

**Dissertação de Mestrado**

**Efeitos citotóxicos de *Tritrichomonas foetus* e  
*Trichomonas vaginalis* em células epiteliais de oviduto  
bovino**

VICTOR DO VALLE PEREIRA MIDLEJ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS

RIO DE JANEIRO  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Victor do Valle Pereira Midlej**

Efeitos citotóxicos de *Tritrichomonas foetus* e *Trichomonas vaginalis* em células epiteliais de oviduto bovino.

Tese: Mestrado em ciências morfológicas

Universidade Federal do Rio de Janeiro, IB, CCS, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas.

Rio de Janeiro, 2010-02-09 Xv, pp. 128.

Orientador: Marlene Benchimol

1. *Tritrichomonas foetus*. 2. *Trichomonas vaginalis*. 3. Interação parasito-célula hospedeira. 4. Apoptose. 5. Fagocitose.

**EFEITOS CITOTÓXICOS DE *Tritrichomonas foetus* E *Trichomonas vaginalis* EM CÉLULAS EPITELIAIS DE OVIDUTO BOVINO**

VICTOR DO VALLE PEREIRA MIDLEJ

Dissertação apresentada ao Programa de Ciências Morfológicas – UFRJ como parte das exigências para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular

Orientador: Dra. Marlene Benchimol

RIO DE JANEIRO  
2010

**EFEITOS CITOTÓXICOS DE *Tritrichomonas foetus* E *Trichomonas vaginalis* EM CÉLULAS EPITELIAIS DE OVIDUTO BOVINO**

VICTOR DO VALLE PEREIRA MIDLEJ

Dissertação submetida ao corpo docente do programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas – PCM, Instituto de Ciências Biomédicas – ICB, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

**Aprovada por:**

---

Prof. Cláudia Mermelstein  
Programa de Ciências Morfológicas – UFRJ

---

Prof. Fernando Costa e Silva Filho  
Instituto de Biofísica – UFRJ

---

Prof. José Batista de Jesus  
Departamento de Ciências Naturais – UFSJ

---

Prof. Helene Santos Barbosa (Revisora)  
Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

---

Prof. Ana Maria Blanco Martinez (Suplente)  
Programa de Ciências Morfológicas – UFRJ

---

Prof. Marlene Benchimol (Orientadora)  
Programa de Ciências Morfológicas – UFRJ

RIO DE JANEIRO  
2010

Esta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Ultraestrutura Celular da Universidade Santa Úrsula, sob orientação da Dra. Marlene Benchimol, com o apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), PRONEX (Programa de Núcleo de Excelência), FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) e AUSU (Associação Universitária Santa Úrsula).

**Este trabalho é dedicado**

**Aos meus pais Maisa Cristina do Valle Pereira Midlej e José Ramos Midlej por apoiar sempre os meus sonhos e me dar forças para seguir em frente.**

## AGRADECIMENTOS

**A Deus** pela graça de viver, por tudo de bom que vem acontecendo em minha vida.

**Aos meus pais** por todo amor que foi me dado desde pequeno, a presença mesmo na ausência. Por confiar em mim e me apoiar, mas nunca deixando de lado os conselhos e as broncas. Obrigado por me ensinar a ser gente. A vocês nem mesmo o maior agradecimento é suficiente. Obrigado por simplesmente serem assim José e Maisa, meu pai e minha mãe, amo-os incondicionalmente.

**Ao meu irmão**, que faz parte da minha vida, aquele que me preocupo sempre e sei que é recíproco. Apesar de nossos pensamentos serem em vários momentos divergentes, convergimos no que sentimos um pelo outro. Também amo incondicionalmente.

**A minha grande família** por sempre me apoiar, confiar e acreditar em mim. Pelo amor, carinho, atenção com que me recebem quando chego à Bahia.

**Ao Marcos, Manuela, Tatiana e Jr**, obrigado por ter compartilhado a mãe de vocês comigo. Por ter permitido que eu convivesse com vocês por 7 anos, por ter deixado eu entrar em suas vidas.

**A Tia Jeanete** por ter me recebido, e por vezes ter me dado um pouco do seu tempo.

**Aos professores** Cláudia Mermelstein, Fernando Costa e Silva, José Batista, Técia Ulisses de Carvalho e Ana Maria Martinez por terem aceitado o convite para fazer parte da banca examinadora

**Aos meus amigos:**

**Ivone Rosa.** Minha linda. Obrigado por gostar de mim assim como você gosta, por se preocupar comigo como a irmã mais velha, pelos conselhos, pela diversão, pela companhia de Sendas, de prato, de viagens, de festas...

**Antonio Pereira.** Esse cara não existe, mas mesmo sendo o maior implicante da face da Terra, obrigado por me ajudar em tudo, a me salvar naqueles momentos em que acho que não resta mais nada a fazer, pela amizade, pelas risadas, o laboratório sem você não seria o mesmo.

**Ricardo Vilela.** Outro ser único, quem te conhece sabe o quanto é maneiro. Obrigado por ser o companheiro de artigo, o amigo do chopp das antigas sextas-feiras, pelas risadas e piadas maldosas. Nos vemos por aí.

**Débora Rocha.** A pequenininha linda. Obrigado pelo carinho, pelos abraços apertados, pelas conversas sobre qualquer coisa. Estamos juntos no objetivo de um corpo melhor, obrigado pela companhia maravilhosa nas noites de malhação.

**Isadora Meinig.** Minha chuchu. Obrigado por ser meu anjo, meu braço direito. Pela ajuda imprescindível em tudo, pelo carinho. Obrigado por ser a melhor aluna de todas que existe. Vamos pegar firme com as giárdias.

**Fernanda Reinol,** pelo carinho, amizade, por estar ali sempre resolvendo todos os pepinos. Sei que posso contar sempre que precisar.

**Júlio Dias** por me dar força e estar comigo nos momentos difíceis, pela companhia, amizade, por ser essa pessoa que você é. Me aguentar não é fácil.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

A minha orientadora, professora Marlene Benchimol. Um obrigado mais que especial, pois sem a senhora nada disto estaria acontecendo. Obrigado por ter me aceitado em sua equipe, por me fazer entender o que é ser um profissional brilhante, uma pessoa íntegra, por me dar alicerce para crescer profissionalmente. A senhora é mais que uma orientadora, é amiga, conselheira, a mãe científica, que nos ensina, nos dá puxões de orelha, mas sempre está do nosso lado. Obrigado por confiar em mim, por me ajudar em qualquer circunstância, seja no lado profissional ou no pessoal. Sempre agradeço a Deus por ter colocado a senhora em minha vida. Obrigado por tudo.

A Professora Helene Barbosa pelo trabalho excepcional que fez. Admiro a sua competência e cuidado. Obrigado por me receber tão bem e pela atenção dada a mim durante a revisão desta dissertação.

A Tia Rose pela oportunidade única. Sem a sua ajuda não teria vindo para o Rio de Janeiro e não teria conhecido a minha orientadora, ou seja, eu não estaria escrevendo essa dissertação de mestrado. Obrigado por ter me dado oportunidade, carinho e abrigo. Obrigado pelas sábias palavras, por ter me deixado compartilhar da sua vida, com as histórias maravilhosas, o quanto aprendi desde que fui recebido pela senhora. Palavras não exprimem o quanto sou grato por tudo, muito obrigado!

*“A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento.”*

(Platão)

## ÍNDICE

<b>DEDICATÓRIA</b>	iv
<b>AGRADECIMENTOS</b>	v
<b>EPÍGRAFO</b>	viii
<b>ÍNDICE</b>	ix
<b>PUBLICAÇÕES</b>	xii
<b>RESUMO</b>	xiii
<b>ABSTRACT</b>	xiv
<b>ABREVIATURAS</b>	xv
<b>1- INTRODUÇÃO</b>	1
<b>1.1 Tricomonadídeos</b>	1
<b>1.2 Epidemiologia e Importância Médica, Veterinária e Econômica</b>	3
<b>1.3 Morfologia</b>	7
1.3.1 Superfície Celular	7
1.3.2 Hidrogenossomos	8
1.3.3 Retículo Endoplasmático	9
1.3.4 Complexo de Golgi e Filamentos Parabasais	10
1.3.5 Vesículas e lisossomos	11
1.3.6 Citoesqueleto	11
1.3.6.1 Flagelos	12
1.3.6.2 Complexo Pelta-Axostilar	13
1.3.6.3 Costa	14
1.3.6.4 Centrossomos e Fuso mitótico	15
1.3.7 Núcleo e Divisão	15
<b>1.4 Interação-parasito hospedeiro</b>	17
1.4.1 Modelos experimentais	20

1.4.2	Células epiteliais	21
1.4.3	Células do oviduto	22
<b>1.5</b>	<b>Objetivos</b>	<b>26</b>
1.5.1	Geral	26
1.5.2	Específicos	26
<b>2-</b>	<b>MATERIAS E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
<b>2.1</b>	<b>Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Tritrichomonas foetus</i> e de <i>Trichomonas vaginalis</i></b>	<b>27</b>
<b>2.2</b>	<b>Cultura primária de células epiteliais de oviduto bovino</b>	<b>28</b>
<b>2.3</b>	<b>Experimentos de interação</b>	<b>28</b>
2.3.1	Experimentos de coincubação e ensaios de adesão	28
2.3.2	Ensaio de citotoxicidade	29
<b>2.4</b>	<b>Fluorescência</b>	<b>29</b>
2.4.1	TUNEL	29
2.4.2	Análise do Potencial de Membrana Mitocondrial	30
2.4.3	Ensaio de PS (fosfatidilserina)	31
2.4.4	Detecção de Caspases (Pan-caspase)	31
2.4.5	Imunofluorescência	32
<b>2.5</b>	<b>Microscopia eletrônica de varredura</b>	<b>33</b>
<b>2.6</b>	<b>Microscopia eletrônica de transmissão</b>	<b>33</b>
<b>2.7</b>	<b>Ensaio de interação com células de oviduto em suspensão</b>	<b>34</b>
<b>2.8</b>	<b>Ensaio de Fagocitose</b>	<b>34</b>
2.8.1	Fosfatase ácida	34
2.8.2	Tratamento com droga	35
<b>2.9</b>	<b>Tratamento com droga</b>	<b>35</b>
<b>3-</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Estabelecimento de uma cultura primária de células epiteliais de oviduto bovino</b>	<b>37</b>

<b>3.2 Ensaio de interação</b>	40
<b>3.3 Evidência dos danos</b>	47
<b>3.4 Testes de viabilidade</b>	48
<b>3.5 Fragmentação do DNA das células epiteliais</b>	49
<b>3.6 Apoptose e necrose secundária</b>	51
<b>3.7 Fagocitose por <i>Trichomonas vaginalis</i></b>	55
<b>3.8 Participação do citoesqueleto de actina no processo de adesão</b>	63
<b>4- DISCUSSÃO</b>	65
<b>4.1 Mudanças do sistema parasito-hospedeiro</b>	65
4.1.1 Região de adesão do parasito	66
4.1.2 Mudanças nas células epiteliais de oviduto bovino	66
<b>4.2 Tricomonas provocam apoptose</b>	66
<b>4.3 Fagocitose por <i>Trichomonas vaginalis</i></b>	67
<b>4.4 Direcionamento para lisossomos</b>	71
<b>4.5 Relações espécie-específicas</b>	72
<b>5- CONCLUSÕES</b>	74
<b>6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	75
<b>7- ANEXO I</b>	100

Os resultados desta dissertação encontram-se publicados nos dois trabalhos abaixo (**ver anexo I**):

MIDDLEJ, V., VILELA, R., DIAS, A.B., BENCHIMOL, M. (2009). Citophatic effects of *Tritrichomonas foetus* on bovine oviduct cells. **Vet. Parasitol.**, 165, 216-230.

MIDDLEJ, V. & BENCHIMOL, M. (2010). *Trichomonas vaginalis* Kills and eats – evidence for phagocytic activity as a cytophatic effect. **Parasitology**, 137, 65-76.

**Durante o desenvolvimento desta dissertação, participei também dos seguintes trabalhos:**

MIDDLEJ, V. & BENCHIMOL, M. (2009). *Giardia lamblia* behavior during encystment: How morphological changes in shape occur. **Parasitol. Int.**, 58, 72-80.

CORRÊA, G., VILELA, R., MENNA-BARRETO, R.F.S., MIDDLEJ, V. BENCHIMOL, M. (2009). Cell death induction in *Giardia lamblia*: Effect of beta-lapachone and starvation. **Parasitol. Int.**, 58, 424-437.

## Resumo

*Tritrichomonas foetus* e *Trichomonas vaginalis* são parasitos do trato urogenital bovino e humano, respectivamente. *T. vaginalis* é o agente etiológico da tricomonose humana, enquanto *T. foetus* é o responsável pela tricomonose bovina. Apesar de vários estudos, pouco se conhece sobre os fatores que conduzem aos quadros graves de infecção da tricomonose, podendo levar ao aborto e esterilidade temporária ou permanente. No intuito de investigar os efeitos citotóxicos de *T. foetus* e *T. vaginalis* em regiões mais profundas do trato reprodutivo, e também de se encontrar um modelo mais próximo ao sistema *in vivo*, foi desenvolvido uma cultura primária de oviduto bovino e comparados os efeitos de ambos os parasitos. Os tratos reprodutivos foram obtidos de vacas em abatedouros comerciais e as células colunares do oviduto cresceram em monocamada. Testes de viabilidade foram realizados através de métodos colorimétricos, utilizando o cristal violeta seguido de leitura no espectrofotômetro. Métodos fluorescentes foram usados para testar a viabilidade das células epiteliais como o TUNEL, iodeto de propídeo, JC-1 e anexina-V. Análises citoquímicas como a fosfatase ácida e a técnica do vermelho de rutênio foram realizadas, bem como a microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Os resultados demonstraram que: (1) o epitélio de oviduto *in vitro* mostrou-se um modelo útil para os experimentos de interação com *T. foetus* e *T. vaginalis*; (2) *T. foetus* aderem às células epiteliais de oviduto individualmente, mas após tempos mais longos de interação formam agregados celulares, enquanto *T. vaginalis* adere majoritariamente em grupos, independente de tempo; (3) Ambas *T. foetus* e *T. vaginalis* provocam vários danos às células epiteliais de oviduto, deixando marcas, ou “*imprints*”, vastos espaços intracelulares e lesões no epitélio; (4) não foi observada uma relação espécie-específica nas interações parasito-hospedeiro; (5) cepas de *T. vaginalis* frescas, isoladas recentemente, são mais agressivas às células epiteliais de oviduto do que *T. foetus*, porém cepas de *T. vaginalis* com longos tempos de cultura têm efeitos similares às *T. foetus*; (6) *T. vaginalis* destrói a cultura de células epiteliais usando mecanismos que incluem: adesão, danos mecânicos até alcançar a citólise, fagocitose e degradação intracelular lisossomal. Ambos os parasitos causam danos e provocam morte celular no epitélio de oviduto bovino, indicando a possibilidade de que os tricomonádídeos possam se deslocar em direção ao oviduto e a infertilidade em vacas possa ser mediada pelo ataque de *T. foetus* às células epiteliais do oviduto.

## Abstract

*Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* are extracellular parasites of the reproductive tract in cattle and humans, respectively. *T. vaginalis* is the etiologic agent of human trichomonosis whereas *T. foetus* is responsible for bovine trichomonosis. Despite of several studies, little is known about the factors that led to the acute infections provoked by trichomonads. To investigate the cytophatic effects of *T. foetus* and *T. vaginalis* in deeper parts of the reproductive tract, and to find a model of study closer to *in vivo*, a bovine primary oviduct epithelial cell system (BOECs) was developed and the effect of both parasites was compared when in interaction with these host-cells. Reproductive tracts were obtained from cows at a commercial abattoir and oviduct collunar cells were grown as a monolayer. Viability tests were performed using colorimetric methods, such as crystal-violet spectrophotometric. Fluorescent methods were used to test the viability of BOECs after the interaction such as *TUNEL* (*Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling*), fluorescein diacetate, propidium iodide, JC-1 and annexin-V. Cytochemistry techniques as acid phosphatase and ruthenium red were performed as well scanning and transmission electron microscopy. The results reported here demonstrated that: (1) the *in vitro* oviduct epithelium is useful for interaction experiments with *T. foetus* and *T. vaginalis*; (2) initially *T. foetus* adhered to the BOECs as single separate cells, and posteriorly the parasites aggregated in large clusters. In contrast, *T. vaginalis* adhered mainly in clusters; (3) Both, *T. foetus* and *T. vaginalis* provoked a severe damage to BOECs leaving imprints on the epithelial cells, inducing wide intercellular spaces and provoking large lesions in the epithelium; (4) no species-specific host-parasite interactions was observed; (5) freshly isolated *T. vaginalis* is more aggressive to BOECs than *T. foetus*, but a long-term strain of *T. vaginalis* exhibited similar effects to *T. foetus*; (6) the cytophathogenic action of *T. vaginalis* could be divided into four stages: adhesion, cytolysis after cell contact, phagocytosis and lysosomal intracellular digestion. Both *T. foetus* and *T. vaginalis* cause damage and provoke bovine oviduct cell death indicating the possibility that *T. foetus* could move up to oviduct. Thus, it is suggested that infertility in cows could be caused by *T. foetus* attack to oviduct cells.

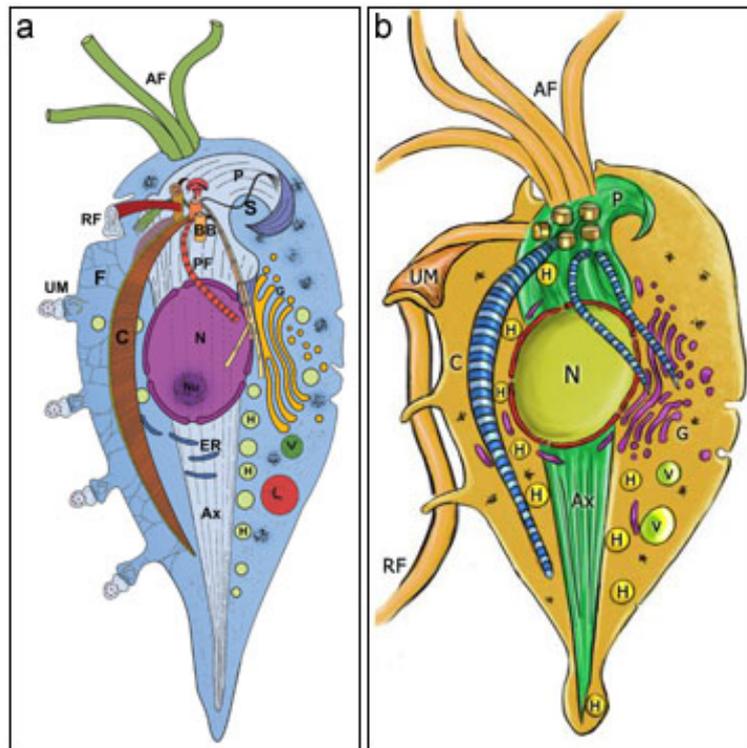
## ABREVIATURAS

– AIDS	“ <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> ” – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
– ATP	“ <i>Adenosine Tri-phosphate</i> ” – Trifosfato de adenosina
– BSA	“ <i>Bovine serum albumine</i> ” – Albumina sérica bovina
– CCD	Dispositivo de carga acoplado
– CHO	“ <i>Chinese hamster ovary</i> ” – Ovário de <i>Hamster</i> chinês
– CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
– CP-30	Cisteíno-protease de 30 KDa
– DAPI	4', 6'-diamidino-2-fenilindol
– DIC	“ <i>Differential interference contrast</i> ” – Contraste interferencial diferencial
– DNA	“ <i>Deoxyribonucleic acid</i> ” – Ácido desoxirribonucléico
– DST	Doença sexualmente transmissível
– EGF	“ <i>Epidermal growth factor</i> ” – Fator de crescimento da epiderme
– FGF	“ <i>Fibroblast growth factor</i> ” – Fator de crescimento dos fibroblastos
– FITC	“ <i>Fluorescein isothiocyanate</i> ” – Isotiocianato de fluorescência
– HIV	“ <i>Human immunodeficiency virus</i> ” – Vírus da imunodeficiência humana
– HPV	“ <i>Human papiloma virus</i> ” – Vírus do papiloma humano
– IGF	“ <i>Insulin-like growth factor</i> ” – Fator de crescimento semelhante à insulina
– MDCK	“ <i>Madin-Darby Canine Kidney</i> ” -
– mRNA	“ <i>messenger Ribonucleic acid</i> ” – Ácido ribonucléico mensageiro
– NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
– PBS	“ <i>Phosphate buffer saline</i> ” – Tampão fosfato salino
– PCR	“ <i>Polymerase chain reaction</i> ” – Reação de polimerase em cadeia
– PF	Paraformaldeído
– RE	Retículo Endoplasmático
– SDS	“ <i>Sodium dodecyl sulfate</i> ” – Dodecil sulfato de sódio
– SFB	Soro fetal bovino
– TGF	“ <i>Transforming growth factor</i> ” – Fator de transformação do crescimento
– TYM	“ <i>Tryptcase – Yeast extract – Maltose</i> ”
– WGA	“ <i>Wheat germ agglutinin</i> ” – Aglutinina de semente de trigo
– WHO	“ <i>World Health Organization</i> ” – Organização de saúde mundial

## 1. Introdução

### 1.1 Tricomonádídeos

*Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) e *Trichomonas vaginalis* (Donné, 1836) são protistas parasitos extracelulares pertencentes ao Filo Parabasala e à Família Trichomonadidea. Os tricomonádídeos (Figs. 1- 2) são organismos que se caracterizam pela presença de quatro a seis flagelos (um sempre recorrente), de um aparato parabasal - Complexo de Golgi com filamentos parabasais associados (Honigberg & Brugerolle, 1990) e do complexo pelta-axóstilo, que é formado por um sistema de microtúbulos (Benchimol *et al.*, 1993). Além disso, esses organismos são amitocondriais, parte do metabolismo energético provém de organelas chamadas hidrogenossomos (Lindmark & Müller, 1973), não apresentam peroxissomos e possuem ribossomos 70S (Champney *et al.*, 1992).



**Figura 1** – Esquema geral de *T. foetus* (a) e *T. vaginalis* (b) destacando as principais organelas e estruturas celulares. AF, flagelos anteriores; RF, flagelo recorrente; UM, membrana ondulante; P, pelta; Ax, axóstilo; C, costa; H, hidrogenossomos; V, vacúolos; G, complexo de Golgi; N, núcleo; Nu, nucléolo; ER, retículo endoplasmático; S, filamento sigmóide; BB, corpúsculos basais; PF, filamento parabasal. (Cortesia: Benchimol, M).

Dentre os representantes desta família encontram-se os patógenos *Tetratrichomonas gallinarum* (Martin & Robertson, 1991), parasito da cavidade bucal e do ceco de aves, *Tritrichomonas muris* (Grassé, 1926), parasito do trato intestinal de roedores, *T. vaginalis*, parasito do trato urogenital humano e *T. foetus*, parasito do trato urogenital bovino e do trato intestinal de felinos.

Apesar de ainda não estar claro o grau de parentesco entre as diversas espécies de tricomonádídeos, estudos moleculares de filogenia indicam que esses organismos encontram-se entre os mais primitivos eucariotos.

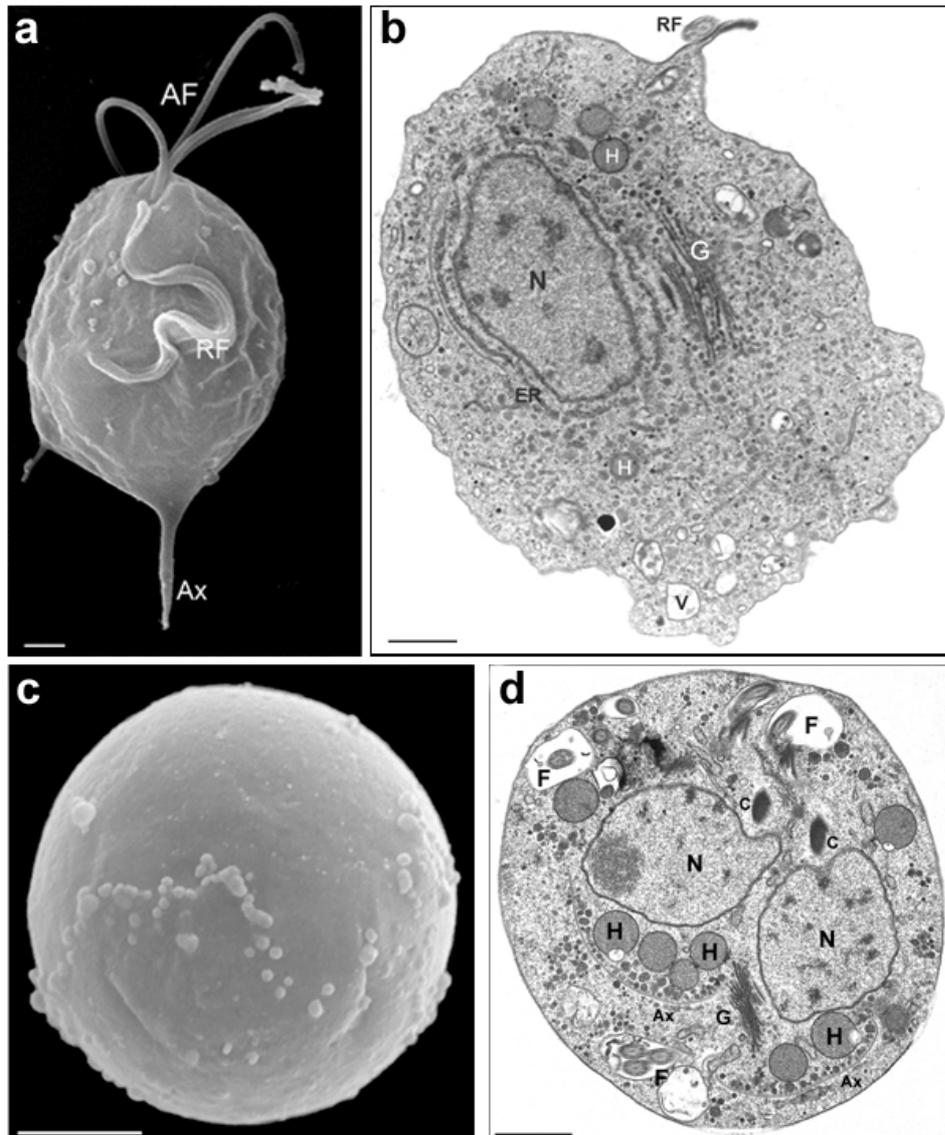
*T. foetus* é o agente etiológico da tricomonose urogenital bovina, uma doença sexualmente transmissível (DST) de ampla distribuição geográfica. A doença em vacas varia de uma suave vaginite a endometrite, aborto e infertilidade, acarretando em perdas econômicas consideráveis em todo mundo (Parsonson *et al.*, 1976; Anderson *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 2004).

*T. vaginalis* é responsável pela tricomonose humana, a DST não viral mais frequente no planeta. Estima-se que, anualmente, sejam infectadas entre 5 a 10 milhões de pessoas nos Estados Unidos e entre 250 e 350 milhões em todo mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995; Fiori *et al.*, 1997). A tricomonose humana parece conduzir à predisposição ao vírus da imunodeficiência adquirida (Laga *et al.*, 1991, 1993; Wasserheit, 1992).

Estes parasitos são eucariontes, unicelulares e reproduzem-se por divisão binária. Quando cultivados em meio axênico apresentam formato oval, medindo em torno de 16 µm de comprimento e 6 µm de largura no eixo maior (Kirby 1951; Mattos *et al.*, 1997). *T. foetus* possui três flagelos anteriores de tamanho aproximadamente semelhante (cerca de 13 µm) e outro recorrente que possui de três a cinco ondulações medindo em torno de 16 µm de comprimento que percorre todo o corpo celular, enquanto *T. vaginalis* apresenta quatro

flagelos anteriores nas mesmas condições e um flagelo recorrente que se destaca do corpo celular antes da região posterior final do corpo do parasito (Benchimol, 2004).

Além do formato oval, que é o mais comum, em meios de cultura axênicos, as tricomonas podem ainda assumir duas outras morfologias distintas: a amebóide, mais freqüente quando o parasito interage com suas células-alvo e o pseudocisto ou forma intraflagelada (Fig. 2c-d), que surge em situações de estresse quando o parasito internaliza seus flagelos. Formas císticas verdadeiras não são encontradas em *T. foetus* nem *T. vaginalis*.



**Figura 2** – Visão geral de *T. vaginalis* (a,b) e *T. foetus* em pseudocisto (c,d) observados por microscopia eletrônica de varredura (a,c) e de transmissão (b,d). Note que nos pseudocistos os flagelos estão internalizados (F), e não possui uma parede cística. Na figura d, é visto uma célula em

divisão, suas organelas já se encontram duplicadas. N, núcleo; F, flagelo; H, hidrogenossomo; Ax, axóstilo; G, complexo de Golgi; C, costa. Barras Fig. A, 1  $\mu\text{m}$ ; Fig. B, 1  $\mu\text{m}$ ; Fig. C, 3  $\mu\text{m}$ ; Fig. D, 1  $\mu\text{m}$ . (Figura c, Pereira-Neves et al., 2003; figura d, Cortesia: Pereira-Neves, A.)

## 1.2 Epidemiologia e Importância Médica, Veterinária e Econômica

A tricomonose humana é uma doença cosmopolita mundial, considerada atualmente a DST mais comum, superando os índices de gonorréia, AIDS e sífilis (WHO, 2001). Registros anteriores estimaram que cerca de 10% de toda a população sexualmente ativa já possuíram ou possuem este parasito.

Esta doença tem implicações médicas, sociais e econômicas. As mulheres que se encontram infectadas durante a gravidez estão mais predispostas à ruptura prematura da placenta, parto prematuro e a gestação de bebês de baixo peso (Petrin et al., 1998). A infertilidade também pode ser relacionada à tricomonose (Grodstein et al., 1993).

Atualmente a tricomonose humana ganhou maior importância pela Organização Mundial de Saúde por ser considerada de alto risco, uma vez que o parasito poderia ser vetor de alguns vírus, como o HIV (Cohen et al., 1999; Moodley et al., 2002). Há alguns anos têm sido relatadas associações entre a presença de tricomonas e uma maior incidência ao câncer do colo uterino e à presença de HPV (Frost, 1962; Kharsany et al., 1993; Zhang & Begg, 1994), aumentando ainda mais a importância deste parasito no âmbito da medicina humana.

A contaminação ocorre em 98% dos casos por relação sexual, embora haja alguns poucos relatos de contágio através de material usado na higiene, como toalha, vaso sanitário e mesmo piscinas públicas (WHO, 2001; Pereira-Neves & Benchimol, 2008). A doença apresenta um período de incubação variável de 3, 7 e 21 dias após a contaminação. Em casos severos, a infecção se manifesta logo após a relação sexual.

Os sintomas clínicos da tricomonose são mais evidentes no sexo feminino, podendo variar desde o quadro assintomático à vaginite e baixa de fertilidade. Os homens

apresentam geralmente quadros assintomáticos, uretrite ou prostatite. Os casos assintomáticos são muito comuns em homens e mais raros nas mulheres. Há uma grande variação de sinais e sintomas, de acordo com a cepa isolada. Existem algumas cepas extremamente virulentas e outras com baixa virulência. As mulheres portadoras de cepas mais virulentas apresentam corrimento vaginal agudo, de cor amarelo-esverdeado, geralmente acompanhado de dor e prurido, irritação, inflamação e descamação do epitélio vaginal (Rein, 1990). No entanto, há casos em que nenhum destes sinais está presente.

Em casos graves, a vulva se torna congesta, aumenta a vascularização ocorrendo à hiperplasia do epitélio cervical e podem aparecer até complicações nas glândulas de Bartholin. A vagina torna-se avermelhada, sendo frequente a presença de diversas pontuações, conhecidas com *Colpitis macularis* ou *cérvice em morango* (Heine & McGregor, 1993). Durante a menstruação ou na gravidez, esses sintomas tomam-se ainda mais fortes, pela presença de ferro e por flutuações hormonais (Ryu *et al.*, 2001).

Embora sejam considerados portadores assintomáticos, os homens podem apresentar uretrites purulentas e até prostatites, infertilidade e uretrite não-gonocócica. Existem fortes indícios de que o alto teor de zinco ( $Zn^{+2}$ ) encontrado no fluido espermático iniba a proliferação do parasito, criando um ambiente hostil (Khaw & Panosian, 1995). Este parece ser um dos fatores responsáveis pela curta duração da infecção nos homens.

O diagnóstico não pode ser baseado apenas nos sintomas clínicos, pois estes podem variar bastante ou estar ausentes. Em muitos casos, para detectar o parasito, utiliza-se o exame ginecológico de rotina, por meios de “swabs” vaginais. A observação direta ao microscópio óptico traz dificuldades por conter uma mistura intensa do muco vaginal e bactérias. Outro método é o cultivo da amostra, onde se isola o organismo em cultura (McLellan *et al.*, 1982). Apesar de ser um método mais preciso, demora vários dias para fornecer um resultado satisfatório.

Atualmente, métodos mais rápidos e sensíveis são utilizados para detectar o parasito, mesmo quando em baixa quantidade. A imunofluorescência com anticorpos específicos é um desses métodos. No entanto, deve-se levar em consideração a heterogeneidade do parasito (Lisi *et al.*, 1988). As técnicas de DNA recombinante, como hibridização *in situ* e PCR se mostraram bastante eficazes, mas precisam ser melhor avaliadas quanto a sua viabilidade econômica, pois ainda apresentam custo elevado.

O tratamento baseia-se no uso de derivados imidazólicos como os 5-nitroimidazóis. O mecanismo de ação destas drogas depende da redução anaeróbica do grupamento nitro pela ferredoxina oxirredutase nos hidrogenossomos, levando a formação de radicais livres que oxidam a molécula de DNA do parasito, com quebras simples ou duplas da molécula (Edwards, 1993). No entanto, têm-se observado casos de resistência a nitroimidazóis em tricomonas.

A FDA (*Food and Drug Administration*), órgão que regula a circulação de medicamentos nos EUA, considera o metronidazol como droga aprovada para uso humano, porém, requer que a embalagem traga avisos em relação ao seu potencial carcinogênico, teratogênico, mutagênico e da possibilidade de conduzir à esterilidade.

A tricomonose bovina provoca graves prejuízos financeiros e econômicos nos Estados Unidos, Canadá e América do Sul, bem como em outras regiões do mundo onde o controle sanitário é deficiente ou o sistema de produção é extensivo, com a prática de procriação natural (Honigberg, 1978; Alstad *et al.*, 1984; BonDurant, 1997). As perdas econômicas com esta doença em gado de corte podem ser relacionadas com os custos com tratamento, sacrifício e reposição de animais infectados e o mais importante: queda na produção de carneiros pela demora no estabelecimento da prenhe (Anderson *et al.*, 1996; BonDurant, 1997; Felleisen, 1999).

A transmissão da tricomonose bovina é direta e se dá através do coito. A transmissão mecânica durante a inseminação artificial é rara. No macho, *T. foetus* se aloja

na cavidade do prepúcio, podendo invadir a uretra e porções mais profundas do trato urogenital. O touro é portador assintomático não demonstrando claramente a infecção nem adquirindo naturalmente imunidade contra a mesma (Anderson *et al.*, 1994) e assim passa a infectar várias vacas. Os touros mais velhos têm maiores riscos de adquirirem a doença e manterem-se portadores permanentes, uma vez que, com a idade, há aumento da profundidade das criptas prepuciais (Honigberg, 1978; Singh *et al.*, 1999).

Após a transmissão, o parasito encontra o epitélio vaginal ao qual se adere e inicia seu processo infeccioso. Como decorrência, surge a vaginite e, subsequentemente, os parasitos migram para o útero e possivelmente para o oviduto, ficando confinado às células epiteliais do endométrio e da placenta, quando a vaca está prenhe. No decorrer da gestação, se a vaca estiver contaminada, o parasito pode comprometer o desenvolvimento fetal. São descritas várias consequências da tricomonose bovina, como o aborto e a esterilidade temporária e às vezes até mesmo esterilidade permanente, caso ocorra destruição da mucosa uterina (Anderson *et al.*, 1996; BonDurant, 1997; Felleisen, 1999). A doença pode ser auto-limitante em vacas, que podem apresentar uma resolução espontânea da infecção (Singh *et al.*, 1999).

Na tricomonose felina, *T. foetus* coloniza e adere à superfície das células do íleo, ceco e cólon do intestino grosso dos gatos provocando diarreia crônica (Yaeger & Gookin, 2005; Stockdale *et al.*, 2009). Esta doença ocorre principalmente, em filhotes e gatos com menos de dois anos de idade (Stockdale *et al.*, 2008; 2009). O mecanismo de transmissão da tricomonose felina ainda não foi determinado. Existe apenas um relato na literatura mostrando uma infecção provocada por *T. foetus* no útero de um felino (Dahlgren *et al.*, 2007).

### **1.3 Morfologia**

#### **1.3.1 Superfície Celular**

A superfície celular de tricomonas possui grande interesse em pesquisa, uma vez que é o ponto de contato com a célula hospedeira.

A organização da membrana plasmática dos tricomonádídeos foi inicialmente descrita com base nos estudos de microscopia eletrônica de transmissão convencional (Simpson & White, 1964; Honigberg *et al.*, 1971). Contudo, somente com o advento das técnicas de congelamento celular e criofratura é que foi possível obter detalhamento da ultraestrutura da membrana plasmática (Benchimol *et al.*, 1981a; 1982a; 1992).

Diversos carboidratos, incluindo ácido siálico, manose, galactose, N-acetil-glicosamina e N-acetil-galactosamina foram identificados na superfície deste parasito, bem como nas membranas de compartimentos intracelulares (Benchimol *et al.*, 1981b, 1982b; Benchimol & Bernardino, 2002).

### **1.3.2 Hidrogenossomos**

Os tricomonádídeos são desprovidos de mitocôndrias, mas possuem uma organela incomum e de grande importância: os hidrogenossomos. O termo hidrogenossomo foi proposto por Lindmark & Müller (1973) devido à atividade produtora de hidrogênio molecular da organela que oxida o piruvato ou o malato em ácidos orgânicos, resultando na síntese de ATP, fundamental para o metabolismo energético (Müller, 1993). Em tricomonas os hidrogenossomos são organelas esféricas, com cerca de 0,3 µm de diâmetro, que se apresentam dispostos preferencialmente próximos ao axóstilo e a costa. Possuem dupla membrana e uma vesícula periférica, que é independente da dupla membrana e da matriz, formando um compartimento distinto (Benchimol *et al.*, 1996a; 1996b; Benchimol, 2008). Através da técnica de microanálise por raios-X, identificou-se a presença de íons divalentes

no interior desta vesícula, tais como os de cálcio, magnésio e zinco (Ribeiro *et al.*, 2001), além de alto nível de fósforo, que provavelmente estaria sob a forma de pirofosfatos (Chapman *et al.*, 1985). Ribeiro *et al.* (2001) relataram ainda a presença de cobalto e alumínio nesta vesícula.

Uma série de similaridades foi observada entre os hidrogenossomos e as mitocôndrias, tanto em nível bioquímico e estrutural, sugerindo um grau de proximidade evolutiva entre as duas organelas. As principais semelhanças encontradas foram: (1) a produção de ATP pela degradação do piruvato (Lindmark & Müller, 1973; Müller, 1993); (2) a dupla membrana (Benchimol & De Souza, 1983); (3) o mecanismo de biogênese, que ocorre por segmentação e bipartição (Benchimol *et al.*, 1996b); (4) o seqüestro de íons cálcio (Ribeiro *et al.*, 2001); (5) as enzimas envolvidas na formação de centros de ferro-enxofre (Caltron *et al.*, 2007); (6) a cardiolipina, um lipídeo marcador de membrana mitocondrial interna e de bactérias (De Andrade Rosa *et al.*, 2006); (7) a NADH-desidrogenase, uma enzima constituinte da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (Carlton *et al.*, 2007). Além disso, verificou-se que os hidrogenossomos e as mitocôndrias possuem mecanismos de importação de proteínas muito similares (Dyall *et al.*, 2000; Carlton *et al.*, 2007), uma vez que foram encontradas em tricomonas várias chaperonas (Hsp70, Hsp60, Hsp10), responsáveis por esta translocação, com seqüências sinais similares às seqüências de importação para mitocôndrias (Bui *et al.*, 1996; Carlton *et al.*, 2007).

Várias diferenças, porém, foram constatadas entre ambas as organelas. Nos hidrogenossomos não foram encontrados citocromos, enzimas do ciclo de Krebs, atividade de F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase, material genético ou ribossomos (Lloyd *et al.*, 1979; Turner & Müller, 1983; Clemens & Johnson, 2000). Além disso, os hidrogenossomos possuem enzimas que as mitocôndrias não apresentam como a hidrogenase (Bui & Johnson, 1996) e a piruvato-ferredoxina oxido-redutase (Hrdý & Müller, 1995).

Diversas hipóteses foram levantadas com o intuito de se estabelecer um grau de parentesco evolutivo entre mitocôndrias e hidrogenossomos. Atualmente, alguns grupos

acreditam na possibilidade dos hidrogenossomos e mitocôndrias terem evoluído de um ancestral comum a partir da mesma organela progenitora (Embley, 2006).

