienen un origen o provienen del parásito y no de las células huésped, se trabajó con la superficie celular de éstas. Las células de HeLa fueron tratadas con papaína (ensayo 6) y un extracto de detergente tricomonal (ensayo 7) los cuales poseen una alta actividad proteínica (Kit para detección de proteinasas, Bio Rad Laboratories, Richmond, CA).

Los niveles de citoadherencia de *I. vaginalis* fueron similares al control (células de HeLa no tratadas, ensayo 5), lo que indica que la acción proteínica en la superficie de las células epiteliales no es necesaria para la citoadherencia. Estos datos indican que una o varias proteinasas involucradas en dicho

proceso, se encuentran interactuando en la superficie del parásito y no de las células huésped.

Finalmente, organismos tratados con TLCK, fueron incubados con extracto tricomonal o papaína. La figura 1, muestra que los parásitos tratados con 1 ug del extracto (fig. 1-A) y 0.25 ug de papaína (fig. 1-B) recobraron sus niveles de citoadherencia aunque cabe mencionar que a altas cantidades de papaína o extracto, pueden reducir también el proceso de adhesión (Alderete et al., 1988; Alderete y Garza, 1985). Esta reversión del efecto inhibitor del TLCK a las proteinasas de *I. vaginalis* involucradas en la citoadherencia, apoya de una forma determinante, la idea de que la acción de estas proteinasas en la superficie del parásito es un pre-requisito indispensable para la unión a la célula huésped.

Es importante señalar que la exposición de los parásitos al TLCK, no afecta la motilidad ni deteriora la síntesis de proteínas de *I. vaginalis*, en otras palabras, el organismo conserva su actividad metabólica necesaria para su desarrollo (Alderete y Garza, 1985).

La figura 2-A, muestra que la incubación de tricomonas a diferentes concentraciones (0.5, 1.0 y 2.0 mM) de TLCK durante 20 minutos (tiempo necesario para inhibir los niveles de citoadherencia mostrados en las tablas 1 y 2), no afectaron el crecimiento y multiplicación de *I. vaginalis*. Sin embargo, se observó que una exposición mayor de dos horas, trae consigo una

Tabla 2. Efecto sobre la citoadherencia usando la cepa *I. vaginalis* NYH286 y células epiteliales de HeLa, previamente tratados.

Experimento	Ensayo	Tratamiento de: parásitos células		% del nivel de citoadherencia
1	1	----	----	100.0 +/- 13.1
	2	TLCK	----	4.4 +/- 0.1
	3	----	TLCK	105.7 +/- 2.3
	4	TLCK (lav.)	----	3.8 +/- 0.3
2	5	----	----	100.0 +/- 11.2
	6	----	papaína	99.3 +/- 6.1
	7	----	extracto	91.9 +/- 9.9

Aproximadamente dos millones de organismos fueron suspendidos en medio TYM y tratados con TLCK al 1 mM por 20 minutos a 37 oC. Los parásitos fueron entonces centrifugados y resuspendidos en una mezcla de medios DMEM:TYM (2:1) para ser agregados a las células huésped.

Los platos de cultivo con las células HeLa fueron pretratados con TLCK al 1mM, para el experimento 2 se utilizaron 0.25 ug de papaína (ensayo 6) y 0.3 ug del extracto tricomonal (ensayo 7) el cual fue previamente dializado por 24 horas. El tratamiento fue durante 10 min. a 37 oC seguido de un prolongado enjuague de las células con DMEM antes de interactuar con los parásitos. Se observó bajo microscopia que el cultivo de las células Huésped en monocapa no se viera afectado al ser sometido a las condiciones mencionadas.

El nivel de citoadherencia registrado para los parásitos no tratados (control), representó el 100 %. Los números representados con +/- significa la desviación estándar de los experimentos por triplicado.

