

# Estudo da relação *Trichomonas vaginalis*-hospedeiro: citotoxicidade *in vitro* do parasito contra células epiteliais vaginais humanas

Lúcia Collares Meirelles\*, Tiana Tasca\*

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

## INTRODUÇÃO

O protozoário flagelado *Trichomonas vaginalis*, parasito do trato urogenital, é o agente etiológico da tricomonose, a qual apresenta incidência de 274 milhões de novos casos por ano, sendo considerada a doença sexualmente transmissível não viral mais comum no mundo.<sup>1</sup> O *T. vaginalis* é um patógeno extracelular, que exerce o parasitismo na mucosa vaginal e uretral, não sendo internalizado pelas células do hospedeiro. O mecanismo da patogenicidade do *T. vaginalis* é objeto de muito estudo; sabe-se que a ligação inicial do parasito com as células hospedeiras é seguida pela transformação da morfologia do protozoário de piriforme para ameboide, resultando em íntimo contato entre o tricomonas e a célula hospedeira.<sup>2</sup> O *T. vaginalis* pode ser infectado com vírus de dupla fita de RNA, denominados *T. vaginalis* vírus (TVV). A infecção viral pode ter implicações importantes para a virulência dos tricomonas e a patogênese da doença.<sup>3</sup> Além disso, isolados de *T. vaginalis* podem ser naturalmente infectados por *Mycoplasma hominis*, uma pequena bactéria intracelular que se hospeda no citoplasma do parasito por endocitose. Estudos demonstram que *T. vaginalis* infectados por *M. hominis* podem apresentar-se mais citotóxicos contra células epiteliais do que os parasitos não infectados.<sup>4</sup>

Nucleotídeos extracelulares são liberados por células em condições de estresse, anóxia ou injúria e podem ser inativados por hidrólise via ectonucleotidasas. As enzimas da família das E-NTPDases fazem a hidrólise de nucleosídeos tri e di- fosfatos e a ecto-5'-nucleotidase é capaz de hidrolisar os nucleosídeos monofosfatos, produzindo adenosina, com efeito anti-inflamatório capaz de reverter os efeitos pró-inflamatórios causados pelo ATP.<sup>5,6</sup>

Considerando a elevada prevalência da tricomonose e ocorrência de simbiose em isolados de *T. vaginalis* e TVV e *M. hominis*, os objetivos do presente estudo foram avaliar a citotoxicidade *in vitro* de isolados de *T. vaginalis* frente a células epiteliais vaginais humanas e determinar o perfil de hidrólise extracelular de nucleotídeos de diferentes isolados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo dos parasitos:

Foram selecionados sete isolados clínicos frescos de *T. vaginalis* previamente avaliados quanto à ausência ou presença de TVV e *M. hominis* (Tabela 1). Os isolados de *T. vaginalis* foram cultivados em meio TYM, pH 6,0, suplementado com 10% de soro bovino a 37°C. A linhagem de células epiteliais humanas utilizada foi HMVII, cultivada em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de soro, a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

Tabela 1: Presença de *M. hominis* e TVV nos isolados de *T. vaginalis*

	TVLACM5	TVLACM11	TVLACM15	TVLACM22	TVLACM24	TVLACH4	TVLACH6
<i>M. hominis</i>	+	+	-	+	+	-	+
TW 1	+	+	-	-	+	+	+
TVV 2	-	+	-	-	+	+	-
TVV 3	-	+	-	-	+	+	+
TVV 4	-	+	-	-	-	+	-

Cultivo das células:

As células HMVII foram semeadas em microplacas de 96 poços e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> até obterem confluência. Os tricomonas, em densidade de 5,0 x 10<sup>4</sup> trofozoítos/mL, foram adicionados à monocamada confluyente de células. Os parasitos e as células foram co-incubados a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 4 horas.

Avaliação da citotoxicidade:

A citotoxicidade dos tricomonas foi determinada pela liberação de lactato desidrogenase (LDH) das células HMVII utilizando-se o kit *CytoTox-One homogeneous membrane integrity assay* (Promega®), de acordo com as instruções do fabricante.

Atividade enzimática:

A atividade específica foi determinada através da liberação de fosfato (Pi) por método colorimétrico e expressa em nmol Pi/h/mg de proteína<sup>6</sup>. Os parasitos foram incubados por 30 minutos e a densidade dos parasitos foi ajustada para manter a linearidade da reação.