### **1.3.3 Retículo Endoplasmático**

Assim como as células de eucariotos superiores, em *T. vaginalis* e *T. foetus*, o retículo endoplasmático (RE) é normalmente visto ao redor do núcleo e também formando a membrana externa do envelope nuclear (Queiroz *et al.*, 1991; Benchimol, 2004). O RE também é encontrado em outros locais do citoplasma, como próximo aos hidrogenossomos, podendo estar relacionado à formação das vesículas periféricas (Benchimol & De Souza, 1985; Benchimol *et al.*, 1996b; Benchimol *et al.*, 2000; Benchimol, 2008). Experimentos citoquímicos demonstraram a presença de cálcio no RE de *T. foetus*, sugerindo que atue como reservatório deste íon (Benchimol *et al.*, 1982c; De Souza & Benchimol, 1988).

A vesiculação do RE durante a divisão celular, fenômeno comumente observado em células de eucariotos superiores, não foi constatado em tricomonadídeos. Sabe-se, porém, que, em tricomonas, algumas cisternas do retículo se alinham de modo paralelo com os microtúbulos do fuso mitótico, o que poderia apresentar um recurso de doação ou seqüestro de cálcio durante a divisão do parasito (Ribeiro *et al.*, 2002b).

### **1.3.4 Complexo de Golgi e Filamentos Parabasais**

Nos tricomonadídeos, o complexo de Golgi corresponde ao aparelho parabasal, formado pelas cisternas e os filamentos parabasais (Benchimol, 2004). O aparelho parabasal fica localizado na região dorsal e à direita do núcleo. *T. vaginalis* e *T. foetus* possuem um único Golgi muito desenvolvido, podendo alcançar cerca 5 µm de comprimento, apresentando de 8 a 12 cisternas (Benchimol *et al.*, 2001). Estudos bioquímicos mostraram a presença das enzimas tiaminopirofosfatase e fosfatase ácida no

Golgi de *T. foetus* (Queiroz *et al.*, 1991). Experimentos utilizando a lectina WGA fluorescente evidenciaram a existência de resíduos de N-acetil-glicosamina nesta organela (Benchimol & Bernardino, 2002), ao contrário do que ocorre nas células de eucariotos superiores, onde há vesiculação durante a divisão celular. Nos tricomonadídeos a organela permanece íntegra, apenas aumentando de tamanho por crescimento lateral e se dividindo em duas, num processo denominado golgicinese (Benchimol *et al.*, 2001).

Os filamentos parabasais são estruturas cilíndricas e periódicas, formadas por bandas claras e escuras, são morfologicamente semelhantes à costa, embora sejam mais delgados que esta. Apresentam-se em número de três, sendo denominados filamentos parabasais 1, 2 e 3 (PF1, PF2 e PF3). O PF1 tem sua origem entre os corpúsculos basais do segundo e terceiro flagelos anteriores, o PF2, entre o terceiro flagelo anterior e o recorrente e o PF3 está localizado bem próximo ao filamento adjacente, aparecendo paralelamente ao PF1 e PF2 (Honigberg *et al.*, 1971; Lee *et al.*, 2009). Acredita-se que os filamentos parabasais dêem suporte e mantenham o posicionamento do complexo de Golgi (Honigberg *et al.*, 1971; Brugerolle & Viscogliosi, 1994). A existência de conexões filamentosas comunicando a cisterna *cis* do Golgi com os filamentos parabasais tem sido sugerida (Benchimol *et al.*, 2001)

Como os filamentos parabasais parecem ser nucleados a partir dos corpúsculos basais (cinetossomos), existiria, portanto, possibilidade de haver uma conexão entre o complexo de Golgi e os cinetossomos através de fibrilas (Benchimol *et al.*, 2001). Esta hipótese explicaria a provável migração do complexo de Golgi que ocorre simultaneamente com a separação dos cinetossomos e dos flagelos durante a mitose de *T. vaginalis* e *T. foetus*.

### **1.3.5 Vesículas e lisossomos**

A atividade endocítica dos tricomonádídeos tem sido observada com a utilização de diversos marcadores, como a peroxidase e várias proteínas conjugadas a ouro ou revestindo microesferas de poliestireno (albumina, lactoferrina, transferrina, lectinas) (Benchimol *et al.*, 1986, 1990; Affonso *et al.*, 1994; 1997).

O citoplasma das tricomonas possui várias vesículas de tamanhos distintos, que compõem o sistema endocítico da célula. *T. foetus* apresenta uma atividade endocítica muito intensa, embora esta aparente ser menor que a de *T. vaginalis* (Benchimol *et al.*, 1990; Affonso *et al.*, 1994). As vesículas podem ser observadas, em sua grande parte, constituindo o processo inicial da endocitose e, por este motivo, localizam-se logo abaixo da superfície celular ou, mais profundamente, no citoplasma (Affonso *et al.*, 1997).

Sugeriu-se que as principais enzimas constituintes dos lisossomos de tricomonas seriam hidrolases ácidas e neutras (Queiroz *et al.*, 1991). Portanto, a acidificação dos lisossomos sugeriria a presença de uma bomba de prótons nas membranas desta organela, tal como observado em eucariotos superiores.

### **1.3.6 Citoesqueleto**

Dentre os principais componentes do citoesqueleto dos tricomonádídeos encontram-se: (1) o complexo pelta-axóstilo, formado por microtúbulos estáveis (Benchimol, 2005; Ribeiro *et al.*, 2002a; 2002b; 2000), (2) os flagelos, *T. foetus* possui três anteriores enquanto *T. vaginalis* quatro anteriores. Ambos possuem um flagelo recorrente formando a membrana ondulante no contato com a membrana plasmática (Honigberg *et al.*, 1971);(3) os corpúsculos basais e seus filamentos associados, de onde emergem os flagelos e as demais estruturas relacionadas ao movimento do parasito (Honigberg *et al.*, 1971; Ribeiro *et al.*, 2000); (4) a costa, estrutura protéica estriada com função de sustentação da membrana ondulante (Honigberg *et al.*, 1971) e (5) os filamentos parabasais (Brugerolle & Viscogliosi, 1994; Benchimol *et al.*, 2001). Diversas estruturas, como os filamentos sigmóides e os

corpos infra e supra cinetossomal, ainda têm suas funções desconhecidas. Em *T. vaginalis* e *T. foetus* pode-se também encontrar microtúbulos lábeis como os que formam o fuso mitótico (Ribeiro *et al.*, 2000; 2002a).

Estudos bioquímicos, moleculares e estruturais também constataram a presença de microfilamentos de actina no citoesqueleto de várias espécies de tricomonádídeos (Brugerolle *et al.*, 1996. Bricheux & Brugerolle, 1997; Bricheux *et al.*, 1998; 2000; Pereira-Neves & Benchimol, 2007). Estes microfilamentos são, preferencialmente, encontrados na região cortical e nos pseudópodes das tricomonas quando realizam fagocitose ou quando em adesão ao substrato ou às células-alvo (Brugerolle *et al.*, 1996; Pereira-Neves & Benchimol, 2007). Em tricomonas, os filamentos intermediários ainda não foram descritos.

Estudos sobre o citoesqueleto de tricomonas mostraram a modificação da morfologia do protozoário durante a atividade fagocítica ou quando aderido à respectiva célula hospedeira (Brugerolle *et al.*, 1996; Pereira-Neves & Benchimol, 2007). Desse modo, foi possível constatar uma reorganização do citoesqueleto (principalmente dos microfilamentos de actina), já que os parasitos apresentam uma forma oval em meio axênico e se transformam em amebóides quando ingerem alguma partícula ou interagem com as células-alvos (Brugerolle *et al.*, 1996; Pereira-Neves & Benchimol, 2007). Em *T. foetus*, observou-se também uma reorganização do citoesqueleto durante a sua transformação em pseudocistos (Granger *et al.*, 2000; Pereira-Neves *et al.*, 2003).

#### **1.3.6.1 Flagelos**

Os flagelos, tanto os anteriores como o recorrente, têm origem nos corpúsculos basais, localizados na região anterior das tricomonas (Honigberg *et al.*, 1971). Cada corpúsculo basal recebeu um número e possui uma posição relativa às demais estruturas. O corpúsculo basal #2 emite de oito a nove fibras estriadas, denominadas filamentos sigmóides (Honigberg *et al.*, 1971). Estes filamentos sigmóides encontram-se próximos à

região da junção pelta-axóstilo e conectam os corpúsculos basais a este complexo, bem como à superfície interna da pelta (Honigberg *et al.*, 1971). Entre o corpúsculo basal #2 e o conectado a ele e à pelta, encontra-se o corpo supra-cinetossomal (Honigberg *et al.*, 1971). As funções do corpo supra-cinetossomal e dos filamentos sigmóides são ainda desconhecidas, embora se especule que sejam centros organizadores dos microtúbulos do complexo pelta-axóstilo (Brugerolle *et al.*, 2000).

Verificou-se que os flagelos anteriores possuem batimentos tipo ciliar, enquanto o recorrente, batimentos tipo flagelar (Monteiro-Leal *et al.*, 1995). Isto faz com que o corpo do parasito gire em torno do seu próprio eixo e produza uma rotação.

#### **1.3.6.2 Complexo Pelta-Axostilar**

O axóstilo de tricomonadídeos é uma estrutura axial, formada por microtúbulos, com função de sustentação e participação na cariocinese. O complexo pelta-axostilar é formado pela pelta e pelo axóstilo e se apresentam como uma folha de microtúbulos, arrumados lado a lado, percorrendo, o axóstilo, o eixo longitudinal da célula, desde sua porção anterior até o extremo posterior da célula, onde termina como uma forma afilada (Honigberg *et al.*, 1971; Benchimol, 2004). A pelta se encontra numa posição mais anterior e contígua ao axóstilo, sustentando as paredes do canal periflagelar, formando uma espécie de “colarinho” na região de emergência dos flagelos (Honigberg *et al.*, 1971; Benchimol, 2004).

Benchimol & De Souza (1987), utilizando microscopia eletrônica de alta voltagem, mostraram a associação de hidrogenossomos com microtúbulos do sistema pelta-axostilar em *T. foetus*. Posteriormente, utilizando técnicas de congelamento ultrarápido, Benchimol e colaboradores (2000) sugeriram que esta associação seria estabelecida por filamentos delgados. Verificou-se também, após o uso de citoquímica ultraestrutural para a detecção de glicose-6-fosfatase, a presença de perfis de retículo endoplasmático percorrendo paralelo aos microtúbulos do axóstilo (Benchimol *et al.*, 2000).

Alguns autores propuseram que o axóstilo de tricomonas fosse formado por microtúbulos lábeis, já que estes seriam despolimerizados durante o início da divisão do parasito ou quando submetidos ao tratamento de drogas que afetam os microtúbulos, como a colchicina (Brugerolle, 1975; Juliano *et al.*, 1986; Viscogliosi & Brugerolle, 1994; Delgado-Viscogliosi *et al.*, 1996). No entanto, nosso grupo mostrou que os microtúbulos do axóstilo são estáveis, permanecendo íntegros durante todo o processo de divisão celular (participando inclusive da cariocinese) ou mesmo quando submetidos a tratamentos com drogas que afetam o citoesqueleto, como vimblastina, colchicina, nocodazol e taxol (Silva-Filho & De Souza, 1986; Batista *et al.*, 1988; Ribeiro *et al.*, 2000; 2002a; Madeiro da Costa & Benchimol, 2004).

#### **1.3.6.3 Costa**

A costa é uma estrutura presente em todos os tricomonadídeos. Assim como as fibras parabasais, a costa é cilíndrica e formada por proteínas que apresentam uma periodicidade com bandas claras e escuras. Contudo a costa é maior e mais larga do que as fibras parabasais (Benchimol, 2004).

A costa percorre o sentido ântero-posterior da região dorsal do parasito, estando sempre associada à membrana ondulante e ao flagelo recorrente, por meio de filamentos observados por freeze-etching (Benchimol *et al.*, 1993). A costa possui origem entre os corpúsculos basais #2 e #3 (Honigberg *et al.*, 1971). O fato de haver filamentos que se projetam da costa, principalmente na região voltada para membrana ondulante, reforçou a idéia de que a costa funcione como uma estrutura de ancoramento (Benchimol *et al.*, 1993).

Existem duas classificações distintas de costa, denominadas tipos A e B, dada por diferenças no padrão periódico de sua estrutura e no formato da região onde ela se origina (Honigberg, *et al.*, 1971). O padrão de estriação da costa do tipo A (presente em *T. foetus*) é em bandas paralelas, alternando bandas eletrodensas (com cerca de 37 nm de largura) com

bandas mais claras (com largura aproximada de 49 nm). O padrão de costa tipo B (presente em *T. vaginalis*) apresenta estriações semelhantes à “espinha de peixe”, com periodicidade de cerca de 42 nm.

#### **1.3.6.4 Centrossomos e Fuso mitótico**

Os centrossomos dos tricomonádídeos são formados pelos corpúsculos basais e pelo atractóforo, que é um centro organizador de microtúbulos (Honigberg & Brugerolle, 1990). Os atractóforos são constituídos por um material denso em forma de pêndulo localizado na base dos corpúsculos basais das tricomonas e de outros parabasalídeos (Brugerolle, 1975; Ribeiro *et al.*, 2002a).

Durante a divisão celular, os atractóforos se tornam responsáveis pela nucleação dos microtúbulos que constituirão o fuso mitótico. Os tricomonádídeos apresentam um tipo de mitose muito peculiar chamado de pleuomitose, que é uma mitose fechada com fuso extranuclear (Brugerolle, 1975; Ribeiro *et al.*, 2000; 2002a). Neste tipo de mitose, o envoltório nuclear permanece íntegro durante todo o processo de divisão celular e não há formação da placa metafásica. O fuso mitótico extranuclear, se dispõe lateralmente ao núcleo sendo formado por dois grupos de microtúbulos: os microtúbulos de pólo-a-polo e de pólo-a-núcleo (Brugerolle, 1975; Ribeiro *et al.*, 2000; 2002a). Os microtúbulos de pólo-a-núcleo interagem diretamente com o envelope nuclear e não com os cinetócoros dos cromossomos. Os microtúbulos de pólo-a-polo, também chamados de paradesmose, formam um feixe espesso e coeso entre os atractóforos duplicados (Brugerolle, 1975; Raikov, 1994; Ribeiro *et al.*, 2002a). À medida que a mitose transcorre, os microtúbulos de pólo-a-polo continuam a se alongar e podem se tornar curvos na forma de “U” ou “V” (Brugerolle, 1975; Viscogliosi & Brugerolle, 1994; Ribeiro *et al.*, 2002a).

#### **1.3.7 Núcleo e Divisão**

Os tricomonádídeos, quando não se encontram em divisão, apresentam um único núcleo localizado, preferencialmente, na região anterior da célula. O envoltório nuclear destes parasitos se apresenta como em eucariotos superiores. A porção mais externa está em continuação com o retículo enquanto a membrana interna se encontra voltada para a matriz nuclear. Inúmeros complexos de poros típicos estão distribuídos ao longo do envoltório (Benchimol *et al.*, 1982a; Benchimol, 2004). Contudo, as lamínas nucleares ainda não foram detectadas.

O fato destes organismos apresentarem uma divisão fechada com fuso extranuclear, dificulta a análise do comportamento celular durante a divisão. Entretanto, pesquisas apontam, além da interfase (períodos  $G_1$ , S e  $G_2$ ), quatro etapas distintas na mitose (Ribeiro *et al.*, 2000; 2002a; 2002b). No início da interfase ( $G_1$ ), o parasito apresenta a típica forma oval e suas estruturas ainda não foram duplicadas. Posteriormente, nos períodos S/ $G_2$ , ocorre a duplicação dos flagelos (anteriores e recorrente), do complexo pelta-axóstilo, da costa e do material genético.

Na fase 1 da divisão celular, o protozoário começa a assumir uma forma triangular, pois os axóstilos duplicados se movimentam para os lados opostos junto com os cinetossomos. Na fase 2, o núcleo é estrangulado pelos axóstilos (que posteriormente culminará na cariocinese) e o flagelo recorrente é elevado a uma posição perpendicular ao eixo axial do corpo celular. Estas mudanças fazem com que o parasito assumira forma alongada. A transição da fase 2 para 3 é caracterizada pela cariocinese. Por último, a fase 4 se caracteriza pela separação das células-filhas. Os movimentos dos flagelos parecem auxiliar a citocinese (Ribeiro *et al.*, 2000; 2002a; 2002b). O mecanismo de segregação dos cromossomos das tricomonas ainda não foi elucidado.

Existem controvérsias quanto ao comportamento das estruturas do citoesqueleto durante a divisão celular em tricomonas. Tem sido sugerido o desaparecimento do axóstilo no início do processo da mitose, indicando sua possível despolimerização (Samuels, 1957; 1959; Brugerolle, 1975; Viscogliosi & Brugerolle, 1994; Delgado-Viscogliosi *et al.*, 1996).

Segundo esses autores, os microtúbulos do fuso de pólo-a-núcleo seriam os únicos responsáveis pela cariocinese e os microtúbulos de pólo-a-pólo seriam essenciais para a separação das células-filhas. Há também discordâncias a respeito do comportamento dos flagelos. Enquanto Viscogliosi & Brugerolle (1994) propuseram que tais estruturas se duplicariam durante a mitose, Ribeiro *et al.*, (2000) afirmaram que esta duplicação aconteceria na interfase, na fase S.

#### **1.4 Interação-parasito hospedeiro**

Apesar da alta incidência de tricomonas em diversas espécies, pouco se sabe sobre os mecanismos das interações parasito-hospedeiro. As tricomonas não penetram no epitélio, estabelecendo uma forte relação de superfície com a célula-hospedeira, sendo considerados parasitos não-invasivos, extracelulares. O parasito ao aderir às células epiteliais geralmente forma interdigitações (Rasmussen *et al.*, 1986; Gonzáles-Robles *et al.* 1995).

Um fato bastante conhecido é a mudança drástica de forma que o parasito assume após a adesão, tornando-se amebóide, sendo este considerado um sinal de virulência (Arroyo *et al.*, 1993). Este fato pode estar relacionado a uma maior superfície de adesão entre as duas células, estando as duas membranas em tão íntimo contato que parecem estar em continuidade em alguns pontos (Furtado & Benchimol, 1998).

Para que se instale a tricomonose, o parasito deve primeiramente ultrapassar a barreira de muco para interagir com o epitélio vaginal (Alderete & Garza, 1988). Isso parece acontecer devido ao movimento flagelar e a ação de enzimas proteolíticas, chamadas mucinases, que vão digerir o muco até que os parasitos tenham alcançado as células epiteliais da vagina (Lehker & Sweeney, 1999). Muitos pesquisadores acreditam que os danos provocados pelo parasito ocorram através de um processo dependente do contato com a célula hospedeira, sendo este um pré-requisito para a citotoxicidade (Gonzáles-Robles

*et al.*, 1995; Burgess *et al.*, 1990; Singh *et al.*, 2004). Entretanto, alguns autores reportaram que proteases e outros produtos metabólicos seriam liberados pelos parasitos no ambiente vaginal, e que estes seriam responsáveis pelos efeitos citotóxicos nas células hospedeiras, não havendo necessidade do contato do parasito com as células vaginais (Garber & Lemchuk-Favel, 1989; Pindak *et al.*, 1993). Contudo, através de experimentos de interação utilizando uma membrana permeável entre os parasitos e células hospedeiras, foi possível confirmar que o contato é necessário para que ocorra o efeito citotóxico (Gilbert *et al.*, 2000).

Foi proposto que a adesão de *T. vaginalis* às células epiteliais seria mediada pelas adesinas (APs) denominadas AP65, AP51, AP33 e AP23. Este grupo de quatro adesinas reconheceria proteínas específicas do hospedeiro através de uma interação tipo ligante-receptor (Arroyo & Alderete, 1992; Arroyo *et al.*, 1993). Porém, o fato das adesinas serem consideradas ligantes exclusivos do processo de adesão nas células epiteliais vaginais recebeu críticas. Foi demonstrado que as adesinas de tricomonas também são capazes de se ligar a diferentes tipos celulares, como eritrócitos de diferentes espécies, *Mycoplasma hominis* e linhagens celulares como células Vero, CHO e HeLa (Addis *et al.*, 2000). Sugerindo assim, que a especificidade da adesão desse parasito ao epitélio vaginal não ocorreria por estas adesinas.

Em relação a *T. foetus*, acredita-se que estruturas imunogênicas, importantes na adesão deste parasito às células epiteliais, estariam localizadas em um componente do complexo da adesina Tf190 (Shaia *et al.*, 1998). Observou-se também a ação mediadora de laminina e fibronectina no processo de interação com *T. foetus*. Em experimentos utilizando partículas de poliestireno revestidas com diferentes tipos de proteínas e utilizando a linhagem celular MDCK, foi visto que a adesão do parasito foi intensificada pela laminina (Silva Filho & De Souza, 1988).

Há também evidências da adesão ser mediada por glicoconjugados. Em testes de inibição com açúcares competidores, observou-se uma diminuição significativa da adesão de *T. foetus* e *T. vaginalis* (Bonilha *et al.*, 1995). Outro fator interessante é a ocorrência de

uma alternância de expressão de uma glicoproteína altamente imunogênica denominada P270, na superfície celular de *T. vaginalis* (Alderete *et al.*, 1988; Engbring *et al.*, 1996).

Admite-se que durante a interação, as tricomonas reconhecem molecularmente o ambiente vaginal e manipulam estas informações a seu favor, utilizando neste processo moléculas envolvidas com a transdução de sinais, adesão à célula epitelial, interação com a matriz extracelular e com a citotoxicidade (Silva Filho *et al.*, 1989). No ambiente onde o parasito se encontra ocorrem intensas mudanças hormonais, o que é de grande importância, pois há indícios do aumento da adesão de tricomonas em interação com células MDCK, sob ação do estrogênio (Silva-Filho & Bonilha, 1992).

Outra classe de moléculas que estaria diretamente ligada com o processo de adesão é representada por cisteíno-proteases (Arroyo & Alderete, 1989). Uma cisteíno-protease de 30 kDa (CP-30) foi encontrada mediando processos citotóxicos de *T. foetus* em células epiteliais vaginais bovinas (Singh *et al.*, 1999) e de *T. vaginalis* em células HeLa e epiteliais vaginais humanas (Mendonza-Lopes *et al.*, 2000). Esta cisteíno-protease estaria relacionada ao processo de apoptose tanto das células vaginais bovinas (Singh *et al.*, 2004) quanto às do endométrio bovino (Singh *et al.*, 2005), agindo de maneira estratégica na modulação deste evento celular.

Pelo fato de estar envolvida na degradação de proteínas da matriz extracelular, como a laminina e a fibronectina, a CP-30 potencializaria o processo de citotoxicidade do parasito, sendo constatada a sua ligação com as proteínas de matriz (Silva-Filho & De Souza, 1988; Benchimol *et al.*, 1990; Crouch & Alderete, 1999). Sendo assim, as tricomonas assumiriam um caráter mais invasivo, pois o acesso do parasito às camadas epiteliais profundas provocaria a esfoliação das camadas mais superficiais. Dependendo da virulência da cepa, ainda pode ocorrer a ruptura do epitélio e de suas junções, atingindo a lâmina basal e causando infecções múltiplas (Krieger *et al.*, 1985; Gault *et al.*, 1995). Neste ambiente há uma baixa tensão de oxigênio conferindo sucesso à infecção visto que o parasito é microaerófilo.

Embora a importância das cisteíno-proteases tenha sido demonstrada *in vitro*, seu papel parece ser relevante também *in vivo* (Felleisen, 1999). Foi observado ainda que algumas cisteíno-proteases de *T. foetus* são capazes de clivar as imunoglobulinas IgG1 e IgG2 bovinas, que podem matar o parasito *in vitro* (Corbeil, 1994; De Azevedo & De Souza, 1992; 1996). Acredita-se que estas cisteíno-proteases sejam capazes de atuar contra a resposta imune do hospedeiro, internalizando seus anticorpos após sua ligação, processo denominado mimetismo molecular (Granger & Wardwood, 1996). Trabalhos anteriores relatam que *T. vaginalis* não causam efeitos citotóxicos em células vaginais bovinas (Singh *et al.*, 2004) e o contrário também se aplicaria para *T. foetus* em relação às células vaginais humanas (Lockwood *et al.*, 1984; Gilbert *et al.*, 2000). Experimentos em que se adicionaram extratos purificados de CP30 de *T. foetus* em células vaginais humanas, não foi observada indução de apoptose, o mesmo com *T. vaginalis* em células vaginais bovinas (Singh *et al.*, 2004). Esses autores acreditam que haja uma interação espécie-específica entre os parasitos e seus hospedeiros, não podendo assim, *T. vaginalis* infectar células epiteliais do trato reprodutivo bovino.

#### **1.4.1 Modelos Experimentais**

Os primeiros modelos de estudos da interação de tricomonas com possíveis hospedeiros foram realizados com fragmentos de fetos e embriões de galinha (Hogue, 1943). O aperfeiçoamento das técnicas de cultivo celular possibilitou a exploração de outros aspectos morfológicos e moleculares durante essa interação.

Nos últimos anos, muitos avanços foram alcançados para o entendimento da interação dos tricomonádídeos e as células hospedeiras. No entanto, os estudos que proporcionaram estes avanços, não empregaram células comumente usadas pelos parasitos *in vivo*, que seriam o alvo natural. Com o objetivo de se estudar o efeito citotóxico

da tricomonas e os danos causados pelo parasito foram utilizadas linhagens celulares como MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) (González-Robles *et al.*, 1995), HeLa (adenocarcinoma cervical humano) (Krieger, 1990; Alderete *et al.*, 1995), McCoy de camundongo (Brasseur & Savel, 1982), Vero provenientes de rim de macaco (Alderete & Pearlman, 1984; Burguess *et al.*, 1990), RK-13 de rim de coelhos (Heath, 1981), testículos de babuínos (Alderete & Pearlman, 1984), células amnióticas humanas – WISH (Honigberg, 1989) CHO - ovário de hamster chinês (Krieger *et al.*, 1985).

Culturas de células epiteliais vaginais humanas e bovinas, bem como células obtidas de esfoliação por raspagem de células vaginais bovinas têm sido utilizadas com objetivos similares (Corbeil *et al.*,; Singh *et al.*, 1999; 1989; Gilbert *et al.*, 2000; Sommer *et al.*, 2005). Recentemente, células epiteliais de útero bovino foram utilizadas como modelo de interação com *T. foetus*, onde foi observado que o parasito se estabelece e é citotóxico a esse epitélio (Singh *et al.*, 2005). Entretanto, existem poucos estudos relacionados a infecções por tricomonas em partes mais profundas do trato reprodutivo. A infecção dos parasitos começa pela adesão na vagina, causando a vaginite e alguns autores relatam que as tricomonas são capazes de mover-se até o útero e oviduto (Singh *et al.*, 2004) e estudos *in vivo* demonstraram a presença do parasito nesses dois órgãos (Parsonson *et al.*, 1976).

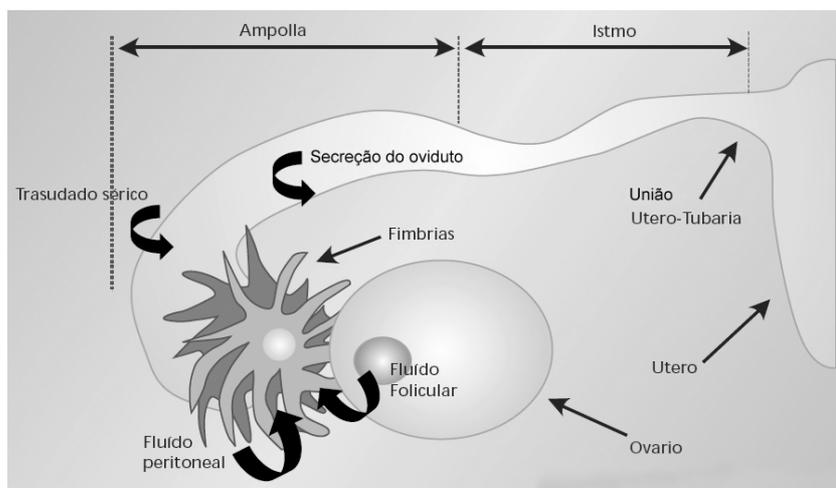
#### **1.4.2 Células epiteliais**

Células epiteliais funcionam promovendo uma barreira entre dois ambientes muito diferentes e permitem o transporte vetorial através dessa camada. Componentes celulares altamente especializados evoluíram para permitir que o epitélio formasse uma barreira impermeável e que fosse capaz de segregar proteínas e lipídeos do domínio apical e basolateral da membrana plasmática (Denker & Nigam, 1998). Este tipo celular possui sua superfície apical voltada para o lúmen e freqüentemente cobertas por microvilosidades. A porção basal apóia-se na lâmina basal, a qual se encontra sobre o tecido conjuntivo. A porção lateral está em íntimo contato com outras células adjacentes.

O desenvolvimento e manutenção da polaridade epitelial requerem adesão célula-célula e célula-substrato, com a presença localizada do citoesqueleto sub-membranar e vias de transporte intracelulares especializadas (Zahraoui *et al.*, 2000). O espaço paracelular é conhecido pela sua contribuição significativa na absorção passiva de solutos hidrofílicos e água através do epitélio (Madara *et al.*, 1990). Esse espaço pode ser uma via de transporte regulada e altamente dinâmica que depende do estado molecular e localização celular de diferentes elementos que formam o complexo juncional intercelular (Citi, 1993).

### 1.4.3 Células do oviduto

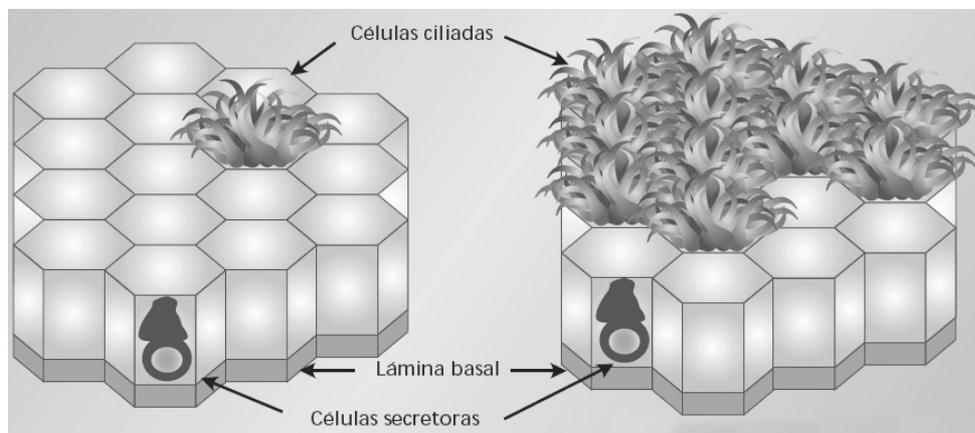
Desde o ponto de vista anatômico, podemos dividir o oviduto ou trompa de falópio em quatro regiões desde o ovário (Fig. 3): as regiões da fímbrias (infundíbulo), com um aspecto tentacular no seu extremo proximal; seguido da região da ampola, o ístmo e por último é encontrado a união útero-tubária, adjacente ao útero (Harper, 1994; Abe, 1996).



**Figura 3** – Esquema de um oviduto e suas estruturas. Também são indicados os fluidos (Quintero *et al.*, 2003).

As distintas regiões do oviduto são compostas por três tipos celulares similares, mas em diferentes proporções. A parede do oviduto consiste de três camadas diferentes: uma serosa externa, uma muscular e uma mucosa. O epitélio do oviduto é formado principalmente por células cilíndricas ciliadas e células secretoras (Fig. 4) (Fawcett, 1995). As células ciliadas do oviduto se encontram em grande proporção no epitélio das fímbrias e da ampola (Salamonsen & Nancarrow, 1994). Observações *in vivo* realizadas em primatas

demonstraram claramente que os cílios têm um papel decisivo no transporte ovocitário através dos segmentos do oviduto (Quintero *et al.*, 2003). Contudo, a função das células ciliadas no istmo não está completamente esclarecida.



**Figura 4** – Esquema representativo do epitélio do oviduto, apresentando todos os tipos celulares mais importantes (Quintero *et al.*, 2003).

As células secretoras formam elevações ou cúpulas no epitélio (Harper, 1994). A estrutura interna das células cilíndricas secretoras, não ciliadas, é típica de células que sintetizam proteínas ativamente, com grande quantidade de grânulos secretores com estrutura distinta e densidade eletrônica (Salamonsen & Nancarrow, 1994). Não se conhece com exatidão se a qualidade da secreção das distintas regiões do oviduto é a mesma, embora existam tipos celulares similares (Salamonsen & Nancarrow, 1994; Abe, 1996). A luz tubária se encontra banhada pelo fluido do oviduto, o qual resulta principalmente do aporte do soro e da secreção do epitélio do oviduto e, em menor medida, do fluido folicular e do fluido peritoneal (Leese, 1988).

Aproximadamente, 25% dos casos de infertilidade feminina são devidos a transtornos tubários. Somado a esta percentagem, há ainda, 5 a 10% de casais que não conseguem engravidar, mesmo sem diagnóstico de algum transtorno aparente (Evers, 2002; Cahill & Wardle, 2002). Neste último grupo, muito provavelmente, há causas tubárias não diagnosticadas com as técnicas convencionais.

Os transtornos tubários mais frequentes resultam das enfermidades pélvicas inflamatórias causadas por infecções microbianas, provocando danos celulares como a

perda de células ciliadas, a produção de exsudato inflamatório gerando aderências entre as pregas das mucosas (Henry-Suchet, 2000). Outra causa é a hidro-salpinge, onde as fímbrias não se reconhecem (Strandell & Lindhard, 2002). Histologicamente existe a perda do epitélio ciliar ou a invaginação do mesmo. Outras condições que podem causar a esterilidade são as fibroses obliterativas, a salpingite, a inflamação crônica, a endometriose e, menos frequentemente, os pólipos, a tuberculose e as seqüelas de uma gravidez ectópica (Lehner *et al.*, 2000; Cahill & Wardle, 2002; Eckert *et al.*, 2002).

Evidente que das patologias que afetam as trompas, salvo nos processos obstrutivos, a alteração do epitélio tubário, seja morfológica ou funcional, seria um obstáculo para o processo reprodutivo em suas etapas iniciais. Deve-se lembrar que a secreção do oviduto está sempre no ambiente que rodeia o processo da fecundação. Desse modo, tem sido sugerido que as alterações na qualidade desta secreção podem influenciar o processo de fecundação, facilitando-o ou dificultando-o (Harper, 1994; Salamonsen & Nacarroo, 1994).

Além de seu papel anatômico, como a conexão entre o ovário e o útero, o oviduto tem um papel importante no processo reprodutivo, agindo como um ambiente condutor para a maturação e transporte dos gametas, fertilização e desenvolvimento do embrião (Chang, 1951; Kille & Hamner, 1973; Shapiro *et al.*, 1974; Gaunt, 1985; Kapur & Johnson, 1985). Os componentes luminais do oviduto são formados pela transdução seletiva dos componentes do soro (Feigelson & Kay, 1972; Oliphant *et al.*, 1978) e produtos específicos secretados a partir do epitélio do oviduto (Urzua *et al.*, 1970; Stone *et al.*, 1980). A proliferação, ciliação e processo secretor do epitélio do oviduto são influenciados por hormônios ovarianos (Fredricsson, 1959; McDaniel *et al.*, 1968; Brenner, 1969; Odor *et al.*, 1983). As secreções dos ovidutos podem ser melhor estudadas independentemente de contribuições do soro, pelo crescimento de células epiteliais *in vitro* em culturas sob condições controladas.

A especificidade das interações fisiológicas íntimas entre gametas, embriões e células do oviduto afeta tanto o epitélio do oviduto quanto os gametas e embriões (Lee *et al.*, 2002; Fazeli *et al.*, 2004; Georgiou *et al.*, 2005). O epitélio promove a viabilidade e

motilidade dos espermatozoides aderidos e modula a capacitação do espermatozoide (Dobrinski *et al.*, 1997; Smith & Nothnick, 1997; Suarez, 2002; Fazeli *et al.*, 2003), aumentando assim a qualidade da maturação do ovócito e conseqüentemente a proliferação *in vitro* das células do blastocisto (Kidson *et al.*, 2003), bem como o desenvolvimento dos embriões (Gandolfi & Moor, 1987).

O mecanismo da atividade embriotrófica pelas células do oviduto não é ainda conhecido, alguns artigos sugerem que os fatores de crescimento secretados pelas células de oviduto estimulem o desenvolvimento dos embriões (Gabler *et al.*, 1997; Daliri *et al.*, 1999), incluindo IGF-I / IGF-2 “*insulin-like growth factor*”, EGF “*epidermal growth factor*”, TGF- $\alpha$  “*transforming growth factor alfa*” e FGFs “*fibroblast growth factor*”.

Dados relacionados aos efeitos citotóxicos de *T. foetus* em células epiteliais de oviduto bovino são importantes, porém escassos. O emprego pioneiro de oviduto inteiro permitiu observar características de morte celular induzidas pelo parasito (Benchimol *et al.*, 2006). A cultura de células de oviduto bovino tem sido descrita para utilização em diferentes experimentos que não a interação com parasitos, como por exemplo, fertilização e desenvolvimento embrionário (Walter, 1995). Até o momento, este tipo de cultura celular não foi empregado para testes de interação de *T. foetus* e *T. vaginalis in vitro*. Desse modo, nossa proposta é avaliar diferentes aspectos da interação desses parasitos, com um modelo celular que ocorre durante a infecção *in vivo*.

## 1.5 Objetivos

### 1.5.1 Geral

- Investigar os mecanismos de citotoxicidade usados por *Tritrichomonas foetus* e *Trichomonas vaginalis* em cultura primária de células de oviduto bovino.

### 1.5.2 Específicos

- Estabelecer uma cultura primária de oviduto bovino
- Induzir a interação dos parasitos com as células epiteliais de oviduto bovino em diferentes tempos
- Verificar e caracterizar o processo de adesão e citotoxicidade das tricomonas frente ao epitélio do oviduto
- Comparar a citotoxicidade de cepas mantidas por longo tempo sob cultivo em laboratório com aquelas obtidas recentemente (isolados frescos) de tricomonas quando co-incubadas com o epitélio de oviduto
- Testar se *T. vaginalis* é capaz de infectar células bovinas e assim esclarecer se a interação parasito-hospedeiro é espécie-específica
- Caracterizar os tipos de morte celular, induzidos nas células epiteliais durante a coincubação com tricomonas
- Verificar a participação de microfilamentos de actina na adesão de tricomonas ao epitélio de oviduto bovino

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Cultivo *in vitro* de *Tritrichomonas foetus* e de *Trichomonas vaginalis***

Microorganismos da cepa K de *T. foetus* foi isolada na década de 70, pelo Dr. Hélio Guida (Embrapa, Rio de Janeiro, Brasil), da cavidade prepucial de um touro naturalmente infectado do estado do Rio de Janeiro, Brasil. Duas cepas de *T. vaginalis* foram utilizadas: a cepa JT foi isolada no Hospital Universitário da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil e tem sido mantida em cultura desde 1980. A cepa FMV1 é um isolado fresco que foi gentilmente cedida pelo Dr. J. B. Jesus (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) e tem sido sendo mantida em cultura por não mais de sete dias, com passagens diárias. Baseando-se na habilidade de destruir células MDCK, a cepa JT foi anteriormente classificada como uma cepa de baixa virulência e a cepa FMV1 como uma cepa de alta virulência (Jesus *et al.*, 2004).

Os trofozoítos, tanto *T. foetus* K, como *T. vaginalis* JT e FMV1 foram cultivados axenicamente em tubos de vidro de 8 mL contendo 7 mL de meio TYM (Diamond, 1957) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Laborclin) inativado pelo calor (60°C por 1 hora). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C por 24 horas e o meio foi trocado após este período, que corresponde à fase logarítmica de crescimento dos parasitos.

O meio TYM é composto por: 22 mg/ml de triptose (BBL), 11 mg/ml de extrato de levedura (BBL), 5,6 mg/ml de maltose (Sigma Chemical Co.), 1 mg/ml de L-cisteína (Sigma Chemical Co.), 0,2 mg/ml de ácido ascórbico (Sigma Chemical Co.), 0,9 mg/ml de fosfato de potássio monobásico (Vetec) e 0,9 mg/ml de fosfato de potássio dibásico (Vetec). Após adicionar os componentes acima, o pH foi ajustado para 6,2 e o meio foi autoclavado a 120°C por 20 minutos.

Todas as observações de células vivas foram realizadas por microscopia óptica de contraste de fase utilizando microscópio óptico invertido Axiovert, Zeiss.

## **2.2 Cultura primária de células epiteliais de oviduto bovino**

Os ovidutos de vacas foram removidos inteiros em um abatedouro comercial, imersos em PBS estéril contendo 0,05g/l de sulfato de gentamicina e transportados para o laboratório em um período máximo de tempo de duas horas. A fimbria foi removida e o istmo e a ampola foram usados nos experimentos.

