

Estudios preliminares sobre la interacción de CD59 y *Trichomonas vaginalis*

Miguel de Górgolas Fernández-Chacón. Pablo Escario Gómez.

Grado en Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
mdegorgo@ucm.es.

Tutores

Alexandra Ibáñez Escribano. José Antonio Escario.

Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia. UCM. CEI Moncloa.
alexandraibanez@ucm.es escario@ucm.es

Resumen: CD59, molécula que se encuentra en la superficie de muchas células de mamíferos, tiene la función de proteger de la lisis producida por el sistema del complemento, parte esencial en el sistema inmunitario de los Mamíferos. Esta propiedad es aprovechada por muchos organismos patógenos con el ánimo de escapar de la acción del sistema del complemento. Para ello algunos microorganismos han desarrollado la capacidad de expresar en su superficie análogos de esta molécula o bien, secuestrarla de las células del hospedador. En estudios previos llevados a cabo en el departamento de Parasitología, se ha observado por primera vez la capacidad del protozoo humano *Trichomonas vaginalis* de sustraer dicha molécula de los glóbulos rojos. En base a estos hallazgos, en el presente trabajo se han llevado a cabo distintos ensayos de lisis poniendo en contacto dos aislados distintos de *T. vaginalis* con suero bovino no descomplementado. Los resultados obtenidos en los estudios de fluorimetría determinan de manera preliminar el papel protector que CD59 ejerce sobre estos protozoos después de haber sido cocultivados con glóbulos rojos murinos.

Palabras clave: Complemento, CD59, Evasión, *Trichomonas vaginalis*.

INTRODUCCIÓN

Trichomonas vaginalis es el parásito urogenital humano causante de unas de las infecciones de transmisión sexual (ITS) más importantes del mundo, con una incidencia anual de 276 millones de casos ⁽¹⁾. *T. vaginalis* parasita los conductos genitourinarios, habiendo desarrollado diversos mecanismos para sobrevivir en un ambiente hostil expuesto a continuos cambios hormonales y de pH asociados a los ciclos menstruales de la mujer ⁽²⁾.

La mayoría, por no decir todos los organismos patógenos utilizan diversos mecanismos de evasión u ocultación que les permiten evadir la respuesta inmunitaria del hospedador. Uno de los mecanismos más potentes con que cuenta la respuesta inmunitaria, es el Sistema del Complemento. Por ello no es de extrañar que durante el proceso de co-evolución hospedador-parásito, este último haya desarrollado mecanismos de simulación y enmascaramiento que le permitan escapar de la acción del Sistema Inmune. Dentro de esta batería de acciones evasivas se encuentran el mimetismo molecular, la neutralización de diversos mecanismos de ataque, la modulación de la respuesta, así como, el secuestro de moléculas propias del hospedador con el objetivo de “disfrazarse” y evitar de este modo, la respuesta inmunitaria del hospedador ^(3,4).

T. vaginalis, como parásito extracelular no puede ser ajeno a estas acciones defensivas que le proporcionará resistencia a los ataques del Sistema Inmunitario y en particular a la acción del Complemento. En este sentido se ha demostrado la capacidad que tiene este protozoo de romper las moléculas C3 adheridas a su superficie mediante la acción de cisteín-proteasas que el parásito es capaz de expresar ⁽⁵⁾. Asimismo en estudios previos en el Departamento de Parasitología de la UCM, se ha comprobado mediante un trabajo de investigación (no publicado), la habilidad que tiene este protozoo para “robar” la molécula CD59 presente en la superficie de las células del hospedador. Dicha molécula está implicada en procesos de inhibición de la formación del Complejo de Ataque a la Membrana (CAM) con el fin de evitar la acción lítica del complemento sobre las células propias ⁽⁶⁾.

