

Efecto protector de una proteinasa contra la infección por *Trichomonas vaginalis* en el tracto genital murino

Hilda Hernández, Mabel Figueredo, Nidia Garrido, Idalia Sariego, Jorge Sarracent

Departamento de Parasitología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"
Apartado Postal 601, Marianao 13, La Lisa
E-mail: hilda@ipk.sld.cu

RESUMEN

Trichomonas vaginalis infecta el epitelio escamoso del tracto urogenital humano, y el mecanismo exacto por el que parasita los tejidos y produce la enfermedad no se conoce con exactitud. Sin embargo, algunos autores coinciden en que la adhesión del parásito a células epiteliales vaginales, constituye el paso inicial en el establecimiento de la infección. *T. vaginalis* posee altos niveles de actividad proteolítica, y se ha demostrado que algunas de estas proteinasas participan en el establecimiento de la infección. Como aún no se ha reportado un candidato vacunal efectivo y debido a que algunas pacientes que padecen de esta parasitosis han manifestado resistencia al metronidazol, surge la necesidad de desarrollar una nueva estrategia para el control de esta afección. Se estudió la importancia de una proteinasa de excreción-secreción, cuyo peso molecular es 62 kDa, en la citoadherencia del parásito a células epiteliales. Se demostró que anticuerpos monoclonales (AcMs) contra esta enzima son capaces de inhibir este proceso *in vitro* e *in vivo* y que la proteinasa de 62 kDa, administrada por vía intranasal con toxina colérica y oligodexonucleótidos con motivos CpG, es capaz de proteger a los ratones ante un reto intravaginal. Estos resultados sugieren que la proteinasa de 62 kDa es un posible candidato vacunal contra la trichomonosis, enfermedad para la cual no existe una vacuna efectiva.

Introducción

En el mundo, cada año, alrededor de 170 millones de personas padecen infección por *Trichomonas vaginalis*, una de las infecciones de transmisión sexual más comunes, de amplia distribución geográfica y frecuente en todos los continentes [1]. Existen evidencias de que *T. vaginalis* está asociada con una variedad de problemas de salud, tanto en hombres como en mujeres, incluyendo el incremento en la transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana, de la neoplasia cervical intraepitelial en mujeres, de la uretritis no gonocócica y de la prostatitis crónica en hombres [2]. Este parásito infecta el epitelio escamoso del tracto urogenital humano, y el mecanismo exacto por el que parasita los tejidos y produce la enfermedad no se conoce con exactitud. Sin embargo, algunos autores coinciden en que la adhesión del parásito a las células epiteliales vaginales, constituye el paso inicial en el establecimiento de la infección. *T. vaginalis* posee elevados niveles de actividad proteolítica, y se ha demostrado que algunas de estas proteinasas participan en el establecimiento de la infección [3]. Garber y Lemchuk-Favel purificaron y caracterizaron parcialmente una proteinasa de 60 kDa, que estaba presente en todos los aislamientos de *T. vaginalis*, y sugirieron que esta proteinasa podía ser útil para el diagnóstico de la enfermedad [4]. Al no existir un candidato vacunal efectivo y aparecer resistencia al medicamento más empleado en su tratamiento, el metronidazol, manifestada en pacientes que padecen esta infección, surge la necesidad de desarrollar una estrategia eficaz para el control de esta parasitosis. Se estudió entonces la importancia de la proteinasa de excreción-secreción, cuyo peso molecular es 62 kDa (se demostró que es la misma proteinasa que pesaba 60 kDa, reportada por Garber y Lemchuk-Favel en 1989), en la

citoadherencia del parásito a las células epiteliales. Se demostró que anticuerpos monoclonales (AcM) contra esta enzima, inhibían este proceso *in vitro* e *in vivo*, y que la proteinasa de 62 kDa de peso, administrada por vía intranasal con toxina colérica (TC) y oligodexonucleótidos con motivo CpG, es capaz de proteger a los ratones ante un reto intravaginal.