O istmo e a ampola dos ovidutos foram empregados como fonte de células epiteliais tal como descrito previamente (Joshi, 1988; Walter, 1995). A região luminal do órgão foi lavada com PBS gelado e o epitélio gentilmente pressionado com uma haste metálica e lavado novamente a fim de serem obtidas as células isoladas. Células ciliadas e não-ciliadas (células secretoras) foram obtidas depois de várias lavagens e transferidas para o meio de cultura 199 (M-5017, Sigma).

As células dos ovidutos foram mantidas em meio 199 suplementado com penicilina e estreptomicina (0,08 mg/ml cada) em garrafas plásticas FALCON de 25 cm<sup>2</sup>, incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar. O epitélio apresenta crescimento em uma semana de cultivo.

Para os testes de viabilidade, as células foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro de 12 mm de diâmetro sem revestimento (inóculo inicial de 2x10<sup>5</sup> células/ml) e os experimentos foram realizados quando confluência de 70-80% das

células foi alcançada ( $10^6$  células por poço). O meio de cultura foi trocado a cada dois dias. A proliferação foi controlada em um microscópio óptico invertido (Axiovert, Zeiss).

## **2.3 Experimentos de interação**

### **2.3.1 Experimentos de coincubação e ensaios de adesão**

Em todos os experimentos onde realizamos a interação de *T. foetus* e *T. vaginalis* com células epiteliais de oviduto bovino, a proporção foi de 5:1 (parasito:célula hospedeira). A proporção dos volumes de meio de cultura foi de 25% de meio TYM e 75% de meio 199 a fim de preservar as células epiteliais de oviduto. A adesão foi confirmada através de sucessivas lavagens da cultura após a exposição aos parasitos. Nos experimentos controle as células de oviduto foram utilizadas omitindo-se as tricomonas. O processo de interação foi seguido em microscópio óptico de contraste de fase Axiophot II da Zeiss (Alemanha).

### **2.3.2 Ensaio de citotoxicidade**

No intuito de avaliar a citotoxicidade dos parasitos nas células hospedeiras, foi utilizado o teste do cristal violeta (Alderete & Pearlman, 1984). As células de oviduto foram aderidas em placas de cultura de 24 poços em meio 199 e mantidas até formar uma monocamada confluenta ( $2 \times 10^5$  células/ml). Os parasitos foram adicionados na proporção mencionada acima e incubados por diferentes tempos a 37°C. Para os experimentos controle, os parasitos não foram adicionados. Ao final dos períodos de incubação, as células que restaram foram fixadas com 2% de paraformaldeído (PF), lavadas em PBS e marcadas com 0,13% de cristal violeta. O material corado foi subsequentemente lavado em água destilada e as placas mantidas ao ar para secar. Após a secagem total das placas, o material restante ainda corado, foi solubilizado com 1% de SDS em 50% de etanol. A intensidade desta coloração foi lida em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. A citotoxicidade foi calculada como  $1 - (E/C)$ , onde **E** representa as medidas das amostras experimentais e **C** as amostras controle.

## **2.4 Fluorescência**

#### **2.4.1 TUNEL**

Para analisar se houve fragmentação da cromatina nas células de oviduto após interação das tricomonas. O método do TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP Nick-end labeling*) foi executado usando o teste “*In Situ Cell Death Detection Kit*” (Roche Diagnostics, Meylan, França). Os parasitos foram incubados com as células de oviduto por 12 horas, fixadas à temperatura ambiente em 2% de PF (v/v) em 0,1M de tampão fosfato (pH 7,2) e subsequentemente lavadas em PBS. Logo após, as células foram permeabilizadas com 3% de Nonidet-40 (Sigma, St. Louis, USA) por 40 minutos. As amostras foram embebidas em cloreto de amônio 50 mM e 3% de albumina bovina (BSA) em PBS por 30 minutos. A marcação foi analisada de acordo com as instruções do fabricante. Controles positivos foram tratados com DNase I (Sigma, St.Louis, MO) por 10 minutos à temperatura ambiente, enquanto os controles negativos foram marcados com o fluorocromo (recipiente 2 do kit), que não possui o terminal da enzima transferase. As amostras foram observadas em um microscópio de fluorescência (Axiphot II – Zeiss, Alemanha). As imagens foram adquiridas usando uma câmera CCD em tempo real C5985-10 (Hamamatsu, Japão).

#### **2.4.2 Análise do Potencial de Membrana Mitocondrial**

As interações dos parasitos com células epiteliais de oviduto foram testadas com o marcador JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide, Molecular Probes, USA) após 12 horas de interação. Este teste foi usado como indicador de alterações do potencial de membrana mitocondrial das células hospedeiras após a infecção pelos parasitos. O JC-1 tem a propriedade de entrar seletivamente nas mitocôndrias e, de acordo com a magnitude do potencial de membrana mitocondrial, seu estado oligomérico se altera e a fluorescência pode passar da cor vermelha para a cor verde. A taxa de intensidade de fluorescência vermelha: verde do JC-1 fornece um perfil do potencial de membrana mitocondrial, onde uma alta taxa de potencial é observada com fluorescência vermelha e uma baixa taxa em fluorescência verde (Reers *et al.*, 1991).

As células epiteliais de oviduto infectadas com os parasitos foram incubadas com 5µg/ml do JC-1 a 37°C por 1 hora. As análises qualitativas microscópicas das imagens fluorescentes foram realizadas com filtros apropriados: a emissão vermelha do JC-1 é lida a 546 nm, enquanto a emissão verde em 488nm. As amostras foram observadas em um microscópio de fluorescência (Axiphot II – Zeiss, Alemanha). As imagens foram adquiridas usando uma câmera CCD em tempo real C5985-10 (Hamamatsu, Japão).

#### **2.4.3 Ensaio de PS (fosfatidilserina)**

Com o objetivo de se verificar a exposição de fosfatidilserina (PS) no folheto externo da membrana plasmática (sinal de apoptose) as células epiteliais de oviduto bovino foram co-cultivadas com os parasitos nas proporções e tempos mencionados acima. Como controles foram utilizados somente às células de oviduto, sem os parasitos. As culturas com as células ainda vivas foram lavadas e marcadas com anexina-V-FITC (Sigma, USA), marcador de PS na presença de cálcio, por 10 minutos e concomitantemente com iodeto de propídeo, marcador usado para indicar células que perderam viabilidade, como recomendado pelo fabricante. A marcação dupla para iodeto de propídeo e anexina-V não caracteriza exposição de PS no folheto externo da membrana, pois a anexina pode entrar na célula devido à perda de permeabilidade, ligando-se a PS no folheto interno da membrana. O resultado foi observado em um microscópio de fluorescência (Axiphot II – Zeiss, Alemanha). As imagens foram adquiridas usando uma câmera CCD em tempo real C5985-10 (Hamamatsu, Japão).

#### **2.4.4 Detecção de Caspases (Pan-caspase)**

Após a interação dos parasitos com as células epiteliais, a solução do reagente FLICA “Fluorochrome Inhibitors of Caspases” (CHEMICON, USA), foi adicionado ao meio de cultura juntamente com as células, sendo o mesmo preparado imediatamente antes da incubação. As células foram incubadas por 1 hora à temperatura de 37°C, sob uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse tempo, o meio foi retirado e as células foram lavadas

duas vezes em PBS pH 7,2. O fixador foi diluído seguindo as instruções do fabricante e as lamínulas contendo as células foram colocadas com a face para baixo sobre uma gota do fixador já diluído. As lamínulas foram seladas e mantidas a 2-8°C protegidas da luz por 24 horas. As amostras foram observadas em um microscópio de fluorescência (Axiphot II – Zeiss-Alemanha). As imagens foram adquiridas usando uma câmera CCD em tempo real C5985-10 (Hamamatsu, Japão).

#### **2.4.5 Imunofluorescência**

Foram feitas análises da participação das estruturas de citoesqueleto dos parasitos no momento de adesão através de ensaios de imunofluorescência com anticorpo monoclonal anti-actina de ameba (Sigma, St. Louis, USA). Para análise de indução de apoptose, via caspase-3, nas células epiteliais de oviduto pelo parasito, foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-caspase-3 (Sigma, St. Louis, USA). As células epiteliais de oviduto bovino foram cultivadas em lamínulas e após 6 e 12 horas de interação com as tricomonas, as amostras foram fixadas com 4% de paraformaldeído em 0,1M de tampão fosfato de sódio por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas 2 vezes em PBS. Em seguida, as células foram permeabilizadas com Triton-X 100 (0,01% em PBS pH 8,0) por 10 minutos, lavadas com PBS (pH 8,0) e bloqueadas com 50 mM de cloreto de amônio por 30 minutos e depois com PBS/BSA 3% por 15 minutos. Após os bloqueios, as células foram incubadas com os anticorpos monoclonais primários descritos acima, ambos diluídos 1:10, por 12 horas, à temperatura de 4°C. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas em PBS (pH 8,0) e bloqueadas novamente com 3% de PBS/BSA por 15 minutos. Logo em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo secundário (*anti-mouse*) conjugado com Alexa 488 (Molecular Probes, E.U.A), diluído 1:100 em 1% de PBS/BSA, por 40 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Finalmente, as lamínulas foram lavadas em PBS e água destilada e montadas em lâminas com o líquido anti-decaimento *slowfade* (Molecular Probes, E.U.A.). Em alguns experimentos, as células

foram incubadas com DAPI (5µg/ml) ou Hoescht (Sigma, St. Louis, USA) por 7 minutos, no escuro, antes de montar as lâminas.

As amostras foram observadas em um microscópio de fluorescência (Axiphot II – Zeiss, Alemanha). As imagens foram adquiridas usando uma câmera CCD em tempo real C5985-10 (Hamamatsu, Japão). Após capturadas, as imagens foram submetidas ao programa Image-J (version 1.4j) software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, E.U.A.), usadas para medir a intensidade de fluorescência. Todas as imagens foram adquiridas com o mesmo de tempo de exposição de luz, aumento e contraste. Análises geradas por computador produziram um espectro de cores e um gráfico tri-dimensional. Cada pico no gráfico representa a intensidade de um pixel do vermelho [UA (unidade arbitrária) = 0] e violeta (UA = 255) no espectro de cores, que foram associadas à intensidade de fluorescência. Os valores dos picos foram inseridos em imagens bi-dimensionais.

## **2.5 Microscopia eletrônica de varredura**

No processamento de rotina para microscopia eletrônica de varredura, as amostras coletadas após diversos tempos de interação das tricomonas com as células de oviduto, foram fixadas em 2,5% de glutaraldeído em 0,1M de tampão fosfato de sódio pH 7,2 por 2 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas em PBS para serem pós-fixadas por 30 minutos em 1% de OsO<sub>4</sub> em 0,1M de tampão fosfato de sódio pH 7,2. A seguir, as células foram lavadas em PBS e desidratadas em graus crescentes de etanol (15%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100% por duas vezes) em etapas de 15 minutos cada. As células foram secas pelo método de ponto-crítico (Bal-Tec CPD 030) e, em seguida, foram montadas em suportes metálicos apropriados. A metalização (Bal-Tec SCD 005) foi feita com ouro na espessura de 25 nm. As amostras foram observadas no microscópio eletrônico de varredura Jeol 5800. Após a aquisição, as imagens foram processadas e coloridas utilizando o programa Photoshop (versão 7.0).

## **2.6 Microscopia eletrônica de transmissão**

As células epiteliais de oviduto aderidas ao substrato foram submetidas a experimentos de interação com tricomonas. Após diversos tempos de interação, tais como 6, 12, 24 e 48 horas, as células foram coletadas e fixadas em 2,5% de glutaraldeído grau I em 0,1M de tampão cacodilato de sódio por, no mínimo, 2 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas em PBS e pós-fixadas por 30 minutos em 1% de OsO<sub>4</sub>, contendo 5 µM de CaCl<sub>2</sub> e 0,8% de ferricianeto de potássio em 0,1M de tampão cacodilato pH 7,2. Para aumentar o contraste do material, foi realizada uma etapa de coloração “*in bloc*” em 5% de acetato de uranila em água destilada, por 2 horas e ao abrigo da luz, lembrando-se que antes desta etapa o material foi lavado duas vezes em água destilada. Depois, as respectivas células foram desidratadas em graus crescentes de acetona (70%, 90% e 100% duas vezes) em etapas de 15 minutos. Por último, o material foi infiltrado e incluído em resina epoxy Poly Bed 812 (Epon) (Ploysciences Inc.), e polimerizado em estufa a 60°C por 72 horas. Após a polimerização, os blocos de resina foram cortados no ultramicrotomo (Leica- Ultracut UCT), obtendo-se cortes ultrafinos prateados (que medem aproximadamente 70nm), coletados em grades de cobre de 300 *mesh*. As grades contendo os cortes foram contrastadas com 5% de acetato de uranila por 30 minutos e citrato de chumbo por 10 minutos para posterior observação no microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1210.

## **2.7 Ensaios de interação com células de oviduto em suspensão**

Ensaios de adesão dos parasitos foram realizados com as células epiteliais de oviduto livres (em suspensão no meio). Estes testes foram feitos a fim de verificar se o parasito adere na célula hospedeira livre de um substrato. Após confluência de 70%, as células epiteliais de oviduto bovino foram removidas do substrato com 0,3% de tripsina-EDTA. Em seguida, as células epiteliais foram co-incubadas com os parasitos por 6, 12 e 24

horas em tubos plásticos sem revestimento. Procedimentos para microscopia eletrônica de varredura e transmissão foram realizados como descritos nos itens 2.5 e 2.6, respectivamente.

## **2.8 Ensaios de Fagocitose**

### **2.8.1 Fosfatase ácida**

A fim de verificar se o material fagocitado pelas tricomonas foi direcionado para lisossomos, foram realizadas análises citoquímicas pelo método modificado de Robinson e Karnovsky (1983), para detectar a presença da enzima fosfatase ácida. Após a interação dos parasitos com as células epiteliais de oviduto em tubos de ensaio, em determinados tempos e nas proporções citadas acima, as amostras foram coletadas por centrifugação, lavadas três vezes em PBS pH 7,2 à temperatura de 37°C e fixadas em 2,5% de glutaraldeído em 0,1M de tampão cacodilato de cálcio pH 7,2 por 1 hora à temperatura ambiente. Depois de fixadas, as amostras foram lavadas duas vezes em 0,1M de tampão TRIS-maleato pH 5,0. Após as lavagens, as células foram incubadas por 1 hora, à temperatura ambiente, em uma solução contendo 10 mM de  $\beta$ -glicerolfosfato de sódio e 2,4 mM de nitrato de chumbo em 0,1M de tampão TRIS-maleato pH 5,0. Em seguida, as células foram novamente lavadas duas vezes em 0,1M de tampão TRIS-maleato pH 5,0 e, em seguida, mais duas lavagens em 0,1M de tampão cacodilato de sódio pH 7,2. Depois, as amostras foram submetidas ao processamento de microscopia eletrônica de transmissão como acima especificado.

### **2.8.2 Uso do Vermelho de Rutênio**

O vermelho de rutênio (Electron Microscopy Sciences, Washington, USA) foi utilizado como marcador das células de oviduto, para demonstrar que o material fagocitado pelos parasitos é proveniente das células hospedeiras. As células de oviduto foram incubadas, ainda vivas, com 5mg/ml de vermelho de rutênio. As células foram incubadas, com vermelho rutênio, durante duas horas, no escuro, à temperatura ambiente. Foram realizadas sucessivas lavagens, a fim de retirar qualquer resíduo de vermelho de rutênio. Em seguida, foi feita a

interação dos parasitos por 6, 12 e 24 horas e posterior fixação com 2,5% de glutaraldeído em 0,1M de tampão cacodilato de sódio, seguindo o procedimento de rotina para microscopia eletrônica de transmissão como descrito no item 2.6. O material foi contrastado somente em citrato de chumbo, por 2 minutos.

## **2.9 Tratamento com citocalasina D**

A fim de testar a participação do citoesqueleto na adesão dos parasitos com as células epiteliais, foi utilizado a citocalasina D (Sigma, St. Louis, USA), droga que impede a polimerização dos microfilamentos de actina, estrutura do citoesqueleto. No momento da interação das tricomonas com as células epiteliais de oviduto, ambas as células foram incubadas com a droga na concentração de 60  $\mu$ M, por 6 e 12 horas, à temperatura de 37°C.

Como controles, os parasitos foram co-incubados com as células epiteliais sem a adição de droga ou somente com 0,5% de DMSO, pois é o agente diluidor. Depois das incubações, as amostras foram processadas para microscopia eletrônica de varredura, como descrito no item 2.5. Contagens foram realizadas, verificando-se quantos parasitos estavam aderidos às células epiteliais, em 100 campos aleatórios, nos ensaios controle e nos tratados com as drogas.

### **3. Resultados**

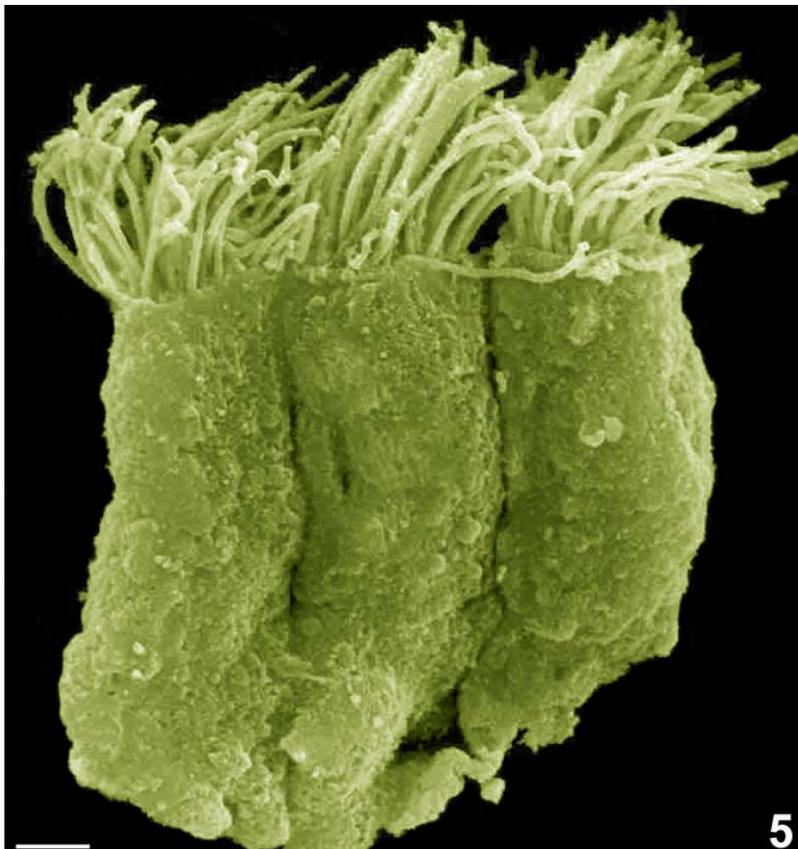
#### **3.1 Estabelecimento de uma cultura primária de células epiteliais de oviduto bovino**

No intuito de investigar os efeitos citotóxicos dos tricomonádídeos nas partes mais profundas do trato reprodutivo, um sistema de cultura primária de células epiteliais de oviduto bovino foi desenvolvido. Neste trabalho, a dissociação celular mecânica foi o método mais viável para isolar essas células epiteliais, fornecendo quantidade suficiente de células epiteliais.

As células epiteliais de oviduto isoladas, em suspensão, foram controladas morfológicamente por microscopia óptica, antes de iniciarem o processo de adesão. Nesta etapa havia grupos de células ciliadas e não-ciliadas (células secretoras). Em meio aos agregados celulares em suspensão foi possível observar células altas, colunares e ciliadas (Fig.5).

**Figura 5.** Microscopia eletrônica de varredura de três células ciliadas isoladas do epitélio do oviduto bovino. Note que estas células são colunares e apresentam polaridade com os cílios na região apical das células. Barra 2 $\mu$ m.

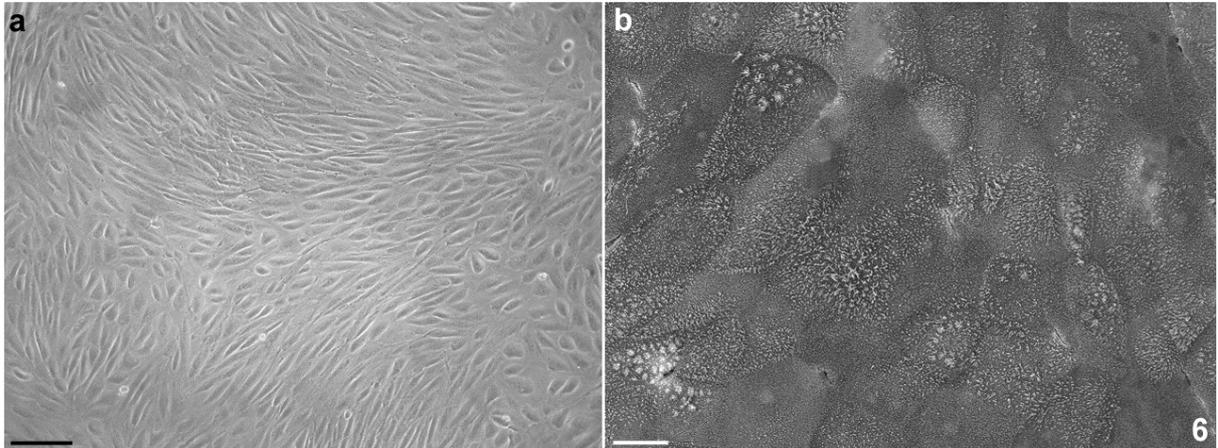
Após 24h do isolamento das células epiteliais foi possível notar que as células epiteliais se encontravam flutuando em meio de cultura, onde exibiram intensa atividade ciliar. Após 72h de cultivo estes agregados celulares começaram a aderir à base da garrafa



de cultura.

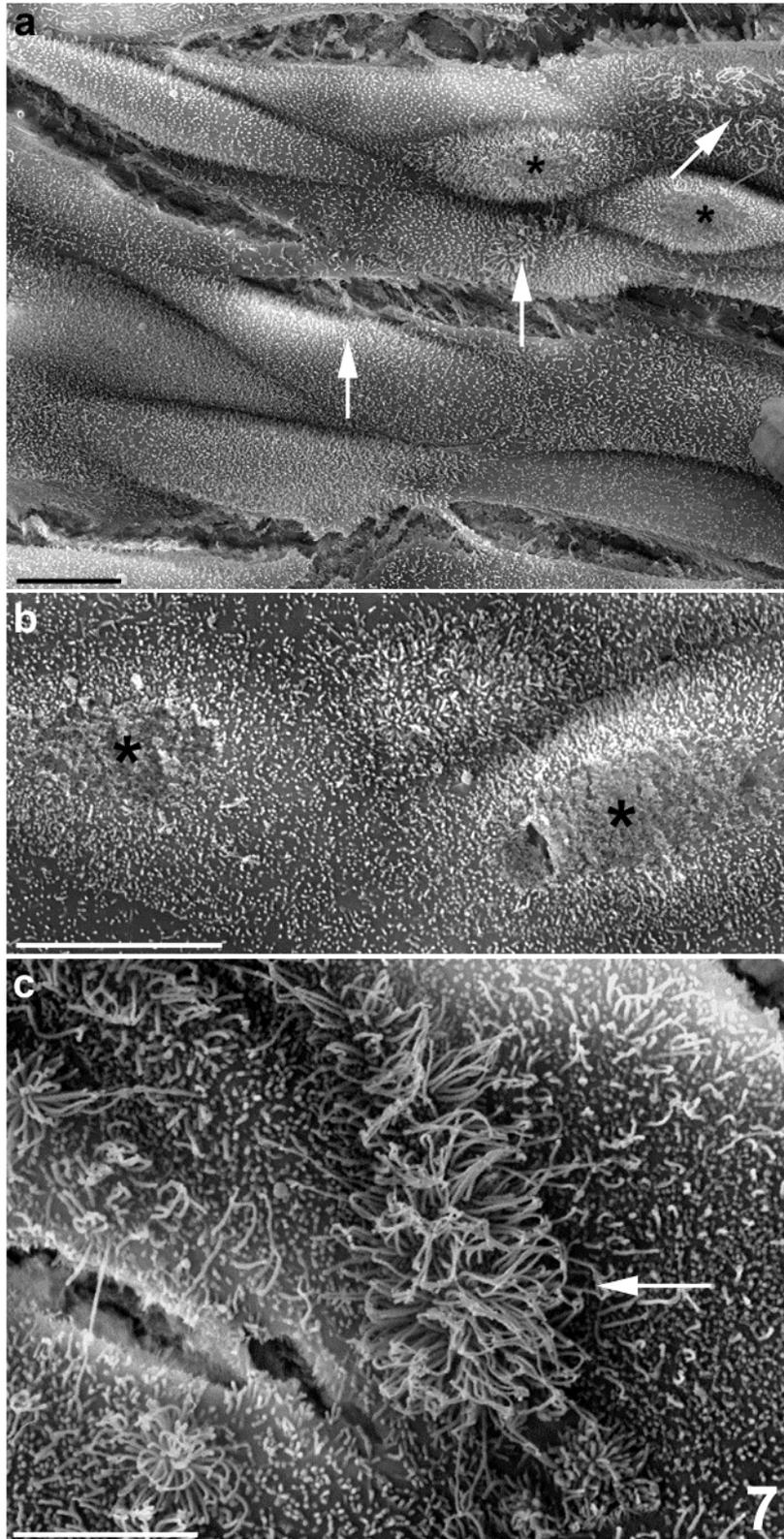
Depois de formada a monocamada, entre 3 e 5 dias de cultura (Fig. 6), os cílios gradualmente desapareceram da maioria das células aderidas. As células ciliadas foram observadas em regiões específicas na cultura celular, identificadas porque exibem um aspecto mais claro, observadas por

contraste de fase (Fig. 6a) e também por microscopia eletrônica de varredura (Fig. 6b).



**Figura 6.** Vista geral de uma cultura primária de oviduto bovino após confluência. Em **a**, observa-se uma monocamada de células após três dias de cultura, usando-se microscopia de contraste de fase. Na figura **b**, uma cultura primária antes da interação com tricomonas por microscopia eletrônica de varredura. Nota-se o epitélio confluyente e sem danos. Barras, Fig. 1a, 50 $\mu$ m; Fig. 1b, 10  $\mu$ m.

Depois de confluentes, as células exibiram morfologia e crescimento característicos, similares às células epiteliais *in vivo*, com uma população apresentando um contato íntimo célula-célula e algumas com a presença de cílios (Figs. 6-7). Após um cultivo de 7 dias, os cílios foram perdidos na maioria das células dos campos analisados deixando as superfícies celulares lisas (Figs. 7a-7b), embora possam ser notadas regiões onde ainda ocorrem células ciliadas (Fig. 7).

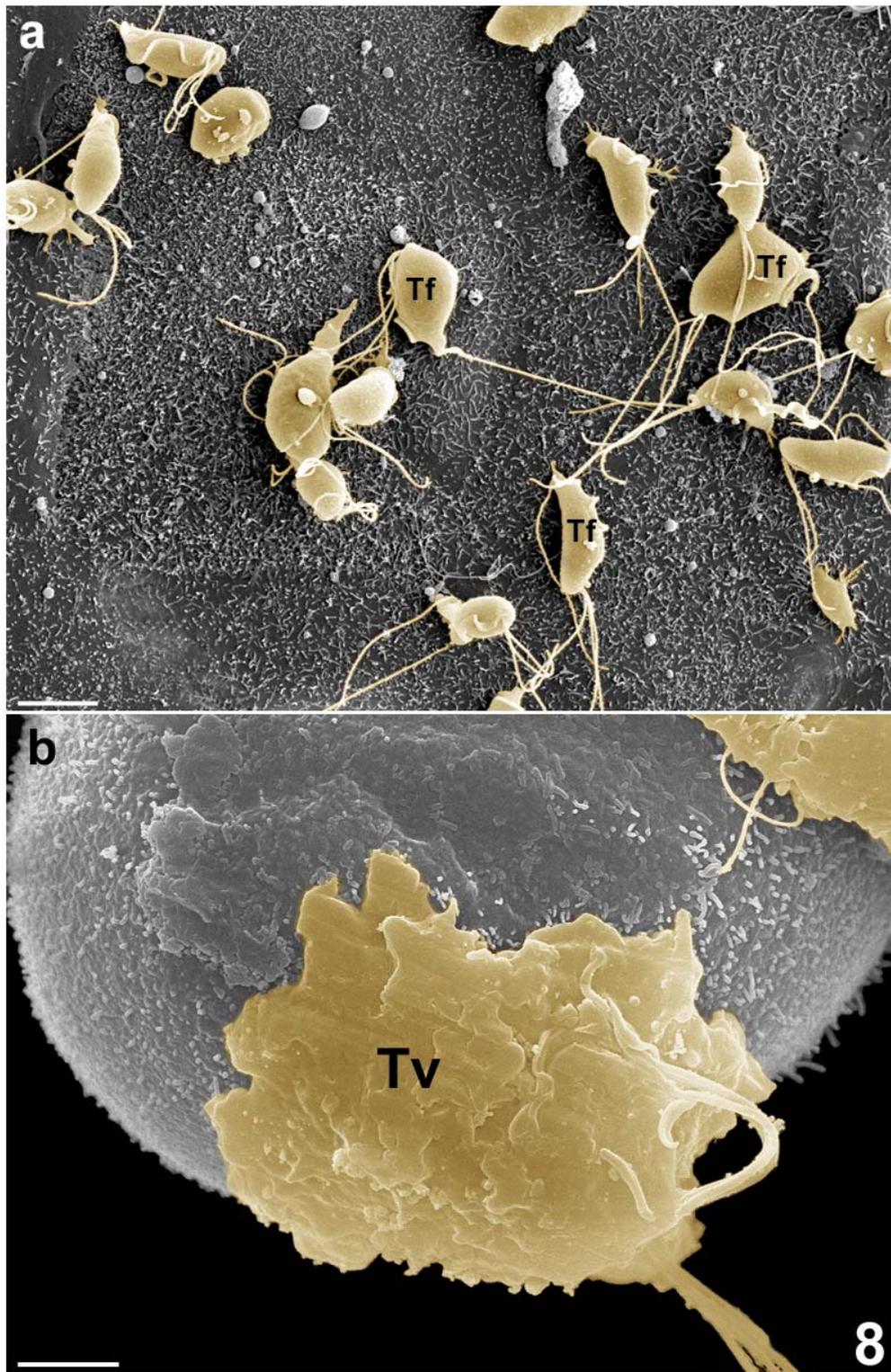


**Figura 7.** Microscopia eletrônica de varredura da monocamada de células epiteliais de oviduto bovino em cultura por 7 dias. Nota-se (a) o arranjo das células em confluência. Cílios são vistos em algumas células (setas). É possível observar na figura b, áreas desnudas correspondentes à regressão dos cílios (asteriscos), enquanto na figura c, algumas células apresentam os cílios intactos. Barras, Figs. 2a-2b 2  $\mu$ m; Fig. 2c, 1  $\mu$ m.

As células aderidas apresentaram intensa atividade proliferativa, com muitas figuras mitóticas (dados não mostrados) e chegaram à confluência dentro de 5-6 dias de cultura. As células em suspensão, ao contrário não proliferam, mas permanecem com suas características originais, assim como cílios, sob condições de cultura idênticas (dados não mostrados). As células começaram a se tornar vacuolizadas depois de 9-10 dias da confluência estabelecida. Assim, culturas sub-confluentes foram destacadas do substrato (garrafas plásticas) com tripsina-EDTA 0,3% e sub-cultivadas por, pelo menos, quatro vezes consecutivas sem que observássemos nenhuma mudança morfológica adversa.

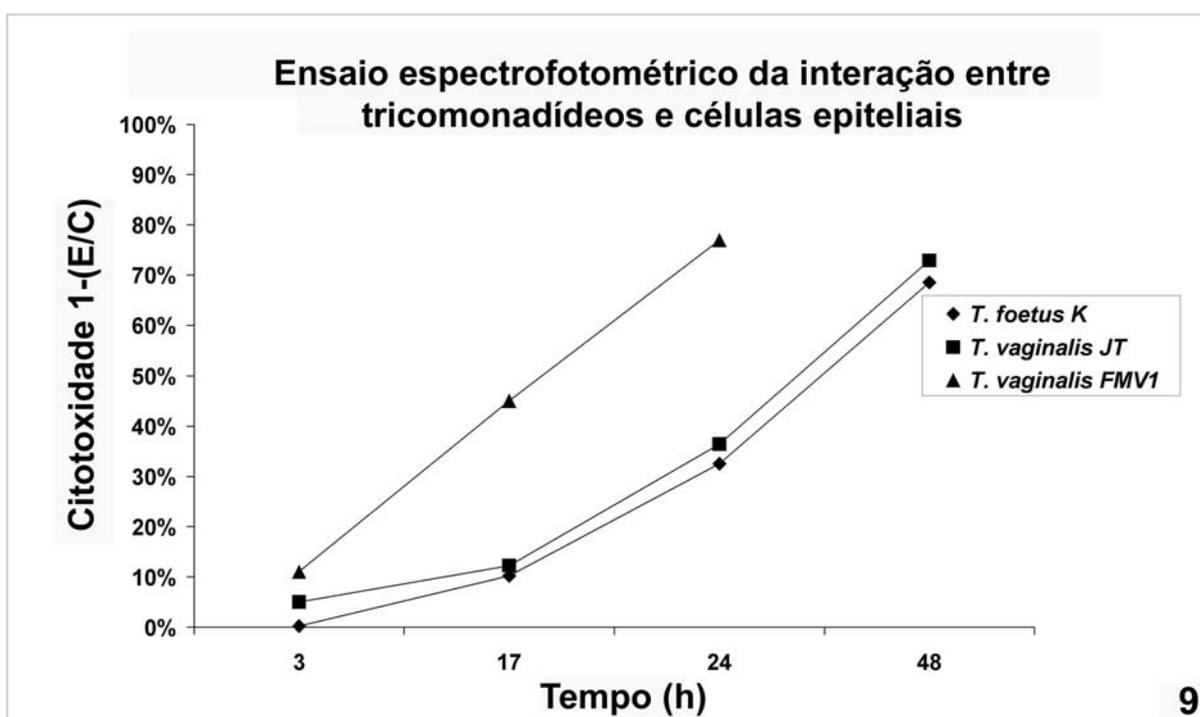
### **3.2 Ensaio de interação**

Os experimentos de interação foram feitos nas concentrações de 5:1 parasitos:células epiteliais, em intervalos de tempos de 30 minutos, 1 h, 2 h, 6 h, 12 h, 24 h e 48 horas. Experimentos com coincubação das células de oviduto e tricomonádídeos demonstraram que *T. foetus* adere de um modo distinto de *T. vaginalis*, o que já foi previamente caracterizado em estudos com células epiteliais vaginais humanas. Incubação das *T. foetus* K vivas com células de oviduto resultaram em pouco ou nenhum dano no espaço de tempo compreendido entre 30 minutos a 6 horas (Fig. 8). Em 17 horas, a perda da viabilidade do epitélio foi de 10% e com 48 horas essa perda subiu para 70%, tal como observado com *T. vaginalis* JT (Fig. 9). Entretanto, quando as células de oviduto foram coincubadas com *T. vaginalis* FMV1, em 24 horas a perda da viabilidade chegou a 80% (Fig. 9).



**Figura 8.** Microscopia eletrônica de varredura da interação de (a) *T. foetus* (Tf) e (b) *T. vaginalis* (Tv) com uma cultura de oviduto bovino por 60 minutos. *T. foetus* mantém seu formato piriforme, sem formar agregados, enquanto *T. vaginalis* se espalha adquirindo uma forma amebóide. O epitélio é mantido ainda preservado, e em (Fig. a) é possível notar que as tricomonas estão distribuídas aleatoriamente; nenhum dano é observado no epitélio. Barras, Fig. 8a, 8  $\mu$ m; Fig. 8b, 1  $\mu$ m.

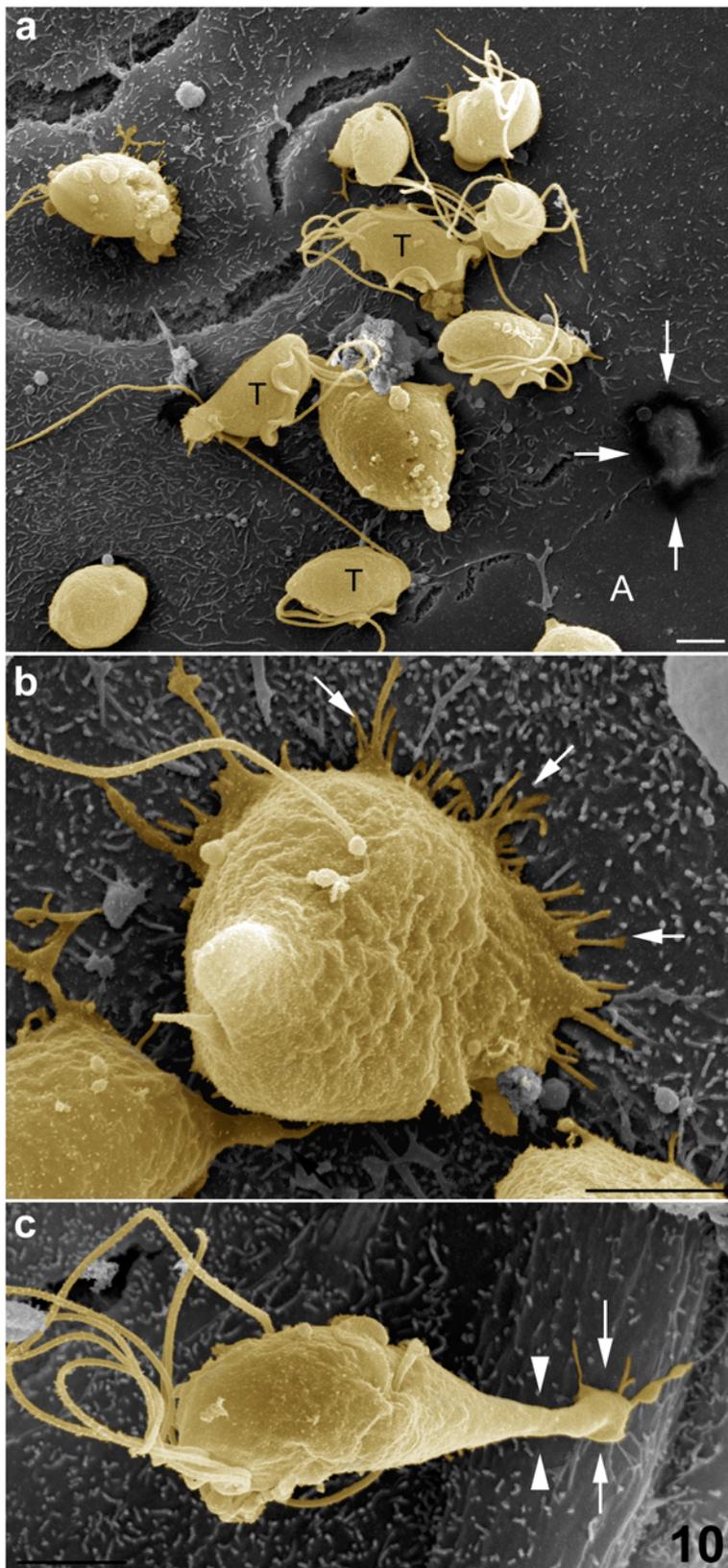
*T. foetus* causou, inicialmente, regressão e, posteriormente, perda gradual das microvilosidades das células de oviduto (Fig. 10). *T. vaginalis*, após a adesão, se moveu em direção às bordas do epitélio aderindo firmemente à periferia das células da cultura (Figs. 11a-b). Ocorreram lesões no epitélio, vistas como imagens espelhadas dos parasitos, denominadas “*imprints*”. Essas impressões deixadas nas células de oviduto (Fig. 10a) sugeriram que, tanto *T. foetus* como *T. vaginalis*, se desprendem do epitélio e movem-se do seu lugar original. Essas modificações foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (Figs. 10-11).



