

# TRICHOMONAS VAGINALIS EN MEDIOS DE CULTIVO: CONSUMO PROTEICO

SIXTO COSTAMAGNA, GABRIELA NIIZAWA, GABRIELA BALOGH\*

**Resumen:** Con el fin de continuar experiencias relacionadas con la endocitosis del parásito *Trichomonas vaginalis*, en el presente trabajo se comparó la composición proteica de cultivos líquidos con desarrollo de este flagelado y sin él.

Las muestras de flujos vaginales pertenecían a mujeres cuya edad estaba comprendida entre 15 y 40 años y que presentaban tricomoniasis activa. Los exudados vaginales inoculados en medio de cultivo Diamond fueron centrifugados y sonificados. Se dosó su contenido proteico y se separaron las proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida. Del análisis de los resultados de las diferentes muestras, pudo observarse que *T. vaginalis* consumió proteínas de peso molecular (PM) aparente entre 14 y 60 kDa y agotó el medio de cultivo, lo que quizá explique la declinación de la curva de crecimiento del parásito a las 48/72 horas, luego de haber sido sembrado en el medio de cultivo. El parásito presenta proteínas de PM aparente entre 70-100 kDa que pueden ser propias, o metabolitos proteicos excretados por él. Se comprobó, además, que la presencia de elementos levaduriformes que ejercen un efecto negativo sobre el crecimiento de *T. vaginalis* produce liberación, en el medio, de proteínas de PM de 180 kDa.

## Introducción

La tricomoniasis es una afección producida por el parásito *T. vaginalis* que afecta, en la actualidad, a un número impredecible de mujeres de todo el mundo (se calcula que, en los Estados Unidos, el número de mujeres infectadas es de 2 500 000). Provoca desde leves molestias genitales, hasta vulvovaginitis con abundante producción de flujo verdoso, maloliente y espumoso. En el varón,

puede ser asintomática o bien provocar uretritis difíciles de curar. <sup>(1-3)</sup> En Bahía Blanca, la prevalencia de esta parasitosis por consultas al ginecólogo en hospitales públicos es del 23,5%. <sup>(4)</sup>

Si bien son numerosos los estudios existentes, ellos no alcanzan para dilucidar los mecanismos fisiológicos de la enfermedad ni explicar la alta incidencia de esta parasitosis, cuya forma de contagio es directa y sin formas de resistencia descritas.

-----  
\* Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia.  
Universidad Nacional del Sur. San Juan 670  
8000 - Bahía Blanca, Argentina.  
E-mail: rcostama@cruba.edu.ar

*T. vaginalis* no logra sobrevivir en cualquier medio, pues necesita nutrientes muy seleccionados, ya que no es capaz de sintetizar gran cantidad de proteínas, como lo demuestra el poco desarrollo de su retículo endoplasmático rugoso. <sup>(5)</sup> Es parásito obligado y presenta receptores de membrana de especificidad aún no determinada. <sup>(6-8)</sup> Se procedió a comparar la composición proteica de medios de cultivo inoculados con flujos vaginales de mujeres con tricomoniasis activa, a fin de aportar nuevos conocimientos referidos al comportamiento *T. vaginalis* en medios de cultivo y sus proteínas para aclarar, en parte, la fisiopatología del parásito en el humano.

### Materiales y métodos

#### *Cultivos de Trichomonas vaginalis*

Se utilizaron muestras de flujo vaginal obtenidas de fondo de saco, de una población de mujeres parasitadas con *T. vaginalis*, cuyas edades estaban comprendidas entre los 15 y 40 años. Los flujos vaginales fueron sembrados en medio de cultivo Diamond (Menarini. Cod Tric-20. Ref 1038. Barcelona, España), e incubados durante 72 horas a 37° C. Posteriormente, se concentraron *T. vaginalis* por centrifugación, y el sedimento se guardó en freezer a -20° C, hasta su procesamiento.

#### *Preparación de las muestras*

Las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 5000 r.p.m a 7° C.