Materiales y métodos

Se purificó la proteinasa de 60 kDa de peso, mediante el procedimiento descrito por Garber y Lemchuk-Favel [4], pero con algunas modificaciones, con el empleo de cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel, con la tecnología del FPLC. El grado de pureza de esta proteinasa se verificó por electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de dodecil sulfato de sodio. Para la obtención y purificación de los AcM contra esta proteinasa, se empleó la tecnología descrita por Godin JB [5]. Para la inmunofluorescencia indirecta se fijaron 50 parásitos por zona de reacción y se aplicaron 10 µL de los AcM experimentales y sus correspondientes controles. Como revelador se utilizó un conjugado anti-ratón, isotiocianato de fluoresceína. Para los ensayos de citoadherencia, se utilizaron células epiteliales HeLa y se marcaron las trichomonas con timidita [³H] [3]. Se estudió el grado de protección pasiva brindada por los AcM inyectados a concentraciones de 2 mg/mL en un modelo de infección intraperitoneal con *T. vaginalis* en ratones Balb/c. Por la reacción de Griess [6], se determinó la concentración de óxido nítrico en cultivo de macrófagos con el parásito y en presencia de los anticuerpos monoclonales, así como los niveles de óxido nítrico en el suero de los ratones inyectados por vía intraperitoneal con los AcM y retados con el parásito. Se administró la proteinasa con adyuvantes vía intranasal a ratones hembra Balb/c. A estos grupos de ratones se les reali-

1. Mendoza-López MR, Becerril-García C, Fattel-Facenda LV et al. CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Infect Immun* 2000;68:4907-12.

2. Soper D. Trichomoniasis: Under control or undercontrolled? *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:281-90.

3. Arroyo R, Alderete JF. Two *Trichomonas vaginalis* surface proteinases bind to host epithelial cells and are related to levels of cytoadherence and cytotoxicity. *Arch Med Res* 1995;26:279-85.

4. Garber GE, Lemchuk-Favel LT. Characterization and purification of extracellular proteases of *Trichomonas vaginalis*. *Can J Microbiol* 1989;35:903-9.

5. Godin JW. *Monoclonal antibodies principles and practice*. 3th ed. San Diego: Academic Press Inc 1996.

6. Rockett KA, Awburn MM, Aggarwal BB. *In vivo* induction of nitrite/nitrate by tumor necrosis factor, lymphotoxin and interleukin-1 implies a role for nitric oxide in cytokine-induced malarial cell-mediated immunity and pathology. *Infect Immun* 1992;60:3725.

✉ Autor de correspondencia

zó un reto con 8×10^5 parásitos para estudiar la capacidad inmunoprotectora de esta proteinasa en un modelo animal.

Resultados

Como resultado de la purificación de esta proteinasa, se obtuvieron tres fracciones con actividad enzimática, cuyos pesos moleculares fueron 62, 40 y 29 kDa. Se obtuvieron tres híbridos estables productores de AcM (4D8, 3C11, 1A8) de subclase IgG₁ contra la proteinasa. De estos, solo dos (4D8 y 1A8) reconocieron el parásito por inmunofluorescencia. En el ensayo *in vitro* de adhesión a las monocapas de las células epiteliales HeLa, se observó que los anticuerpos 4D8, 1A8 y 3C11 inhiben la citoadherencia del parásito a las células (Figura 1). El AcM 4D8 administrado 24 horas antes de un reto con *T. vaginalis*, por vía intraperitoneal, protegió a la mayoría de los ratones. A este le siguió el AcM 1A8. Se encontró un elevado nivel de óxido nítrico en los cultivos y en el suero de los ratones tratados con el AcM 4D8 (tablas 1 y 2, respectivamente). Pero *T. vaginalis* infesta el tracto genital humano, y para definir si la proteinasa protegía a los ratones hembras ante un reto vaginal, se inmunizaron dos grupos de ratones por vía intranasal con el antígeno de 62 kDa combinado con toxina colérica y CpG como adyuvantes, respectivamente, así como otros cuatro grupos con los animales control correspondientes TC, CpG, proteinasa y solución salina. Después de creadas las condiciones en el ratón para lograr la infección con este parásito, se retaron los animales, y ocho días después del reto, se colectaron muestras vaginales para determinar la presencia o no del parásito. En los grupos experimentales (p-62-TC y p-62-CpG) se infestaron entre el 5 y el 15% de los ratones, y en los grupos control, entre el 80 y el 90% de los animales (tabla 3). Además, se determinaron los niveles de anticuerpos contra p-62 en los sueros y en los lavados vaginales de ratones inmunizados, mediante ELISA. En los grupos inmunizados por vía intranasal con la proteinasa p-62 de *T. vaginalis* con TC y CpG, se observaron niveles significativos de anticuerpos en muestras vaginales IgG ($p < 0.05$) e IgA ($p < 0.01$).