(continuación tabla 2)

La solubilización de proteínas con desoxicolato al 1 % de 20 millones de organismos en solución PBS fue realizada a 4 oC durante 30 minutos (Alderete y Garza, 1988). La eliminación del material insoluble fue hecha por centrifugación en un amortiguador de sacarosa al 10 % a 17,000 rpm por 30 minutos a 4 oC. El exceso de detergente fue removido por diálisis contra PBS por 24 horas a 4 oC. La actividad proteínica presente en el extracto fue monitoreada con el kit Bio-Rad, usando caseína como sustrato.

disminución de la motilidad así como de la densidad de organismos (fig. 2-B).

La síntesis de proteínas de *I. vaginalis* fue monitoreada para cada uno de los tiempos mostrados en la figura 2. Los niveles de incorporación de (S)-metionina³⁵ a las proteínas de *I. vaginalis* fueron determinados mediante un fluorograma de intensidad de bandas de las proteínas totales precipitadas, encontrándose una similitud entre el número e intensidad de bandas durante los primeros 20 minutos para todos los casos y una reducción en la intensidad de estas bandas después de dos horas (Alderete y Garza, 1988). Cabe mencionar que se ha reportado la desaparición de algunas bandas en lapsos de incubación de 6 a 18 horas (resultados no mostrados; Peterson y Alderete, 1982). Dependencia de la inhibición de la citoadherencia de *I. vaginalis* con respecto a la concentración de TLCK. La figura 3, muestra que la máxima inhibición se obtuvo usando una concentración de 1 mM de TLCK en organismos suspendidos en medio TYM o solución PBS. Concentraciones mayores a 1 mM, no indujeron a un aumento en la inhibición. Organismos en medio TYM, registraron niveles bajos de inhibición con respecto a las tricomonas en solución PBS, posiblemente debido a la presencia de cisteína en el medio TYM (North, 1982) o a la unión del TLCK a macromoléculas presentes en un medio de cultivo complejo como es éste. Sin embargo, en este medio se observó que las tricomonas presentan mayor motilidad en comparación con aquellos organismos en solución PBS.

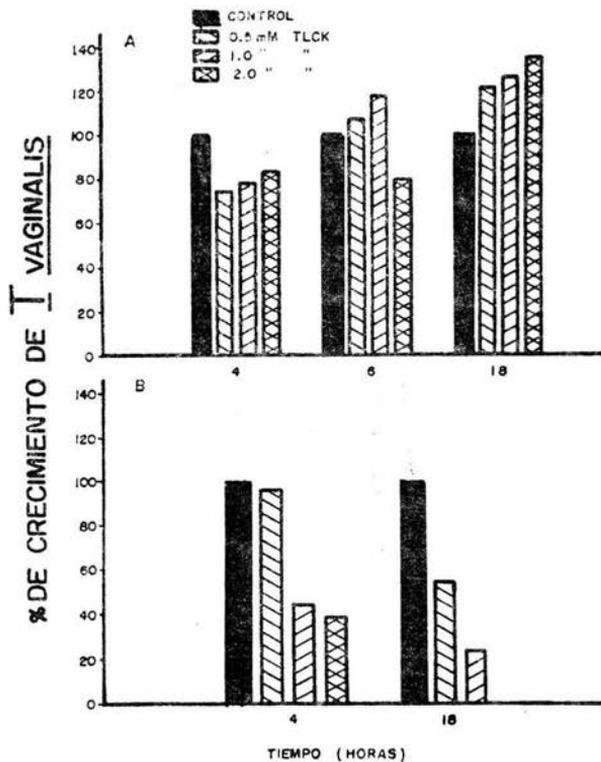


Figura 2. Crecimiento de *T. vaginalis* (NYH286) en presencia de diferentes concentraciones de TLCK. Las tricomonas fueron pretratadas durante 20 minutos (A) o incubadas por 4 hrs (B) a 37 °C con diferentes concentraciones de TLCK en medio TYM. Los parásitos fueron contados a varios tiempos siguiendo el tratamiento de TLCK. El 100 % de crecimiento fue tomado del número total de organismos del grupo control.