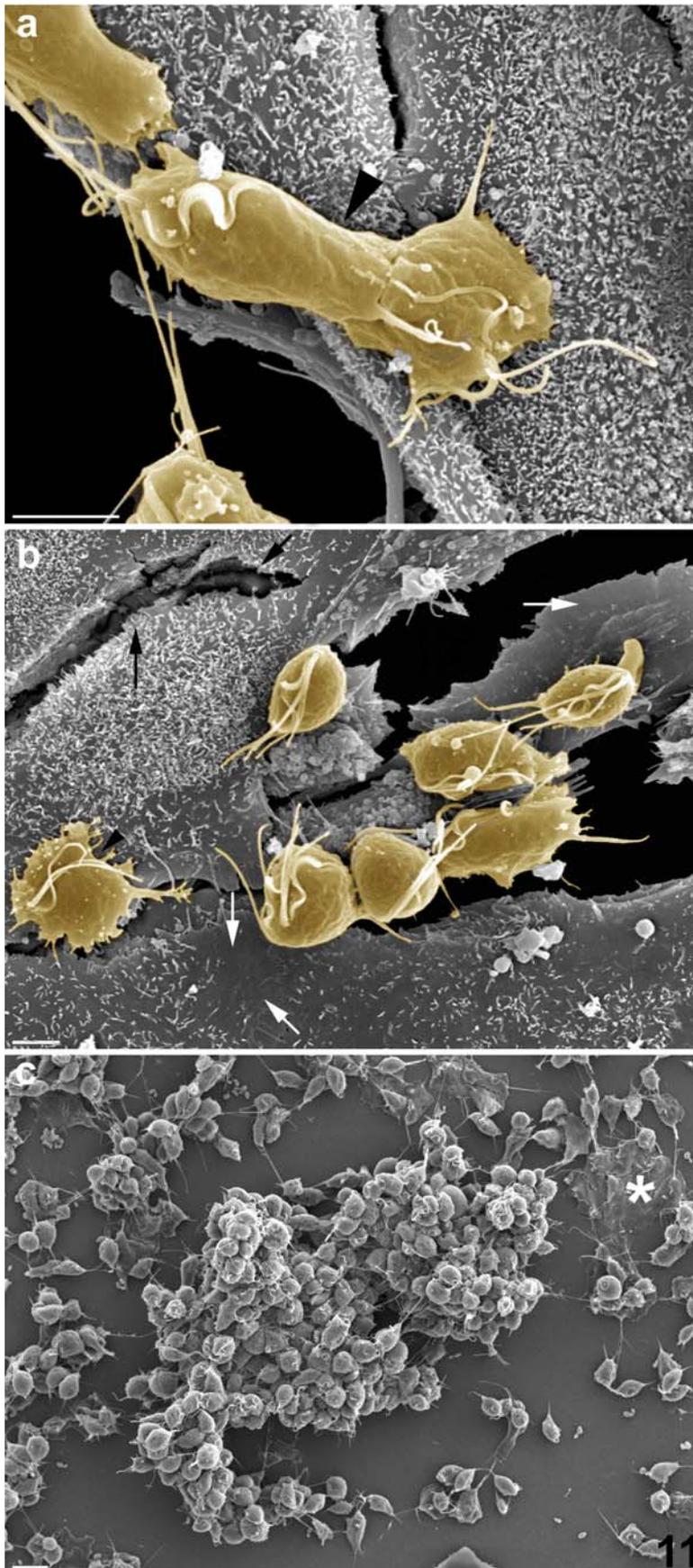
**Figura 9.** Gráfico mostrando a citotoxicidade exercida por *T. foetus* e *T. vaginalis* em células epiteliais de oviduto bovino através do ensaio de espectrofotometria usando a técnica do cristal violeta. Os danos causados nas monocamadas de células de oviduto bovino são observados depois da incubação com cada uma das duas cepas de *T. vaginalis* com diferentes níveis de patogenicidade (JT, que é menos virulenta que a FMV1) e *T. foetus* K. Note que as *T. foetus* apresentam danos similares à cepa JT de *T. vaginalis* quando em interação com as células de oviduto, enquanto as *T. vaginalis* FMV1 provocam um dano maior.

Após 30 minutos de interação, já foi possível encontrar vários parasitos aderidos às células epiteliais. As *T. foetus* aderiram pela sua porção posterior (Fig. 10c) que passaram a apresentar digitopódios (fig. 10b), enquanto a região anterior permaneceu livre e os flagelos anteriores continuaram batendo. Já as *T. vaginalis*, tornaram-se amebóides, mantendo a região oposta da membrana ondulante em contato com as células epiteliais (Fig. 11b).

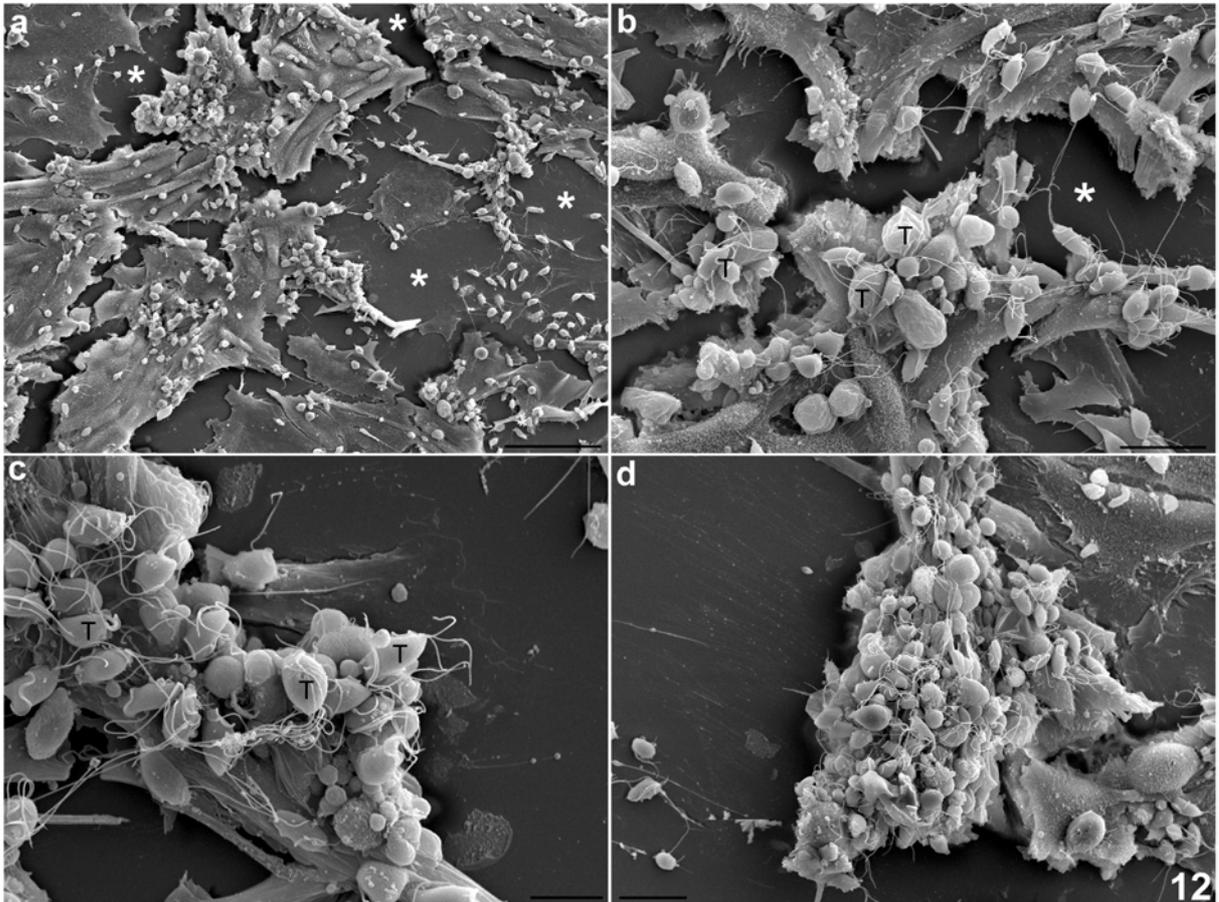
*T. vaginalis* logo após sua adesão às células epiteliais, mudaram para uma forma amebóide (Fig. 11a-11b), podendo atuar sozinha atacando as células hospedeiras (Fig. 11b) ou, mais frequentemente, em grupos com outros parasitos (Figs. 11b-11c). Contrariamente, as *T. foetus* após a adesão, se mantiveram piriformes, com o flagelo recorrente externalizado, percorrendo todo o corpo celular (Fig. 10a). Somente formam agregados após longo tempo de interação, quando o processo de dano à célula epitelial já se encontra em estado avançado (Fig. 12).



**Figura 10.** Microscopia eletrônica de varredura da interação de *T. foetus* (T) com a cultura de oviduto bovino crescida por 7 dias. Na Figura (a) o parasito mantém-se piriforme. Observa-se uma impressão (imprint) deixada por *T. foetus* (setas brancas). Na figura (b) observa-se que a região de adesão encontra-se na área oposta do flagelo recorrente. Todos os flagelos estão livres e as microvilosidades foram reduzidas. Notam-se os numerosos contatos de filopódios do parasito com as células de oviduto (setas brancas). Na figura (c) evidencia-se que *T. foetus* (T) adere às células epiteliais pela sua região posterior (cabecinhas de seta). Os parasitos apresentam digitopódios (setas brancas). É possível encontrar distorções (na região de adesão), regressão e até mesmo ausência (A) das microvilosidades de células próximas das tricomonas nas regiões de adesão. Na figura (c) observam-se digitopódios como uma especialização de membrana na região de adesão da *T. foetus* (seta). Barras, 4  $\mu$ m.



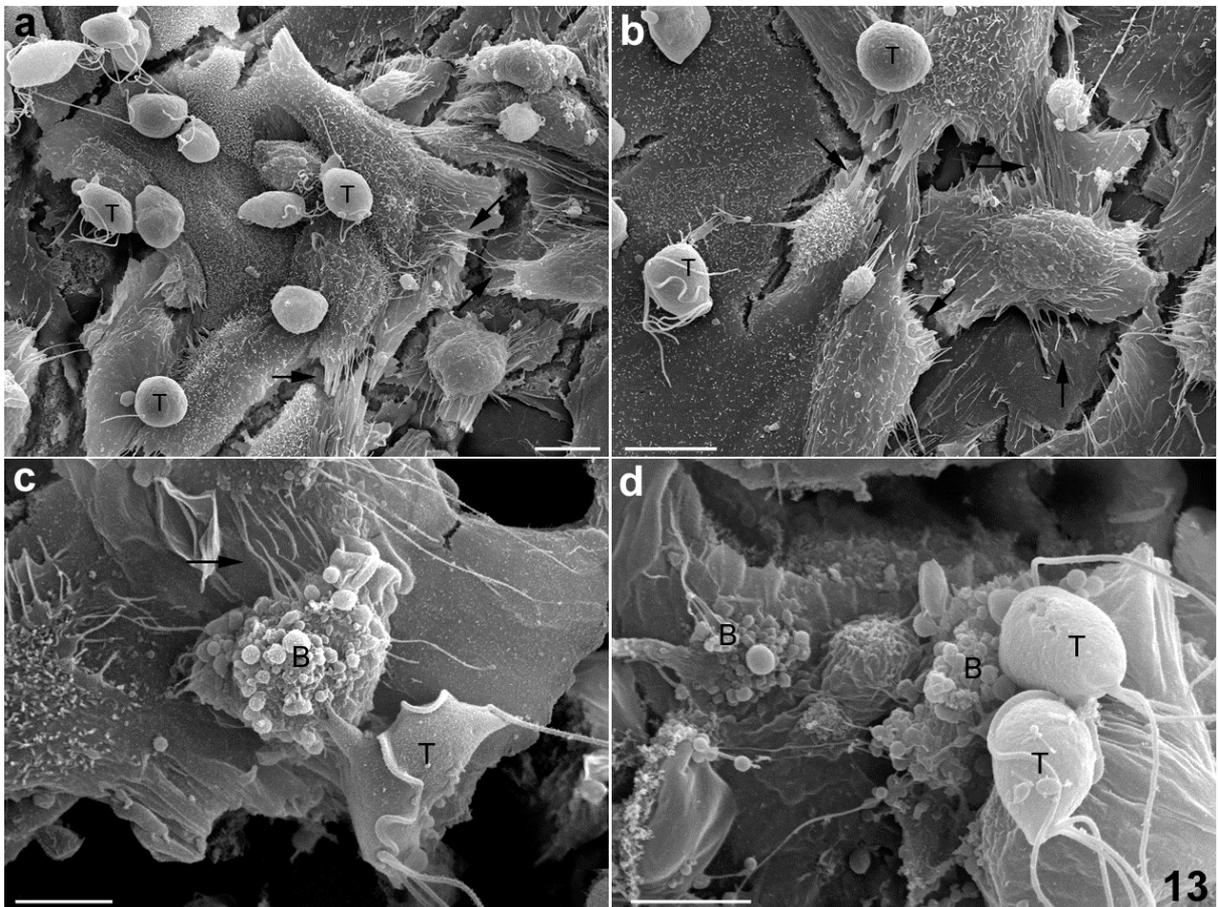
**Figura 11.** Microscopia eletrônica de varredura da interação de *T. vaginalis* com a cultura em monocamada de células de oviduto bovino. Após 3 horas de interação, os parasitos já se encontram em um formato amebóide (Figs. a-b), com o corpo celular alongado (cabeça de seta). Observa-se que os parasitos estão aderidos preferencialmente nas bordas do epitélio. Na figura b, as células de oviduto começam a apresentar danos, se destacam das células vizinhas (setas pretas), e é possível verificar a agregação de parasitos. Também há uma diminuição das microvilosidades encontrando-se áreas desnudas (setas brancas). As *T. vaginalis* não apresentam uma região específica para adesão, uma vez que modificam sua forma original para um formato amebóide. Apenas a região do flagelo recorrente se mantém posicionada para cima. Na figura c tem-se uma visão geral da interação dos parasitos com as células de oviduto bovino por 24 horas. Note que as *T. vaginalis* se encontram formando agregados, restando somente grupos pequenos de epitélio (asteriscos). Barras, Figs. 11a-b, 5  $\mu\text{m}$ ; Fig. 11c, 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 12.** Microscopia eletrônica de varredura da interação de *T. foetus* (T) com as células epiteliais de oviduto bovino mostrando alterações nas células hospedeiras. Na figura **a** uma vista geral das células epiteliais após 6 horas de interação. Vários parasitos são encontrados sobre o epitélio. Note os grandes espaços entre as células hospedeiras (asteriscos). Na figura **b** uma micrografia em maior aumento do mesmo experimento da figura **a**. Os asteriscos apontam para espaços entre as células epiteliais. A figura **c** apresenta 12 horas de interação. Note que várias *T. foetus* são observadas sobre as células que sofreram injúria. Agregados de *T. foetus* (Fig. **d**) podem ser encontrados ao redor das células epiteliais, após 18 horas de interação, quando se observa uma extensa destruição das células epiteliais. Barras Fig. **12a**, 80  $\mu\text{m}$ ; Fig. **12b**, 20  $\mu\text{m}$ ; Fig. **12c**, 10  $\mu\text{m}$ ; Fig. **12d**, 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.3 Evidência dos danos

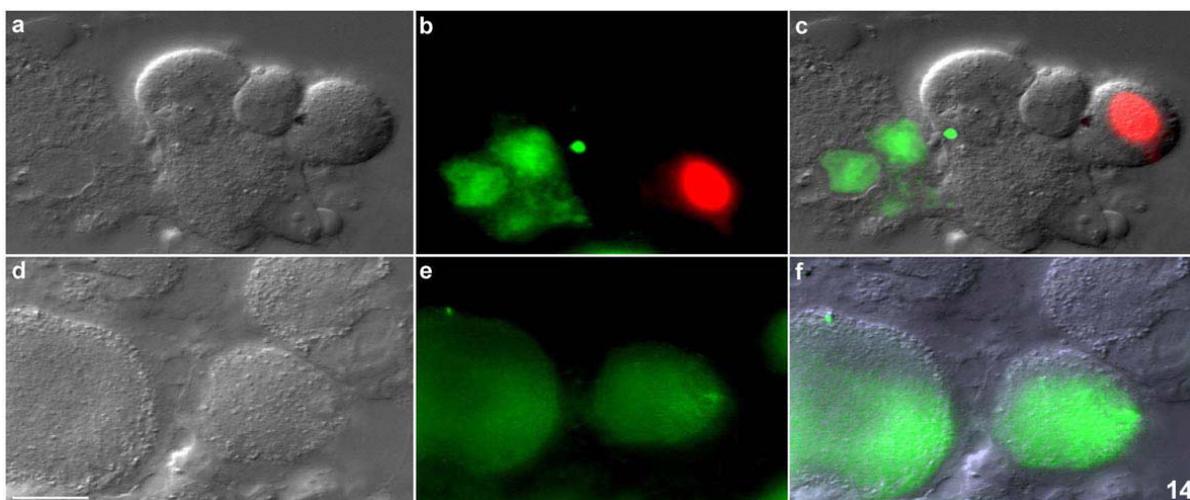
Um sinal morfológico severo do efeito citotóxico nas células epiteliais foi uma regressão gradual, seguida de perda completa das microvilosidades, retração da célula e destacamento das células-hospedeiras afetadas, onde foram vistas separando-se das células vizinhas (Fig. 13a-d). Intenso “blebbing” de membrana e extensões finas, como protruções membranas foram vistas na superfície das células que sofreram danos, por microscopia de varredura (Figs. 12-13). Sinais morfológicos (Figs. 13c-13d) e moleculares (Figs. 14-16; Figs. 18-19) de apoptose foram encontrados.



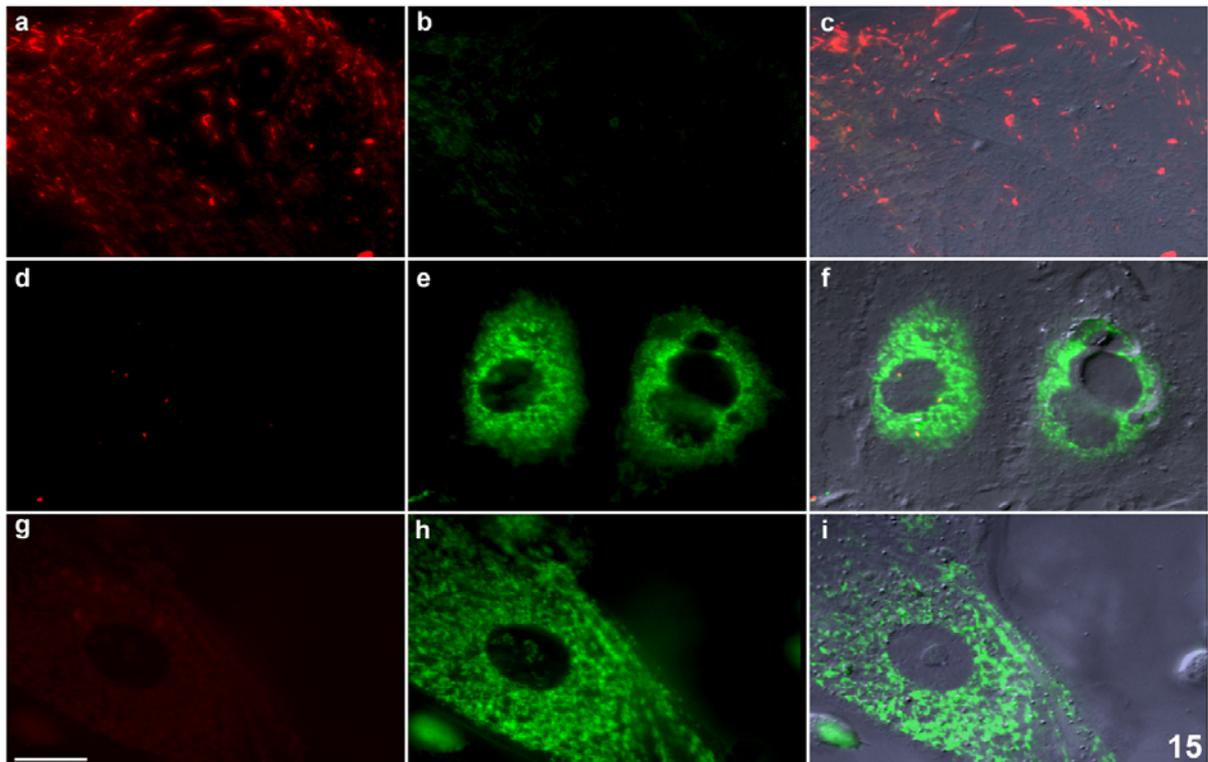
**Figura 13.** Comportamento das células epiteliais de oviduto bovino após interação com *T. foetus K.* Note nas figuras a-b que, gradualmente, as células epiteliais são retraídas (setas). Um intenso “blebbing” (B) de membrana é observado nas figuras c-d, correspondendo a sinais morfológicos de morte celular. Barras, Figs. 13a-b, 10  $\mu$ m; Figs. 13c-d, 5  $\mu$ m.

### 3.4 Testes de viabilidade

O efeito citotóxico *in vitro* de *T. foetus* e *T. vaginalis* nas células epiteliais foi explorado através da co-cubação dos parasitos com as monocamadas de células do oviduto, em intervalos de tempo de 3 a 48 horas e visualizadas por marcações fluorescentes, microscopia eletrônica de varredura e transmissão (Figs. 8-24). Estas interações foram analisadas e comparadas através de técnicas complementares. Após 12 horas interação, um número considerável de células epiteliais de oviduto bovino tornou-se positivas para anexina-V (Fig. 14) com exposição de fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática. Além disso, foi observada a perda do potencial de membrana mitocondrial na maioria das células epiteliais após 12 horas de interação com os parasitos, demonstrado através do teste do JC-1 (Fig. 15). Os ensaios de viabilidade, anexina-V e JC-1, indicam que as células hospedeiras tenham sido induzidas por *T. vaginalis* e por *T. foetus* a uma morte celular por apoptose, através das características apresentadas.



**Figura 14.** Ensaio de ligação para anexina-V. Células epiteliais bovinas foram co-cultivadas com *T. foetus* por 12 horas e marcadas com Annexin-V-conjugada com fluoresceína. Quando as células hospedeiras entram em contato com o parasito, podemos notar uma marcação em verde (Figs. b, e), significando a exposição da fosfatidilserina no folheto externo da membrana caracterizando células apoptóticas. Em vermelho, marcação para iodeto de propídeo, significando células necrosadas ou que perderam a permeabilidade seletiva. Imagens em DIC são observadas em a e d, sendo sobrepostas com as imagens de fluorescência em c e f. Ensaio de interação são demonstrados em todas as imagens. Barra, 10  $\mu$ m.

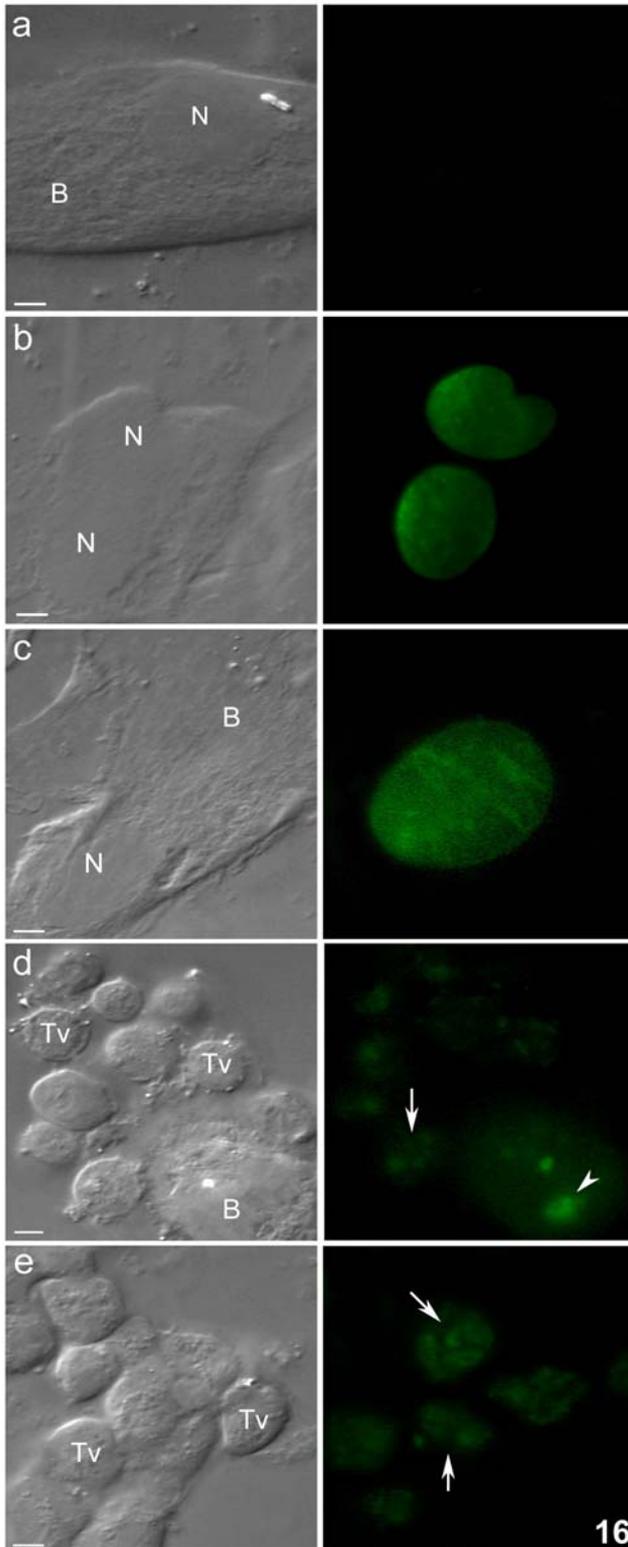


**Figura 15.** Análise do potencial de membrana mitocondrial. *T. foetus* e *T. vaginalis* durante interação com células epiteliais de oviduto bovino, usando o marcador fluorescente JC-1. A fluorescência verde define a perda do potencial de membrana enquanto a fluorescência vermelha a existência de potencial de membrana. A infecção promoveu um decréscimo no potencial de membrana mitocondrial das células de oviduto após 12 horas de interação. Nas figuras **a-c**, células epiteliais controle, sem co-incubação com parasitos. As células hospedeiras são infectadas com *T. foetus* K nas figuras **d-f**, e com *T. vaginalis* nas figuras **g-i**. Uma sobreposição das imagens é mostrada nas figuras **c, f, i**. Note uma intensa marcação em verde quando as células epiteliais foram infectadas com os parasitos. Barra, 20  $\mu$ m.

### 3.5 Fragmentação do DNA das células epiteliais

A atividade de endonucleases foi avaliada pela técnica do TUNEL. Não foi observada marcação do TUNEL no controle (Fig. 16, linha a). Entretanto, no controle positivo onde as células epiteliais foram tratadas com DNase-I (Fig. 16, linha b) nota-se uma intensa marcação. Nos ensaios de interação, as células epiteliais sofreram morte celular por apoptose após 12 horas de infecção por tricomonas, indicada pela marcação positiva do TUNEL nas células epiteliais (Fig. 16, linhas c-e). Foi possível notar marcação positiva em vesículas encontradas em *T. vaginalis* em ambas as cepas, JT e FMV1, indicando uma possível fagocitose de ácidos nucléicos oriundos das células de oviduto. Nesta última cepa

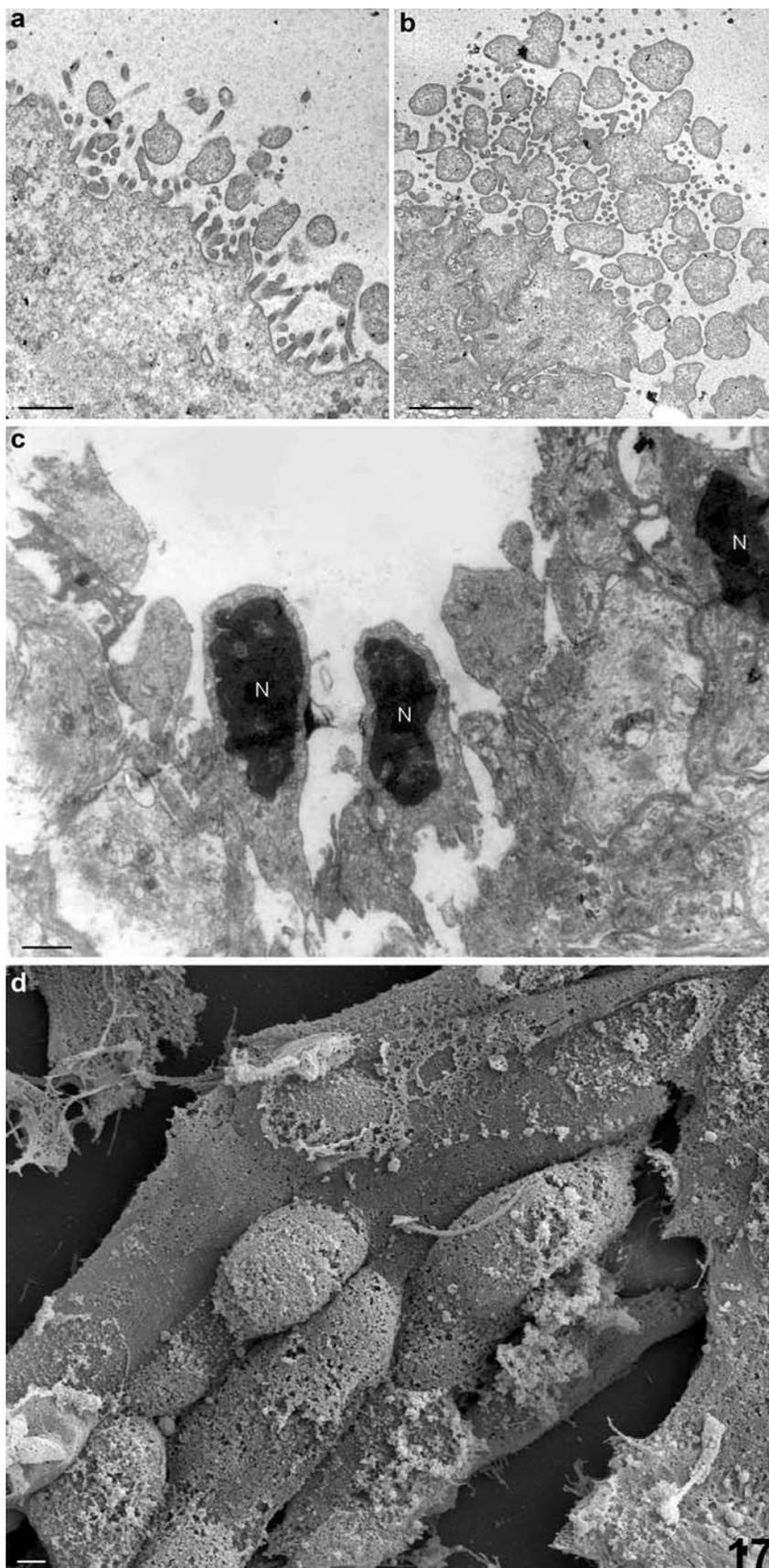
não observamos a presença de uma única célula de oviduto inteira, somente restos celulares.



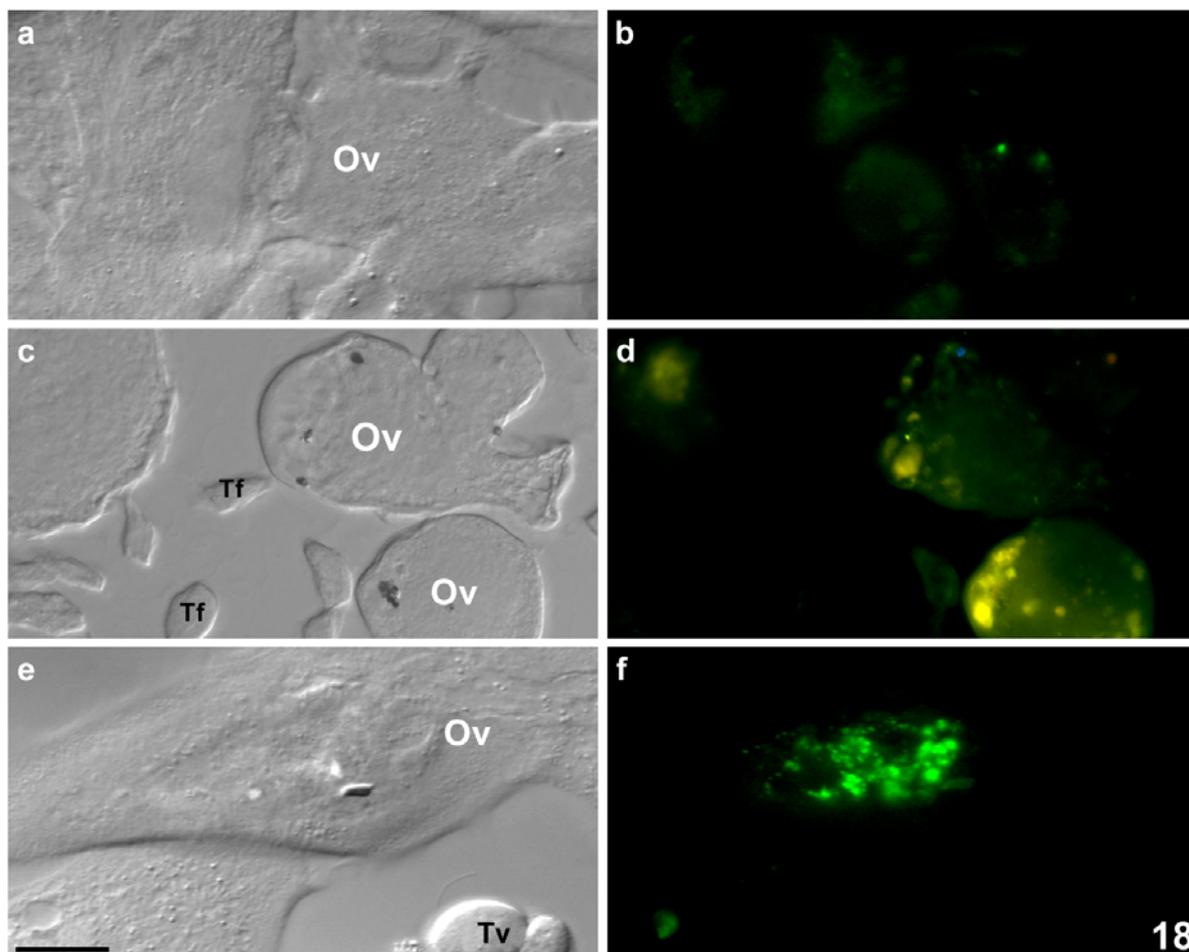
**Figura 16.** Interação de células epiteliais de oviduto bovino com *T. vaginalis* e *T. foetus* por um período de 12 horas. Após este tempo, realizamos testes para evidenciar se a morte celular ocorria por apoptose usando o teste do TUNEL - marcação para DNA fragmentado. Os parasitos e células epiteliais são observados por microscopia óptica em DIC (painéis do lado esquerdo) e por fluorescência quando da marcação com TUNEL (painéis do lado direito). Em **a-b** são observadas células epiteliais controle, sem exposição aos parasitos, na linha **b** temos um controle positivo onde as células epiteliais foram tratadas com DNase I. Nas linhas **c-e**, as células de oviduto foram infectadas com os parasitos por 12 horas. A marcação no núcleo das células hospedeiras é observada quando essas são co-incubadas com *T. foetus* K (linha **c**). Entretanto, quando as *T. vaginalis* cepa JT, cultivada por longo tempo em laboratório (linha **d**) e FMV1, uma cepa fresca, (linha **e**) são co-incubadas com as células epiteliais, observa-se uma marcação em pequenas vesículas nos parasitos de ambas as cepas. Com a JT, ainda observamos uma marcação das células epiteliais de oviduto, no entanto com a FMV1, não notamos a presença de uma célula epitelial inteira, somente debris celulares. B, oviduto bovino; Tv, *T. vaginalis*; N, núcleo. Barras, 5  $\mu$ m.

### 3.6 Apoptose e necrose secundária

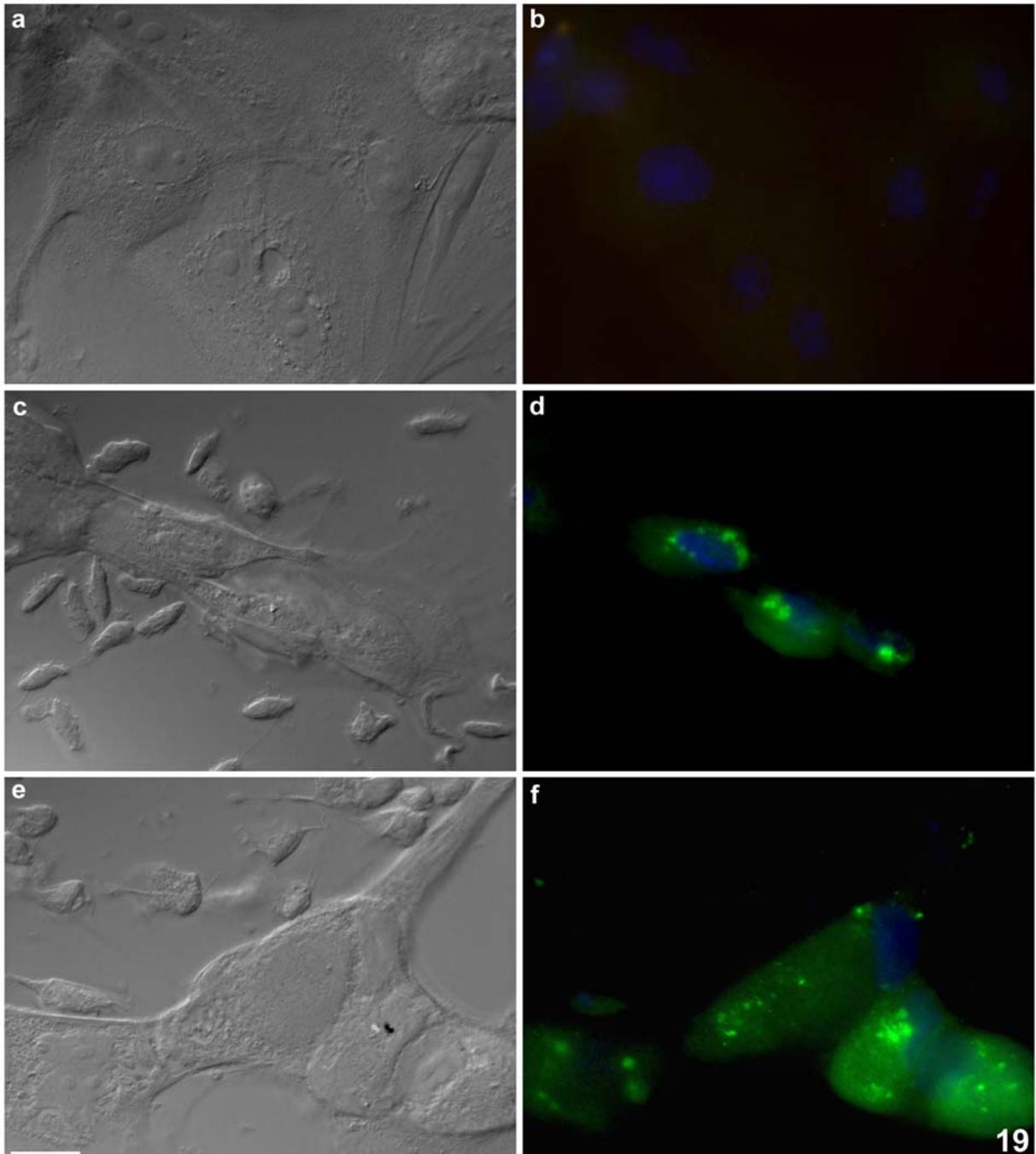
Sinais morfológicos de apoptose como intenso “*blebbing*” de membrana (Figs. 13c-d, 17a-b), condensação de cromatina (Fig. 17c) e necrose secundária (Fig. 17d) foram vistos após 24-48 horas de interação com *T. foetus*. Além disso, uma forte marcação em grande parte das células de oviduto após detecção de caspases em geral (Fig. 18), foi observada após 12 horas de interação com *T. foetus* e *T. vaginalis* (Fig. 18d) utilizando o Kit Pan-caspase. No entanto, somente foi observada uma leve marcação em células de oviduto que não tiveram contato com os parasitos (Fig. 18b). O mesmo ocorreu quando foi feita detecção da enzima caspase-3. O controle apresentou uma leve marcação (Fig. 19b) enquanto, após 12 horas de interação com os tricomonadídeos, houve uma intensificação da marcação na maioria das células de oviduto, principalmente próximo ao núcleo (Figs. 19d, f).



**Figura 17.** Sinais morfológicos de morte celular em células de oviduto após interação com *T. foetus* por 6-24 horas. Em a-c, microscopia de transmissão e em d, varredura. “Blebbing” de membrana, característico de morte por apoptose, é observado após 6 horas (Fig. a) e 8 horas (Fig. b) de interação. Condensação de cromatina é claramente vista dentro do núcleo (N) após 12 horas de interação (Fig. c). A cultura apresentou uma necrose secundária depois de 14 horas (Fig. d). Barras, 500nm.