Se descartó el sobrenadante, y el sedimento se resuspendió en 100 µl de buffer de homogeneización con contenido de Tris-HCl 20,0 mM pH:7,4; sacarosa 0,33 M; EGTA 5,0 mM; CaCl<sub>2</sub> 0,7 mM; fenilsulfonil flúor (PMSF) 0,5 mM; DTT 1,0 mM; leupeptina 40,0 µg/ml y aprotinina 40,0 µg/ml. Posteriormente, las muestras fueron sonicadas durante 20 segundos a 5 ciclos/min. con sonicador Vibra-Cell, y se tomaron alícuotas de 10 µl cada una para determinar el contenido proteico de las muestras y del medio de cultivo, empleando el método de Lowry. <sup>(9)</sup>

#### *Electroforesis en gel de poliacrilamida*

La separación de las proteínas se realizó de acuerdo con el método de Laemmli, <sup>(14)</sup> el cual se basa en la diferente velocidad electroforética de las proteínas, de acuerdo con su peso molecular. Las muestras se mezclaron con igual volumen de buffer muestra pH 6,8 2X (SDS 2,0%; sacarosa

10,0 %; Tris-HCl 10,0 mM; β-mercaptoetanol 0,1%, azul de bromofenol 0,2 mg). Se calentaron durante cinco minutos a ebullición, para favorecer la desnaturalización de las proteínas, y se congelaron a -20° C hasta el momento de su uso.

Se sembraron las muestras (100 µg de proteínas) en gel de poliacrilamida al 10 % y se procedió a la corrida electroforética aplicando una intensidad de corriente de 30 mA por placa, durante aproximadamente 45 minutos. Posteriormente, se tiñeron los geles con Coomassie Brilliant Blue R-250, se destiñeron con solución decolorante, se secaron al vacío y se determinó el peso molecular aparente de las bandas proteicas por comparación con la movilidad electroforética de los estándares empleados. Paralelamente a las muestras, se procesaron los componentes proteicos del medio de cultivo utilizado: suero inactivado de caballo, peptona, extracto de levadura y agar.

### Resultados

En la figura 1, se puede observar la corrida electroforética en gel de poliacrilamida. Las calles 1 y 8 corresponden a los estándares de PM; las calles 3 y 4 corresponden al medio de cultivo de *T. vaginalis*; las calles 5 y 7 corresponden a cultivo de 72 horas de *T. vaginalis* y la calle 6 corresponde a cultivo de *T. vaginalis* con elementos levaduriformes.

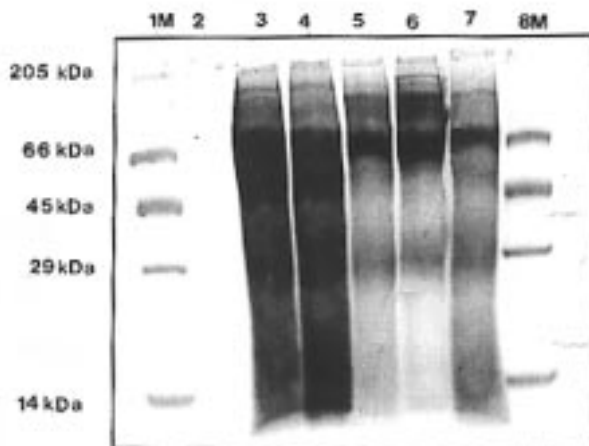
Del análisis del perfil proteico de las muestras, se desprende que:

1. El medio de cultivo utilizado contiene varias proteínas de peso molecular aparente entre 14 y 200 kDa.

2. En el medio sembrado con el desarrollo *T. vaginalis* puede visualizarse una marcada disminución de las bandas correspondientes a proteínas de peso molecular aparente entre 14 y 60 kDa. En experiencias paralelas, pudimos visualizar que estas bandas corresponderían al suero inactivado de caballo que contiene el medio (resultados no mostrados). En las calles 5, 6 y 7, también se puede observar la aparición de bandas de peso molecular aproximado entre 70 y 100 kDa, que no se visualizan en las calles donde se corrió el medio sin sembrar.

3. En la calle 6, se puede observar la aparición de una banda de peso molecular aparente de 180 kDa, que no se presenta en las demás calles.