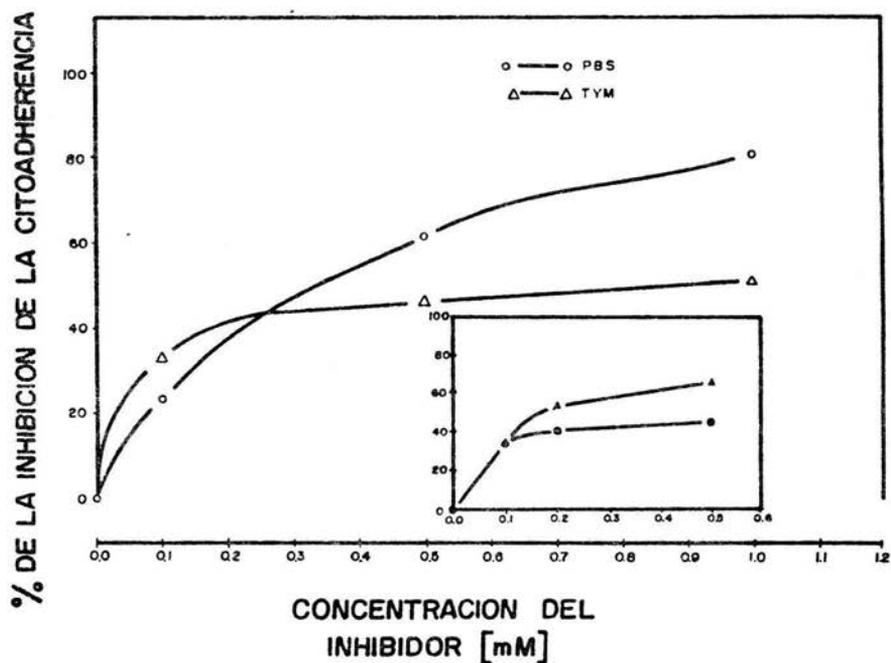


Figura 3. Experimento que muestra la inhibición de la citoadherencia después de resuspender *I. vaginalis* (NYH2B6) pretratadas en solución PBS (O) o medio TYM (Δ) con TLCK. El recuadro muestra la comparación de inhibición entre TLCK (\bullet) y leupeptina (\blacktriangle) bajo las mismas condiciones experimentales.

Un aspecto importante al determinar la dependencia del efecto inhibitor con respecto a la concentración de TLCK fue la comparación de éste con leupeptina, el cual es otro inhibidor frecuentemente usado en los experimentos de citoadherencia (Diamond, 1957; Muller, 1983).

En el recuadro de la figura 3, se muestra que la leupeptina fue más efectiva para reducir la citoadherencia que el TLCK a las mismas concentraciones molares.

Comparación del grado de inhibición de la citoadherencia por TLCK, entre diferentes cepas de *I. vaginalis*. Dentro de la variedad de cepas de *I. vaginalis* existen ciertas diferencias entre ellas, siendo el grado de patogenicidad o virulencia, uno de los más importantes. En las tres cepas más representativas o las más frecuentemente utilizadas para la investigación, se probó como se afectaba su proceso de adhesión a la célula huésped al ser tratadas con TLCK (fig. 4). El grado de inhibición del mecanismo de unión hacia las células por parte de las tres cepas fue, al igual que en los resultados anteriores, dependiente de la concentración de TLCK. La cantidad necesaria de este inhibidor para obtener un 50 % de la reducción de la adhesión del parásito a las células fue diferente para cada cepa, así se observó que para NYH286, IR78 y RU375 las concentraciones requeridas fueron 0.5, 1.0 y 2.0 mM de TLCK respectivamente.