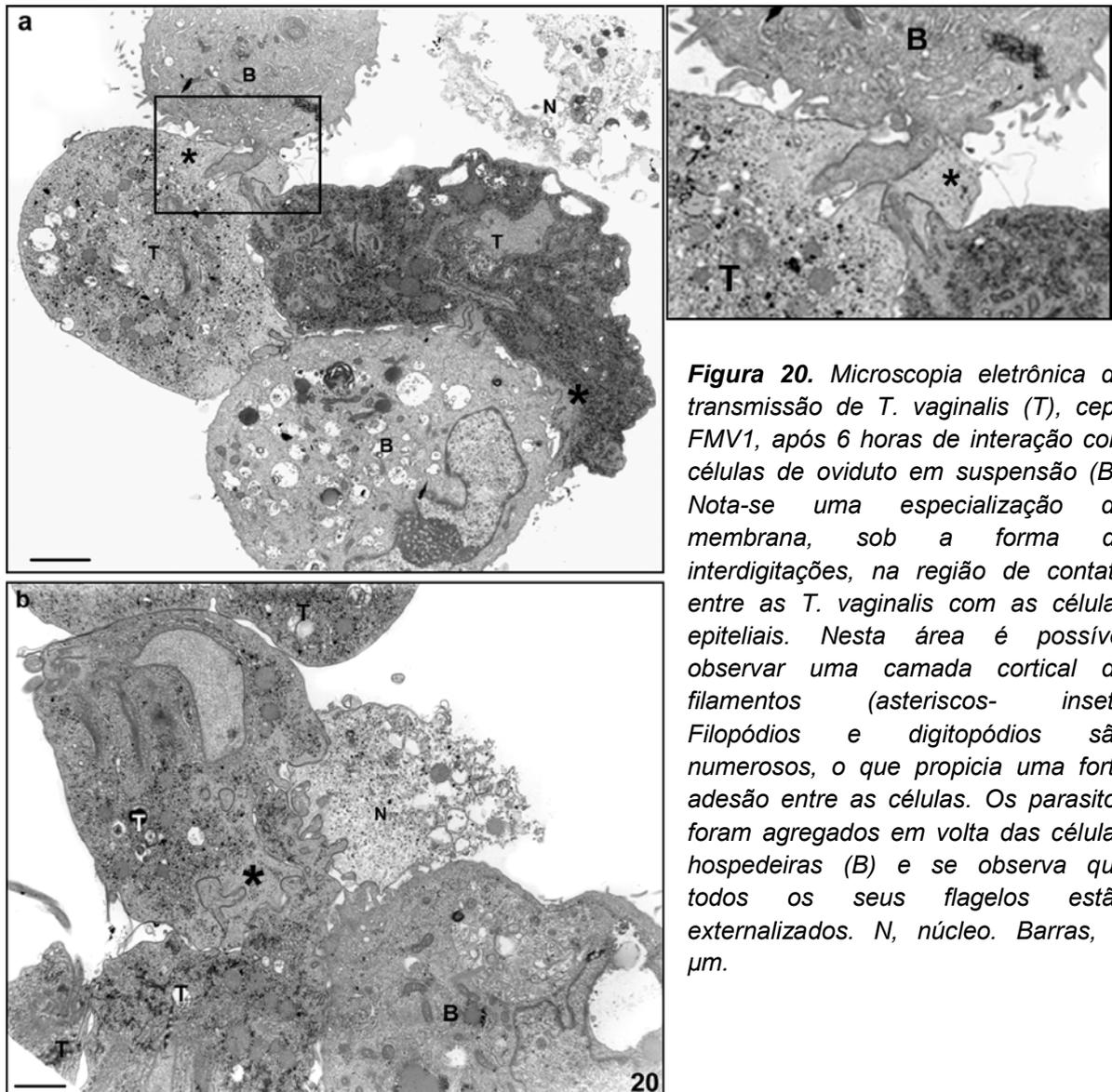
**Figura 18.** Ensaio qualitativo para detecção de caspases ativas – teste da Pancaspase. Os parasitos, *T. foetus* K (Figs. c-d) e *T. vaginalis* JT (Figs. e-f) foram co-incubados com as células epiteliais de oviduto bovino. Nas figuras a e b, podemos observar uma fraca marcação para caspases (Fig. b) em células epiteliais sem a interação com o parasito. Quando os parasitos são adicionados, após 12 horas, é possível notar uma intensa marcação para o pan-caspase em grande parte da cultura, indicando a ativação da cascata de morte celular (Figs. d, f). Ov, oviduto; Tf, *T. foetus*; Tv, *T. vaginalis*. Barra, 10 $\mu$ m.



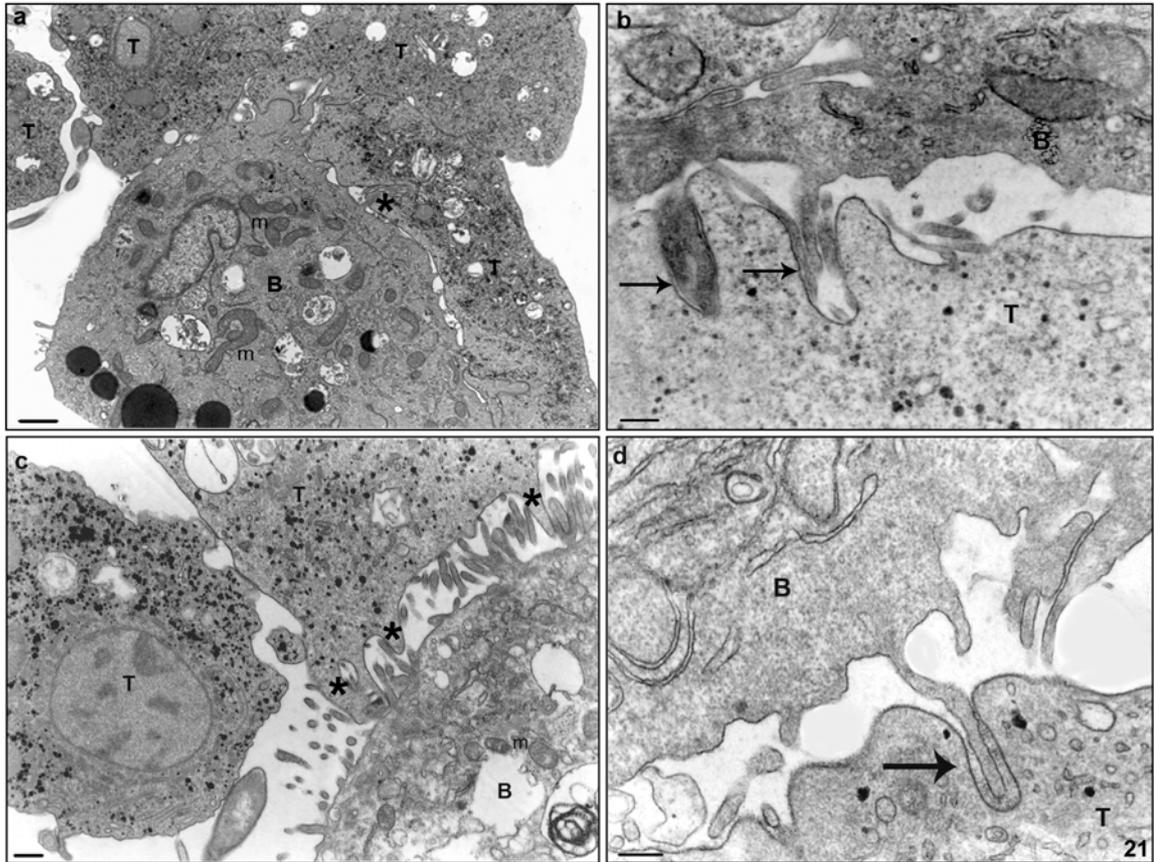
**Figura 19.** Ensaio para detecção de caspase-3. Interação de *T. foetus k* (Figs. c-d) e *T. vaginalis JT* (Figs. e-f) com células epiteliais de oviduto bovino. A ativação da caspase-3 é o último evento da cascata de caspases, resultando nas características de morte celular por apoptose. Nas células controle, sem infecção dos parasitos (Figs. a-b) há uma marcação muito leve, utilizando o anticorpo monoclonal anti-caspase-3. No entanto, após 12 horas de interação, ambos *T. foetus* e *T. vaginalis* induziram a ativação da enzima caspase-3. Note a intensa marcação em verde (Figs. d, f) preferencialmente próximo ao núcleo. Em azul marcação nuclear com DAPI. Barra, 20  $\mu$ m.

### 3.7 Fagocitose por *Trichomonas vaginalis*

Embora as imagens apresentadas sejam estáticas, por microscopia de transmissão foi possível inferir um processo de estresse mecânico (Figs. 20-21) no qual as microvilosidades apareceram sendo esticadas pelos parasitos (Fig. 21). Detectaram-se pequenos “ganchos” envolta das células epiteliais de oviduto que foram desaderidas do substrato (Figs. 21a-d).



**Figura 20.** Microscopia eletrônica de transmissão de *T. vaginalis* (T), cepa FMV1, após 6 horas de interação com células de oviduto em suspensão (B). Nota-se uma especialização da membrana, sob a forma de interdigitações, na região de contato entre as *T. vaginalis* com as células epiteliais. Nesta área é possível observar uma camada cortical de filamentos (asteriscos- inset). Filopódios e digitopódios são numerosos, o que propicia uma forte adesão entre as células. Os parasitos foram agregados em volta das células hospedeiras (B) e se observa que todos os seus flagelos estão externalizados. N, núcleo. Barras, 1  $\mu$ m.

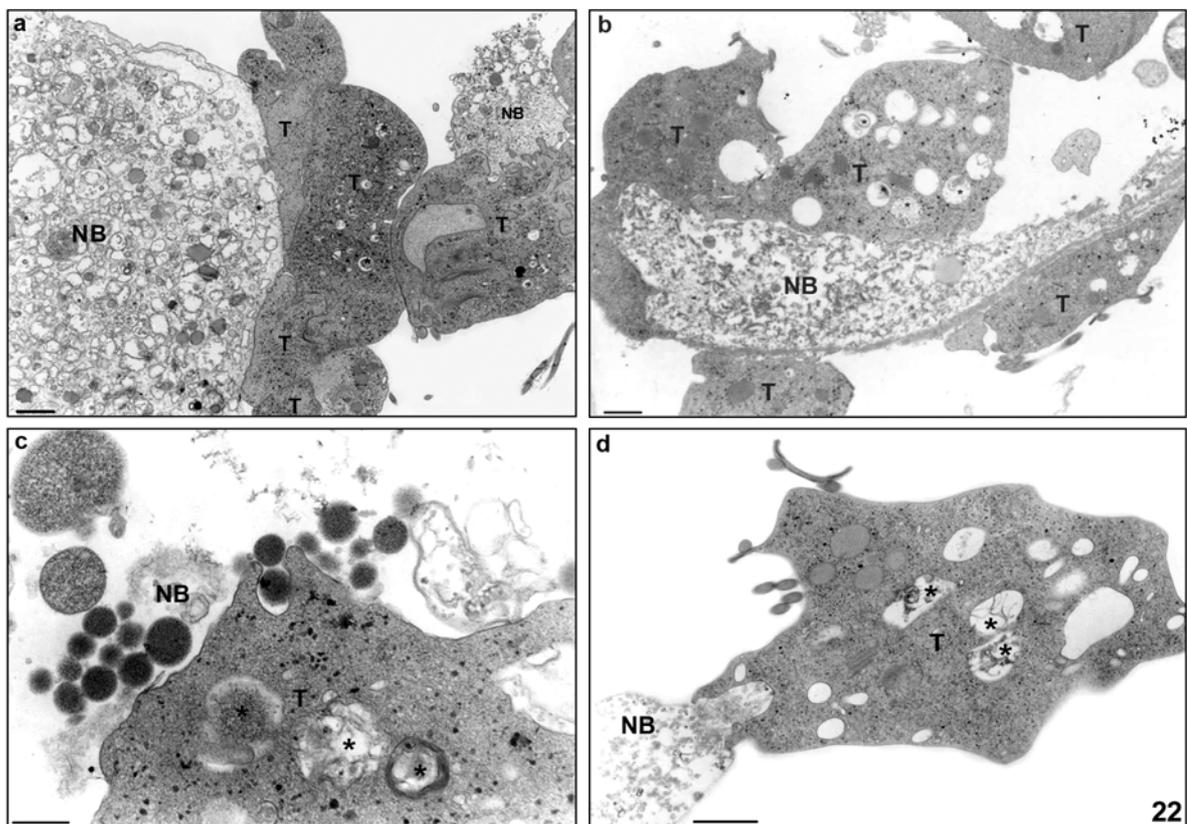


**Figura 21.** Microscopia eletrônica de transmissão da interação entre células epiteliais de oviduto (B) e *T. vaginalis* (T). *T. vaginalis*, cepa FMV1, após interação de 3 horas com células epiteliais de oviduto bovino em suspensão. Note que as células epiteliais estão cercadas de vários parasitos fortemente aderidos (Fig. a). Ambos os tipos celulares apresentam um aspecto normal. É possível observar nas células de oviduto, várias mitocôndrias (m) e outras organelas com aspecto morfológico normal. Nas figuras a, c é possível observar projeções de membrana do parasito em direção às microvilosidades das células epiteliais (asteriscos). Em imagens de maior aumento (Figs. b, d), as setas apontam para um evento inicial de endocitose onde microvilosidades das células epiteliais são incorporadas pelos parasitos (Figs. b, d). Note que na figura 21c, as células de oviduto já não apresentam um aspecto saudável, mostrando vacuolização e mitocôndrias anormais. Barras, Fig. 21a, 1  $\mu$ m; Fig. 21b, 300 nm; Fig. 21c, 600 nm; Fig. 21d, 300nm.

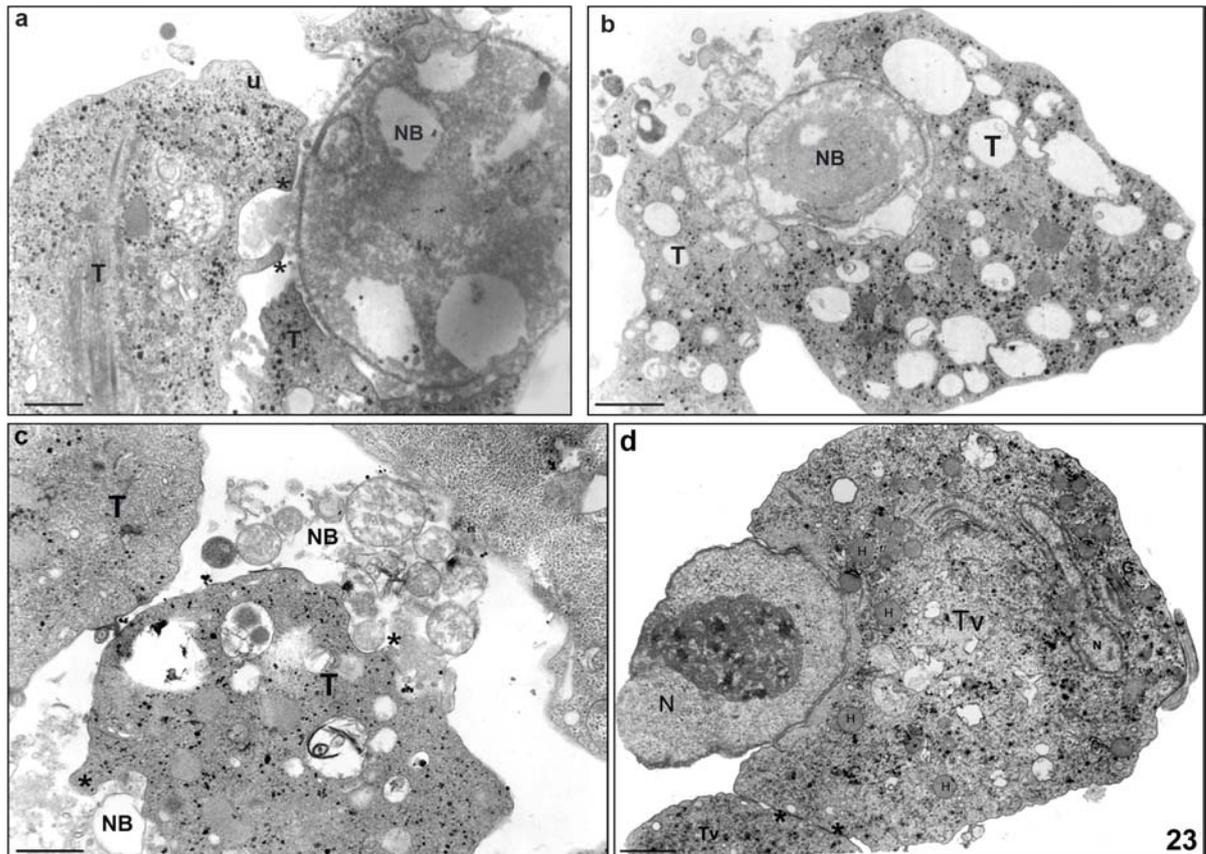
Os debris celulares foram inequivocamente incorporados pelos parasitos (Figs. 22-24). A sequência dos eventos descritos acima termina com uma destruição quase total da monocamada depois de 8-12h de interação com o isolado fresco, a cepa FMV1 e após 18h de interação com o isolado mantido em cultura por muito tempo, a cepa JT. A fagocitose das células-alvo necróticas e/ou com algum dano foi claramente observada (Figs. 22c-d, 23).

*T. vaginalis* foi capaz de fagocitar simultaneamente células-alvo necróticas ou com danos aparentes em diferentes partes do corpo celular (Fig. 23c), mostrando que não há

uma região preferencial para ocorrer às atividades endocíticas, sendo o contrário do observado por Brugerolle (1971). Durante a realização desse trabalho não foi observado nenhuma célula epitelial de oviduto inteira sendo fagocitada pelos parasitos. Entretanto, células necróticas apresentando organelas íntegras foram vistas com freqüência. Neste caso, parte das células hospedeiras e até mesmo organelas inteiras, como um núcleo, foram encontradas em processo de internalização ou incorporadas pelas tricomonas (Fig. 23). Os debris das células epiteliais de oviduto foram observados em diversos vacúolos intracelulares em *T. vaginalis* (Figs. 22b-d).



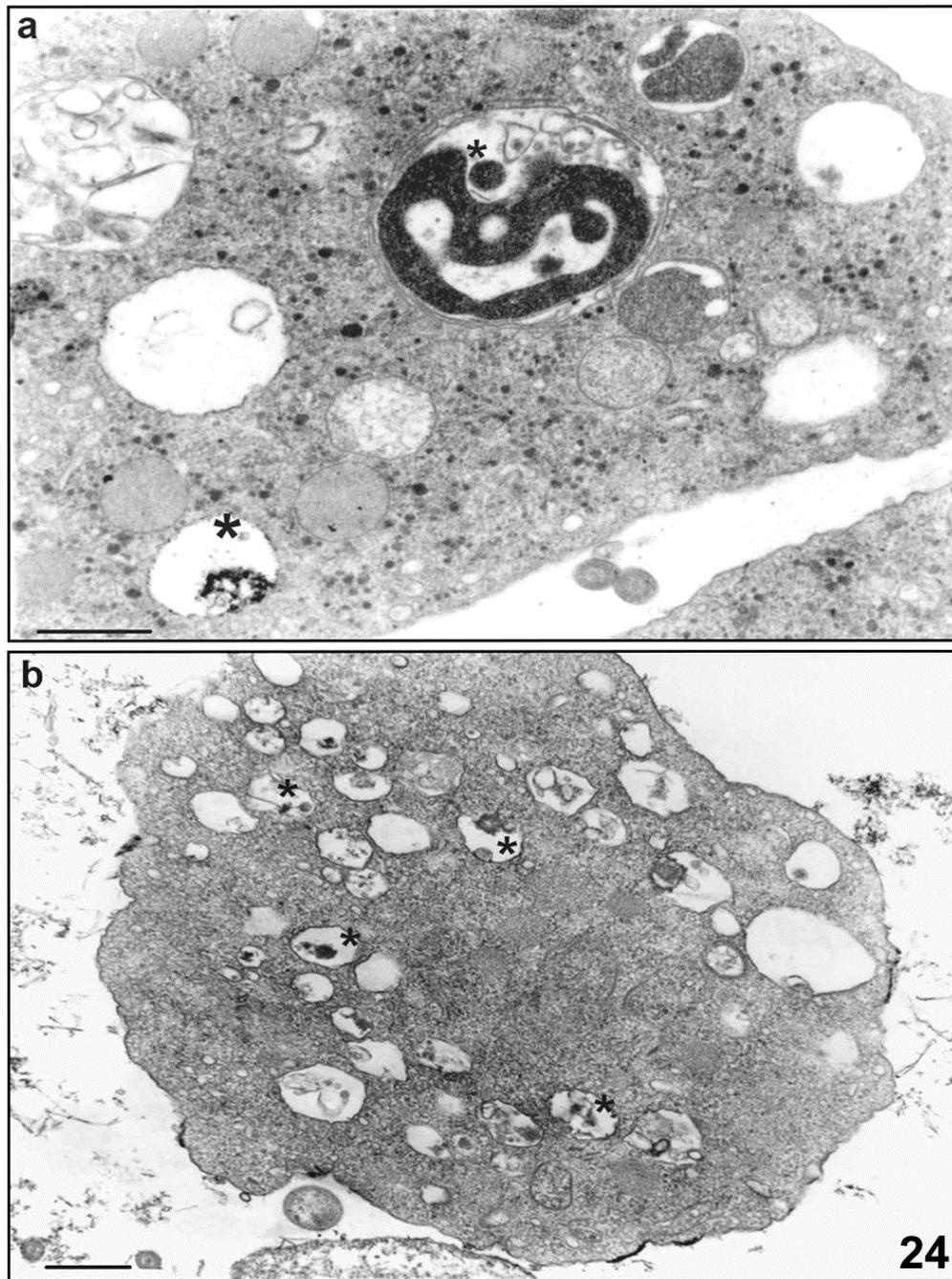
**Figura 22.** Microscopia eletrônica de transmissão durante interação de 20 horas entre células de oviduto (B) e *T. vaginalis* (T), com células hospedeiras em suspensão (Figs. a-b) ou células hospedeiras em monocamada (Figs. c-d). Células de oviduto necróticas (NB) são observadas em ambas as situações. Várias tricomonas são vistas sugerindo um processo de ingestão de debris celulares. Os asteriscos marcam vacúolos de um parasito, onde debris celulares podem ser visualizados. Barras, 1  $\mu$ m.



**Figura 23.** Ingestão de células necróticas de uma cultura primária de oviduto bovino por *T. vaginalis*. Após 20 horas de interação entre *T. vaginalis*, cepa FMV1 (T) e as células epiteliais (B), foi possível observar que os parasitos parecem endocitar células epiteliais necróticas (NB). As tricomonas endocitam partes pequenas das células necróticas (Fig. a). Note que nos vacúolos dos parasitos há debris celulares. Grandes fragmentos como um núcleo (N) podem ser fagocitados (Figs. b, d). A fagocitose pode ocorrer por qualquer região do corpo do parasito, parecendo não haver uma região específica preferencial (Fig. c). Barras, 1  $\mu$ m.

No intuito de verificar se os fragmentos das células hospedeiras seguem para uma via lisossomal, foi feita citoquímica para fosfatase ácida após os ensaios de interação de *T. vaginalis* e as células epiteliais de oviduto bovino. Foram encontradas reações positivas para a fosfatase ácida após 6 horas de interação com o parasito (Fig. 24a).

Além disso, para confirmar se o material intravacuolar observado nas tricomonas foi originado das células hospedeiras, as células epiteliais de oviduto foram coradas com vermelho de rutênio antes da interação. Foi observado vermelho de rutênio nos vacúolos contendo material ingerido proveniente das células hospedeiras (Fig. 24b).



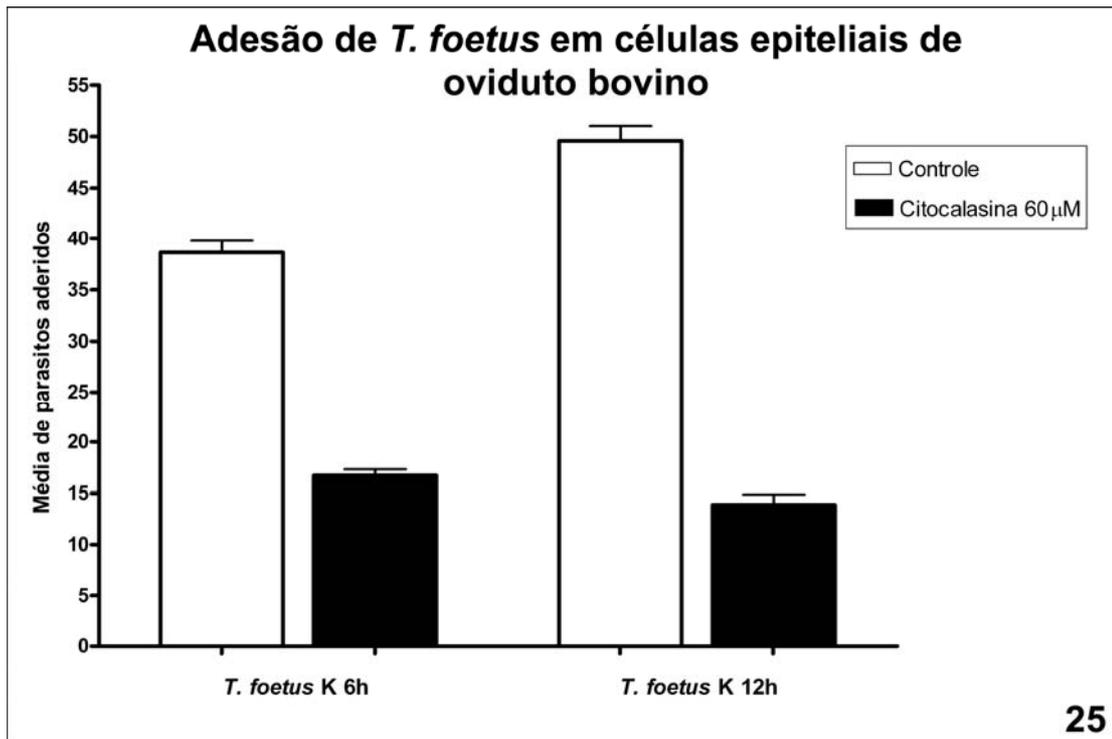
**Figura 24.** Citoquímica para fosfatase ácida (Fig. a) e vermelho de rutênio (Fig. b). *T. vaginalis* foi citoquimicamente testada para fosfatase ácida (asteriscos) após interação com as células de oviduto por 21 horas (Fig. a). Note uma intensa marcação positiva (asteriscos). Nas células hospedeiras marcadas com vermelho de rutênio antes da interação, uma reação positiva para o vermelho de rutênio foi encontrada em vacúolos (asteriscos) nas tricomonas (Fig. b), sugerindo assim que o material encontrado nos vacúolos dos parasitos seja proveniente das células epiteliais de oviduto. Barras, 500 nm.

### 3.8 Participação do citoesqueleto de actina no processo de adesão

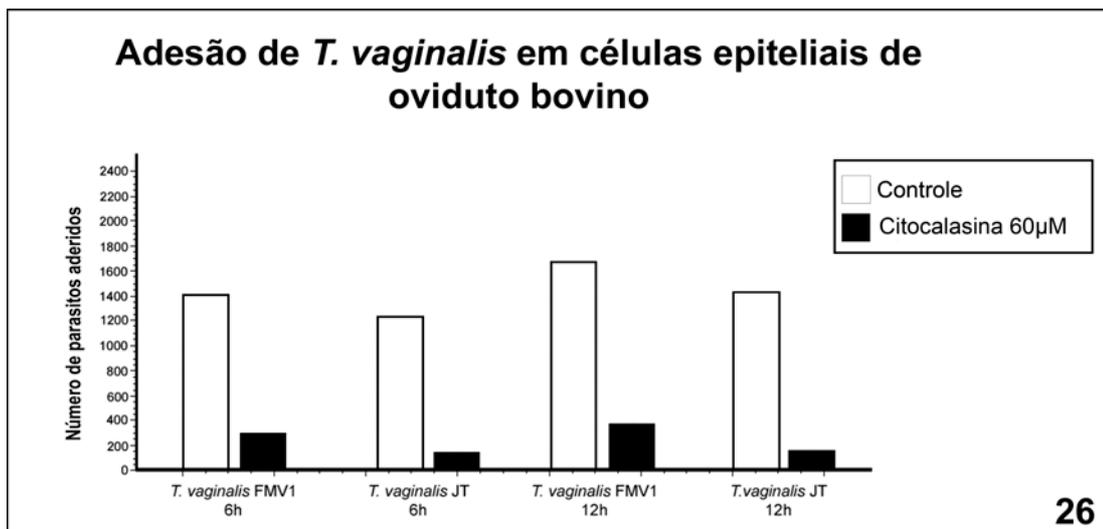
Durante a interação de *T. foetus*, cepa K e *T. vaginalis*, cepas JT e FMV1 com as células epiteliais de oviduto bovino foi observado o papel do citoesqueleto de actina no processo de adesão dos parasitos.

No sítio de interação, o citoplasma das *T. vaginalis* aderidas, especialmente os pseudopódios apresentaram uma zona periférica fibrogranular formada por componentes do citoesqueleto, contendo actina (Figs. 20a-b, 21a). Os resultados também demonstraram que o tratamento com citocalasina D teve efeito positivo na redução da habilidade de adesão de *T. foetus* K (Fig. 25) e de *T. vaginalis*, ambas JT e FMV1 (Fig. 26). Quando usado o anticorpo monoclonal anti-actina (de ameba) foi possível localizar e observar a distribuição dos microfilamentos de actina durante o processo de adesão (Fig. 27).

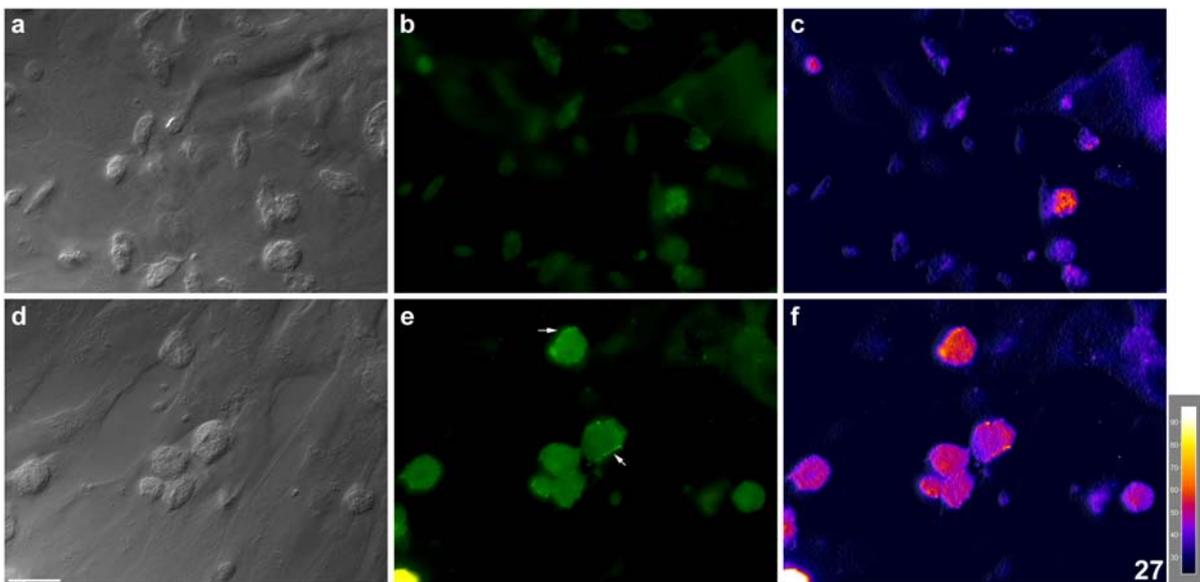
A intensidade de fluorescência foi usada para analisar a concentração dos microfilamentos de actina nos parasitos durante o momento da adesão. A actina fibrilar foi observada em todo o citoplasma tanto de *T. foetus* como de *T. vaginalis* (Fig. 27). Entretanto, em *T. vaginalis* a marcação pareceu estar mais concentrada na periferia da célula e nos sítios de adesão à célula hospedeira (Fig. 27f).



**Figura 25.** Cinética da adesão de *T. foetus*, cepa K em monocamadas de células de oviduto. Os experimentos foram realizados em uma concentração de 5:1 parasitos: células de oviduto com 60 µM de citocalasina D, mantida durante todo o ensaio de interação. Não foi adicionada a droga nos controles. Nota-se que o tratamento com citocalasina, reduziu o número de parasitos aderidos a células epiteliais. Os valores são médias ± S.D de parasitos aderidos que foi estimado pela contagem de 100 campos aleatórios usando microscopia eletrônica de varredura.



**Figura 26.** Cinética da adesão de *T. vaginalis*, cepas JT e FMV1 em monocamadas de células epiteliais de oviduto. Os experimentos foram realizados com uma concentração de 5:1 parasitos: células de oviduto com 60 µM de citocalasina D, mantida durante todo o ensaio de interação. Não foi adicionada droga nos controles. Observa-se uma redução no número de parasitos aderidos quando tratados com citocalasina. O número de parasitos aderidos foi estimado pela contagem de 100 campos aleatórios usando microscopia eletrônica de varredura.



**Figura 27.** Distribuição de actina em *T. foetus*, cepa K e *T. vaginalis*, cepa JT durante interação com células epiteliais de oviduto bovino. A interação é mostrada por DIC (Figs. **a**, **d**) e por imunofluorescência (Figs. **b**, **e**) usando anticorpo monoclonal anti-actina, de ameba. A intensidade de fluorescência é indicada (Figs. **c**, **f**), usando uma escala que varia de 0 (azul) a 90 (amarelo). Todas as imagens de fluorescência foram adquiridas com o mesmo tempo de exposição, brilho e contraste. Ambas *T. foetus* (Figs. **a-c**) e *T. vaginalis* (Figs. **d-f**) apresentaram actina fibrilar no citoplasma. Entretanto, na interação de *T. vaginalis* e as células de oviduto, a fluorescência é mais concentrada na periferia dos parasitos e nos sítios de contato com as células hospedeiras (Figs. **e-f**). Barra, 20  $\mu\text{m}$ .

#### 4. Discussão

Os mecanismos usados pelos parasitos para causar efeitos patogênicos são de crucial importância para elucidar o parasitismo. O modo de adesão das tricomonas às células epiteliais ainda não foi totalmente esclarecido e ensaios experimentais têm sido dificultados pela falta de um modelo apropriado. O oviduto é formado por um epitélio simples, colunar, com células ciliadas e não ciliadas, em todos os segmentos da tuba, pré-ampola, a ampola e o istmo. O epitélio do oviduto proporciona o microambiente para o transporte de gametas, fertilização e desenvolvimento dos primeiros dias de pré-implantação do embrião. Assim, como os gametas podem alcançar partes mais profundas do trato reprodutivo, nós hipotetizamos que as tricomonas poderiam também se comportar de modo semelhante.

Estudos anteriores *in vivo* demonstraram a infecção no oviduto (Parsonson *et al.*, 1976) e mudanças inflamatórias foram observadas no endométrio e ocasionalmente nas tubas uterinas de bezerras infectadas (Anderson *et al.*, 1996). Em mulheres, a relação de infertilidade com os relatos de doenças sexualmente transmissíveis tem sido descrita (Grodstein *et al.*, 1993). Este grupo demonstrou uma associação entre a infecção de *T. vaginalis* e a infertilidade primária na tuba, a qual é aumentada em mulheres com tricomoníase. Também foi relatado um aumento de 1,7 vezes de gravidez tubária em mulheres com um histórico de tricomonas (Grodstein *et al.*, 1993).

No presente estudo, nós desenvolvemos uma cultura primária de células epiteliais de oviduto bovino de acordo com os protocolos propostos por Joshi (1988) e Walter (1995). Esse modelo é mais semelhante fisiologicamente com o *in vivo*, pois não constitui uma linhagem celular de carcinomas. Devemos enfatizar que a maioria dos estudos caracterizou o processo de adesão *in vitro* utilizando linhagens celulares, as quais não foram originadas nem de bovinos, nem do trato reprodutivo.

O desenvolvimento de um modelo específico e reprodutivo potencialmente se apresenta como uma nova ferramenta no estudo da interação com tricomonas e células hospedeiras, visando o entendimento dos mecanismos usados pelos parasitos durante a sua interação com o epitélio hospedeiro. Neste cenário, uma cultura primária de células epiteliais de oviduto pode representar um alvo mais adequado para os estudos dos efeitos citotóxicos produzidos pelas tricomonas.

A colonização de *T. foetus* em todas as regiões do trato reprodutivo tem sido descrita por vários autores (Parsonson *et al.*, 1976; Skirrow & Bom Durant, 1990; Anderson *et al.*, 1996). Entretanto, não existem descrições detalhadas na literatura da adesão de *T. foetus* às células de oviduto bovino, mesmo sendo a salpingite um componente importante da doença. Os poucos estudos existentes demonstraram imagens obtidas por microscopia óptica, somente em baixo aumento, onde os parasitos foram encontrados confinados ao lúmen do trato reprodutivo (Parsonson *et al.*, 1976; Anderson *et al.*, 1996). Em nossas observações, os parasitos foram detectados aderidos firmemente às células epiteliais, e livres no meio nas seguintes situações: (1) quando mudam de posição na camada celular; e/ou (2) quando as células epiteliais são destacadas e grupos de parasitos são mantidos aderidos a elas. Artigos na literatura antiga têm sugerido que em gado infectado, o útero foi assumido como um reservatório da infecção por *T. foetus* quando eram feitas análises das secreções vaginais e os parasitos não eram encontrados (Bartlett, 1947; Clark, 1972). Foi sugerido por Bartlett (1947) que o útero seria o sítio definitivo e persistente na infecção de tricomonas e que a vagina teria somente um papel passivo no decorrer do progresso da doença, providenciando uma fonte relativamente incerta de tricomonas para o diagnóstico.

Evidências recentes mostraram interações de *T. foetus* com embriões em desenvolvimento (Bielansky *et al.*, 2004; Benchimol *et al.*, 2007), com espermatozoides (Benchimol *et al.*, 2008), e com útero bovino (Singh *et al.*, 2005), levantando questões sobre outros mecanismos de infertilidade provocados por *T. foetus*. É interessante notar que o oviduto *in vivo* é formado por um epitélio com uma única camada de células e assim os

danos provocados pelas tricomonas poderiam ter consequências drásticas. Se as células epiteliais são destacadas, o tecido adjacente se torna exposto e assim, em teoria, poderia ocorrer à erosão do tecido. A erosão do endométrio e a salpingite em oviduto tem sido demonstrada em vacas infectadas (Parsonson *et al.*, 1976) e nós aqui demonstramos resultados que reforçam esses dados.

#### **4.1 Mudanças do sistema parasito-hospedeiro**

##### **4.1.1 Região de adesão do parasito**

No presente estudo foi observado claramente que *T. foetus* adere principalmente por sua porção posterior, através de digitopódios e, posteriormente, forma dezenas de filopódios que entram em contato com a superfície das células hospedeiras. A idéia de estabelecimento dessa firme adesão dos parasitos às culturas de células foi reforçada pela estratégia de lavagens sucessivas da monocamada de células epiteliais após a exposição aos parasitos.

A polaridade observada em *T. foetus* é especialmente característica e distinta da adesão de *T. vaginalis*, que ocorre na maior parte pela região oposta da membrana ondulante. Quando em interação, *T. foetus* não alterou seu formato, piriforme, enquanto *T. vaginalis* passou a exibir uma forma fina, aplainada e amebóide, tal como descrita quando aderidas em células MDCK (Arroyo *et al.*, 1993; González-Robles *et al.*, 1995), e como também descritos neste trabalho empregando células de oviduto bovino. O grupo de Corbeil *et al.*, (1989) afirmou que *T. foetus* normalmente adere primeiro pelo flagelo posterior e depois pelo corpo celular quando raspagens de células epiteliais vaginais bovinas foram usadas em experimentos de coincubação. Em nossas observações, a adesão inicial não ocorreu pelo flagelo posterior, mas através da porção posterior final da célula, onde está presente a ponta do axóstilo. Acreditamos que ao usar a microscopia eletrônica de varredura foi possível distinguir claramente que a adesão às células de oviduto

primeiramente ocorre pela porção final posterior da célula e não pelo flagelo recorrente como previamente publicado em células vaginais.

#### **4.1.2 Mudanças nas células epiteliais de oviduto bovino**

Lesões físicas nas bordas das microvilosidades das células epiteliais são produzidas pelas tricomonas e foram vistas como imagens espelhadas do parasito. As impressões deixadas nas células epiteliais são similares àquelas previamente descritas no epitélio intestinal pela *Giardia intestinalis* (Erlandsen & Chase, 1974). Quando em interação com tricomonas, as células epiteliais gradualmente diminuem o número e tamanho das microvilosidades e mudam seu formato, apresentando longas extensões celulares e “*blebbing*” de membrana, indicando sérios danos ao epitélio.