Este trabajo, tras haber comprobado la presencia de esta molécula en la superficie de dos aislados de *T. vaginalis* (C1NIH e IR78) co-cultivados con glóbulos rojos murinos (GRm) (Fig.1a y 1b), y su ausencia en los cultivos de los parásitos que no han tenido contacto con células del hospedador (Fig. 1C), trata del estudiar la resistencia intrínseca que tienen las diferentes cepas a la acción del complemento y la capacidad que adquieren los protozoos de resistir la acción lítica después de haber sido co-cultivados con glóbulos rojos murinos.

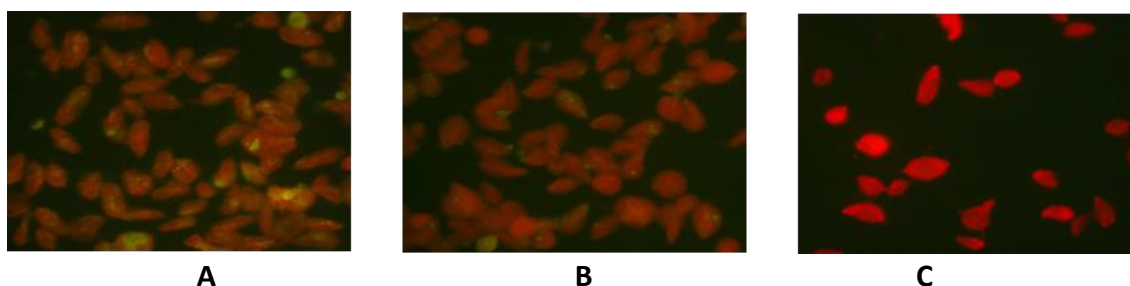


Figura 1. Resultados de las pruebas de inmunofluorescencia sobre C1NIH (A) e IR78 (B) cultivados con GRm y *T. vaginalis* crecidas *in vitro* sin GRm (C).

MATERIAL Y METODOS

Para el presente trabajo se han utilizado dos cepas de *T. vaginalis*: C1NIH (Referencia 30001) e IR78 (referencia 50138) de la American Type Culture Collection (ATCC). El medio de cultivo empleado fue TYM-Diamond (pH 6-6,4) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF) inactivado por calor y solución antibiótica. Los protozoos fueron cultivados en tubos de vidrio estériles a 37 °C y 5% de CO₂ realizando pases cada 48-72 horas.

Para estudiar la sensibilidad al complemento se co-cultivaron ambos aislados con glóbulos rojos obtenidos de ratón (GRm), tratados con heparina y centrifugados a 3500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente fueron lavados en PBS estéril por duplicado y almacenados a 4 °C. Los co-cultivos con el parásito se realizaron en medio TYM a pH 7.

Con el objetivo de estudiar la dinámica de crecimiento de ambos aislados de *T. vaginalis* en presencia de SBF sin descomplementar y de esta forma comprobar la protección que ejerce el secuestro de la molécula CD59 por parte del parásito; se llevaron a cabo ensayos de lisis empleando cultivos *in vitro* de los aislados en presencia y ausencia de GRm (0,2% v/v). En todas las determinaciones se procedió a un recuento de los flagelados en cámara de Neubauer ajustando la concentración de trofozoitos a 250000/tubo. A continuación se añadieron distintos volúmenes de SBF sin descomplementar (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mL) completando hasta un volumen final de 2 ml por tubo con medio TYM. Posteriormente tras incubar los tubos durante 1,5 h a 37 °C y 5% de CO₂, se traspasaron 200 µL del contenido de cada tubo a una placa de 96 pocillos. A continuación la placa se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos para eliminar el sobrenadante. Finalmente, los trofozoitos se resuspendieron en 200 µL de tampón fosfato PBS suplementado con glucosa al 0,1% y 20 µL del colorante redox resazurina (solución stock 3 µM). El recuento de parásito viables, en todos los casos se realizó siguiendo el método descrito por Ibáñez Escribano y col. (2012)⁽⁶⁾.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1, se muestran la media (8 réplicas en dos experimentos) de fluorescencia emitida por los protozoos viables después de mantenerse en contacto con volúmenes crecientes de SBF sin descomplementar, antes y después de haber sido co-cultivadas con GRm. Los resultados mostraron como la cantidad de tricomonádidos viables disminuye a medida que se aumenta la cantidad de SBF, debido a la acción que el complemento presente en el suero ejerce sobre los protozoos.

