

Adesão de *Trichomonas vaginalis* a superfícies bióticas e abióticas

Graziela de Vargas Rigo e Tiana Tasca

*Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, UFRGS.

INTRODUÇÃO

A tricomonose é a doença sexualmente transmissível (DST) de origem não viral mais comum no mundo, causada pelo protozoário *Trichomonas vaginalis*. A prevalência desta DST é de 187 milhões de pessoas no mundo¹. A patogenia está associada com aquisição do vírus HIV^{2,3} e outras sérias complicações como câncer cervical e de próstata⁴. O *T. vaginalis* possui a capacidade de aderir e causar danos às células epiteliais vaginais humanas (CEVHs)⁵ como também aderir ao epitélio uretral masculino, embora a hostilidade deste meio dificulte a colonização. A adesão é uma etapa crítica para a infecção, sendo atingida após alteração morfológica do trofozoíto de pinforme para amebóide. Este processo deve-se à reorganização de estruturas internas do citoesqueleto, componentes extracelulares como lipofosfoligano e proteínas. O uso do dispositivo intrauterino (DIU) tem sido associado ao aumento de infecção por *T. vaginalis*. Porém, pouco se conhece sobre a capacidade e os mecanismos que medeiam o processo de adesão do parasito às superfícies abióticas.

Neste contexto, este estudo teve como objetivos: determinar a capacidade de adesão ao plástico de diferentes isolados de *T. vaginalis*; investigar os mecanismos do processo de adesão ao plástico; avaliar se existe semelhança entre os mecanismos de adesão ao plástico e citoaderência às células epiteliais vaginais humanas (CEVHs).

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados de *Trichomonas vaginalis*:

Em estudo prévio foram coletados consecutivamente trinta isolados clínicos de *T. vaginalis* no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS (projeto 18923 aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UFRGS). Todos estes isolados e dois isolados *American Type Culture Collection* (ATCC 30236 e 30238) foram testados em relação à capacidade de adesão ao plástico.

Cultivo dos isolados:

Os trofozoítos foram cultivados em meio *trypticase-yeast extract-maltose* (TYM), a 37°C, pH 6,0 e suplementados com 10% de soro bovino inativado.

Adesão ao plástico:

Após cultivo *overnight* os trofozoítos foram submetidos à três lavagens com meio não suplementado aquecido a 37°C. Os parasitos foram resuspensos a uma concentração de $2,5 \times 10^8$ trofozoítos/mL e 2,0 mL dessa suspensão foram incubados em triplicata em placas de 24 poços por 4h a 37°C. Após a incubação, os poços foram lavados três vezes com meio TYM não suplementado e aquecido para retirar os trofozoítos não aderidos. Os poços foram incubados com cristal violeta (0,13% em 5,2 de etanol:formaldeído) por 5 min. Depois as placas foram lavadas três vezes com PBS 1x e o corante foi solubilizado com 1,0% de SDS em etanol 5,0%, a absorbância foi medida em 570nm em espectrofotômetro. Os poços contendo somente meio de cultura foram usados como controles negativos¹¹.

Tratamento químico:

Após o rastreamento para determinação da capacidade de adesão ao plástico nos isolados clínicos e ATCC, dois isolados com maior capacidade de adesão (TVLAC-M6 e TVLAC-M14) foram selecionados aleatoriamente, através de sorteio, e usados nos experimentos de determinação dos mecanismos de adesão ao plástico. Os trofozoítos foram pré-tratados com 10 mM de meta-periodato de sódio, 125 µg/mL de metronidazol, 0,2 µg/mL de colchicina (alteração dos microtúbulos fibrilares), 0,1 µg/mL de citochalasinina B (inibidor da polimerização da actina), e 1,0 mg/mL de tripsina (protease) durante 30 minutos a 37°C. Após o tratamento químico, a aderência ao plástico foi reavaliada pelo método do cristal violeta, como previamente descrito. Para analisar a viabilidade dos trofozoítos, após o tratamento químico, foi analisada a morfologia e motilidade usando o método de exclusão por *trypan blue* (0,2%), assim como o número de trofozoítos/mL por contagem em câmara de Neubauer. Além disso, uma alíquota de 100µL dos trofozoítos tratado foi retirada e incubada *overnight* em meio TYM suplementado com 10% de soro bovino adulto inativado, após os mesmos parâmetros que determinam a viabilidade dos trofozoítos foram avaliados.

Citometria de fluxo:

Foram utilizados dois isolados clínicos frescos com forte capacidade de adesão à placa de poliestireno (TVLAC-M6 e TVLAC-M14), esses isolados foram previamente corados com 0,5 µM de *CellTracker* e incubados durante 30 min com células HMV17, logo após trofozoítos não-aderidos foram lavados com TYM sem soro a 37°C. Os trofozoítos aderidos às células epiteliais vaginais foram retirados por tripsinização. Foi realizada a quantificação das células e dos trofozoítos no citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ e o número de células aderidas foi expresso em células por µL.

