

Determinación de Marcadores Moleculares para el Estudio de la Patogenia de *Trichomonas vaginalis*

Determining Molecular Markers on the Study of *Trichomonas vaginalis* Pathogenia

Ana Lira Olmos

Tutora:

Alexandra Ibáñez Escribano

Universidad Complutense de Madrid

Resumen

En este trabajo se ha estudiado la patogenia de diferentes aislados de *Trichomonas vaginalis* (agente etiológico de una de las infecciones de transmisión sexual más importantes) mediante el estudio de factores biológicos que podrían resultar influyentes como la sensibilidad al metronidazol, la presencia de virus (TVV o virus de *T. vaginalis*) o de *Mycoplasma hominis* (Mh); así mismo se ha realizado la caracterización genotípica de los mismos estudiando 3 microsatélites (MS) específicos. Los resultados obtenidos han demostrado que este parásito es capaz de desarrollar múltiples mecanismos de patogenia, lo que le permite vivir en un medio tan hostil como el genitourinario. Además, nos ha permitido llevar a cabo una correlación con estudios previamente realizados, que diferencian los aislados de este patógeno en “Tipo I y Tipo II”. Siendo los de Tipo I más sensibles al metronidazol, TVV⁺, *M. hominis*⁺ y con las regiones de MS conservadas; al contrario que los de Tipo II que son resistentes al metronidazol, TVV⁻, *M. hominis*⁻ y con alguna mutación en los MS, por lo que se cree que los de Tipo II han evolucionado más recientemente a partir de los de Tipo I.

Palabras clave: *Trichomonas*, *patogenia*, *microsatélite*, *virus*, *Mycoplasma*.

Abstract

In this work we have studied the pathogenesis of different *Trichomonas vaginalis* isolates (etiological agent of one of the most important sexually transmitted infections) by studying biological factors that could be influential such as sensitivity to metronidazole, presence of virus (TVV or *T. vaginalis* virus) or *Mycoplasma hominis*; likewise, the genotypic characterization of this microorganism has been carried out by studying three specific microsatellites (MS). The results obtained have shown that this parasite is able to develop multiple mechanisms of pathogenesis, allowing it to live in a medium as hostile as the genitourinary. Besides, it has allowed us to carry out a correlation with previous studies, which differentiate isolates of this pathogen in Type I and Type II. Type I isolates are more sensitive to metronidazole, TVV⁺, *M. hominis*⁺ and their MS regions are conserved; in contrast to those of Type II that are resistant to metronidazole, TVV⁻, *M. hominis*⁻ and with some mutation in the MS, so it is believed that Type II have evolved more recently from Type I.

Keywords: *Trichomonas*, *pathogenesis*, *microsatellite*, *virus*, *Mycoplasma*.

Introducción

La tricomonosis es la infección de transmisión sexual (ITS) de origen no viral de mayor morbilidad en el mundo, con más de 280 millones de casos anuales, producida por el parásito *Trichomonas vaginalis* (World Health Organization, WHO, 2012). Las investigaciones científicas de las últimas décadas han demostrado que la gravedad de esta ITS es debida no tanto a la clínica sino a las consecuencias derivadas de su padecimiento. En embarazadas, *T. vaginalis* puede ocasionar graves complicaciones. Así mismo, la inflamación local que ocasiona el parásito favorece la transmisión de otras ITS como gonorrea, papilomavirus o VIH entre otras. Además, es un factor de riesgo en el desarrollo de lesiones neoplásicas de cérvix y próstata (Schwebke y Burgess, 2004).

T. vaginalis ha logrado una excelente adaptación al medio genitourinario en el que vive habiendo desarrollado numerosos mecanismos de patogenia que le permiten colonizar al hospedador y evadir su respuesta inmune fácilmente. Así mismo, otro dato relevante es que cuenta con uno de los genomas más grandes jamás secuenciados en proporción a su pequeño tamaño (Conrad et al., 2012). A pesar de todo lo anteriormente mencionado, *T. vaginalis* ha recibido poca atención por parte de los organismos de salud, resultando innumerables las dudas que se plantean sobre la capacidad adaptativa de este parásito a un entorno tan hostil; siendo necesario continuar con los estudios que arrojen luz sobre los mecanismos de interacción parásito-hospedador.

En este trabajo se aborda el estudio de la patogenia de 6 aislados diferentes de este parásito mediante el estudio de factores biológicos que podrían resultar influyentes como la sensibilidad al fármaco de referencia (metronidazol), la presencia de virus (TVV o virus de *T. vaginalis*) o de *Mycoplasma*; así mismo se ha realizado la caracterización genotípica de los mismos estudiando 3 microsatélites (MS) específicos.