Volumen SBF	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
C1NIH						
Promedio	11135	8612	8153	7167	6366	6480
C1NIH-GR						
Promedio	6258	5464	5345	5026	4588	3870
IR78						
Promedio	7205	6131	4478	3677	3532	3544
IR78-GR						
Promedio	7697	6426	6032	5601	5368	4970

Tabla 1. Media de los valores de protozoos viables de las dos cepas, cultivadas con y sin glóbulos rojos, en presencia de SBF no descomplementado a distintos volúmenes en ml.

Durante la estandarización del método fluorimétrico para la determinación de la viabilidad de *T. vaginalis* empleando resazurina se comprobó la linealidad existente entre la señal emitida por el fluorímetro y el número de protozoos viables ⁽⁶⁾; por lo que se procedió a realizar la conversión de la señal emitida por el fluorímetro a número de protozoos muertos. Dado el carácter asintótico de la curva, se procedió a valorar los resultados sobre la zona lineal de la misma de 0,2 a 0,6 (Fig. 2). En ella se observa la linealidad de la señal en relación al volumen en la zona de la curva escogida.

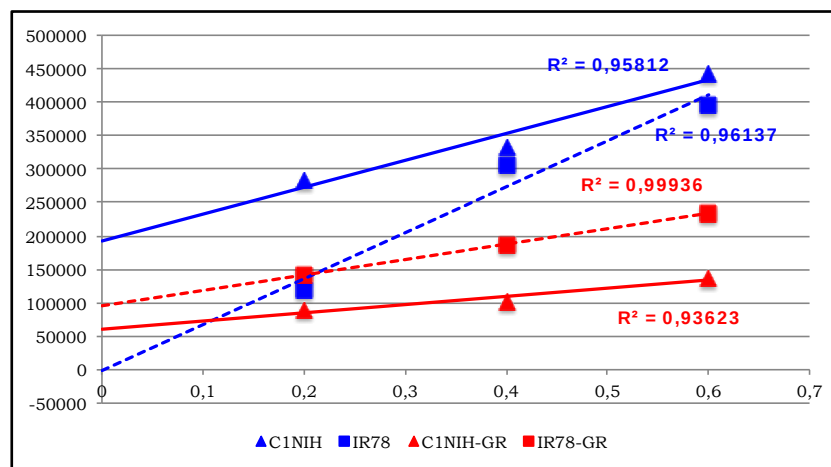


Figura 2: Número de tricomonádidos afectados por el SBF (*Trichomonas*/ml) dentro del rango de linealidad de la curva de crecimiento.

En la figura 3, donde se representan el número de tricomonádidos afectados, se comparan las curvas reales obtenidas experimentalmente frente a las rectas de su comportamiento teórico suponiendo que hubiera linealidad en todo el rango ensayado. En ella se observan que los datos son concordantes a volúmenes bajos, siendo proporcional a una menor cantidad de C3 presente en el SBF, responsable de la activación de la vía alternativa del complemento. Asimismo los resultados obtenidos muestran una sensibilidad al complemento por parte de ambas cepas, coincidente con

lo descrito para otros parásitos ⁽⁷⁾, pudiendo ser esta susceptibilidad una característica intrínseca de las diferentes cepas.