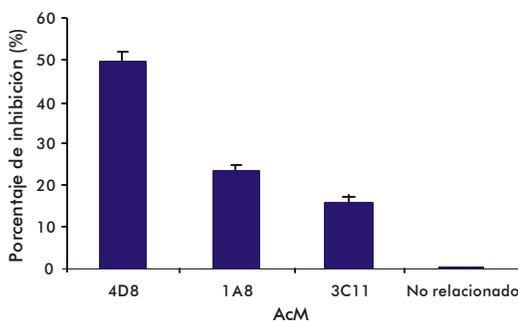


Figura 1. Efecto producido por los AcM contra la proteinasa de 62 kDa sobre la adhesión del parásito a las células HeLa en cultivo. Los parásitos marcados con timidina y con el anticuerpo monoclonal se adicionaron a las células HeLa e incubaron durante 30 minutos. Los resultados son de dos experimentos e indican la media \pm desviación estándar de 10 pozos. Prueba t de Student. * Diferencias significativas en relación con el AcM no relacionado.

Tabla 1. Determinación de óxido nítrico en cultivo de macrófagos tratados con los AcM en presencia del parásito

Incubación	Nitrito (μ M) Media \pm DE
1A8 + LPS + IFNg	590.01 \pm 32.53 *
4D8 + LPS + IFNg	676.75 \pm 26.52 *
4D8 + LPS + IFNg + L-NMMA	96.4 \pm 7.60
AcM no relacionado + LPS + IFNg	83.20 \pm 4.27

Se cultivaron 3×10^5 macrófagos por pozo. Posteriormente, se adicionaron 6×10^4 parásitos por pozo, los AcM, y 2 h más tarde el LPS, el interferón γ y L-NMMA. Los sobrenadantes se colectaron 18 h más tarde. Los sobrenadantes se mezclaron con el reactivo de Griess para la determinación de óxido nítrico. Los valores representan la media y la desviación estándar de 5 pozos ($n = 5$). Prueba t de Student.

* Representa los valores significativos en relación con el anticuerpo no relacionado.

Tabla 2. Determinación de óxido nítrico en suero de ratones inoculados con AcM anti-proteinasa de *T. vaginalis*

Grupos	AcM	Nitrito (μ M) Media \pm DE
1	3C11	80.09 \pm 24.03
2	1A8	139.90 \pm 39.77 *
3	4 D8	165.82 \pm 65.58 *
4	No relacionado	83.20 \pm 21.40

Cuatro grupos de animales se inocularon por vía intraperitoneal con 2 mg/mL de cada AcM. Transcurridas 24 h, los animales se infectaron con 8×10^6 parásitos por ratón por vía intraperitoneal. Tres días después, se midieron los niveles de nitrito en suero mediante la reacción de Griess. Los valores representan la media \pm SD de 5 ratones ($n = 5$). Prueba t de Student.

* Representa los valores significativos en relación con el anticuerpo no relacionado anti-*T. gondii*.