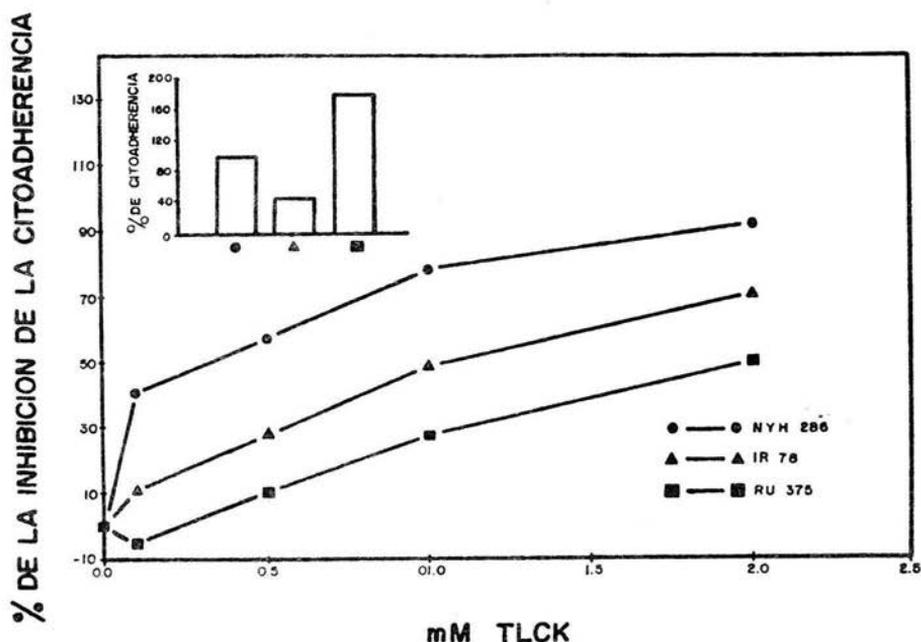


Figura 4. Inhibición de la citoadherencia de las cepas de *T. vaginalis* NYH286 (●), IR78 (▲) y RU375 (■) por TLCK. Las diferentes cepas de tricomonas fueron pretratadas con TLCK en medio TYM y los ensayos fueron realizados en un plato para cultivo de 96 pozos para cada ensayo. Los niveles individuales de adhesión para cada cepa en ausencia de inhibidor fueron tomados como el 100 % de citoadherencia para cada cepa.

DISCUSION.

Hasta la fecha a sido poca o casi nula la importancia que han recibido las cistein-proteinasas de *I. vaginalis* como factores verdaderamente potenciales de virulencia (Coombs y North, 1983; Lockwood et al., 1987). En el presente estudio se evidenciò que las proteinasas de *I. vaginalis* se encuentran ubicadas en la superficie del parásito además de su relación en los primeros eventos del reconocimiento y unión a las células huésped, pasos claves del parasitismo. Los resultados sugieren que estas proteinasas juegan un papel muy importante y determinante en la patogenesis de la enfermedad.

Los datos aquí descritos muestran que algunos miembros de este repertorio de moléculas (enzimas proteolíticas), pueden tener otras actividades biofuncionales que la simple digestión de proteínas para fines nutritivos (North, 1982). El hecho de que se haya pretendido implicar a las proteinasas en el mecanismo de citoadherencia de *I. vaginalis*, no es ilógico si se toma en cuenta que este grupo de proteínas han sido relacionadas con el proceso de adhesión a tejidos en *Candida* (Borg y Ruchel, 1988) y en la invasión de parásitos de la malaria a células sanguíneas (Dluzewsky et al., 1986). De igual forma *Trypanosoma cruzi* requiere de la acción de una proteínasa durante su maduración y subsecuente parasitismo a las células huésped (Boschetti et al., 1987; Piras et al., 1985).

Al trabajar con organismos previamente tratados con inhibidores de las cistein-proteinasas, se obtuvo una reducción de la citoadherencia tricómonal (tabla 1 y figura 3). Cabe aclarar que bajo ninguna circunstancia la concentración empleada del inhibidor, disminuyó la capacidad biosintética y metabólica de los organismos. Esta observación resultó idéntica para cada una de las cepas examinadas en el presente estudio.