#### **4.2 Tricomonas provocam apoptose**

As evidências morfológicas de apoptose como o “*blebbing*” de membrana, destacamento celular, condensação da cromatina, vacuolização e necrose secundária durante a interação das tricomonas com células epiteliais de oviduto foram visualizadas por microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Anteriormente, outros autores demonstraram que *T. fetus* (Singh *et al.*, 2004) e *T. vaginalis* (Sommer *et al.*, 2005) induziram morte celular por apoptose em cultura de células epiteliais vaginais e em cultura de células epiteliais de útero bovino (Singh *et al.*, 2005). Alguns trabalhos sugeriram que as cisteíno-proteases liberadas pelos parasitos desempenhariam um papel importante nos efeitos patogênicos em células hospedeiras bovinas (Talbot *et al.*, 1991; Singh *et al.*, 2004; 2005) e que estas enzimas poderiam ser indutoras de apoptose. Entretanto, estes autores não investigaram os detalhes morfológicos dos danos às células hospedeiras pelo parasito. Aqui, nós demonstramos como uma célula danificada gradualmente se destaca das células vizinhas e forma finas extensões, intenso “*blebbing*” de membrana, condensação da cromatina e necrose secundária, que foram as características morfológicas de morte celular por apoptose aqui detectado. Ainda assim, evidências de quebra do DNA pela técnica do

TUNEL, a exposição da fosfatidilserina e a ativação da enzima caspase-3, foram mostradas em ambas as interações com *T. foetus* e *T. vaginalis*. Todos os métodos aqui usados evidenciaram apoptose depois das interações de tricomonas e células epiteliais de oviduto. É bem conhecido que a apoptose em células de mamíferos ocorre em resposta à infecção, como observado em alguns protozoários invasivos como a *Entamoeba histolytica* (Boettner & Petri, 2005) e patógenos microbiológicos não invasivos como o parasito intestinal *Giardia lamblia*, que foi descrito como sendo capaz de induzir apoptose em uma linhagem celular de intestino, as células HCT-8 (Panaro *et al.*, 2007). Rocha-Azevedo e colaboradores (2005) mostraram que durante a interação da *Acanthamoeba polyphaga* e células osteoblásticas humanas *in vitro*, foram vistas extensões filopodiais que resultaram em uma morfologia apoptótica das células hospedeiras, o que foi similar àquela observada aqui com *T. foetus* nas células de oviduto bovino. Todavia, nestes trabalhos, as etapas dos danos causados na célula hospedeira não foram apresentadas. No presente trabalho, demonstramos os efeitos causados pelo parasito desde o primeiro contato (adesão) até as vias de morte celular de células epiteliais do oviduto induzida pelas tricomonas.

#### **4.3 Fagocitose por *Trichomonas vaginalis***

Ainda hoje, muitas questões a respeito dos mecanismos de patogenicidade de *T. vaginalis* e os mecanismos que provocam a inflamação aguda no hospedeiro humano são discutidos. A tricomonas tem sido considerada não-invasiva desde que biópsias humanas revelaram que o parasito não penetra no epitélio (Nielsen & Nielsen, 1975). Entretanto, Krieger *et al.* (1985) afirmaram que as cepas mais virulentas de tricomonádídeos poderiam romper as camadas epiteliais e alcançar células de camadas mais profundas nos tecidos. No presente estudo, nós demonstramos que dependendo da virulência da cepa, este parasito é capaz de destruir rapidamente e fagocitar fragmentos de células hospedeiras mortas. Se isso ocorrer *in vivo*, as tricomonas teriam papel invasivo nos epitélios, causando severas lesões, o que indicaria o aumento de infecções dos vírus descritos na literatura, principalmente o HIV (Laga *et al.*, 1991, 1993; Wasserheit, 1992).

No nosso trabalho, comparamos uma cepa mantida por mais de 30 anos em laboratório em cultura axênica com cepas provenientes de isolados frescos. Contrariamente aos achados de Rasmussen *et al.* (1986), no qual mostraram que cepas mantidas por muito tempo em laboratório não aderiam às monocamadas de células epiteliais, nós observamos intensa adesão do parasito às células epiteliais em todas as culturas testadas. Nos sítios de interação, o citoplasma das *T. vaginalis* aderidas exibiram modificações, como uma zona cortical desprovida de organelas, ribossomos e partículas de glicogênio onde componentes formados por actina foram descrita (Brugerolle *et al.* 1996; Pereira-Neves & Benchimol, 2007). Essas observações corroboram o que foi encontrado quando colocamos as *T. vaginalis* e *T. foetus* para interagir com as células de oviduto. Entretanto, quando tratamos ambos os parasitos com citocalasina D observou-se a diminuição da adesão célula-célula, sugerindo-se a importância dos microfilamentos para consolidar a adesão. Já foi mostrado que quando as *T. foetus* e *T. vaginalis* são tratadas com citolasina B há uma diminuição da adesão em células MDCK (Silva Filho & De Souza, 1988) e em um substrato de poliestireno (Silva Filho *et al.* 1987). Uma inibição total da atividade fagocítica de *T. vaginalis* em fibroblastos de camundongo também foi observado quando o parasito foi tratado com citocalasina (Juliano *et al.* 1987). Entretanto esses achados são contrários quando outros microorganismos como *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi* são tratados com citocalasina. O tratamento desses parasitos com a droga não reduziu a taxa de adesão em células como macrófagos, apenas impediu a entrada dos parasitos na célula hospedeira (Nogueira & Cohn, 1976; Rynning & Remington, 1978). *T. gondii* e *T. cruzi* são parasitos intracelulares obrigatórios, diferentemente das tricomonas que são extracelulares. Nós mostramos nesse trabalho que a adesão é o passo inicial para que se estabeleça a infecção. Desse modo, o comportamento dos protistas citados é bastante diferente, onde foi observado que a citocalasina bloqueia os eventos iniciais (entrada e adesão na célula hospedeira) para o estabelecimento da infecção e os possíveis danos a célula hospedeira.

A capacidade de *T. vaginalis* de matar e fagocitar as células-alvo poderia estar correlacionada com observações clínicas, uma vez que este parasito provoca vaginite e

hemorragias pontuais. Nossas observações também estão correlacionadas com achados clínicos onde tricomonádídeos são encontrados associados com células necróticas (Nielsen & Nielsen, 1975; Rasmussen *et al.* 1986). Alguns autores (Krieger *et al.*, 1983; Fiori *et al.*, 1993; 1996; 1997) investigaram os mecanismos usados por *T. vaginalis* nos danos celulares de membranas celulares usando eritrócitos como células-alvo e sugeriram a existência de poros funcionais nas membranas das células-alvo, como a hemolisina. Nós concordamos que a citólise pode atuar como fonte de nutrientes para o parasito.

Aqui, nós demonstramos que *T. vaginalis* é capaz de estressar mecanicamente as células hospedeiras *in vitro* pelo estiramento das microvilosidades até a ruptura da membrana plasmática, acarretando em um vazamento citoplasmático e morte celular por necrose secundária. Este tipo de estresse mecânico tem similaridades com alguns danos já anteriormente observados e descritos com amebas (Martinez-Palomo *et al.*, 1985) e macrófagos, durante a ingestão de células tumorais (Chambers & Weiser, 1969). Resultados similares têm sido descritos em *Acanthamoeba castellanii* e *T. vaginalis* quando em interação com monocamadas de uma linhagem de células epiteliais de rim de cachorro, as células MDCK (González-Robles *et al.*, 1995; González-Robles *et al.*, 2006). Entretanto, até o momento, nosso trabalho apresenta, pela primeira vez, imagens por microscopia de transmissão nítidas dos estágios subsequentes, quando os tricomonádídeos incorporam e, posteriormente, digerem organelas celulares, núcleos e outros fragmentos celulares das células hospedeiras.

É importante ressaltar que os mecanismos citolíticos independentes de contato têm sido propostos e os maiores efeitos citolíticos têm sido atribuídos às substâncias secretadas pelo parasito no meio de cultura (Silva-Filho *et al.*, 1989; Singh *et al.*, 2004; Kummer *et al.*, 2008).

Neste estudo foi também investigado o comportamento das tricomonas após adesão celular, como por exemplo, as consequências da adesão do parasito. Nós observamos que as células-alvo foram destacadas do substrato enquanto grande quantidade de tricomonas

estava ao redor delas, induzindo a uma morte celular por apoptose (condensação de cromatina, “*blebbing*” de membrana) e necrose (ruptura da membrana plasmática, liberação de organelas). As organelas, núcleos e debris celulares foram prontamente fagocitados pelas tricomonas. Estes eventos foram observados tanto em células crescidas em monocamadas quanto em células em suspensão e com todas as cepas dos parasitos testados no presente estudo. Os efeitos citotóxicos foram mais pronunciados com isolados frescos, como a cepa FMV1. Em todos os experimentos, somente fragmentos de células necróticas foram ingeridos, nunca células vivas ou mesmo as apoptóticas. Isto pode ser explicado pelo tamanho das células de mamíferos, as quais são muitas vezes maiores do que o parasito. Estudos anteriores têm mostrado que leveduras vivas ou mortas (Pereira-Neves & Benchimol, 2007) e bactérias (Francioli *et al.*, 1983; Benchimol & De Souza, 1995) são prontamente ingeridas pelas tricomonas. Outros elementos de superfícies celulares podem também estar envolvidos no reconhecimento celular, pois algumas cepas de bactérias não são ingeridas pela *T. vaginalis* (Pereira-Neves & Benchimol, observações não publicadas). Em outros tipos celulares, a fibronectina, carboidratos e outras moléculas de superfície são fatores importantes para o sucesso da endocitose (Benchimol *et al.*, 1986; 1990; 2008; Bonilha *et al.*, 1995). Assim, *T. vaginalis* parece atuar diferentemente de amebas, que são capazes de ingerir células epiteliais independentemente de terem sido previamente lisadas ou não (Martinez-Palamo *et al.*, 1985). As atividades hemolíticas e fagocíticas dos parasitos têm sido correlacionadas com a virulência (Krieger *et al.*, 1983; Dailey *et al.*, 1990; Pereira-Neves & Benchimol, 2007). A citólise pode ser um importante fator que fornece nutrientes aos tricomonadídeos.

Em estudos bioquímicos da interação *T. vaginalis* e células de ovário de *hamster* chinês (células CHO), os autores afirmaram que o parasito mata células de vertebrados sem envolver o processo de fagocitose (Krieger *et al.*, 1985). Nossos resultados diferem desses dados, mas estão de acordo com esses autores nos seguintes aspectos: (1) as interações dependentes de contato são necessárias e (2) os tricomonadídeos matam as células-alvo na cultura por um processo extracelular. Esta discrepância pode ser explicada pelo fato de que

o grupo do Krieger não seguiu os eventos após a interação das células-alvo com as tricomonas e nem utilizaram a microscopia eletrônica, como descrito no presente trabalho.

Embora Brugerolle (1971) tenha reportado que a fagocitose das partículas por *T. vaginalis* ocorra preferencialmente pelo lado posterior no segundo terço do corpo do parasito, esta polarização não foi observada em nenhum experimento de fagocitose realizado no presente estudo. Nossos dados, no entanto, suportam os resultados obtidos por Francioli *et al.* (1983), Rendón-Maldonado *et al.* (1998) e Pereira-Neves & Benchimol (2007), onde não foi possível a identificação de um sítio preferencial de fagocitose no corpo do parasito. Também, nós observamos que a mesma célula é capaz de fagocitar múltiplos fragmentos das células hospedeiras em diferentes regiões da superfície celular, simultaneamente.

#### **4.3.1 Direcionamento para lisossomos**

Os fragmentos das células epiteliais foram encontrados em diferentes estágios de degradação, em locais fosfatase ácida positiva, confirmando assim que os parasitos digerem os fragmentos celulares internalizados. Ainda mais, quando as células hospedeiras foram coradas com vermelho de rutênio antes da interação, este material foi encontrado em vacúolos das tricomonas, quando novamente se verificou a ingestão de debris celulares das células hospedeiras. Jesus *et al.* (2002) mostraram que as *T. vaginalis* liberaram fosfatases ácidas no meio de cultura. Assim podemos inferir que a morte de algumas tricomonas por necrose poderia ser devido a um vazamento das enzimas lisossomais ou uma estratégia usada pelas tricomonas para atacar as células-alvo facilitando a lise celular. Essa é uma questão ainda em aberto, que merece um estudo mais aprofundado.

Desse modo, achamos razoável dividir a ação citotóxica das *T. vaginalis* em quatro estágios: adesão, contato seguido de citólise, fagocitose e digestão intracelular. A tricomonose é considerada como uma doença sexualmente transmissível não ulcerativa. Entretanto, em infecções sintomáticas agudas se observam hemorragias pontuais na

mucosa vaginal e cervical, bem como dores no momento do ato sexual, podendo sugerir que esta infecção seria, ao menos em alguns casos, uma infecção ulcerativa. Se as tricomonas forem capazes de destruir e fagocitar células epiteliais *in vivo*, provavelmente poderiam provocar lesões na superfície da mucosa do trato urogenital, estabelecendo assim um portal de entrada para patógenos como HIV-1.

#### **4.4 Relações espécie-específicas**

Alguns autores (Singh *et al.*, 2004; Sommer *et al.*, 2005) demonstraram que *T. vaginalis* foi incapaz de provocar efeitos citotóxicos em células epiteliais vaginais bovinas, enquanto *T. foetus* provocava intensos danos a esta cultura, indicando uma interação específica entre o parasito e a célula-hospedeira. Em contraste a estes achados, no presente estudo, nós mostramos que a infecção de *T. vaginalis* com uma cultura primária de oviduto bovino provocou injúria às células hospedeiras e, dependendo da cepa, era ainda mais agressiva que *T. foetus*, mostrando assim que não haveria espécie-especificidade e discordando frontalmente dos achados de Singh e Sommer. Em outros estudos, infecções vaginais experimentais *in vivo* usando macacas, *hamster* e porcas (Kulda, 1967; Honigberg, 1989) mostraram infecções sintomáticas provocadas por *T. vaginalis*. Também, os primeiros estudos sobre interação de tricomonas com possíveis hospedeiros foram realizados com fragmentos de fetos e embriões de galinha (Hogue, 1943). Estudos *in vitro* com monocamadas de MDCK resultaram em uma infecção não específica (Silva Filho & De Souza, 1986; Gonzáles-Robles *et al.*, 1995; Jesus *et al.* 2004).

Além das células MDCK, linhagens provenientes de hospedeiros não específicos já haviam sido usadas, como as células de ovário de hamster chinês - CHO (Krieger *et al.*, 1985), células McCoy de camundongo (Bresseur & Savel, 1982), células Vero provenientes de rim de macaco (Alderete & Pearlman, 1984; Burgess *et al.*, 1990) e células RK-13, de rim de coelho (Heath, 1981). Estes achados diferentes podem ser atribuídos às diversas cepas usadas e/ou a cultura primária celular de vagina usada por outros autores. Desse

modo, nossos dados sugerem fortemente que a interação espécie-específica em *T. vaginalis* seja inexistente.

## **5. Conclusões**

- *T. foetus* e *T. vaginalis* foram capazes de aderir e provocar lesões nas células epiteliais de oviduto bovino, sugerindo que a infecção possa ocorrer em regiões mais profundas do trato genital.
- A adesão inicial à célula-hospedeira ocorre através da porção posterior final da célula, onde está presente a ponta do axóstilo e não pelo flagelo posterior.
- Os danos provocados por *T. foetus* às células do oviduto poderiam estar relacionados aos casos de infertilidade quando se dá a infecção *in vivo*.
- Isolados frescos de *T. vaginalis*, como os microorganismos da cepa FMV1, são mais citotóxicos às células hospedeiras do que microorganismos mantidos em laboratório por muito tempo, como as tricomonas da cepa JT.
- Os tricomonadídeos induzem a uma morte celular por apoptose seguida de necrose secundária das células hospedeiras.
- *T. vaginalis* destrói a cultura de células epiteliais usando mecanismos que incluem: adesão, danos mecânicos que culminam com a citólise, fagocitose e degradação intracelular em lisossomas.
- Há participação do citoesqueleto de actina durante o processo de adesão das tricomonas nas células epiteliais de oviduto bovino.
- Não há espécie-especificidade de *T. vaginalis*, tal como observado quando estas células interagem com as células de oviduto bovino.

## 6. Referências

- ABE, H. (1996). The mammalian oviductal epithelium: regional variations in cytological and functional aspects of the oviductal secretory cells. **Histol. Histopathol.**, v. 11 p.743-768.
- ADDIS, M.F., RAPPELLI, P., FIORI, P.L. (2000). Host and tissue specificity of *Trichomonas vaginalis* is not mediated by its known adhesion proteins. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 4358-4360.
- AFFONSO, A.L., BENCHIMOL, M., RIBEIRO, K.C., LINS, U., DE SOUZA, W. (1994). Further studies on the endocytic activity of *Tritrichomonas foetus*. **Parasitol. Res.**, v. 80, p. 403-413.
- AFFONSO, A.L., DE ALMEIDA, J.C., BENCHIMOL, M. (1997). Partial characterization of cytoplasmic compartments involved in the endocytic process of *Tritrichomonas foetus*. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 72, p. 247-256.
- ALDERETE, J.F. & GARZA, J.E. (1988). Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 28-33.
- ALDERETE, J.F. & PEARLMAN, A. (1984). Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers. **Brit. J. Vener. Dis.**, v. 60, p. 99-105.
- ALDERETE, J.F., PROVENZANO, D., LEHKER, M.W. (1995). Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complete lysis. **Microb. Pathog.**, v. 19, p. 93-103.
- ALSTAD, A.D., KROGH, D., FISCHER, K., GUSTAFSON, S., CASSEL, G., REICHERT, L., BASZLER, T. (1984). Trichomoniasis in a beef herd. **Vet. Med.**, v. 79, p. 708-709.
- ANDERSON, M.L., BARR, B.C., CONRAD, P.A. (1994). Protozoal causes of reproductive failure in domestic ruminants. **Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.**, v. 10, p. 439-461.
- ANDERSON, M.L., BONDURAND, R.H., CORBEIL, R.R., CORBEIL, L.B. (1996). Immune and inflammatory responses to reproductive tract infection with *Tritrichomonas foetus* in immunized and control heifers. **J. Parasitol.**, v. 82, p. 594-600.

- ARROYO, R. & ALDERETE, J.F. (1992). Molecular bases of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. **Mol. Microbiol.**, v. 6, p. 853-862.
- ARROYO, R. & ALDERETE, J.F. (1989). *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 2991-2997.
- ARROYO, R., GONZÁLEZ-ROBLES, A., MARTÍNEZ-PALOMO, A., ALDERETE, J.F. (1993). Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. **Mol. Microbiol.**, v. 7, p. 299-309.
- BARTLETT, W. (1947). Concept of Toxic Goiter. **Ann. Surg.**, v. 125, p. 566-571.
- BATISTA, C.M., BENCHIMOL, M., CUNHA E SILVA, N.L., DE SOUZA, W. (1988). Localization of acetylated alpha-tubulin in *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. **Cell Struct. Funct.**, v.13, p. 445-453.
- BENCHIMOL, M. (2004). Trichomonads under Microscopy. **Microsc. Microanal.**, v. 10, p. 528-550.
- BENCHIMOL, M. (2005). New ultrastructural observations on the skeletal matrix of *Tritrichomonas foetus*. **Parasitol. Res.**, v. 97, p. 408-416.
- BENCHIMOL, M. (2008). The hydrogenosome peripheral vesicle: similarities with the endoplasmic reticulum. **Tissue Cell**, v. 40, p. 61-74.
- BENCHIMOL, M., ALMEIDA, J.C., DE SOUZA, W. (1996a). Further studies on the organization of the hydrogenosome in *Tritrichomonas foetus*. **Tissue Cell**, v. 28, p. 287-299.
- BENCHIMOL, M., BATISTA, C., DE SOUZA, W. (1990). Fibronectin- and laminin-mediated endocytic activity in the parasitic protozoa *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 22, p. 39-45.

- BENCHIMOL, M. & BERNADINO, M.V. (2002). Ultrastructural localization of glycoconjugates in *Tritrichomonas foetus*. **Parasitol. Res.**, v. 88, p. 134-143.
- BENCHIMOL, M., DA CUNHA E SILVA, N.L., ELIAS, C.A., DE SOUZA, W. (1986). Tritrichomonas foetus: ultrastructure and cytochemistry of endocytosis. **Exp. Parasitol.**, v. 62, p. 405-415.
- BENCHIMOL, M., DE ANDRADE ROSE, I., DA SILVA FONTES, R., BURLA DIAS, A.J. (2008). Trichomonas adhere and phagocytose sperm cells: adhesion seems to be a prominent stage during interaction. **Parasitol. Res.**, v. 102, p. 597-604.
- BENCHIMOL, M. & DE SOUZA, W. (1983). Fine structure and cytochemistry of the hydrogenosome of *Tritrichomonas foetus*. **J. Protozool.**, v. 30, p.422-425.
- BENCHIMOL, M. & DE SOUZA, W. (1985). Tritrichomonas foetus: cytochemical visualization of the endoplasmic reticulum-Golgi complex and lipids. **Exp. Parasitol.**, v. 59, p. 51-58.
- BENCHIMOL, M. & DE SOUZA, W. (1987). Structural analysis of the cytoskeleton of Tritrichomonas foetus. **J. Submicrosc. Cytol.**, v. 19, p.139-147.
- BENCHIMOL, M. & DE SOUZA, W. (1988). *Tritrichomonas foetus*: freeze-fracture cytochemistry using polymyxin B. **Exp. Parasitol.**, v. 66, p. 35-43.
- BENCHIMOL, M. & DE SOUZA, W. (1995). Carbohydrate involvement in the association of a prokaryotic cell with *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **Parasitol. Res.**, v. 81, p. 459-464.
- BENCHIMOL, M., DIAS, A.B., FONTES, R. (2006). Interaction of *Tritrichomonas foetus* and the bovine oviduct in an organ culture model. **Vet. Parasitol.**, v. 140, p. 244-250.
- BENCHIMOL, M., DINIZ, J.A., RIBEIRO, K. (2000). The fine structure of the axostyle and its associations with organelles in Trichomonads. **Tissue Cell**, v. 32, p. 178-187.

- BENCHIMOL, M., ELIAS, C.A., DE SOUZA, W. (1981a). Specializations in the flagellar membrane to *Tritrichomonas foetus*. **J. Parasitol.**, v. 67, p. 174-178.
- BENCHIMOL, M., ELIAS, C.A., DE SOUZA, W. (1982a). *Tritrichomonas foetus*: fine structure of freeze-fracture membranes. **J. Protozool.**, v. 29, p. 348-353.
- BENCHIMOL, M., ELIAS, C.A., DE SOUZA, W. (1982b). *Tritrichomonas foetus*: ultrastructural localization of basic proteins and carbohydrates. **Exp. Parasitol.**, v. 54, p. 135-144.
- BENCHIMOL, M., ELIAS, C.A., DE SOUZA, W. (1982c). *Tritrichomonas foetus*: ultrastructural localization of calcium in the plasma membrane and in the hydrogenosome. **Exp. Parasitol.**, v. 54, p. 277-284.
- BENCHIMOL, M., FONTES, R.S., DIAS, A.J.B. (2007). *Tritrichomonas foetus* damages bovine oocytes in vitro. **Vet. Res.**, v. 38, p. 399-408.
- BENCHIMOL, M., JOHNSON, P.J., DE SOUZA, W. (1996b). Morphogenesis of the hydrogenosome: an ultrastructural study. **Biol. Cell**, v. 87, p. 197-205.
- BENCHIMOL, M., KACHAR, B., DE SOUZA, W. (1992). Surface domains in the pathogenic protozoan *Tritrichomonas foetus*. **J. Protozool.**, v. 39, p. 480-484.
- BENCHIMOL, M., KACHAR, B., DE SOUZA, W. (1993). The structural organization of the pathogenic protozoan *Tritrichomonas foetus* as seen in replicas of quick frozen, freeze-fractured and deep etched cells. **Biol. Cell**, v. 77, p. 289-295.
- BENCHIMOL, M., PEREIRA, M.E., ELIAS, C.A., DE SOUZA, W. (1981b). Cell surface carbohydrates in *Tritrichomonas foetus*. **J. Protozool.**, v. 28, p. 337-341.
- BENCHIMOL, M., RIBEIRO, K.C., MARIANTE, R.M., ALDERETE, J.F. (2001). Structure and division of the Golgi complex in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 80, p. 593-607.

- BENCHIMOL, M., DINIZ, J.A., RIBEIRO, K. (2000). The fine structure of the axostyle and its associations with organelles in Trichomonads. **Tissue Cell**, v. 32, p. 178-187.
- BIELANSKI, A., GHAZI, D.F., PHIPPS´TOODD, B. (2204). Observations on the fertilization and development of preimplantation bovine embryos n vitro in the presence of *Tritrichomonas foetus*. **Theriogenology**, v. 61, p. 821-829.
- BOETTNER, D.R. & PETRI, W.A. (2005). *Entamoeba histolytica* activates host cell caspases during contact-dependent cell killing. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 289, p. 175-184.
- BONDURANT, R.H. (1997). Pathogenesis, diagnosis, and management of trichomoniasis in cattle. **Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.**, v. 13, p. 345-361.
- BONILHA, V.L., CIAVAGLIA, M.C., DE SOUZA, W., COSTA E SILVA FILHO, F. (1995) The involvement of terminal carbohydrates of the mammalian cell surface in the cytoadhesion of trichomonads. **Parasitol. Res.**, v. 81, p. 121-126.
- BRASSEUR, P., SAVEL, J. (1982). Evaluation de la virulence des souches de *Trichomonas vaginalis* par l'étude de l'effect cytophatogène sur culture de cellules. **C. R. Soc. Biol.**, v. 176, p. 849-860.
- BRENNER, R.M. (1969). Renewal of oviduct cilia during menstrual cycle of the rhesus monkey. **Fert. Steril.**, v. 20, p. 599-611.
- BRICHEUX, G. & BRUGEROLLE, G. (1997). Molecular cloning of actin genes in *Trichomonas vaginalis* and phylogeny inferred from actin sequences. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 153, p. 205-213.
- BRICHEUX, G., COFFE, G., BAYLE, D., BRUGEROLLE, G. (2000). Characterization, cloning and immunolocalization of a coronin homologue in *Trichomonas vaginalis*. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 79, p. 413-422.

- BRICHEUX, G., COFFE, G., PRADEL, N., BRUGEROLLE, G. (1998). Evidence for an uncommon alpha-actinin protein in *Trichomonas vaginalis*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 95, p. 241-249.
- BRUGEROLLE, G. (1971). Mise en évidence du processus d'endocytose et des structures lysosomiques chez *Trichomonas vaginalis*. **C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D.**, v. 272, p. 2558-2560.
- BRUGEROLLE, G. (1975). Étude de la cryptopleuromitose et de la morphogenèse de division chez plusieurs Genres de la trichomonadines primitive. **Protistologica**, v. 4, p. 457-468.
- BRUGEROLLE, G., BRICHEUX, G., COFFE, G. (1996). Actin cytoskeleton demonstration in *Trichomonas vaginalis* and in other trichomonads. **Biol. Cell**, v. 88, p.29-36.
- BRUGEROLLE, G., BRICHEUX, G., COFFE, G. (2000). Centrin protein and genes in *Trichomonas vaginalis* and close relatives. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 47, p. 129-138.
- BRUGEROLLE, G. & VISCOGLIOSI, E. (1994). Organization and composition of the striated roots supporting the Golgi apparatus, the so-called parabasal apparatus, in parabasalid flagellates. **Biol. Cell**, v. 81, p. 277-285.
- BUI, E.T. & JOHNSON, P.J. (1996). Identification and characterization of [Fe]-hydrogenases in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. **Mol Biochem. Parasitol.**, v. 76, p. 305-310.
- BUI, E.T., BRADLEY, P.J., JOHNSON, P.J. (1996). A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 9651-9656.
- BURGESS, D.E., KOBLOCK, K.F., DAUGHERTY, T., ROBERTSON, N.P. (1990). Cytotoxic and hemolytic effects of *Tritrichomonas foetus* on mammalian cells. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 3627-3632.

- CAHILL, D.J. & WARDLE, P.G.(2002). Management of infertility. **B.M.J.**, v. 325, p. 28-32.
- CARLTON, J.M., HIRT, R.P., SILVA, J.C., DELCHER, A.L., SCHATZ, M., ZHAO, Q., WORTMAN, J.R., BIDWELL, S.L., *ET AL.* (2007). Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. **Science**, v. 315, p. 207-212.
- CHAMBERS, V.C. & WEISER, R.S. (1969). The ultrastructure of the target cells and immune macrophages during their interaction *in vitro*. **Cancer Res.**, v. 29, p. 301-317.
- CHAMPNEY, W.S., CHITTUM, H.S., SAMUELS, R. (1992). Ribosomes from trichomonad protozoa have prokaryotic characteristics. **Int. J. Biochem.**, v. 24, p. 1125-1133.
- CHANG, M.C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in the fallopian tube. **Nature.**, v. 168, p. 697-698.
- CHAPMAN, A., HANN, A.C., LINSTED, D., LLOYD, D. (1985). Energy-dispersive X-ray microanalysis of membrane-associated inclusions in hydrogenosomes isolated from *Trichomonas vaginalis*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 131, p. 2933-2939.
- CITI, S. (1993). The molecular organization of tight junctions. **J. Cell Biol.**, v. 121, p. 485-489.
- CLARK, D. (1972). Voluntary visitors to the elderly deaf. **Br. Med. J.**, v. 30, p. 766-768.
- CLEMENS, D.L. & JOHNSON, P.J. (2000). Failure to detect DNA in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* by nick translation and immunomicroscopy. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 106, p. 307-313.
- COHEN, C.R., PLUMMER, F.R., NUGO, N., MACLEAN, I., SHEM, C., BURKUSI, E.A., IRUNGU, E., SINEI, S., BWAYO, I., BRUNHAM, R.C. (1999). Increase interleukin-10 in the endocervical secretions of women with not-ulcerativo sexually transmitted diseases: a mechanism for enhanced HIV-1 transmission? **AIDS**, v. 13, p. 327-332.

- CORBEIL, L.B. (1994). Vaccination strategies against *Tritrichomonas foetus*. **Parasitol. Today**, v. 10, p. 103-106.
- CORBEIL, L.B., HODGSON, J.L., JONES, D.W., CORBEIL, R.R., WIDDERS, P.R., STEPHENS, L.R. (1989). Adherence of *Tritrichomonas foetus* to bovine vaginal epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 2158-2165.
- CROUCH, M.L. & ALDERETE, J.F. (1999). *Trichomonas vaginalis* interactions with fibronectin and laminin. **Microbiology**, v. 145, p. 2835-2843.
- DAHLGREN, S.S., GJERD, B., PETTERSEN, H.Y. (2007). First record of natural *Trichomonas foetus* infection of the feline uterus. **J. Small Anim. Pract.**, v. 48, p. 654-657.
- DAILEY, D.C., CHANG, T.H., ALDERETE, J.F. (1990). Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis. **Parasitology**, v. 101, p. 171-175.
- DALIRI, M., RAO, K.B., KAUR, G., GARG, S., PATIL, S., TOTEY, S.M. (1999). Expression of growth factor ligand and receptor genes in preimplantation stage water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos and oviduct epithelial cells. **J. Reprod. Fertil.**, v. 117, p. 61-70.
- DE ANDRADE ROSA, I., EINICKER-LAMAS, M., RONEY BERNARDO, R., PREVIATTO, L.M., MOHANA-BORGES, R., MORGADO-DÍAZ, J.A., BENCHIMOL, M. (2006). Cardiolipin in hydrogenosomes: evidence of symbiotic origin. **Eukaryot. Cell**, v. 5, p. 784-787.
- DE AZEVEDO, N.L. & DE SOUZA, W. (1992). A cytochemical study of the interaction between *Tritrichomonas foetus* and mouse macrophages. **Parasitol. Res.**, v. 78, p. 545-552.
- DE AZEVEDO, N.L. & DE SOUZA, W. (1996). An ultrastructural and cytochemical of *Tritrichomonas foetus*-eosinophil interaction. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 28, p. 243-249.

- DE SOUZA, W. & BENCHIMOL, B. (1988). Electron spectroscopic imaging of calcium in the hydrogenosomes of *Tritrichomonas foetus*. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 28, p. 619-621.
- DELGADO-VISCOGLIOSI, P., BRUGEROLLE, G., VISCOGLIOSI, E. (1996). Tubulin post-translational modifications in the primitive protist *Trichomonas vaginalis*. **Cell Motil. Cytoskeleton.**, v. 33, p. 288-297.
- DENKER, B.M. & NIGAM, S.K. (1998). Molecular structure and assembly of the tight junction. **Am. J. Physiol.**, v. 274, p. F1-9.
- DIAMOND, L.S. (1957). The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. **J. Parasitol.**, v. 43, p. 488-490.
- DOBRINSKI, I., SMITH, T.T., SUAREZ, S.S., BALL, B.A. (1997). Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. **Biol. Reprod.**, v. 56, p. 861–869.
- DONNE, A. (1836). Animalcules observes dans lês matiè respurulentes et lê produit dès sécrétions dès organes gênitaires de l'homme et de la femme. **Acad. Sci. Paris**, v. 3, p. 385-386.
- DYALL, S.D., KOEHLER, C.M., DELGADILLO-CORREA, M.G., BRADLEY, P.J., PLÜMPER, E., LEUENBERGER, D., TURCK, C.W., JOHNSON, P.J. (2000). Presence of a member of the mitochondrial carrier family in hydrogenosomes: conservation of membrane-targeting pathways between hydrogenosomes and mitochondria. **Mol. Cell. Biol.**, v. 20, p.2488-2497.
- ECKERT, L.O., HAWES, S.E., WALLNER-HANSEN, P.K., KIVIAT, N.B., WASSERHEIT, J.N., PAAVONEN, J.A., ESCHENBACH, D.A., HOLMES, K.K. (2002). Endometritis: the clinicalpathologic syndrome. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 186, p. 690-695.

- EDWARDS, A. (1993). Nitroimidazole drugs – action and resistance mechanisms I. **J. Antimicrob. Chemoth.** v. 31, p. 9-20.
- EMBLEY, T.M. (2006). Multiple secondary origins of the anaerobic lifestyle in eukaryotes. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 361, p. 1055-1067.
- ENGBRING, J.A., O'BRIEN, J.L., ALDERETE, J.F. (1996). *Trichomonas vaginalis* adhesions proteins display molecular mimicry to metabolic enzymes. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 408, p. 207-223.
- ERLANDSEN, S.L. & CHASE, D.G. (1974). Morphological alterations in the microvillous border of villous epithelial cells produced by intestinal microorganisms. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 27, p. 1277-. 1286.
- EVERS, J.L. (2002). Female subfertility. **Lancet.**, v. 360, p. 151-159.
- FAWCET, D.W. (1995). Tratado de Fisiología, 12ª ed. Madrid: **Interamericana McGraw-Hill**, p. 885-933.
- FAZELI, A., AFFARA, N.A., HUBANK, M., HOLT, W.V. (2004). Sperm-induced modification of the oviductal gene expression profile after natural insemination in mice. **Biol. Reprod.**, v. 71, p. 60–65.
- FAZELI, A., ELLIOTT, R.M., DUNCAN, A.E., MOORE, A., WATSON, P.F., HOLT, W.V. (2003). In vitro maintenance of boar sperm viability by a soluble fraction obtained from oviductal apical plasma membrane preparations. **Reproduction**, v. 125, p. 509–517.
- FEIGELSON, M. & KAY, E. (1972). Protein patterns of rabbit oviduct fluid. **Biol. Reprod.**, v. 6, p. 244-252.
- FELLEISEN, R.S. (1999). Host-parasite interaction in bovine infection with *Trichomonas foetus*. **Microb. Infect.**, v. 1, p. 807-816.

- FIORI, P. L., RAPPELLI, P., ADDIS, M. F., MANNU, F., CAPPUCCINELLI, P. (1997). Contact-dependent disruption of the host cell membrane skeleton induced by *Trichomonas vaginalis*. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 5142-5148.
- FIORI, P.L. RAPELLI, P., ADDIS, M.F., SECHI, A., CAPPUCCINELLI, P. (1996). *Trichomonas vaginalis* haemolysis: pH regulates a contact-independent mechanisms based on pore-forming proteins. **Microb. Pathog.**, v. 20, p. 109-118.
- FIORI, P.L., RAPPELLI, P., ROCCHIGIANI, A.M., CAPPUCCINELLI, P. (1993). *Trichomonas vaginalis* haemolysis: evidence of functional pores formation on red cell membranes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 109, p. 13-18.
- FRANCIOLI, P., SHIO, H., ROBERTS, R.B., MULLER, M. (1983) Phagocytosis and killing of *Neisseria gonorrhoeae* by *Trichomonas vaginalis*. **J. Infect. Dis.**, v. 1, p. 87-94.
- FREDRICSSON, B. (1959). Proliferation of rabbit oviduct epithelium after estrogenic stimulation, with reference to the relationship between ciliated and secretory cells. **Acta. Morphol. Neerl. Scand.**, v. 2, p. 193-202.
- FROST, J.K. (1962). *Trichomonas vaginalis* and cervical epithelial changes. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 97, p. 792-799.
- FURTADO, M.B. & BENCHIMOL, M. (1998). Observation of membrane fusion on the interaction of *Trichomonas vaginalis* with human vaginal epithelial cells. **Parasitol. Res.**, v. 84, p. 213-220.
- GABLER, C., LAUER, B., EINSPANIER, A., SCHAMS, D., EINSPANIER, R. (1997). Detection of mRNA and immunoreactive proteins for acidic and basic fibroblast growth factor and expression of the fibroblast growth factor receptors in the bovine oviduct. **J. Reprod. Fertil.**, v. 109, p. 213–221.
- GANDOLFI, F. & MOOR, R.M. (1987). Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. **J. Reprod. Fertil.**, v. 81, p. 23–28.

- GARBER, G.E, & LEMCHUK-FAVEL, L.T. (1989). Characterization and purification of extracellular proteases of *Trichomonas vaginalis*. **Can. J. Microbiol.**, v. 35, p. 903-909.
- GAULT, R.A., KVASNICKA, W.G., HANKS, D., HANKS, M., HALL, M.R. (1995). Specific antibodies in serum and vaginal mucus of heifers inoculated with a vaccine containing *Tritrichomonas foetus*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 56, p. 454-459.
- GAUNT, S.J. (1985). In vivo and in vitro cultured mouse preimplantation embryos differ in their display of teratocarcinoma cell surface antigen: possible binding of an oviduct factor. **J. Embryol. Exp. Morph.**, v. 88, p. 55-69.
- GEORGIU, A.S., SOSTARIC, E., WONG, C.H., SNIJDERS, A.P., WRIGHT, P.C., MOORE, H.D., *ET AL.* (2005). Gametes alter the oviductal secretory proteome. **Mol. Cell Proteomics**, v. 4, p. 1785–1796.
- GILBERT, R.O., ELIA, G., BEACH, D.H., KLAESSIG, S., SING, B.N. (2000). Cytopathogenic effects of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultured *in vitro*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 4200-4206.
- GONZÁLEZ-ROBLES, A., CASTANON, G., CRISTÓBAL-RAMOS, A.R., LÁZARO-HALLER, A., OMAÑA-MLINA, M., BONILLA, P., MARTINEZ-PALOMO, A. (2006). *Acanthamoeba castellanii*: structural bases of the cytopathic mechanisms. **Exp. Parasitol.**, v. 114, p. 133-140.
- GONZÁLEZ-ROBLES, A., LÁZARO-HALLER, A., ESPINOSA-CANTELLANO, M., ANAYA-VELÁZQUEZ, F., MARTÍNEZ-PALOMO, A. (1995). *Trichomonas vaginalis*: ultrastructural bases of the cytopathic effect. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 42, p. 641-651.
- GRANGER, B.L. & WARWOOD, S.J. (1996). Rapid internalization and degradation of surface-bound antibodies by *Trichomonas foetus*. **J. Parasitol.**, v. 82, p. 539-549.
- GRANGER, B.L., WARWOOD, S.J., BENCHIMOL, M., DE SOUZA, W. (2000). Transient invagination of flagella by *Tritrichomonas foetus*. **Parasitol. Res.**, v. 86, p. 699-709.

- GRASSÉ, P.P. (1926). Contribution à l'étude de flagellés parasites. **Arch. Zool. Exp. Gén.**, v. 65, p. 345-602.
- GRODSTEIN, F., GOLDMAN, M.B., CRAMER, D.W. (1993). Relation of tubal infertility to history of sexually transmitted diseases. **Am. J. Epidemiol.**, v. 137, p. 577-584.
- HARPER, M.J.K. (1994). Gamete and zygote transport. En: Knobil, E. and Neill, J.D., (eds). *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed.,. New York: **Raven Press**, p. 131-147.
- HEATH, J.P. (1981). Behavior and pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* in epithelial cell cultures: a study by light and scanning electron microscopy. **Br. J. Vener. Dis.**, v. 57, p. 106-117.
- HEINE, P. & MCGREGOR, T.A. (1993). *Trichomonas vaginalis*: a reemerging pathogen. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 36, p. 137-144.
- HENRY-SUCHET, J. (2000). PID: clinical and laparoscopic aspects. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 900, p. 301-308.
- HOGUE, M.J. (1943). The effect of *Trichomonas vaginalis* on tissue culture cells. **Am. J. Hyg.**, v. 37, p. 142-152.
- HONIGBERG, M.B. Introduction. In: HONIGBERG, B.M. (1978). *Trichomonads of Veterinary Importance in Parasitic Protozoa.*, New York: **Academic Press.**, p. 164-273.
- HONIGBERG, B.M. (1989). Host cell-trichomonad interactions and virulence assays using *in vitro* systems. In: Honigberg B.M. (Ed.), *Trichomonads parasitic in humans*, **Springer-Verlag**, New York, p. 155-212.
- HONIGBERG, B.M., BRUGEROLLE, G. (1990). Structure. In: Honigberg B.M. (Ed.), *Trichomonads parasitic in humans*, **Springer-Verlag**, New York, p. 5-35.
- HONIGBERG, B.M., MATTERN, C.F., DANIEL, W.A. (1971). Fine structure of the mastigont system in *Tritrichomonas foetus*. **J. Protozool.**, v. 18, p. 183-198.