Discusión

Mendoza-López y sus colaboraciones [1] y Arroyo y Alderete [3] reportaron que las proteinasas son fundamentales para los procesos de citoadherencia del parásito. Esta observación coincide con los resultados de este estudio, en el cual se demuestra que los MAb contra la proteinasa de 62 kDa inhiben la citoadherencia.

El MAb 4D8, administrado 24 horas antes del reto intraperitoneal, protegió al 92% de los ratones estudiados. Llama la atención que este es el anticuerpo que mostró la mayor inhibición de la adhesión *in vitro*. El MAb que le siguió en orden fue el 1A8, lo

Tabla 3. Efecto de la inmunización intranasal con la proteinasa p-62 en la prevención de la infección con *T. vaginalis* de ratones Balb/c

Pretratamiento	Ratones infectados con <i>T. vaginalis</i> / grupo 6		Ratones infectados / ratones totales	Porcentaje de infección (%)
	A	B		
p-62 ¹	8/10	10/10	18/20	90
p-62 + TC ²	0/10	1/10	1/20	5*
p-62 + CpG ³	1/10	2/10	3/20	15*
Control TC ⁴	10/10	8/10	18/20	90
Control CpG ⁵	8/10	8/10	16/20	80
Solución salina	9/10	9/10	18/20	90

20 μ g de antígeno (dosis / ratón).¹

20 μ g de antígeno, TC 5 μ g (dosis / ratón).²

20 μ g de antígeno, CpG 10 μ g (dosis / ratón).³

TC 5 μ g (dosis / ratón).⁴

CpG 10 μ g (dosis / ratón).⁵

Los ratones recibieron un reto con 8×10^5 de *T. vaginalis* por vía intravaginal, dos semanas después de la última inmunización.⁶

* Diferencias significativas en relación con el control (solución salina). Prueba t de Student.

que sugiere que los epítopes reconocidos por los MAb 4D8 y 1A8 son importantes en los mecanismos de citoadherencia de *T. vaginalis*.

Estos resultados demuestran que esos MAb pueden actuar mediante mecanismos celulares, posiblemente por interacciones con macrófagos residentes en el peritoneo. La generación de óxido nítrico es característico de muchas células involucradas en la reacción inmune, tales como las células dendríticas, las células asesinas naturales (o NK, del inglés *natural killers*), los monocitos y los macrófagos [7]. Estudios previos con *Trichomonas foetus* han demostrado que los niveles elevados de nitrito inactivan probablemente las proteínas FeS de los hidrogenosomas, lo cual provoca la muerte del parásito [8]. Los niveles elevados de óxido nítrico que se encontraron en el suero de los ratones tratados con los MAb 4D8 y 1A8, así como las determinaciones de óxido nítrico en el experimento *in vitro*, sugieren que

esta es la causa de la citotoxicidad mostrada por estos anticuerpos sobre el parásito en el modelo *in vitro*.

La inmunización intranasal tiene el potencial de estimular tanto la inmunidad sistémica como la mucosal, esta última *in situ* o a distancia [9]. Estos resultados demuestran que la inmunización intranasal con la proteinasa de 62 kDa con CpG y TC, no solo induce niveles elevados de anticuerpos específicos contra p-62 en suero, sino también en vagina. Ella también induce la protección para los grupos de ratones retados con *T. vaginalis*, además, muestra la efectividad de la ruta de inmunización con ambos tipos de adyuvantes y sugiere que los niveles elevados de IgA son importantes en la respuesta inmunitaria protectora contra *T. vaginalis*. Son necesarios nuevos estudios para el conocimiento de los mecanismos de respuesta inmune contra *T. vaginalis* inducidos por la administración de la proteinasa de 62 kDa con adyuvantes.

7. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunol.* 2001;10:907-16.

8. Lloyd D, Willians AS, James CJ. Nitrite inhibits hydrogen production and kills the cattle *Trichomonas foetus*. *J Appl Microb* 2002;93:492-6.

9. Holmgren, J., Czerkinsky, C. Mucosal Immun vaccines. *Nat Med* 2005;11:S45-53.