En investigaciones paralelas, se encontró que en organismos tratados con TLCK son capaces de regenerar el mecanismo de adhesión a las células. Sin embargo, la regeneración de este mecanismo parece no requerir de una síntesis de proteínas (Alderete y Neale, 1989).

Estos datos indican la posible existencia de una proteinasa o proteinasas preformadas, las cuales pueden estar ubicadas en la superficie del parásito, ya sea en una conformación inactiva o en forma de un precursor, tales estudios aún en progreso, tratan de vislumbrar cual es exactamente la llave que activa a las proteinasas para reconocer y unirse a las células epiteliales.

Los resultados obtenidos no permiten determinar el número de cistein-proteinasas que pudieran estar involucradas en los experimentos realizados. Aproximadamente once proteinasas de *I. vaginalis* han sido identificadas mediante electroforesis (Lockwood et al., 1987) y su caracterización fue realizada en base a la actividad proteolítica en presencia de inhibidores conocidos (Coombs y North, 1983; Lockwood et al., 1987).

El hecho de que la leupeptina haya resultado un inhibidor más efectivo que el TLCK es un dato notable, sin embargo, de las once cistein-proteinasas de *T. vaginalis* se ha reportado que no tienen el mismo grado de inhibición al ser tratadas con otros inhibidores y que el TLCK presenta una acción general sobre todas estas (Coombs y North, 1983; Lockwood et al., 1987). Resultados como éste, dan pie a nuevas investigaciones, en las que manipulando el tipo de inhibidor ya sea de amplio espectro o específico y su concentración, se pueda lograr en un futuro no muy lejano una identificación y caracterización de aquella o aquellas proteinasas involucradas en el proceso de la citoadherencia.

La función exacta o el paso preciso en el que las proteinasas tricomonales se ven involucradas en el reconocimiento y unión a la superficie de las células epiteliales, aún no se conoce. Es posible que exista un enmascaramiento entre adhesinas y proteinasas, ambas ubicadas en la superficie del parásito y protagonistas importantes del mismo evento; de igual forma, es posible que las adhesinas en la membrana tricomonal estén presentes como precursores los cuales pueden ser activados mediante una digestión específica por parte de las proteinasas. Por otra parte, aún queda abierto el campo de investigación con respecto a la superficie celular y el receptor o blanco sobre el que interactúan las proteínas tricomonales aunque los datos de la tabla 2 muestran que al tratar las células huésped con papaina o

con el extracto tricomonal no afectó ni disminuyó la citoadherencia de *T. vaginalis*. Además, al incubar organismos previamente tratados con TLCK en un medio con papaina o extracto tricomonal se observó (fig. 1) que estos organismos recobran sus niveles de adhesión a las células huésped. Tales resultados apoyan la idea de que las modificaciones ocurren en la superficie de *T. vaginalis* y no de las células epiteliales. Tales alteraciones de la superficie del parásito son necesarias para una eficiente unión a la célula huésped, por lo que clarificar y poder disectar paso por paso la acción de las proteinasas en la relación huésped-parásito representa una importante área de investigación.

La reducción del parasitismo de *T. vaginalis* hacia las células epiteliales por inhibidores cistein-proteinasas se ha observado en todas las cepas examinadas (Alderete y Garza, 1985). Esto no es sorprendente si se toma en cuenta que en todas estas cepas se ha observado citoadherencia, aunque en diferentes niveles (Alderete et al., 1986, 1988; Alderete y Garza, 1985). El hecho de que todas las cepas sean afectadas por el mismo inhibidor es muy importante desde el punto de vista de una potencial intervención farmacológica (Coombs et al., 1983). Los datos y observaciones aquí presentados marcan el camino a nuevas investigaciones dirigidas a la identificación de estas moléculas (proteinasas) para poder dar lugar al desarrollo de una vacuna o tratamiento químico en contra de este agente infeccioso transmitido sexualmente.