- HRDÝ, I. & MÜLLER, M. (1995). Primary structure and eubacterial relationships of the pyruvate:ferredoxin oxidoreductase of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. **J. Mol. Evol.**, v. 41, p. 388-396.
- JESUS, J.B., PODLYSKA, T.M., LOPES, A.H.C.S., VANNIER-SANTOS, M.A., MEYER-FERNANDES, J.R. (2002). Characterization of an ecto-phosphatase activity in the human parasite *Trichomonas vaginalis*. **Parasitol. Res.**, v. 88, p. 991-997.
- JESUS, J.B., VANNIER-SANTOS, M.A., BRITTO, C., GODEFROY, P., SILVA-FILHO, F.C., PINHEIRO, A.A., ROCHA-AZEVEDO, B., LOPES, A.H., MEYER-FERNANDES, J.R. (2004). *Trichomonas vaginalis* virulence against epithelial cells and morphological variability: the comparison between a well-established strain and a fresh isolate. **Parasitol. Res.**, v. 93, p. 369-377.
- JOSHI, M.S. (1988). Isolation, cell culture and immunocytochemical characterization of oviduct epithelial cells of the cow. **J. Reprod. Fertil.**, v. 83, p. 249-261.
- JULIANO, C., MONACO, G., BANDIERA, P., TEDDE, G., CAPPUCCINELLI, P. (1987). Action of anticytoskeletal compounds on in vitro cytopathic effect, phagocytosis, and adhesiveness of *Trichomonas vaginalis*. **Genitourin. Med.**, v. 63, p. 256-263.
- JULIANO, C., RUBINO, S., ZICCONI, D., CAPPUCCINELLI, P. (1986). An immunofluorescent study of the microtubule organization in *Trichomonas vaginalis* using antitubulin antibodies. **J. Protozool.**, v. 33, p. 56-59.
- KAPUR, R.P. & JOHNSON, L.V. (1985). An oviductal fluid glycoprotein associated with ovulated mouse ova and early embryos. **Dev. Biol.**, v. 112, p. 89-93.
- KHARSANY, A. B., HOOSEN, A. A., MOODLEY, J., BAGARATER, J., GOWNS, E. (1993). The association between sexually transmitted pathogens and cervical intra-epithelial neoplasia in a developing community. **Genitourin. Med.**, v. 69, p. 357-365.

- KHAW, M. & PANOSIAN, C.B. (1995). Human antiprotozoal therapy: past, present and future. **Clin. Microbiol.**, v. 8, p. 427-432.
- KIDSON, A., SCHOEVERS, E., LANGENDIJK, P., VERHEIJDEN, J., COLENBRANDER, B., BEVERS, M. (2003). The effect of oviductal epithelial cell co-culture during in vitro maturation on oocyte morphology, fertilization and embryo development. **Theriogenology**, v. 59, p. 1889–1903.
- KILLE, J.W. & HAMNER, C.E. (1973). The influence of oviduct fluid on the development of one-cell rabbit embryos in vitro. **J. Reprod. Fert.**, v. 35, p. 415-423.
- KIRBY, B. (1951). Observation of the trichomonad flagellates of the reproductive organs of cattle. **J. Parasitol.**, v. 37, p. 445-459.
- KRIEGER, J.N. (1990). Trichomoniasis. In: Warren KS & Mahmoud AAF (Ed), Tropical and Geographical Medicine. **McGraw-Hill**, New York, p. 358-365.
- KRIEGER, J.N., POISSON, M.A., REIN, M.F. (1983). Beta-hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* correlates with virulence. **Infect. Immun.**, v. 41, p. 1291-1295.
- KRIEGER, J.N., RAVDIN, J., REIN, M.F. (1985). Contact dependent cytopathogenic mechanisms of *Trichomonas vaginalis*. **Infect. Immun.**, v. 50, p. 768–770.
- KULDA, J. (1967). Effect of different cell species of trichomonads on monkey kidney cell cultures. **Folia Parasitol.**, v.14, p.295-310.
- KUMMER, S., HAYES, G.R., GILBERT, R.O., BEACH, D.H., LUCAS, J.J., SINGH, B.N. (2008). Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron. **Microbiol. Pathog.**, v. 44, p. 197-203.

- LAGA, M., MANOKA, A., KIVUVU, M. (1993). Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. **AIDS**, v. 7, p. 95-102.
- LAGA, M., NZILA, N., GOEMAN, J. (1991). The interrelationship of sexually transmitted diseases & HIV infection: implications for the control of both epidemics in Africa. **AIDS**, v. 5, p. 553-563.
- LEE, K.E., KIM, J.H., JUNG, M.K., ARII, T., RYU, J.S., HAN, S.S. (2009). Three-dimensional structure of the cytoskeleton in *Trichomonas vaginalis* revealed new features. **J. Electron. Microscop.**, v. 58, p. 305-313.
- LEE, K.F., YAO, Y.Q., KWOK, K.L., XU, J.S., YEUNG, W.S. (2002). Early developing embryos affect the gene expression patterns in the mouse oviduct. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 292, p. 564–570.
- LEESE, H.J. (1988). The formation and function of oviduct fluid. **J. Reprod. Fert.** v. 82, p. 843-856.
- LEHKER, M.W. & SWEENEY, D. (1999). Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. **Sex. Transm. Infect.**, v. 75, p. 231-238.
- LEHNER, R., KUCERA, E., JIRECEK, S., EGARTER, C., HUSSLEIN, P. (2000). Ectopic pregnancy. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v. 263, p. 87-92.
- LINDMARK, D.G. & MÜLLER, M. (1973). Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate, *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. **J. Biol. Chem.**, v. 248, p. 7724–7728.
- LISI, P.S., DONDERO, R.S., KWIATKOSKI, D., SPENCE, M.R., REIN, M. F., ALDERETE, J.F. (1988). Monoclonal-antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for *Trichomonas vaginalis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 26, p. 1684-1686.

- LLOYD, D., LINDMARK, D.G., MULLER, M. (1979). Adenosine triphosphatase activity of *Tritrichomonas foetus*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 115, p. 301-307.
- LOCKWOOD, B.C., NORTH, M.J., COOMBS, G.H. (1984). *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas foetus*, and *Trichomonas batrachorum*: comparative proteolytic activity. **Exp. Parasitol.**, v. 58, p. 245-253.
- MADARA, J.L., NASH, S., MOORE, R., ATISOOK, K. (1990). Structure and function of the intestinal epithelial barrier in health and disease. **Monogr. Pathol.**, v. 31, p. 306-324.
- MADEIRO DA COSTA, R.F. & BENCHIMOL, M. (2004). The effect of drugs on cell structure of *Tritrichomonas foetus*. **Parasitol. Res.**, v. 92, p. 159-170.
- MARTIN, C.H. & ROBERTSON, M. (1991). Further observations on the caecal parasites of fowls, with some reference to the rectal fauna of other vertebrates. **Quart. J. Microscop. Sc.**, v. 57, p. 53-81.
- MARTINEZ-PALOMO, A., GONZÁLEZ-ROBLES, A., CHÁVEZ, B., OROZCO E., FENÁDEZ-CASTELO, S., CERVANTES, A. (1985). Structural basis of the cytolytic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. **J. Protozool.**, v. 32, p. 166-175.
- MATTOS, A., SOLÉ-CAVA, A.M., DE CARLI, G., BENCHIMOL, M. (1997). Fine structure and isozymic characterization of trichomonadida protozoa. **Parasitol. Res.**, v. 83, p. 290-295.
- MCDANIEL, J.W., SCALZI, H., BLACK, D.L. (1968). Influence of ovarian hormones on histology and histochemistry of the bovine oviduct. **J. Dairy Sci.**, v. 51, p. 754-761.
- MCLELLAN, R., SPENCE, M. R., GROCKMAN, M., RAFFEL, L., SMITH, J.L. (1982). The clinical diagnosis of trichomoniasis. **Obstet. Gynecol.**, v. 60, p. 30-34.
- MENDONZA-LOPEZ, M.R., BECERRIL, B.C., FATTEL-FACENDA, L.V., GONZALES-AVILA, L., RUÍZ-TACHIQUIN, M.E., ORTEGA-LOPEZ, J., ARROYO, R. (2000). CP-30, a

- cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 4907-4912.
- MONTEIRO-LEAL, L.H., FARINA, M., BENCHIMOL, M., KACHAR B., DE SOUZA, W. (1995). Coordinated flagellar and ciliary beating in the protozoon *Tritrichomonas foetus*. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 42, p. 709-714.
- MOODLEY, P., CONNOLLY, C., STURN, A.W. (2002). Interrelationships among human immunodeficiency virus type I infection, bacterial vaginosis, trichomoniasis and the prevalence of yeasts. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p. 69-73.
- MÜLLER, M. (1993). The hydrogenosome. **J. Gen. Microbiol.**, v. 139, p. 2879-2889.
- NIELSEN, M.H., & NIELSEN, R. (1975). Electron microscopy of *Trichomonas vaginalis* Donné: Interaction with vaginal epithelium in human trichomoniasis. **Acta Pathol. Microbiol. Scand. B**, v. 83, p. 305-320.
- NOGUEIRA, N. & COHN, Z. (1976). *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. **J. Exp. Med.**, v. 143, p. 1402-1420.
- ODOR, D.L., GADDUM-ROSSE, P., RUMERY, R.E. (1983). Secretory cells of the oviduct of the pig-tailed monkey, *Macaca nemestrina*, during the menstrual cycle and after estrogen treatment. **Am. J. Anat.**, v. 166, p. 149-172.
- OLIPHANT, G., BOWLING, A., ENG, L.A., KEEN, S. & RANDALL, P.A. (1978). The permeability of the rabbit oviduct to proteins present in the serum. **Biol. Reprod.**, v. 18, p. 516-520.
- PANARO, M.A., CIANCIULLI, A., MITOLO, V., MITOLO, C.I., ACQUAFREDA, A., BRANDONISIO, O., CAVALHO, P. (2007). Caspase-dependent apoptosis of the HCT-8 epithelial cell line induced by the parasite *Giardia intestinalis*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 51, p. 302-309.

- PARSONSON, I.M., CLARCK, B.L., DUFTY, J.H. (1976). Early pathogenesis and pathology of *Tritrichomonas foetus* infection in virgin heifers. **J. Comp. Pathol.**, v. 86, p. 59-66.
- PEREIRA-NEVES, A & BENCHIMOL, M. (2008). *Trichomonas vaginalis*: *in vitro* survival in swimming pool water samples. **Exp. Parasitol.**, v. 118, p. 438-441.
- PEREIRA-NEVES, A. & BENCHIMOL, M. (2007). Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. **Biol. Cell**, v. 99, p. 87-101.p
- PEREIRA-NEVES, A., RIBEIRO, K.C., BENCHIMOL, M. (2003). Pseudocysts in trichomonads – new insights. **Protist**, v. 154, p. 313-329.
- PETRIN, D., DELGATY, K., BHATT K., GARBER G. (1998). Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clin. Microbiol.**, v. 11, p. 300-317.
- PINDAK, F.F., MORA DE PINDAK, M., GARDNER, J.R. (1993). Contact independent cytotoxicity of *Trichomonas vaginalis*. **Genitourin. Med.**, v. 69, p. 35-40.
- QUEIROZ, R.C., SANTOS, L.M., BENCHIMOL, M., DE SOUZA, W.. (1991). Cytochemical localization of enzyme markers in *Tritrichomonas foetus*. **Parasitol. Res.**, v. 77, p. 561-566.
- QUINTERO, I., CAILLE, A., MUNUCE, M., MORISOLI, L., GHERSEVICH, S. (2003). Función tubaria e infertilidad. **Reproducción Humana Argentina**, v. 3, p. 29-38.
- RAIKOV, I.B. (1994). The diversity of forms of mitosis in protozoa: a comparative review. **Eur. J. Protistol.**, v. 30, p. 253-269.
- RASMUSSEN S.E.,NIELSEN, M.H., LIND, I., RHODES, J.M. (1986). Morphological studies of the cytotoxicity of *Trichomonas vaginalis* to normal human vaginal epithelial cells *in vitro*. **Genitourin. Med.**, v. 62, p. 240-246.

- REERS, M., SMITH, T.W., CHEN, L.B. (1991). J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. **Biochemistry**, v. 30, p. 4480-4486.
- REIN, M.F. (1990). Clinical manifestations of urogenital trichomoniasis in women. In: trichomonads parasitic in humans. **Springer-Verlag**, New York. p. 225-234.
- RENDÓN-MALDONADO, J.G., ESPINOSA-CANTELLANO, M., GONZÁLEZ-ROBLES, A., MARTINEZ-PALOMO, A. (1998). *Trichomonas vaginalis*: *in vitro* phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes and erythrocytes. **Exp. Parasitol.**, v. 89, p. 241-250.
- RIBEIRO, K.C., BENCHIMOL, M., FARINA, M. (2001). Contribution of cryofixation and freeze-substitution to analytical microscopy: a study of *Tritrichomonas foetus* hydrogenosomes. **Microsc. Res. Tech.**, v. 53, p. 87-92.
- RIBEIRO, K.C., MARIANTE, R.M., COUTINHO, L.L., BENCHIMOL, M. (2002a). Nucleus behavior during the closed mitosis of *Tritrichomonas foetus*. **Biol. Cell**, v. 94, p. 289-301.
- RIBEIRO, K.C., MONTEIRO-LEAL, L.H., BENCHIMOL, M. (2000). Contributions of the axostyle and flagella to closed mitosis in the protists *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 47, p. 481-492.
- RIBEIRO, K.C., PEREIRA-NEVES, A., BENCHIMOL, M. (2002b). The mitotic spindle and associated membranes in the closed mitosis of trichomonads. **Biol. Cell**, v. 94, p. 157-172.
- RIEDMÜLLER, L. (1928). Über die morphologie, übertragungsversuche, uns klinische bedeutung der beim sporadischem abortus des rindes vorkommenden Trichomonaden. **Zentralbl. Bakteriol.**, v. 108, p. 103-118.
- ROBINSON, J.M. & KARNOVSKY, M.J. (1983). Ultrastructural localization of several phosphatases with cerium. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 31, p. 1197-1208.

- ROCHA-AZEVEDO, B., MENEZES, G.C., SILVA-FILHO, F.C. (2005). The interaction between *Acanthamoeba polyphaga* and human osteoblastic cells *in vitro*. **Microbiol. Pathogen.**, v. 40, p. 8-14.
- RYNING, F.W. & REMINGTON, J.S. (1978). Effect of cytochalasin D on *Toxoplasma gondii* cell entry. **Infect. Immun.**, v. 20, p. 739-743.
- RYU, J. S., CHOI, H. K., MIN, D. Y., HA, S. E., AHN, M. H. (2001). Effect of iron on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. **J. Parasitol.**, v. 87, p. 457-460.
- SALAMONSEN, L.A. & NANCARROW, C.D. (1994). Cell biology of the oviduct and endometium. En: Findley JK (ed). Molecular biology of the female reproductive system, New York: **Academy Press**, p. 305-319.
- SAMUELS, R. (1957). Studies of *Tritrichomonas batrachorum* (perty) 2: normal mitosis and morphogenesis. **Trans. Am. Microsc. Soc.**, v. 76, p. 295-307.
- SAMUELS, R. (1959). Studies of *Tritrichomonas batrachorum* (perty) 3: abnormal mitosis and morphogenesis. **Trans. Amer. Microsc. Soc.**, v. 78, p. 49-65.
- SHAIA, C.I., VOYICH, J., GILLIS, S.J., SINGH, B.N., BURGESS, D.E. (1998). Purification and expression of the Tf190 adhesin in *Tritrichomonas foetus*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 1100-1105.
- SHAPIRO, S.S., JENTSEH, J., YARD, A.S. (1974). Isolation of an acid glycoprotein from rabbit oviductal fluid and its association with the egg coating. **Reprod. Fert.**, v. 40, p. 281-290.
- SILVA-FILHO, F.C. & BONILHA, V.L. (1992). Effect of estrogens on the adhesion of *Trichomonas vaginalis* to epithelial cells *in vitro*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 25, p. 9-18.

- SILVA FILHO, F.C. & DE SOUZA, W. (1986). Effect of colchicine, vinblastine and cytochalasin B on cell surface anionic sites of *Tritrichomonas foetus*. **J. Protozool.**, v. 33, p. 6-10.
- SILVA FILHO, F.C. & DE SOUZA, W. (1988). The interaction of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus* with epithelial cells *in vitro*. **Cell Struct. Funct.**, v. 13, p. 301-310.
- SILVA FILHO, F.C., BREIER-SARAIVA, E.M., TOSTA, M.X., DE SOUZA, W. (1989). *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus* secrete neuraminidases into the culture médium. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 35, p. 73-78.
- SILVA FILHO, F.C., ELIAS, C.A., DE SOUZA, W. (1987). Role of divalent cations, pH, cytoskeleton components and surface charge on the adhesion of *Trichomonas vaginalis* to a polystyrene substrate. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 379-384.
- SIMPSON, C.F. & WHITE, F.H. (1964). Structure of *Trichomonas foetus* as revealed by electron microscopy. **Am. Vet. Res.**, v. 66, p. 815-825.
- SINGH, B.N., HAYES, G.R., LUCAS, J.J., BEACH, D.H., GILBERT, R.O. (2005) *In vitro* cytopathic effects of a cysteine protease of *Tritrichomonas foetus* on cultured bovine uterine epithelial cell. **Am. J. Vet. Res.**, v. 66, p. 1185-1186.
- SINGH, B.N., LUCAS, J.J., BEACH, D.H., SHIN, S.T., GILBERT, R.O. (1999). Adhesion of *Tritrichomonas foetus* to bovine epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 3847-3854.
- SINGH, B.N., HAYES, G.R., LUCAS, J.J., BEACH, D.H., GILBERT, R.O. (2004). *Tritrichomonas foetus* induces apoptotic cell death in bovine vaginal epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 4151-4158.
- SKIRROW, S.Z., BONDURANT, R.H. (1990). Immunoglobulin isotype of specific antibodies in reproductive tract secretions and sera in *Trichomonas foetus* – infected heifers. **Am. J. Vet. Res.**, v. 51, p. 645-653.

- SMITH, T.T. & NOTHNICK, W.B. (1997). Role of direct contact between spermatozoa and oviductal epithelial cells in maintaining rabbit sperm viability. **Biol. Reprod.**, v. 56, p. 83–89.
- SOMMER, U., COSTELLO, C.E., HAYES, G.R., BEACH, D.H., GILBERT, R.O., LUCAS, J.J. (2005). Identification of *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases that induce apoptosis in human epithelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 23853-23860.
- STOCKDALE, H.D., DILLON, A.R., NEWTON, J.C., BIRD, R.C., BONDURANT, R.H., DEINNOCENTES, P., BARNEY, S., BULTER, J. (2008). Experimental infection of cats (*Felis catus*) with *Tritrichomonas foetus* isolated from cattle. **Vet. Parasitol.**, v. 154, p. 156-161.
- STOCKDALE, H.D., GIVENS, M.D., DYKSTRA, C.C., BLAGBURN, B.L. (2009). *Tritrichomonas foetus* infections in surveyed pet cats. **Vet. Parasitol.**, v. 160, p. 13-17.
- STONE, S.L., HUCKLE, W.R., OLIPHANT, G. (1980). Identification and hormonal control of reproductive-tracts specific antigens present in rabbit oviductal fluid. **Gamete Res.**, v. 3, p. 169-177.
- STRANDELL, A. & LINDHARD, A. (2002). Why does hydrosalpinx reduce fertility? The importance of hydrosalpinx fluid. **Hum. Reprod.**, v. 17, p. 1141-1145.
- SUAREZ, S.S. (2002). Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 37 p. 140–143.
- TALBOT, J.A., NIELSEN, K., CORBEIL, L.B. (1991). Cleavage of proteins of reproductive secretions by extracellular proteinases of *Tritrichomonas foetus*. **Can. J. Microbiol.**, v. 37, p. 384-390.
- TURNER, G. & MULLER, M. (1983). Failure to detect extranuclear DNA in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **J. Parasitol.**, v. 69, p. 234-236.

- URZUA, M.A., STAMBAUGH, R., FLICKINGER, G., MASTROIANNI, L., JR. (1970). Uterine and oviduct fluid protein patterns in the rabbit before and after ovulation. **Fert. Steril.**, v. 21, p. 860-865.
- VISCOGLIOSI, E. & BRUGEROLLE, G. (1994). Cytoskeleton in trichomonads III: study of the morphogenesis during division by using monoclonal antibodies against cytoskeleton structures. **Eur. J. Protistol.**, v. 30, p. 129-138.
- WALTER, I. (1995). Culture of bovine oviduct epithelial cells (BOEC). **Anat. Rec.**, v. 243, p. 347-356.
- WASSERTHEIT, J.N. (1992). Interrelationship between human immunodeficiency virus infection and other sexually transmitted diseases. **Sex. Trans. Dis.**, v. 19, p. 61-77.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1995). An overview of selected curable sexually transmitted diseases. In Global Program on AIDS. **World Health Organization**, Geneva, Switzerland.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2001). Global prevalence and incidence of select curable sexually transmitted infections. In Global program on AIDS. **World Health Organization**, Geneva, Switzerland. p. 2-27.
- YAEGER, M.J. & GOOKIN, J.L. (2005). Histologic features associated with *Trichomonas foetus* – induced colitis in domestic cats. **Vet. Pathol.**, v. 42, p. 797-804.
- ZAHRAOUI, A., LOUVARD, D., GALLI, T. (2000). Tight junction, a platform for trafficking and signaling protein complexes. **J. Cell Biol.**, v. 151, p. F31-6.
- ZHANG, Z. & BEGG, C.B. (1994). Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasma? Results from a combined analysis of 24 studies. **Int. J. Epidemiol.** v. 23, p. 682-690.

## **ANEXO I**





## Cytopathic effects of *Tritrichomonas foetus* on bovine oviduct cells

V. Midlej<sup>a,c</sup>, R. Vilela<sup>a,d</sup>, A.B. Dias<sup>b</sup>, M. Benchimol<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Santa Ursula, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup> Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Brazil

<sup>c</sup> Pós-graduação em Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

<sup>d</sup> Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 February 2009

Received in revised form 12 July 2009

Accepted 13 July 2009

#### Keywords:

*Tritrichomonas foetus*

Oviduct

Cow

Cytopathogenic effect

Apoptosis

### ABSTRACT

*Tritrichomonas foetus* is an extracellular parasite of the reproductive tract in cattle. To investigate the cytopathic effects of *T. foetus* in deeper parts of the reproductive tract, a bovine primary oviduct epithelial cell system (BOECs) was developed. Reproductive tracts were obtained from cows and the effect of co-incubating *T. foetus* with BOECs was analyzed by scanning electron, transmission electron and fluorescence microscopy. Viability tests were performed using colorimetric methods, TUNEL (Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling), fluorescein diacetate, propidium iodide, JC-1 and annexin-V. The results demonstrate that: (1) the in vitro oviduct epithelium is useful for interaction experiments with *T. foetus*; (2) *T. foetus* adheres to the BOECs as single separate cells, and later on the cells aggregate as large clusters; (3) the posterior region of the cell initiates the process of adhesion and forms filopodia and digitopodia; (4) *T. foetus* severely damages BOECs leaving imprints in the epithelial cells, wide intercellular spaces, and large lesions in the epithelium; and (5) *T. foetus* provokes bovine oviduct cell death by apoptosis and secondary necrosis. Our observations indicate the possibility that *T. foetus* can move through the reproductive tract to the oviduct and that infertility in cows can be mediated by an attack on the oviduct cells by *T. foetus*.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Tritrichomonas foetus* is the causative agent of cattle trichomonosis, one of the most prevalent sexually transmitted diseases in cattle. In cows, the infection varies from a mild vaginitis or cervicitis, to endometritis, abortion and infertility. Significant losses may occur because of infertility and abortion (Anderson et al., 1996; Krieger et al., 1983).

The cellular mechanism by which *T. foetus* colonizes mucosal surfaces is not well defined nor is the mechanism(s) of tissue damage understood. Thus, there is a need

for a deeper understanding of the pathogenic effects of this parasite to better delineate the host–parasite relationship.

Many simple cell line systems that permit the study of the trichomonad–host interaction have been previously used, such as chicken embryo explants (Alderete and Pearlman, 1981), HeLa cells (Brasseur and Savel, 1982; Burgess et al., 1990), McCoy (Brasseur and Savel, 1982), Vero cells (Alderete and Pearlman, 1981; Burgess et al., 1990), RK-13 cells (Heath, 1981), CHO cells (Krieger et al., 1983), WISH cells (Korbecki and Dyer, 1976), MDCK cells (Grodstein et al., 1993; Silva-Filho and Bonilha, 1992; Silva-Filho and de Souza, 1988), baboon testes, and others (Gentry et al., 1985; Burgess et al., 1990; Kulda, 1967). Human (Gilbert et al., 2000) and bovine vaginal epithelial cell cultures (Singh et al., 1999; Skirrow and Bon Durant, 1990) as well as scraped bovine vaginal cells (Corbeil et al., 1989) have been used for similar purposes. Moreover, a uterus primary cell line (Singh et al., 1999) has been

\* Corresponding author at: Rua Jornalista Orlando Dantas 59, Botafogo, CEP 222-31-010, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel.: +55 21 2237 0440; fax: +55 21 2237 0440.

E-mail address: [marlenebenchimol@gmail.com](mailto:marlenebenchimol@gmail.com) (M. Benchimol).

recently established. *T. foetus* initially adheres to and infects the vagina, causing vaginitis. Yet, some authors have suggested that the parasites are able to move to the uterus and oviduct (Singh et al., 2004). Curiously, there are no studies of infection in cow oviducts. Most papers are related to vaginal infection, and only a few articles focus on the uterus (Anderson et al., 1996; Parsonson et al., 1976; Singh et al., 2005). The oviduct is an important organ that is involved in several functions of fertilization, including maturation of gametes, transport of gametes to the uterus and early development of the embryo. During fertilization, ciliated oviduct cells promote the transport of gametes whereas the secretory cells promote the release of several growth factors (Gabler et al., 1997; Daliri et al., 1999) that stimulate gamete development. Given the broad range of actions taking place in this organ, it is important to elucidate the interactions between *T. foetus* and oviduct cells in a primary culture system. Thus, data related to the morphological cytopathic effects of *T. foetus* on bovine oviduct epithelial cells (BOECs) are needed, but not available. Although cultures of oviduct cells have been described for other purposes (Walthers, 1995), this paper is the first to report on an oviduct epithelial cell culture system that is used to test interactions with *T. foetus* in vitro.

Our goal in this study was to investigate the ability of *T. foetus* to damage bovine oviduct cells in an in vitro culture and to follow the steps of the resulting cytotoxicity.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganisms

The K strain of *Tritrichomonas foetus* was isolated by Dr. H. Guida (Embrapa, Rio de Janeiro, Brazil) from the urogenital tract of a bull and maintained in TYM Diamond's medium. The cells were grown for 24 h at 36.5 °C.

### 2.2. Oviducts

The oviducts from 40 healthy, virgin cows that were negative for the presence of *T. foetus* were removed at a commercial slaughterhouse, immersed in sterile phosphate balanced salt solution (PBS) containing 0.05 g/L gentamycin sulphate, and transported to the laboratory within 2 h.

### 2.3. Isolation of oviduct epithelial cells

The isthmus and ampulla of the oviducts were the sources for epithelial cells. The luminal region of the organ was flushed with cold PBS to obtain cell clusters, which were transferred to Medium 199 culture media (M-5017, Sigma, USA) supplemented with penicillin and streptomycin (0.08 mg/ml each). Ciliated and non-ciliated secretory cells were obtained after several washes and transferred to Medium 199 culture media (M-5017, Sigma).

Cells were maintained in 25 cm<sup>2</sup> bottles and incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. Fibroblasts and epithelial cells grew from explants within 1–2 weeks and were separated by differential trypsinization, as described

before (Gilbert et al., 2000). The two cell types exhibited different morphological characteristics, with the fibroblasts being spindle-shaped and the epithelial cells being more full-bodied. The culture containing the two cell types was washed with calcium- and magnesium-free buffer and then exposed to 0.05% trypsin diluted in calcium- and magnesium-free buffer. The cells were kept under microscopic observation while the fibroblasts rounded up and became detached. This method works very well because the epithelial cells are insensitive to this concentration of, and exposure duration to, trypsin. The flasks were then tapped to loosen the detached fibroblasts, which were removed by aspiration and discarded or cultured separately (Gilbert et al., 2000). The trypsin was inactivated by addition of serum-containing media. This procedure was repeated if necessary to obtain a morphologically uniform cell population. The purity of epithelial cells was determined using an anti-multicytokeratin monoclonal antibody (mAb) (FK-Biotec, RS, Brazil). Staining with a mAb against human fibroblasts (Dako) controlled any contamination by fibroblasts. For cell viability studies, cells were used when their cultures reached confluence, which occurred between 1 and 2 weeks post-plating. Alternatively, non-adherent, floating cells, corresponding to about 50% of the culture (these cells retain their cilia and can move in solution; Walthers, 1995), were used in experiments. The primary cultures and the floating cell aggregates were cryoprotected in 10% DMSO and frozen in liquid nitrogen for several weeks.

### 2.4. Co-incubation and attachment assays

For the interaction analysis, either the confluent culture or the non-adherent BOEC culture was exposed to *T. foetus* K at a cell ratio of 5:1 parasites:BOECs for 1 min to 48 h at 37 °C. The cells were equilibrated in incubation media containing two parts of complete DMEM (pH 7.2) and one part of Diamond's medium (W/D 2:1) for 15 min at 37 °C (5% CO<sub>2</sub>) prior to the addition of parasites. Adhesion was confirmed by thorough washing of the cultured mono-layers after their exposure to parasites. In control experiments, parasites were omitted. The interaction process was followed by videomicroscopy (from the first minute of interaction) and by light phase contrast microscopy using the Zeiss Axiophot II instrument (Germany). Images were acquired using a chilled C5985-10 CCD camera (Hamamatsu, Japan).

### 2.5. Scanning electron microscopy

After parasite interaction, the cultures were fixed in 2.5% (v/v) glutaraldehyde (in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2), post-fixed for 15 min in 1% OsO<sub>4</sub>, dehydrated in ethanol, critical point dried with CO<sub>2</sub>, and sputter-coated with gold-palladium. The samples were examined in a JEOL 5800 scanning electron microscope.

### 2.6. Transmission electron microscopy (TEM)

Cells were fixed in 2.5% (v/v) glutaraldehyde, post-fixed for 15 min in 1% OsO<sub>4</sub>, dehydrated in acetone, and

embedded in Epon. Ultra-thin sections were observed in a JEOL 1210 transmission electron microscope.

## 2.7. TUNEL

The TUNEL (Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling) method was carried out using the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics, Meylan, France). Cells, which were adhered on coverslips, were fixed at room temperature in 2% paraformaldehyde (PF) (v/v) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2), permeabilized with 3% Nonidet-40 (Sigma, USA) for 40 min, and quenched in 50 mM ammonium chloride and 3% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in PBS. The labeling and signal conversion processes were carried out according to the manufacturer's instructions. Positive control slides were treated with DNase (Sigma, USA) for 10 min at room temperature. Negative control slides were tested without DNase. The slides were observed in a fluorescence microscopy (Axiophot II, Zeiss, Germany). Images were acquired using a chilled C5985-10 CCD camera (Hama-matsu, Japan).

## 2.8. Viability stains

The viability of host cells was checked using fluorescein diacetate (FDA) (Sigma, USA), propidium iodide (PI) (Sigma, USA), or JC-1 (Molecular Probes, USA). At different time points, cultures with *T. foetus* were stained with 4 mg/ml of FDA, and 5 mg/ml of PI for 5 min before fluorescence analysis. Viable cells were seen in green color with FDA, whereas dead cells fluoresced with an orange color with PI. The percentage of viable parasites was based on the average number of 500 cells counted in 25 fields in a Neubauer chamber.

## 2.9. Mitochondrial membrane potential

This test was used to measure changes in mitochondrial membrane potential following trichomonad infection. The interaction of *T. foetus* with either BOECs was tested with 5 mg/ml JC-1 dye (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide) (Molecular Probes, USA) at 37 °C for 1 h. JC-1 has the ability to selectively enter into mitochondria and, according to the magnitude of the mitochondrial membrane potential, change its oligomeric state, thereby allowing it to fluoresce. The ratio of red:green fluorescence intensity for JC-1 acts as an index of the mitochondrial membrane potential, where a higher ratio indicates a higher mitochondrial membrane potential. Microscopic images were acquired using a chilled C5985-10 CCD camera (Hamamatsu, Japan).

## 2.10. Annexin-V assay

BOECs were co-cultivated with the parasites at a cell ratio of 1:5 (BOEC:parasites) for 12 h. BOECs that were not co-incubated with parasites were used as controls. The medium was washed out and cultures were stained with annexin-V-FITC (Sigma, USA) for 10 min and with propidium iodide, as recommended by the manufacturer, and

observed using the Axiophot II (Zeiss, Germany). Images were acquired using a chilled C5985-10 CCD camera (Hamamatsu, Japan).

## 2.11. Cytotoxicity assays

For cytotoxicity analysis, the BOECs were grown until confluence (about  $2.3 \times 10^5$  cells) on 24-well plates and exposed to *T. foetus* K at a cell ratio of 5:1 parasites:BOECs for 3, 17, 24, and 48 h at 37 °C (see Figs. 11 and 12). The cells were equilibrated in incubation media containing two parts of complete DMEM (pH 7.2) and one part of Diamond's medium (W/D 2:1) for 15 min at 37 °C (5% CO<sub>2</sub>) prior to the addition of parasites. In control experiments, parasites were omitted. At the end of the incubation periods, the wells were gently (to avoid disrupting the remaining monolayer) washed twice with warm PBS, and the remaining cells that were still adhered to the wells were fixed with 2% (w/v) paraformaldehyde in phosphate buffer for 15 min at room temperature. The wells were washed with PBS and the remaining cells were stained with 0.13% crystal violet dissolved in a 5:2 (v/v) ethanol-paraformaldehyde solution. The stained product was subsequently washed twice with distilled water and air dried. The stained cells were finally solubilized in 1% (w/v) SDS in 50% (v/v) ethanol, and the intensity of the staining was read in a spectro-photometer at a wavelength of 570 nm. Each experiment was performed in triplicate, and the mean of the data was presented. Cytotoxicity was calculated as  $1 - (E/C)$ ; i.e., all measurements of experimental (E) samples ( $A_{570}$ ) were indexed to those of the control (C) samples ( $E/C$ ), which showed no loss of cells from the well, and subtracted from 1.0.

## 3. Results

### 3.1. Isolated oviduct cells

In the present study, mechanical cell isolation was the most reliable method to isolate bovine oviduct epithelial cells because it provided sufficient amounts of isolated epithelial cells both to test for interactions with parasites and to establish primary cell cultures. Initial cell suspensions contained sheets of tall columnar ciliated and non-ciliated (secretory) cells (Fig. 1). Suspensions of isolated oviduct epithelial cells were morphologically controlled and were used for interaction assays before seeding (Figs. 2–4). These free floating epithelial cells formed large vesicular aggregates (with cilia on their external surface), which exhibited intense cilia beating, as seen by video-microscopy.

### 3.2. Establishment of bovine oviduct epithelial cell culture

After 72 h of culturing, the vesicular aggregates exhibiting intense cilia beating began to adhere to the culture bottle. As the monolayers were formed, which occurred between days 5 and 15 of the culture (Figs. 2 and 4d), the cilia gradually disappeared (Fig. 2) from a majority of the adhering cells, although ciliated cells were still

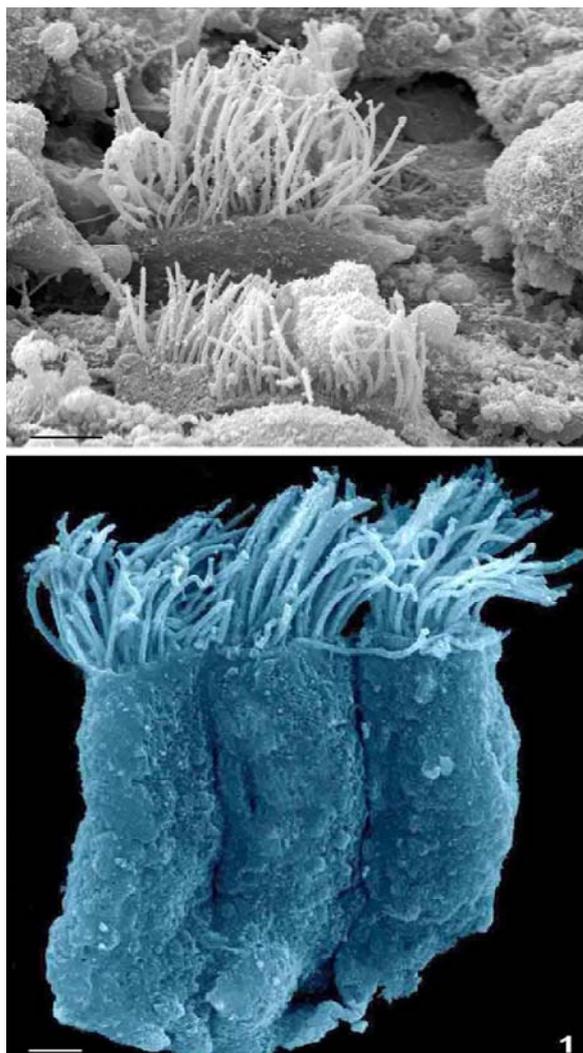


Fig. 1. Scanning electron microscopy of cells isolated from cow oviduct epithelial cells. In (a), ciliated and secretory cells are maintained as an in vivo epithelium, whereas in (b), only three of these cells are seen. These cells have tall columnar structures and present a polarity with the cilia at the apical border of the cells. Bars, 2 mm.

observed in specific regions of the cell culture. It is important to point out that cilia were observed in some regions of the monolayers even after 2 weeks of seeding ( Fig. 2b). These regions could be identified because they exhibited a more lucent aspect by phase contrast microscopy ( Fig. 3a) or under low magnification in a SEM ( Fig. 2). However, after successive trypsinations, when the cultures were passaged, they became a monolayer, as displayed in Fig. 3. These cultures could be maintained for seven to eight passages, which correspond to approximately 2 months of primary culture. Primary culture monolayers ( Figs. 2 and 4d) and ciliated cell aggregates ( Fig. 4a–c) could be frozen in liquid nitrogen using a cryoprotector, although we preferred to work with unfrozen cultures for the interaction experiments.

### 3.3. Interaction assays

#### 3.3.1. Media compositions used for interaction studies. Initial times (1 min to 6 h)

Before the interaction studies, control experiments with several different proportions of TYM media (tricho-monad medium) to 199 media (oviduct cell medium) were performed (a and b). The optimal proportion was 1:2 (TYM:199) because in this proportion the cells did not show any signs of damage. Experiments involving the co-incubation of oviduct cells, either in primary cultures or in ciliated aggregates, with trichomonads demonstrated that *T. foetus* adhered in a specific way ( Figs. 4d–f and 5). *T. foetus* maintained its teardrop shape with all of its flagella externalized and the recurrent flagellum situated on the top side ( Figs. 4d–f and 5). The posterior tip was firmly adhered to the host cell ( Figs. 4d and 5c) because successive washes did not detach the cells.

We observed by videomicroscopy (not shown) that *T. foetus* adhered to the host cell using its posterior region, where the axostyle tip is found. After first contact, which occurred at times varying from 1 min to 5 min after co-incubation, *T. foetus* established a tight adhesion with its posterior tip. When observed by SEM after 30 min, the tip

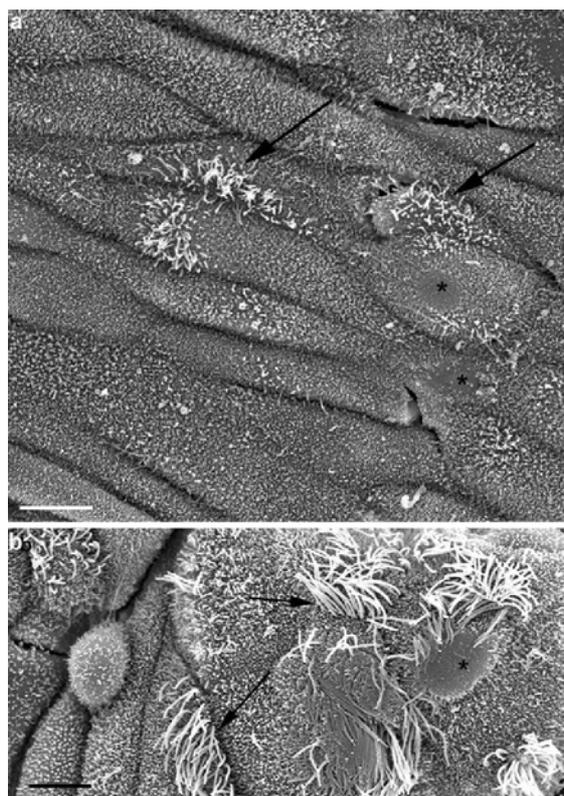


Fig. 2. SEM of bovine oviduct epithelial cells grown for 5 days. Note the epithelial arrangement without spaces between the cells and the presence of cilia in some regions (arrows). As time progresses, naked areas corresponding to cilia regression are seen (asterisks). (b) shows at a higher magnification that some cells present intact cilia (arrows) even after 2 weeks of cell culturing, whereas others exhibit a naked area corresponding to cilia regression (asterisk). Bars, 2 mm.