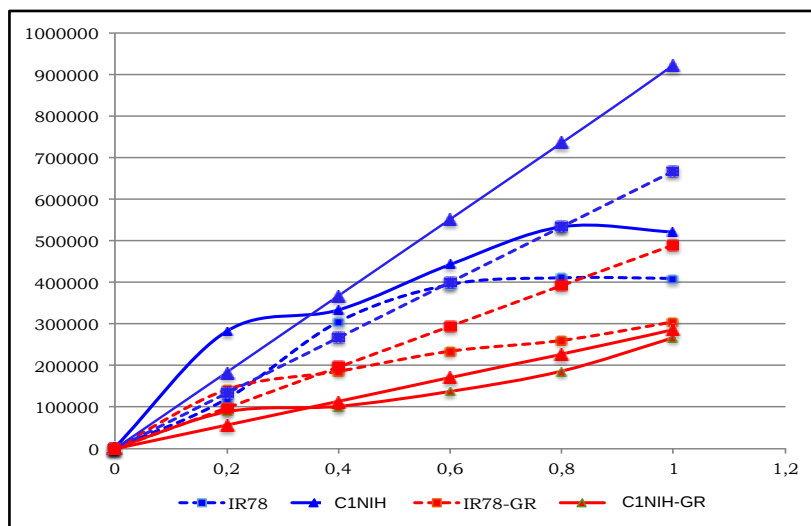


Figura 3: Curvas reales y teóricas del número de protozoos afectados por contacto SBF no descomplementado.

En esta línea se observa que la cepa más sensible al complemento corresponde a la cepa C1NIH, catalogada como cepa de alta patogenicidad por la ATCC con un valor de más de 900.000 protozoos afectados por 1 ml de suero. Asimismo, esta cepa se convierte en la más resistente al complemento, triplicando su resistencia cuando es co-cultivada con glóbulos rojos. Este aumento de resistencia es en gran parte debido a la adquisición de CD59 “robada” de los glóbulos rojos. En las microfotografías de la figura 1, se observa como la cantidad de CD59 adquirida por la C1NIH es muy superior a la que se observa en la cepa IR78. Circunstancia que puede explicar que la cepa sin tratar pase de ser la más sensible a la más resistente después del co-cultivo con GRm. En cuanto a la sensibilidad intrínseca, la C1NIH muestra unos porcentajes de sensibilidad del 12% mientras que en la IR78 es del 17%. Esta situación varía tras su tratamiento con GRm. Así la IR78 tan sólo aumenta en un 6% su resistencia, mientras que C1NIH aumenta hasta el 39%, siendo similar a lo que se ha observado en otros parásitos, como *Trypanosoma cruzi*, en los que la adquisición de ácido siálico le confiere un aumento de la resistencia al complemento de entre el 5 y el 24% ⁽⁸⁾.

CONCLUSIONES

La sensibilidad al complemento, activado por la vía alternativa parece ser una característica intrínseca de las cepas

Esta molécula interviene aumentando la supervivencia del parásito, otorgándole la capacidad de hacer frente a los ataques del sistema del complemento y constituye

otro de los numerosos mecanismos de resistencia y evasión de la respuesta inmune que tienen estos flagelados.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections-2008. World Health Organization; 2012.
2. Hickey DK, Patel MV, Fahey JV et al. Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: Stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. J.Reproductive Immunol. 2011; 88(2):185–194.
3. Würzner R. Evasion of pathogens by avoiding recognition or eradication by complement, in part via molecular mimicry. Molecular Immunology. 199; 36: 249-260.
4. Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV. Complement evasion by human pathogens. Nature Reviews Microbiology. 2008; 6(2): 132-142.
5. Alderete JF, Provenzano D, Lehker MW. Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. Microbial Pathogenesis. 1995; 19:93-103.
6. Ibáñez Escribano A, Meneses Marcel A, Machado Tugores Y, et al. Validation of a modified fluorimetric assay for the screening of trichomonacidal drugs. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2012; 107(5): 637-645.
7. Demes P, Gombosova A, Valent M et al. Fewer *Trichomonas vaginalis* organisms in vaginas of infected women during menstruation. Genitourin Med. 1988; 64:22-24.
8. Tomlinson S, Pontes de Carvalho LC, Vandekerckhove F et al. Role of sialic acid in the resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. Journal of Immunology. 1994; 153: 3141-3147.

Recibido: 17 marzo 2014.

Aceptado: 26 abril 2014.