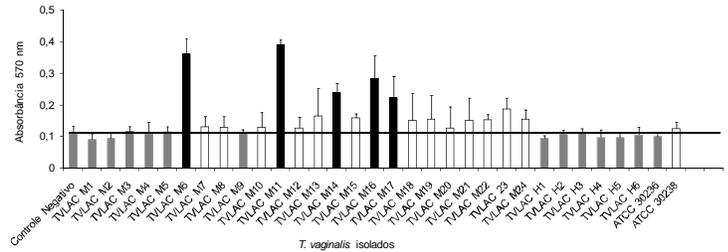


Figura 1: Avaliação quantitativa da aderência das 32 amostras ao plástico pelo método de cristal violeta. Barras cinza: isolados não aderentes; barras brancas: moderados; e barras pretas: isolados com elevada capacidade de adesão. Os valores representam a média e o desvio padrão da absorbância medida em 570nm em espectrofotômetro obtidos em três experimentos independentes (n=3).

Após os tratamentos químicos, o periodato e o metronidazol reduziram mais de 90% da adesão em ambos os isolados. No TVLAC-M6 a colchicina, tripsina e citochalasinina B reduziram 54%, 56% e 67%, respectivamente. De forma semelhante, o isolado TVLAC-M14 pré-tratado com os mesmos compostos, teve a adesão reduzida em 31%, 40% e 32%, respectivamente (Figura 2).

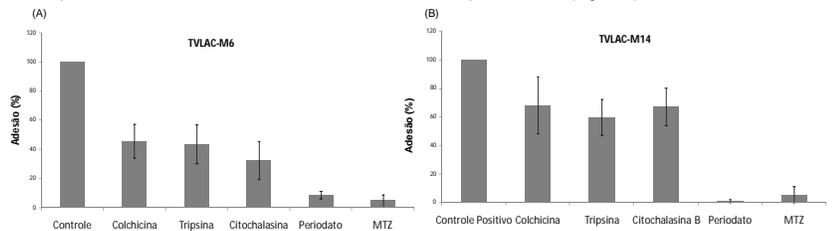


Figura 2: Adesão de *T. vaginalis* após o tratamento com colchicina, citochalasin B, meta-periodato e metronidazol (MTZ). (A) TV-LACM6; (B) TV-LACM14. As barras expressam a média e o desvio padrão da absorbância medida em 570nm em espectrofotômetro obtidos em três experimentos independentes (n=3).

Ao avaliar a taxa de perturbação no processo de citoaderência, o isolado TVLAC-M6 apresentou significativa redução na citoaderência de 46%, 58%, 61% e 66% quando tratado com colchicina, tripsina, citochalasinina B e periodato, respectivamente. Comportamento semelhante foi observado para o isolado TVLAC-M14: tripsina reduziu citoaderência em 43%, citochalasinina B e colchicina reduziram 65% e 69%, respectivamente. Já o tratamento com o periodato apresentou forte redução na citoaderência, 80% (Figura 3).

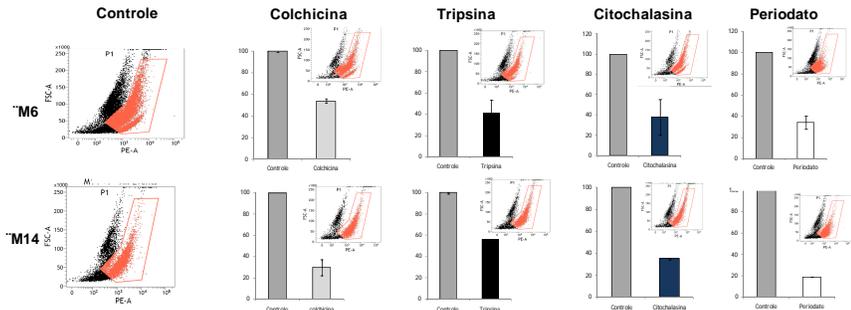


Figura 3: Dado representativo da citometria de fluxo citoaderência após tratamento com colchicina, tripsina, citochalasinina B e periodato de trofozoítos corados com CellTracker, cada trofozoíto corado foi detectado em PE.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que tanto a perturbação no citoesqueleto como em proteínas de superfície prejudicam de forma eficiente a adesão ao plástico, assim como o processo de citoaderência às células epiteliais vaginais. Para a aplicação prática da adesão dos parasitos a superfícies abióticas, ensaios de adesão de diferentes isolados de *T. vaginalis* ao DIU e anel vaginal estão em andamento.

REFERÊNCIAS

- 1 WHO, Geneva, 1-28 2012.
- 2 Sorvillo et al., 7:927-932, 2001.
- 3 Van Der Pol et al., 197:548-554, 2008
- 4 Viikki et al., 39:71-75, 2000
- 5 Sommer, U et al., 280:23853-23860, 2005

AGRADECIMENTOS



RESULTADOS

Na aderência ao plástico pelo método do cristal violeta observou-se que dos 32 isolados analisados, 14 apresentaram moderada adesão ao plástico e em 5 isolados observou-se uma elevada adesão quando comparado aos demais (Figura 1). Estes resultados demonstraram uma ampla variabilidade com relação à capacidade de adesão entre os isolados clínicos de *T. vaginalis*.