## RESULTADOS

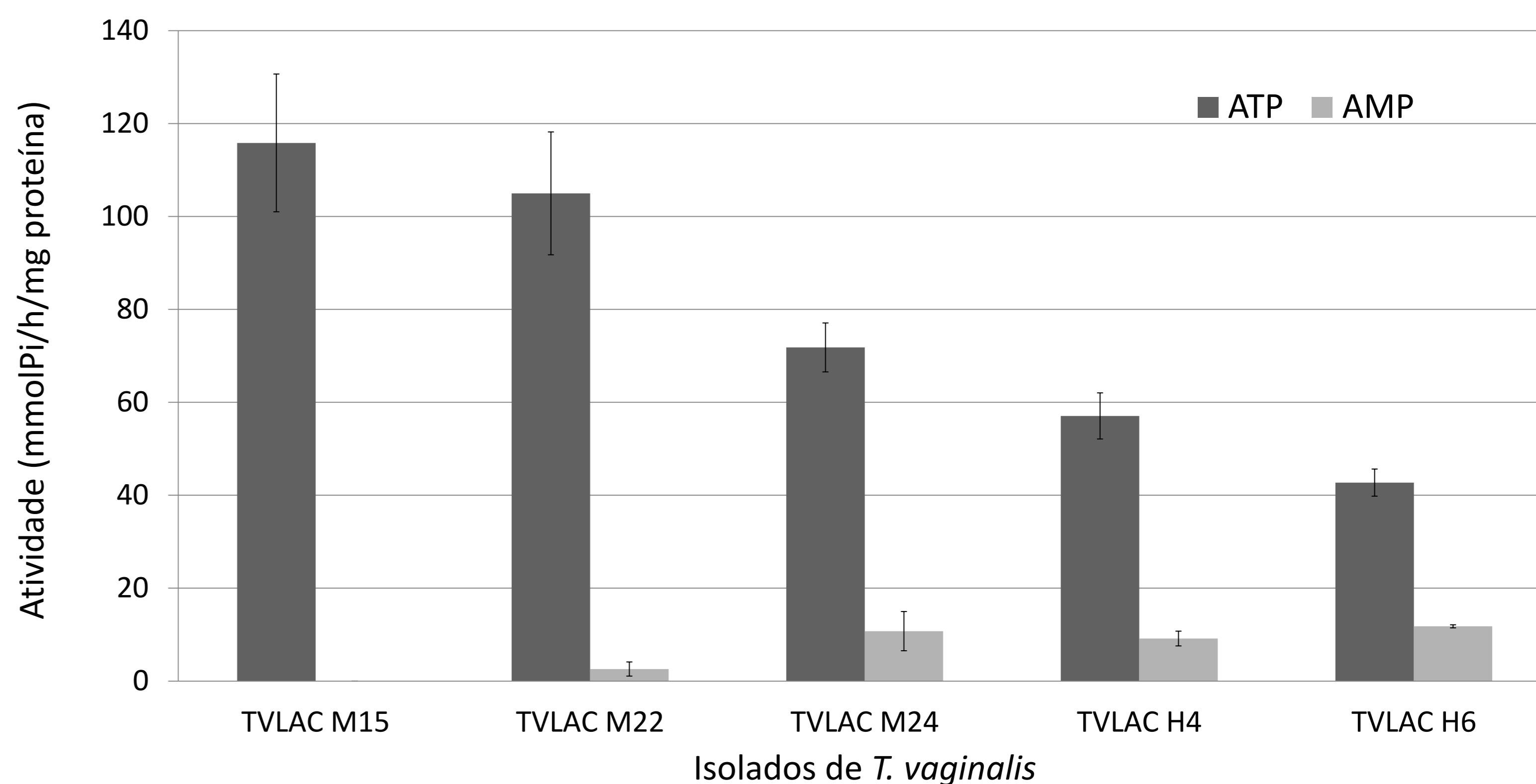
Tabela 2: Citotoxicidade de isolados de *T. vaginalis* às células epiteliais vaginais.

Isolado	Citotoxicidade (%)*
Background**	18,3 ± 4,8
TV LACM5	20,9 ± 4,3
TV LACM11	27,2 ± 3,6
TV LACM15	28,1 ± 10,8
TV LACM22	23,2
TV LACM24	21,1 ± 7,7
TV LACH4	14,1
TV LACH6	24,8 ± 6,5

\* Valores são média ± desvio padrão.

\*\*Liberação de LDH das células HMVII sem exposição aos isolados.

Figura 1: Atividade específica de hidrólise extracelular de nucleotídeos (ATP e AMP) em diferentes isolados de *T. vaginalis*. Dados representam média ± desvio padrão da atividade determinada conforme descrito nos Materiais e Métodos.



## CONCLUSÕES PRELIMINARES

- Todos os isolados de *T. vaginalis* testados apresentaram efeito citotóxico contra as células epiteliais vaginais humanas (HMVII), sendo que o isolado TVLACM15, não infectado por TVV e *M. hominis*, apresentou o efeito mais citotóxico (28,1%).
- Com relação à hidrólise de ATP pela NTPDase, todos os isolados apresentaram atividade, sendo que os isolados provenientes de pacientes do sexo feminino (TVLACM) apresentam atividade mais elevada que os provenientes de pacientes do sexo masculino (TVLACH). Este dado indica a eficiente remoção do ATP citotóxico e pró-inflamatório pelos isolados TVLACM, corroborando com o parasitismo bem sucedido do *T. vaginalis* em mulheres.
- Por outro lado, a hidrólise de AMP foi significativamente mais baixa em todos os isolados, destacando-se o isolado TVLACM15 que não apresentou atividade. A deficiência na atividade de ecto-5'-nucleotidase em isolados de *T. vaginalis* pode estar associada a maior virulência e produção de sintomas, visto que não é produzida adenosina com efeitos anti-inflamatórios. Nossos dados mostraram que o isolado TVLACM15 não apresentou atividade de ecto-5'-nucleotidase e foi o mais citotóxico contra células HMVII.
- Os resultados preliminares mostram a citotoxicidade de *T. vaginalis* contra as células epiteliais vaginais humanas (HMVII), e indicam que o efeito é devido principalmente a fatores de virulência do parasito, mais do que a presença de TVV e *M. hominis*. Experimentos adicionais estão em andamento para esclarecer o mecanismo de citotoxicidade de *T. vaginalis* contra células epiteliais vaginais humanas.

## REFERÊNCIAS

- 1 WHO, Geneva, 1-28
- 2 Petrin, D. Clin Microbiol Rev. 11:300-317
- 3 Fraga, J. et al. Infect Genet Evol. 12: 113-120
- 4 Fraga, J. et al. Experimental Parasitology. 131:393-398
- 5 Robson, S.C. et al. Purinergic Signal 2: 409-430
- 6 Chan, K. et al. Anal. Biochem. 157: 375-380

## AGRADECIMENTOS