Material y métodos

La determinación de la **sensibilidad a metronidazol** (MT) se llevó a cabo en cultivos controlados de 10^5 trofozoitos/mL a los que se les añadieron distintas concentraciones del fármaco. Tras 24 h en contacto con los cultivos, se procedió a la observación de los mismos en un microscopio invertido. La concentración mínima letal (CML) se determinó por triplicado y realizando al menos dos ensayos independientes. La **presencia de TVV** se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta en el que se empleó el anticuerpo monoclonal (AcMo) C20A3 capaz de unirse específicamente a la proteína parasitaria P270, revelando con un conjugado marcado con fluoresceína.

Para la **detección de *M. hominis*** se usó el kit comercial *Mycoplasma Detection Kit* (SouthernBiotech, Birmingham,

USA), que detecta la presencia de esta bacteria mediante la amplificación de una región conservada del ARNr 16S.

La **caracterización molecular** se llevó a cabo tras la extracción del ADN de los aislados usando el kit *Speedtools DNA Extraction Kit* (Biotools B&M Labs. S.A).

Posteriormente se realizó la amplificación de los tres MS mediante PCR siguiendo la pauta descrita por Conrad et al. (2012). El tamaño de los amplicones se determinó en el servicio de genómica de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

Resultados

La **sensibilidad al MT** en los 6 aislados estudiados mostró valores de MIC_{100} por debajo de $46,7 \mu M$ en el 83%. Tan sólo el aislado de referencia de la ATCC IR78 fue resistente ($MIC_{100} = 2991 \mu M$) (Tabla 1).

Las figuras 1 y 2 muestran los resultados de la **determinación de TVV**. Los parásitos infectados expresan P270 en su superficie mostrando fluorescencia verde al emplear el AcMo (C20A3). Mientras que los TVV⁻ se muestran de color rojo. Tal y como refleja la Tabla 1, los aislados JH31A4, S760 y S261 son TVV⁺. Mientras que las muestras IR78, S852 y S351 no presentan virus.

La Figura 3 muestra los resultados obtenidos tras evaluar la **presencia de *M. hominis*** en el ADN extraído de los diferentes aislados. Todas las muestras cuentan con un control interno de PCR, generándose un amplicón de 270 pb. Solamente los aislados frescos S760 y S351 mostraron ser Mh + apareciendo una banda a 500 pb (Tabla 1). Los resultados de la **caracterización molecular** mediante la determinación del tamaño de MS de los seis aislados se pueden apreciar en la Figura 4. La Tabla 1 muestra el tamaño de los amplicones de los tres MS estudiados (MS06, MS129 y MS184). Tres de los aislados presentaron siempre el mismo tamaño de MS mientras que: IR78, S852 y S261 presentaron un tamaño de amplicón diferente en al menos uno de los MS.

Discusión

Como hemos podido comprobar en los resultados obtenidos, en tan sólo seis aislados de *T. vaginalis*, hemos observado una alta variabilidad en factores fenotípicos entre los que destacan la presencia de otros microorganismos en su interior como TVV (50%) o *M. hominis* (33%). En este sentido la existencia de TVV capaces de infectar *T. vaginalis* está relacionado con modificaciones en la expresión de proteínas inmunogénicas de localización citoplasmática, induciendo su expresión en la superficie del parásito favoreciendo la variación fenotípica parasitaria. La presencia de *Mycoplasma* está implicada en el desarrollo de enfermedad inflamatoria pélvica y posibles complicaciones durante

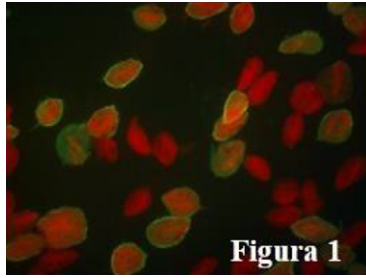


Figura 1

Figura 1. Aislado de *T. vaginalis* TVV+.

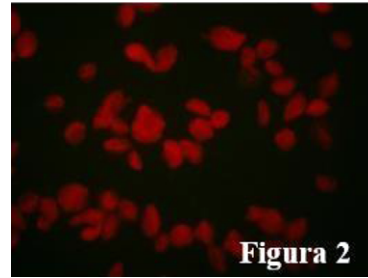


Figura 2

Figura 2. Aislado de *T. vaginalis* TVV-.

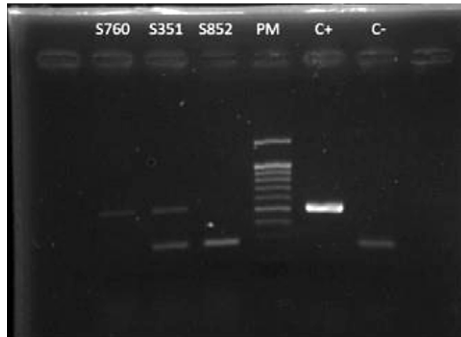


Figura 3. Resultados del gel de electroforesis tras la prueba de detección de *M. hominis* empleando el Kit comercial. Los aislados S760 y S351 (carriles 1 y 2) muestran una banda a la misma altura que el control positivo (carril 5). El aislado S852 (carril 3) sólo presenta banda de control interno de 220pb.