Figura 1 - Corrida electroforética en gel de poliacrilamida de *Trichomonas vaginalis* en medios de cultivo líquidos.



### Conclusiones

En los medios con desarrollo de *T. vaginalis*, aparecen bandas proteicas de peso molecular aparente entre 70 y 100 kDa, las que podrían ser estructurales de los parásitos o metabolitos proteicos excretados por ellos. Del análisis del perfil proteico, se sugiere que *T. vaginalis* consume totalmente las proteínas aportadas por el suero de caballo, presentes en el medio de Diamond (Menarini) durante su desarrollo, en un período de 72 horas. Ésta podría ser una de las razones por las cuales se torna difícil su mantenimiento durante tiempos mayores en los medios de cultivo, además de que sus propios metabolitos podrían ejercer una acción negativa sobre su multiplicación y sobrevivida. Este consumo selectivo de proteínas por parte de la *T. vaginalis* podría relacionarse con las vesículas de endocitosis ya documentadas para este parásito,<sup>(5-6)</sup> ya que, presumiblemente a través de ellas, se incorporarían estas proteínas, tal como ocurre con otros protozoos.<sup>(10-13)</sup>

En virtud de lo expuesto, se concluye que es recomendable aumentar la concentración de suero de caballo en el medio de cultivo de Diamond (Menarini), a fin de permitir una mayor sobrevivida *T. vaginalis* en él, hecho que resulta importante para el mantenimiento del parásito en el laborato-

rio, para ensayos de investigaciones futuras.

### Agradecimientos

A la doctora Ana Russo, por facilitar el instrumental utilizado durante la corrida electroforética.

A la bioquímica Alicia Carrica, del servicio de Bacteriología del Centro de Salud *Doctor Leónidas Lucero*, quien colaboró en la recolección de las muestras.

### Bibliografía

- 1- Mc Lellan R, Spence M, Brockman M, Rafell L and Smith J. The Clinical Diagnosis of Trichomoniasis. *Obstetrics and Gynecology*.1982; 60: 30-4.
- 2- Thomason J and Gelbart S. *Trichomonas vaginalis*. *Obstetrics and Gynecology*.1989, 74: 536-41.
- 3- Catterall RD. Infecciones del aparato genital por *Trichomonas*. *Clin Med*,1972, 11: 1203-9.
- 4- Costamagna SR, Vaylet Susana, Prado M y Mezquita L. Trichomonosis: validación de tres pruebas para el diagnóstico por el laboratorio de análisis clínicos. *Parasitol al día*. 1997; 21: 61-5.
- 5- Costamagna SR y Prado Figueroa M. Ultraes-

- estructura de *Trichomonas vaginalis*. Parasitol al día, 1995; 19: 423-4.
- 6- Costamagna SR y Prado Figueroa M. Receptores de membrana en *Trichomonas vaginalis*. XI Congreso Latinoamericano de Parasitología, Lima, Perú. 1993.
  - 7- Terkuile BH and Muller M. Maltosa utilization by extracellular hydrolysis followed by glucose transporte in *Trichomonas vaginalis*. Parasitology 1995; 110: 37-44.
  - 8- Alderete JF. The mechanisms and molecules involved in cytoadherence and pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. Parasitology Today 1995; 11:70-4.
  - 9- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with foling Phenol-reagent. Journal Biol Chem 1951; 193: 265-75.
  - 10- Webster P. Endocytosis by African trypanosomes. Eur J Cell Biol 1989, 49: 295-302.
  - 11- Shapiro SZ and Webster P. Coated vesicles from the Protozoan parasite *Trypanosoma brucei*: purification and characterization. J Protozool 1989; 36: 344-9.
  - 12- Coppens I, Opperdoes FR, Courtoy P and Baudhuin P. Receptor mediated endocytosis in the bloodstream from *T. brucei*. J Protozool. 1987; 34: 465-73.
  - 13- Pearsons M. Protozoan Cell organelles. Marr, J and Muller, M. Biochemistry and Molecular Biology of Parasites. Academic Press. London, 1995; 233-56.
  - 14- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T IV. Nature. 1970; 227: 680-5.