CONCLUSIONES.

Con base a los resultados obtenidos y a la discusión presentada se concluye:

- Que las cistein-proteinasas de Trichomonas vaginalis se encuentran ubicadas en la superficie del parásito además de estar involucradas en los eventos primarios del reconocimiento y unión hacia las células huésped.
- Que los principales inhibidores de la actividad de las proteinasas, capaces de impedir o disminuir el mecanismo de adhesión entre T. vaginalis y las células epiteliales son: el TLCK, TPCK y leupeptina, siendo el primero el inhibidor que actúa de una forma más general sobre dichas moléculas.
- Que aún no se conoce si es una o varias las proteinasas que pueden estar involucradas en el proceso de citoadherencia.
- Que los resultados aquí presentados ofrecen un apoyo importante a las investigaciones encaminadas a encontrar una vacuna o un tratamiento en contra de la tricomoniasis.

BIBLIOGRAFIA.

- 1) Ackers, J.P. 1982. Immunology of amebas, giardia and trichomonas. p.420-430. In: A.J. Nahmias and R.J. O'Reilly (Eds), Immunology of Human Infection, Vol. 9, Part II, Viruses and Parasites; Immunodiagnosis and Prevention of Infectious Diseases. Plenum Publishing Corp., New York.
- 2) Alderete, J.F. 1983. Antigen analysis of several pathogenic strains of Trichomonas vaginalis. Infect. Immun. 39: 1041.
- 3) Alderete, J.F. 1983. Identification of immunogenic and antibody-binding membrane proteins of pathogenic Trichomonas vaginalis. Infect. Immun. 40: 284-291.
- 4) Alderete, J.F., P. Dees, A. Gombosova, Michal Valent, M. Fadusova, A. Janoska, J. Stefanovic, and R. Arroyo. 1988. Specific parasitism of purified vaginal epithelial cells by Trichomonas vaginalis. Infect. Immun. 56: 2558-2562.
- 5) Alderete, J.F. and G.E. Garza. 1985. Specific nature of Trichomonas vaginalis parasitism of host cells surfaces. Infect. Immun. 50: 701-708.
- 6) Alderete, J.F. and G.E. Garza. 1988. Identification and properties of Trichomonas vaginalis proteins involved in cytodherence. Infect. Immun. 56: 28-33.
- 7) Alderete, J.F., L. Kasamala, E. Metcalfe and G.E. Garza. 1986. Phenotypic variation and diversity among Trichomonas

vaginalis and correlation of phenotype with trichomonal virulence determinants. *Infect. Immun.* 53: 285-293.

8) Alderete, J.F. and K.A. Neale. 1989. Relatedness of Major Immunogen Among all Trichomonas vaginalis Isolates Established Using Trichomonad Cystein Proteases. *Infect. Immun.* Accepted for publication.

9) Alderete, J.F. and E. Pearlman. 1983. Pathogenic Trichomonas vaginalis cytotoxicity to cell culture monolayers. *Brit. J. Vener. Dis.* 60: 99-105.

10) Alderete, J.F. 1988. Alternating phenotypic expression of two classes of Trichomonas vaginalis surface markers. *Rev. Infect. Dis.* 10: 408-412.

11) Alderete, J.F., L. Suprun-Brown and L. Kasamala. 1986. Monoclonal antibody to a major surface glycoprotein immunogen differentiates isolates and subpopulations of Trichomonas vaginalis. *Infect. Immun.* 52: 70-75.

12) Borg, M. and R. Ruchel. 1988. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic Candida spp. during experimental infection of oral mucosa. *Infect. Immun.* 56: 626-631.

13) Boschetti, M.A., M.M. Piras, D. Henriquez and R. Piras. 1987. The interaction of a Trypanosoma cruzi surface protein with Vero cells and its relationship with parasite adhesion. *Mol. Biochem. Parasitol.* 24: 175-184.