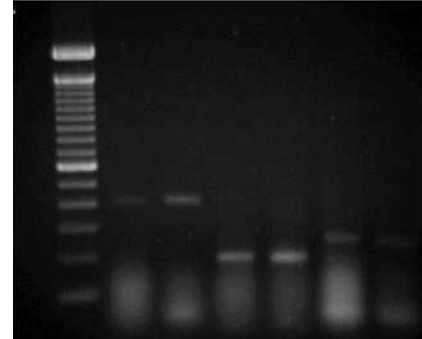


Figura 4. Electroforesis de dos aislados de *T. vaginalis*. En los carriles 1 y 2 se muestran el tamaño del MS06 (~400 pb). Carriles 3 y 4 corresponde a los amplicones del MS129 (~190 pb) y el MS184 con un tamaño en torno a 250 pb (carriles 5 y 6).

Tabla 1

Resumen de los resultados de la caracterización biológica y molecular de los seis aislados de *Trichomonas vaginalis* analizados.

Aislado	JH31A4	IR78	S760			
Tipo	Referencia	Referencia	Fresco	Fresco	Fresco	Fresco
Sensibilidad MTZ	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
S351				S852	S261	
MIC 100 (µM)	23,4	2991	46,7	46,7	23,4	11,7
TVV	+	-	+	-	-	+
Mh	-	-	+	+	-	-
MS06	395	412	395	395	407	412
MS129	192	192	192	192	186	192
MS184	250	250	250	250	250	244

el embarazo. La capacidad de *M. hominis* de sobrevivir en el interior de *Trichomonas* le confiere una protección frente a los antibióticos y al sistema inmune del hospedador. De igual forma, recientes estudios evidencian que la simbiosis con esta bacteria parece conferir ciertos beneficios a *T. va-*

ginalis en términos de aumento de su patogenicidad (Butler, Augustini, Secor, 2010).

De forma paralela, los resultados de caracterización de MS también han mostrado en el 50% de las muestras parasitarias diferentes tamaños en el producto de PCR, lo que es

debido a mutaciones en esta región. Esta alta variabilidad parece explicar cómo este parásito es capaz de desarrollar múltiples mecanismos de patogenia. Nuestros aislados catalogados como Tipo I (JH31A4, S760 y S351) se caracterizan por ser más sensibles al MT, TVV+ y *M. hominis* +, además de tener MS de tamaño constante. Mientras que, los de Tipo II (IR78, S852 y S261) fueron en su mayoría más resistentes al MT, TVV-, *M. hominis* - y con mutaciones en algún MS. Estos resultados coinciden con la hipótesis de Conrad et al. (2012) en el que sugieren que los aislados de Tipo II podrían haber evolucionado más recientemente a partir de los de Tipo I que tendrían características moleculares más conservadas.

Conclusiones

La sensibilidad al MT, la presencia de TVV y la presencia de *Mycoplasma* spp. han demostrado ser características biológicas que permiten agrupar a los aislados en los dos grupos (Tipo I y Tipo II), correlacionándose con los resultados moleculares de los MS 06, 129 y 184 que agrupan en base a la mayor o menor conservación del tamaño de los amplicones.

Referencias

- Butler, S. E., Augostini, P., & Secor, W. E. (2010). *Mycoplasma hominis* infection of *Trichomonas vaginalis* is not associated with metronidazole-resistant trichomoniasis in clinical isolates from the United States. *Parasitology Research*, 107(4), 1023-1027. <http://doi.org/10.1007/s00436-010-1975-y>
- Conrad, M. D., Gorman, A. W., Schillinger, J. A., Fiori, P.L., Arroyo, R., Malla, N., ... Carlton, J. M. (2012). Extensive genetic diversity, unique population structure and evidence of genetic exchange in the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(3), e1573. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001573>
- Kissinger, P. (2015). Epidemiology and treatment of trichomoniasis. *Current Infectious Disease Reports*, 17, 31. <http://doi.org/10.1007/s11908-015-0484-7>
- Schwebke, J. R., & Burgess, D., (2004). Trichomoniasis. *Clinical Microbiological Reviews*, 17, 794-803. <http://doi.org/10.1128/CMR.17.4.794-803.2004>
- World Health Organization (WHO) (2012). *Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted diseases - 2008*. Geneva, Switzerland: Author.