14) Coombs, G.H. 1982. Proteinases of Leishmania mexicana and another flagellate protozoa. *Parasitology.* 84: 149-155.

- 15) Coombs, G.H., D.T. Hart and J. Capaldo. 1983. Proteinase inhibitors as antileishmanial agents. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 76 (5): 660-663.
- 16) Coombs, H.G. and M.J. North. 1983. An analysis of proteinases Trichomonas vaginalis by acrylamide gel electrophoresis. Parasitol. 86: 1.
- 17) Diamond, L.S. 1957. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. J. Parasitol. 43: 488-490.
- 18) Dluzewsky, A.R., K. Rangachari, R.J.M. Wilson and W.B. Gratzer. 1986. Plasmodium falciparum: Protease inhibitors and inhibition of erythrocyte invasion. Exp. Parasitol. 62: 616-622.
- 19) Heath, J.P. 1981. Behavior and pathogenicity of Trichomonas vaginalis in epithelial cells. Br. J. Vener. Dis. 57: 106-117.
- 20) Hoisingberg, B.M. 1978. Trichomonads of importance in human medicine. p. 275-454. In: J.P. Kreier (ed), Parasitic Protozoa II., Academic Press, New York.
- 21) Krieger, J.N., J.I. Ravdin and M.F. Rein. 1985. Contact-dependent cytopathogenic mechanisms of Trichomonas vaginalis. Infect. Immun. 50: 778-786.
- 22) Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature (Lond.). 227: 680-685.
- 23) Libby, P., J. Alroy and M.E. Pereira. 1986. A

neurominidase from Trypanosoma cruzi removes sialic acid from the surface of mammalian myocardial and endothelial cells. J. Clin. Invest. 77: 127-135.

24) Lockwood, B.C., M.J. North, K.I. Scott, A.F. Breaner and G.H. Coombs. 1987. The use of a highly sensitive electrophoretic method to compare the proteinases of trichomonads. Mol. Biochem. Parasitol. 24: 89-95.

25) Muller, M. 1983. Trichomonas vaginalis and other sexually transmitted protozoan infections, p. 113-124. In: K.K. Holmes and T. Mardh (ed), International Perspectives of Neglected Sexually-transmitted Diseases. Hemisphere Publishing Corp., New York.

26) North, M.J. 1982. Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms. Microbiological Reviews. p. 304-340.

27) Peterson, K.M. and J.F. Alderete. 1982. Host plasma proteins on the surface of pathogenic Trichomonas vaginalis. Infect. Immun. 37: 755-762.

28) Peterson, K.M. and J.F. Alderete. 1983. Acquisition of alpha₁ antitrypsin by a pathogenic strain of Trichomonas vaginalis. Infect. Immun. 40: 640-646.

29) Peterson, K.M. and J.F. Alderete. 1984. Iron uptake and increased intracellular enzyme activity follow lactoferrin binding Trichomonas vaginalis receptors. J. Exp. Med. 160: 398-410.

30) Peterson, K.M. and J.F. Alderete. 1984. Trichomonas vaginalis is dependent on uptake and degradation of human low density lipoproteins. J. Exp. Med. 160: 1261.

31) Piras, M.M., D. Henriquez and R. Piras. 1985. The effect of proteolytic enzymes and proteases inhibitors on the interaction Trypanosoma cruzi-fibroblasts. Mol. Biochem. Parasitol. 14: 151-163.

32) Ray, T.L. and C.D. Payne. 1988. Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis. A role for Candida acid proteinase. Infect, Immun. 56: 1942-1949.

33) Rosenthal, P.J., K. Kim, J.H. McKerrow and J.H. Leech. 1987. Identification of three stage-specific proteinases of Plasmodium falciparum. J.Exp. Med. 166: 816-821.

34) Schmidt, G.D. and L.S. Roberts. 1985. Foundations of parasitology. Times Mirror/ Mosby College Publishing, St. Louis. MO.