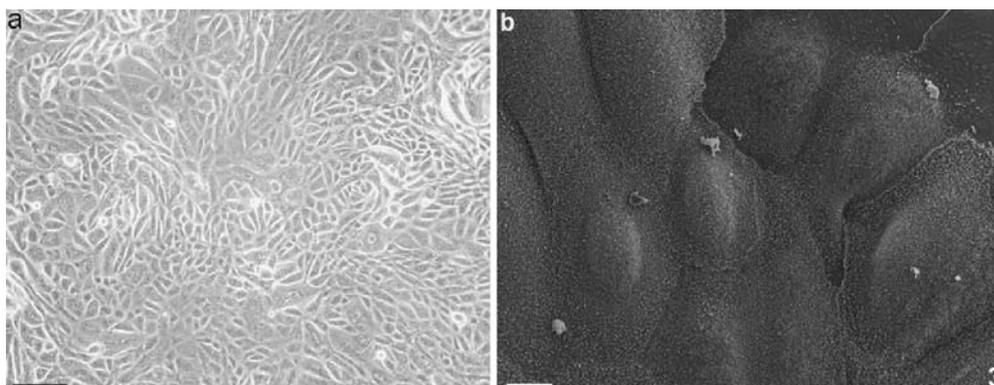


Fig. 3. General view of a confluent primary culture of cow epithelial cells obtained from the oviduct. (a) Phase contrast after 15 days of culture, when a monolayer is observed. (b) SEM of a primary culture after 3 weeks of culture. The epithelium is confluent without any signs of damage and serves as a control, before any interaction with *T. foetus*. Bars, 10 mm.

formed digitopodia and afterwards dozens of filopodia that contacted the surface of the host cell (Figs. 4 and 5).

Interactions studies were performed using both floating oviduct cell aggregates before the monolayer was formed, when ciliated and secretory cells were present and discernible (Fig. 4a–c), and the monolayers (Figs. 4d–7). When the interaction time was 60 min for oviduct aggregate cells that had been in culture for 2 days, we observed that the preferential *T. foetus* localization was on the non-ciliated (secretory) cells (Fig. 4b–c) and that a firm attachment of *T. foetus* by the posterior tip had occurred.

The interaction with *T. foetus* resulted in little or no damage within 1 min to 6 h (Fig. 4a–d); the epithelium was still well preserved, and the trichomonads were randomly distributed. However, more damage was seen after longer incubation times (Figs. 5–13). Between 17 and 48 h, 10–70% of the host cells were destroyed (Figs. 6e, 12 and 13).

### 3.3.2. Early to intermediate times (6–12 h)

Fig. 5 displays some of the initial alterations that took place in the host cells. For bovine cultures of oviduct cells grown for 5 days, when the interaction time was between 6 h (Fig. 5a and b) and 12 h (Fig. 5c and d) of *T. foetus* (*T*) exposure, the parasite started to modify its morphology, changing from its usual pear shape (Fig. 5a) to a shape with filopodia (Figs. 5b and 7a), digitopodia (Fig. 5c and d) and finger-like structures on its posterior tip (Fig. 5c). The first lesions on the epithelium were seen as imprints and mirror images of the parasite (Fig. 5a). Subsequently, the height of the host cells and the number of microvilli on the host cells decreased (Fig. 5c and d), and they exhibited membrane blebbing, one important morphological sign of apoptosis (Fig. 5d). With regard to *T. foetus*, the adhesion region was on the side opposite the recurrent flagellum and all flagella were externalized, which indicates that no pseudocyst was formed.

### 3.3.3. Intermediate times (12–18 h)

*T. foetus* caused regression and a further complete loss of microvilli in BOECs (Fig. 6) followed by cell retraction and the displacement of damaged host cells, which were separated from the neighboring cells. Intercellular space

enlargement was seen in the epithelium within 12 h after co-incubation (Fig. 6a–c). Within 18 h, large trichomonad clusters forming multiple foci of agglutinated trophozoites were seen distributed over the disrupted host cells (Fig. 6d and e), which presented intense membrane blebbing. Extensive destruction of the BOEC monolayer (Fig. 6d and e) with many trichomonads adhered to lysed cells was observed (Fig. 6d and e).

### 3.3.4. Advanced times (18–24 h)

Large areas denuded from BOECs with abundant trichomonads adhered were observed (Fig. 7b and c). In addition, thin protruding membranous extensions were seen on the surface of the damaged cells by SEM (Fig. 7c–f). Parasites undergoing mitosis were also adhered to the host cells (Fig. 7c). Fig. 12 shows by spectrophotometric analysis the destruction of BOECs, demonstrating that after 48 h, about 70% of the host cells were destroyed.

## 3.4. Cell killing of host cells by trichomonads

Damage to the epithelium culminated in segments of the epithelium being detached, with dozens of clustered trichomonads attached to the damaged oviduct cells. To follow the consequences of the trichomonad attack, several methods for the detection of cell death were employed.

### 3.4.1. TUNEL

To detect possible DNA fragmentation, the TUNEL technique was applied to the interactions of *T. foetus* and BOECs. Several tests were performed to elucidate the minimal time before the host cells experienced DNA damage. Two controls were used: (1) a negative control, in which BOECs had no parasites added (Fig. 8a) and (2) a positive control, in which BOECs were treated with DNase I (Fig. 8b). Fig. 8c shows that the earliest time at which BOECs exhibited fragmented DNA was 12 h after interaction. Control samples without parasites did not show nuclear staining (Fig. 8a), whereas BOECs treated with DNase I alone exhibited a positive reaction (Fig. 8b) similar to that of BOECs incubated with *T. foetus* for 12 h (Fig. 8c).

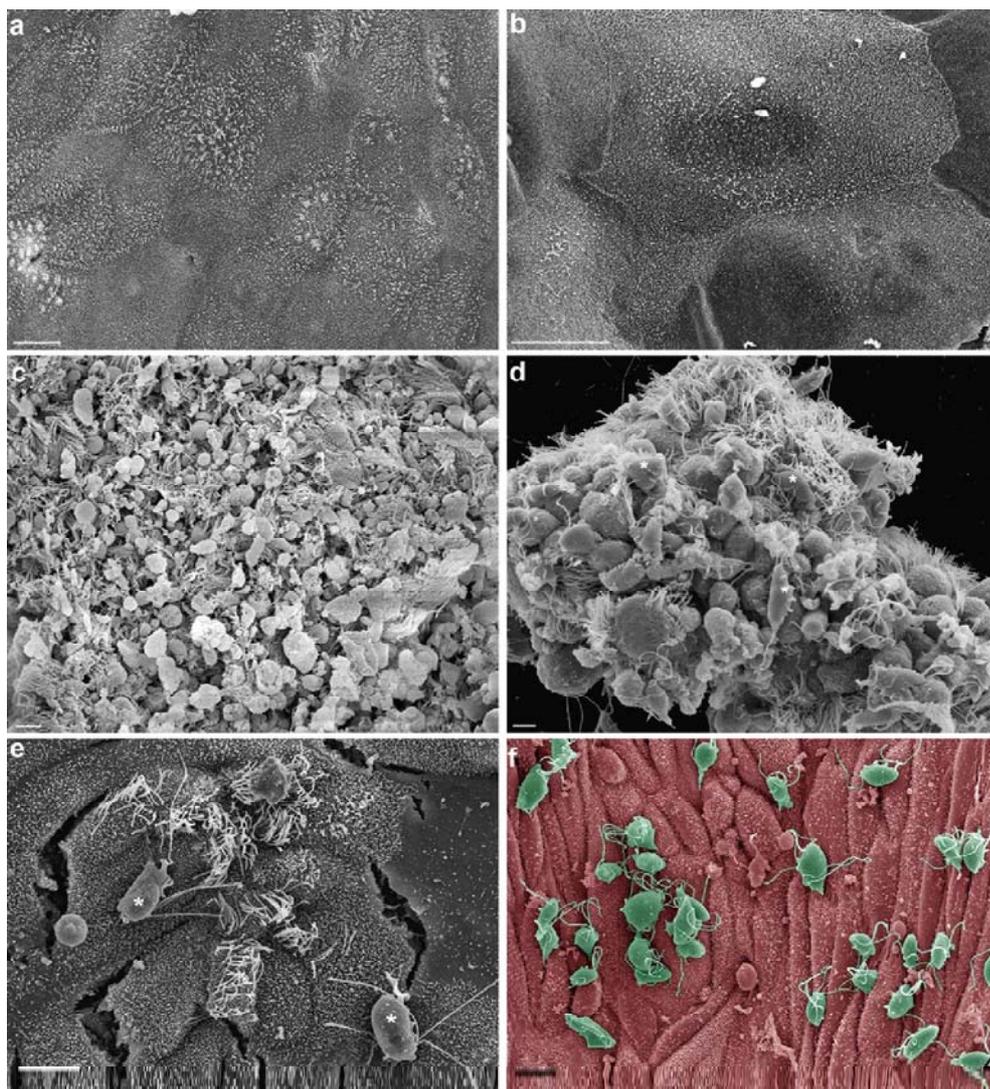


Fig. 4. SEM of the interaction of *T. foetus* (asterisks in (d) and (e)) with a ciliated and secretory primary culture of oviduct cells (d) or a monolayer (e). (a and b) General view of 24 h and 48 h primary cultures of oviduct cells, respectively, using a proportion of 1:2 TYM:Medium 199. Notice the normal morphology. (c–e) Ciliated and secretory cells alone (c) and in interaction with *T. foetus* (asterisks) (d and e) showing isolated oviduct cells, which form aggregates before the monolayer is formed, when ciliated and secretory cells are present and discernible. (d) The interaction time was 60 min and the oviduct cells were in cultures for 2 days. The preferential *T. foetus* localization seems to be attached to the non-ciliated cells (e). Note that all flagella are free and the parasites (asterisks) adhere to their targets by the posterior end of their cells. (f) SEM of the interaction of *T. foetus* with a bovine culture of oviduct cells grown for 15 days after a 60-min co-cubation. All the parasites maintain their tear shape and are firmly adhered to the host cells because successive washes did not detach the cells. Note that all flagella are externalized. The epithelium is still well-preserved, and the trichomonads are randomly distributed. No damage is discernible. Bars, a–b, 20 mm; c–f, 10 mm.

### 3.4.2. Mitochondrial potential

A viability test using the fluorescent stain JC-1 was performed before (Fig. 9a) and after *T. foetus* interaction with BOECs (Fig. 9b). JC-1 is a fluorescent probe that can be used to determine the mitochondrial membrane potential. Because it changes from red to green color as the mitochondria loses its membrane potential, JC-1 is an indicator of organelle death. Red fluorescence was observed in the mitochondria of BOECs that had no parasites present (Fig. 9a). On the other hand, green fluorescence was observed in the mitochondria of BOECs

that interacted with *T. foetus* (after a 12-h time period), indicating that this parasite induced a loss of mitochondrial membrane potential.

### 3.4.3. Annexin-V test

In an experiment using living cells, annexin-V conjugated with FITC was used to reveal phosphatidyl serine (PS) exposure on the outer plasma membrane leaflet, which is indicative of cell death by apoptosis. BOECs, after 12 h of interaction with *T. foetus* K, exhibited green fluorescence (Fig. 10), and because the cells were not

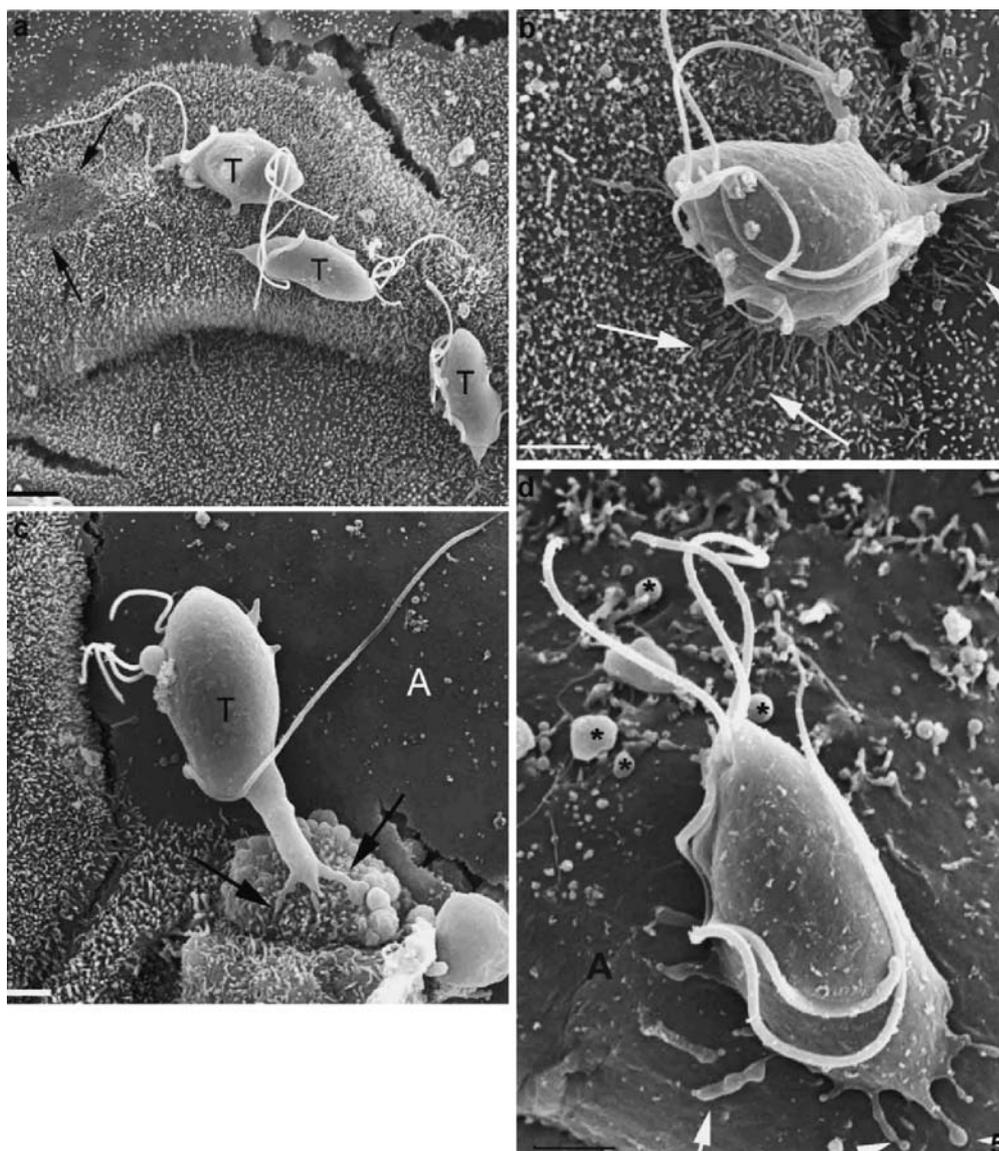


Fig. 5. SEM of the interaction after 6 h (a and b) and 12 h (c and d) of co-incubation of *T. foetus* (T) and bovine cultures of oviduct cells grown for 5 days. (a) The parasite maintains its pear shape. Notice an imprint is left by *T. foetus* (arrows). In (b), it is possible to observe that the adhesion region is in the area opposite of the recurrent flagellum. All flagella are free, and microvillus height is reduced. Numerous filopodia connect the parasite to the epithelial cells (arrows). (c) shows *T. foetus* (T) adhered to a BOEC by the posterior region of the cell (arrows), which modifies its original morphology to form finger-like structures, as digitopodia are observed (arrows). Note the distortion (in the attachment region), regression and even absence (A) of microvilli in cells close to the region of adhesion. (d) Digitopodia are seen as membrane specializations in the adhesion region of *T. foetus* (arrows). The epithelial cell shows the first morphological signs of apoptosis, as blebbing occurs (asterisks) in the absence of microvilli (A). Bars, 4  $\mu$ m.

permeabilized, the fluorescence was present in the outer plasma membrane leaflet, which indicates the exposure of PS. In the first row ( Fig. 10a) propidium iodide (PI) was added, to detect an already necrosed cell.

#### 3.4.4. Crystal-violet assay

To quantitatively estimate the damage caused by trichomonas infection on BOECs, the crystal-violet assay was applied ( Fig. 11). After the interaction of *T. foetus* with BOECs, the cells were stained with crystal violet and washed several times. The remaining cells, attached to the

bottom plates, were removed using ethanol washes and the absorbance of the stained material was read in a spectrophotometer at 570 nm. Higher absorbances were indicative of greater BOEC survival, since dead, floating cells were removed prior to sample harvesting." As seen in Figs. 11 and 12, time is an important factor in BOEC destruction by *T. foetus*.

#### 3.4.5. Damage as seen by electron microscopy

Transmission and scanning electron microscopy were used to observe the details of cell damage ( Fig. 13). Several

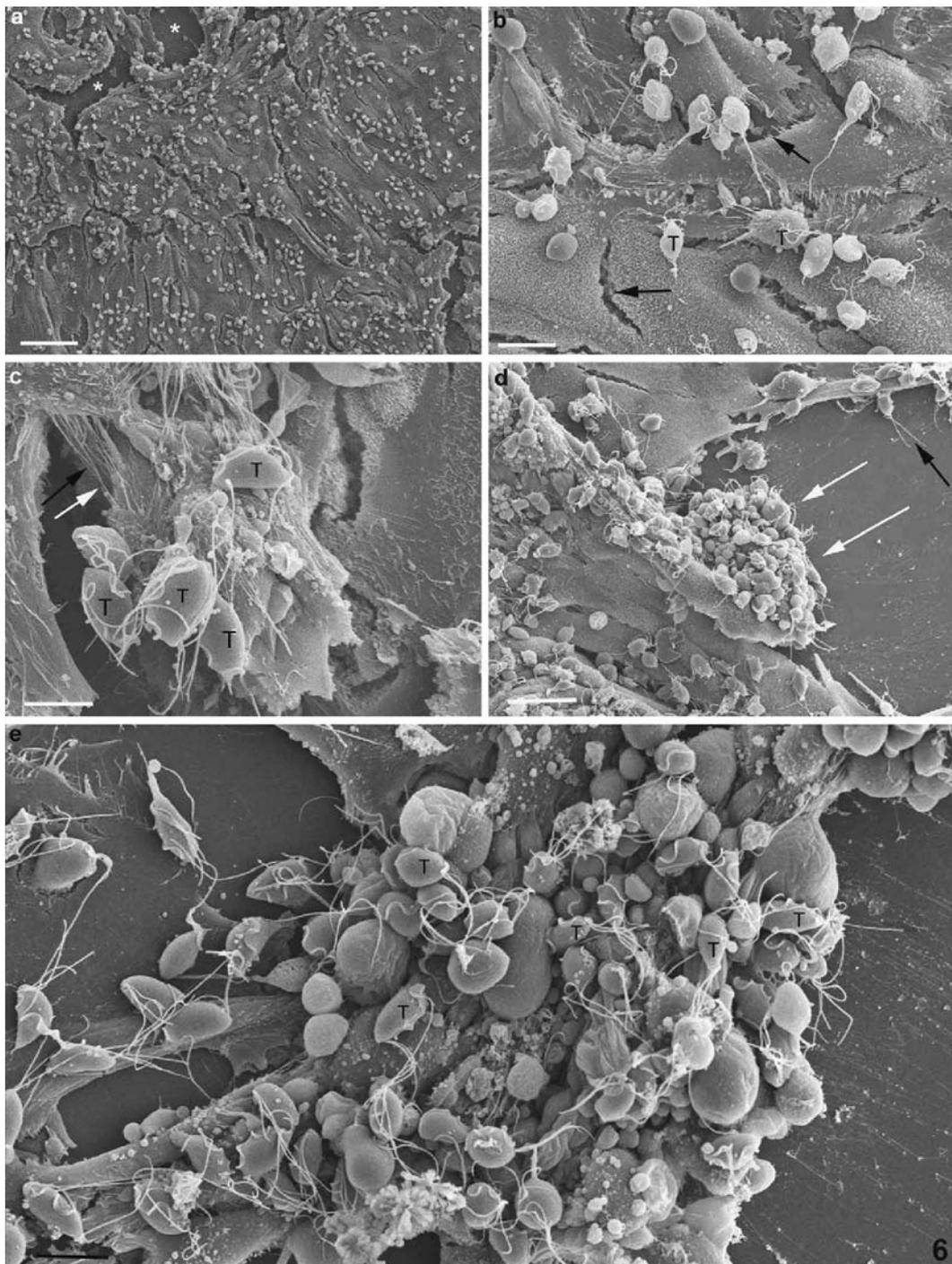


Fig. 6. SEM of the interaction of *T. foetus* (T) with a bovine epithelial cell culture showing bovine cell alterations after 12 h (a–c) to 18 h (d and e) of co-incubation. In (a), a general view of BOECs after 12 h of interaction, several parasites (T) is seen on the epithelium, and spaces between the epithelium monolayer are now visible (asterisks). Bar, 100  $\mu$ m. (b) A higher magnification image of the same experiment shown in (a). Arrows point to wide apertures between cells. Bar, 20  $\mu$ m. (c) Interaction after 12 h. Notice that several *T. foetus* (T) are seen over the disrupted cells. Arrows point to filiform membrane projections still connecting to a neighboring cell. Bar, 15  $\mu$ m. (d and e) Clusters of *T. foetus* around dying BOECs (white arrows) after 18 h of interaction forming multiple foci of agglutinated trophozoites. The black arrow in (d) points to a *T. foetus* adhered to lysed epithelial cells. Extensive destruction of the BOEC monolayers is seen. Bar, 40  $\mu$ m. (e) Intense aggregation of both BOECs and *T. foetus* (T) after 18 h of interaction. The BOECs are apparently destroyed because they are detached, covered by trichomonads and exhibit intense blebbing. Bar, 15  $\mu$ m.

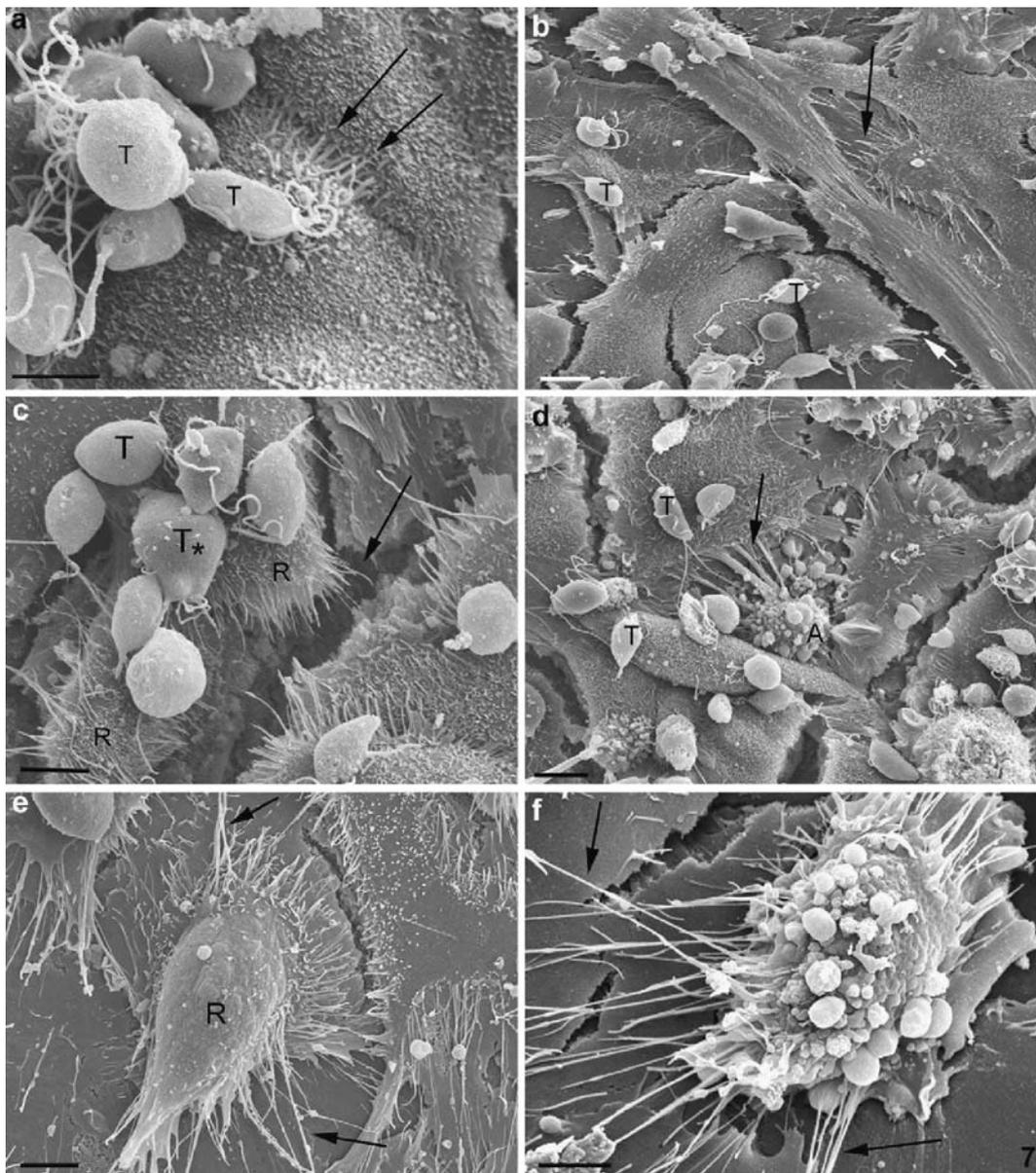


Fig. 7. SEM of the interaction of *T. foetus* (T) with a bovine epithelial cell culture (BOEC) after 6 h (a), 12 h (b–d), 18 h (e), and 24 h (f) of co-incubation showing epithelial alterations. Notice that the BOECs are gradually displaced and retracted (R) from the neighboring cells (arrows). A mitotic trichomonad is also seen (asterisk in (c)). Notice that several *T. foetus* (T) become closer and are seen attached to disrupted cells. Black and white arrows (b) point to filiform membrane projections, which are still connected to a neighboring cell. Bars: a–d, 15 μm. (e and f) Intense cell retraction (R) and membrane blebbing are seen, which are signs of cell death (f). Bars, 5 μm.

signs of cell death by apoptosis were detected, including the following: (a) intense membrane blebbing ( Figs. 7f and 13a,b), (b) chromatin condensation ( Fig. 13c), and (c) intense cellular vacuolization ( Fig. 13a–c). Secondary necrosis was also observed ( Fig. 13d) after 24–48 h of *T. foetus* interaction. Under these conditions, the plasma membranes of the epithelial cells were disrupted, with subsequent cytosol leaking and complete cellular damage.

#### 4. Discussion

The mechanisms used by parasites to cause pathogenic effects are crucial for understanding parasitism. The mode of attachment of *T. foetus* to epithelial cells has not been fully established, and experimental verification has been hindered by the lack of a suitable model. Bovine oviducts are lined with a simple columnar epithelium, which includes tall cells of uniform appearance in all tubal

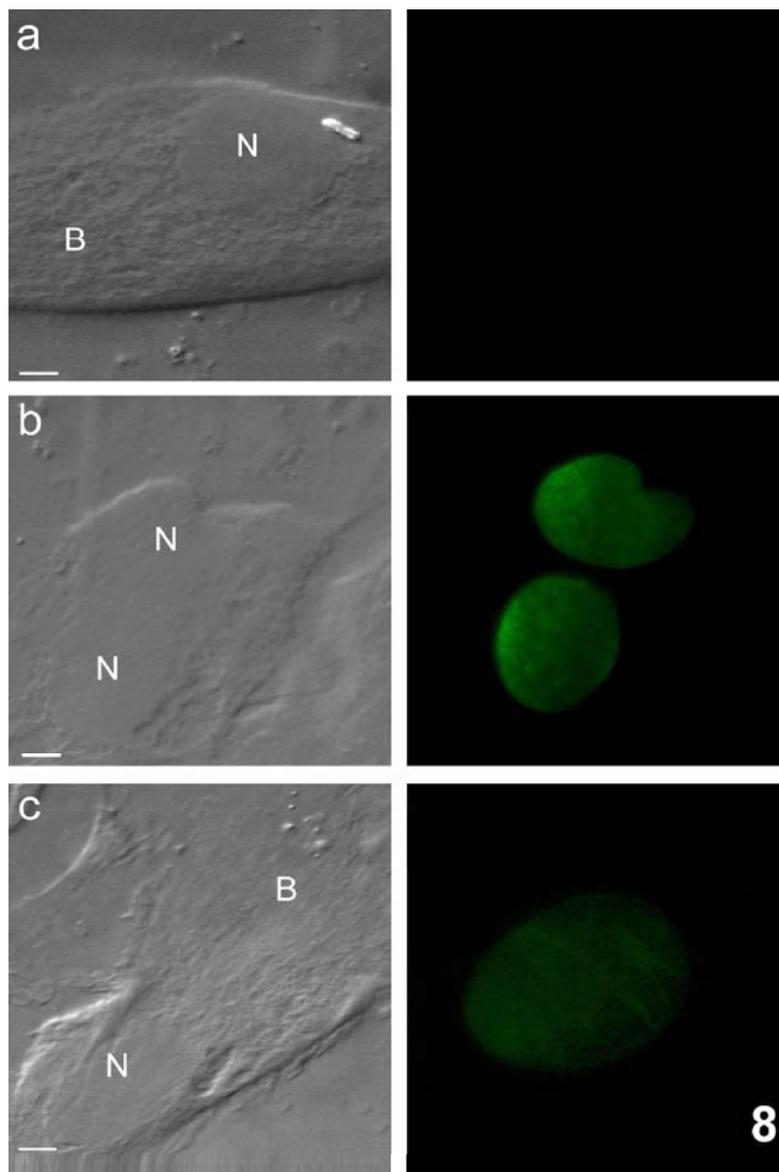


Fig. 8. TUNEL fluorescence staining of fragmented DNA. DIC microscopy (left-hand panels) and TUNEL staining (right-hand panels). No parasites were added to the control BOECs in (a and b). (a) Negative control: no nuclear fluorescence; (b) positive control: BOECs were treated with DNase I, and the nucleus shows the fluorescence indicative of fragmented DNA. In (c), epithelial cells were incubated with *T. foetus* for 12 h. BOEC nuclear staining is observed, indicating fragmented DNA. B, BOEC; N, nuclei. Bars, 5 mm.

segments (the preampulla, the ampulla, and the isthmus). The epithelium lining the oviduct provides the micro-environment for gamete transport, fertilization and the first days of pre-implantation embryo development. Thus, as gametes can reach deeper parts of the reproductive tract, we reasoned that trichomonads could do so as well. In the literature, only one paper dealing with infections in the cow oviduct has been published (Parsonson et al., 1976), which also reported inflammatory changes in the endometrium and occasionally in the uterine tubes of infected heifers (Anderson et al., 1996). In women, a relation between tubal infertility and a

history of sexually transmitted diseases has been reported (Grodstein et al., 1993). This group demonstrated a correlation between *Trichomonas vaginalis* infections and primary tubal infertility, which was increased twofold to sixfold in women with trichomoniasis. In addition, tubal pregnancy increased 1.7 times in women with a trichomonas history (Grodstein et al., 1993). Recently, it has been demonstrated that *T. foetus* is able to adhere to and infect deeper parts of the reproductive tract, such as freshly isolated whole oviducts maintained in an in vitro organ culture (Benchimol et al., 2006). The authors found few morphological

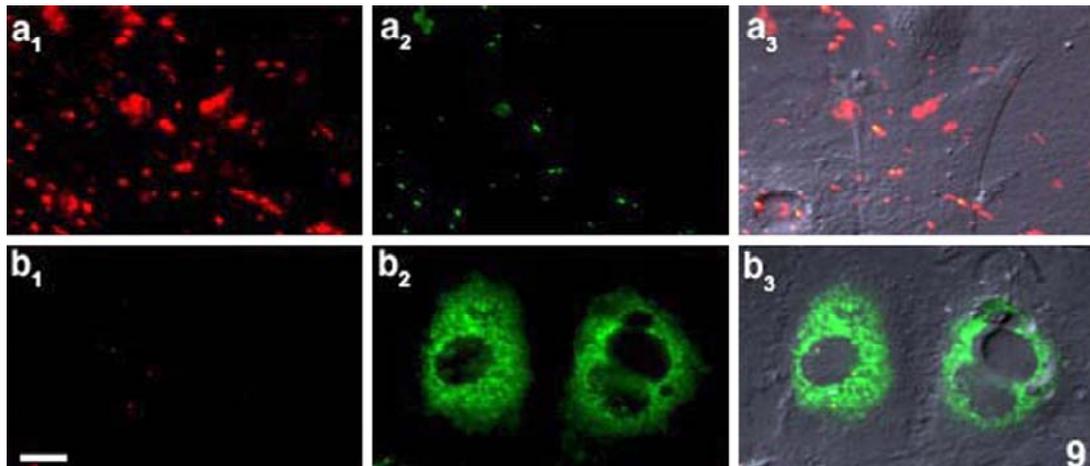


Fig. 9. Mitochondria viability test using JC-1. Mitochondrial membrane potential was determined using the potential-sensitive fluorescent probe JC-1. Red fluorescence defines normal mitochondrial membrane potential whereas green fluorescence defines the loss of mitochondrial membrane potential. Row a: Control, epithelial cells with no parasites added. Row b: BOECs interacting with *T. foetus* after 12 h of co-incubation. It is possible to note that when no parasites are added, almost all of the mitochondrial fluorescence is red, indicative of a normal mitochondrial membrane potential (a), whereas after co-incubation with *T. foetus* this potential is lost (mitochondria fluoresce with a green color) (b). Column 1: red filter; column 2, green filter; column 3: image overlay. Bar, 5 mm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

signs of cell death. However, no details, fluorescence results or biochemical methods were presented.

In this study, we developed a primary non-transformed oviduct culture system (BOECs), which is a more physiologically relevant model because the cells are derived from the bovine reproductive tract and constitute a non-carcinoma cell line. It must be emphasized that most of the studies characterizing the adhesion process of tricho-monads *in vitro* have been performed with cell lines that are not of bovine origin and do not originate from the reproductive tract. The development of a specific and reproducible model could be a great new tool for the study of *T. foetus* host–parasite interactions. In this scenario, the primary culture of oviduct epithelial cells provides a more

realistic target for studies of cytopathic effects. We established a bovine epithelial cell culture from oviducts following protocols used by previous authors (Joshi, 1988; Walther, 1995) to test for host–parasite cytotoxicity. The BOEC culture was very stable, could be frozen, and could be subcultured up to eight times without many modifications, thus proving to be a good model for cell interactions. When the BOECs formed a monolayer the cilia gradually disappeared. Thus, some experiments were performed with floating ciliated and non-ciliated cell aggregates.

*T. foetus* colonization of all regions of the reproductive tract has been described by others (Anderson et al., 1996; Krieger et al., 1983; Skirrow and Bon Durant, 1990). However, there is no detailed description in the literature

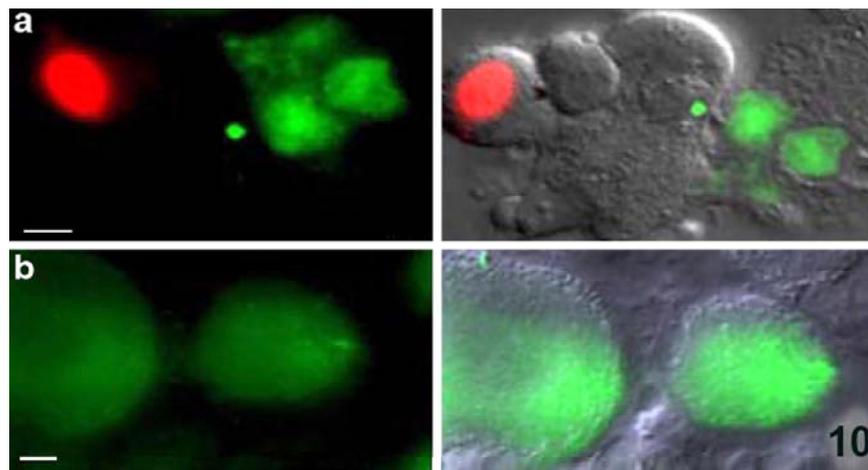


Fig. 10. Annexin-V tests. Annexin-V conjugated to FITC was used to reveal PS exposure on the outer plasma membrane leaflet, indicative of cell death by apoptosis. BOECs after 12 h of interaction with *T. foetus* K are presented in both rows, but a propidium iodide (PI) red fluorescence was added for the samples in (a), indicating a necrosed cell. The right-hand column is an overlay of the fluorescence with DIC. Bars, 5 mm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

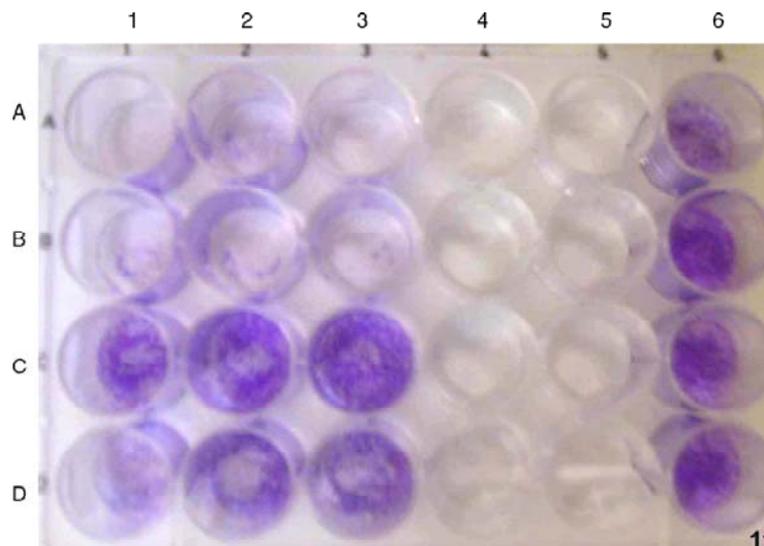


Fig. 11. Crystal-violet test. Interaction of *T. foetus* with BOECs for 3, 17, 24, and 48 h time periods. Each well contained about  $10^6$  BOECs, with a parasite:host cell ratio of 5:1. The experiments were performed in triplicate (Columns 1, 2, 3). Columns 4–5: Only *T. foetus* added, no BOECs. Column 6: Control, BOECs with no parasites added. Row A, 1–3: 48-h interaction. Note that more than 70% of the BOECs were destroyed, as demonstrated in the graphic of Fig. 12 after spectrophotometric analysis. Row B, 1–3: 24-h interaction. Row D, 1–3: 17-h interaction. Row C, 1–3: 3-h interaction.

of *T. foetus* adhesion to bovine oviduct cells even though salpingitis is a component of trichomoniasis in cattle. The few previous studies have only included images obtained by light microscopy (at low magnification) where the parasites were confined to the lumen of the reproductive tract (Anderson et al., 1996; Parsonson et al., 1976). In our observations, the parasites were found tightly adhered to epithelial cell monolayers and to floating aggregates. The parasites were free and unattached in the medium in the following situations: (1) when they changed their position in the cell monolayer and/or (2) when epithelial cells were detached and clumps of *T. foetus* were firmly attached to them. As our present study was performed using electron

microscopy, inconsistencies between our results and previous results may be due to the lack of resolution in the methods used in the previous studies.

Reports in the early literature have suggested that in infected cattle, the uterus was the reservoir for *T. foetus* infection because organisms could not be obtained from vaginal secretions (Bartlett, 1947; Clark, 1972). It was previously suggested (Bartlett, 1947) that the uterus is the definite and persistent site of trichomonas infection and that the vagina would play only a passive inconsequential role in the progress of the disease, providing a relatively unreliable source of *T. foetus* for diagnosis. However, the oviduct did not receive the proper attention. Recent evidence shows the interactions of *T. foetus* with a developing embryo (Benchimol et al., 2007; Bielanski et al., 2004), with sperm cells (Benchimol et al., 2008), and with the bovine uterus (Singh et al., 2005), raising questions about other mechanisms of infertility triggered by *T. foetus*.

It is of interest to note that the oviduct in vivo is a simple epithelium formed by a single layer of cells, and thus the damage provoked by trichomonads may have drastic consequences. If the epithelial cells are detached, the connective tissue becomes exposed and thus, in theory, tissue erosion may occur. Erosion of the endometrium and salpingitis in the oviduct has been demonstrated in infected cows (Parsonson et al., 1976).

#### 4.1. Host–parasite changes

##### 4.1.1. Adhesion region

In the present study we observed that *T. foetus* first adheres to its target cell through interactions from the posterior region of the cell where the axostyle tip is found. Afterwards, *T. foetus* adheres via the opposite side of the undulating membrane. The axostyle tip forms digitopodia



Fig. 12. Graphic showing the cytototoxicity exerted by *T. foetus* and *T. vaginalis* when interacting with BOECs after crystal-violet staining (Fig. 11) and spectrophotometric analysis. Damage to BOEC monolayers is seen after incubation with *T. foetus* for different times. Cytotoxicity was determined after staining the remaining fixed cells in microtiter plate wells and subtracting the ratio of absorbance at 570 nm of the experimental (E) to control (C) samples from 1.

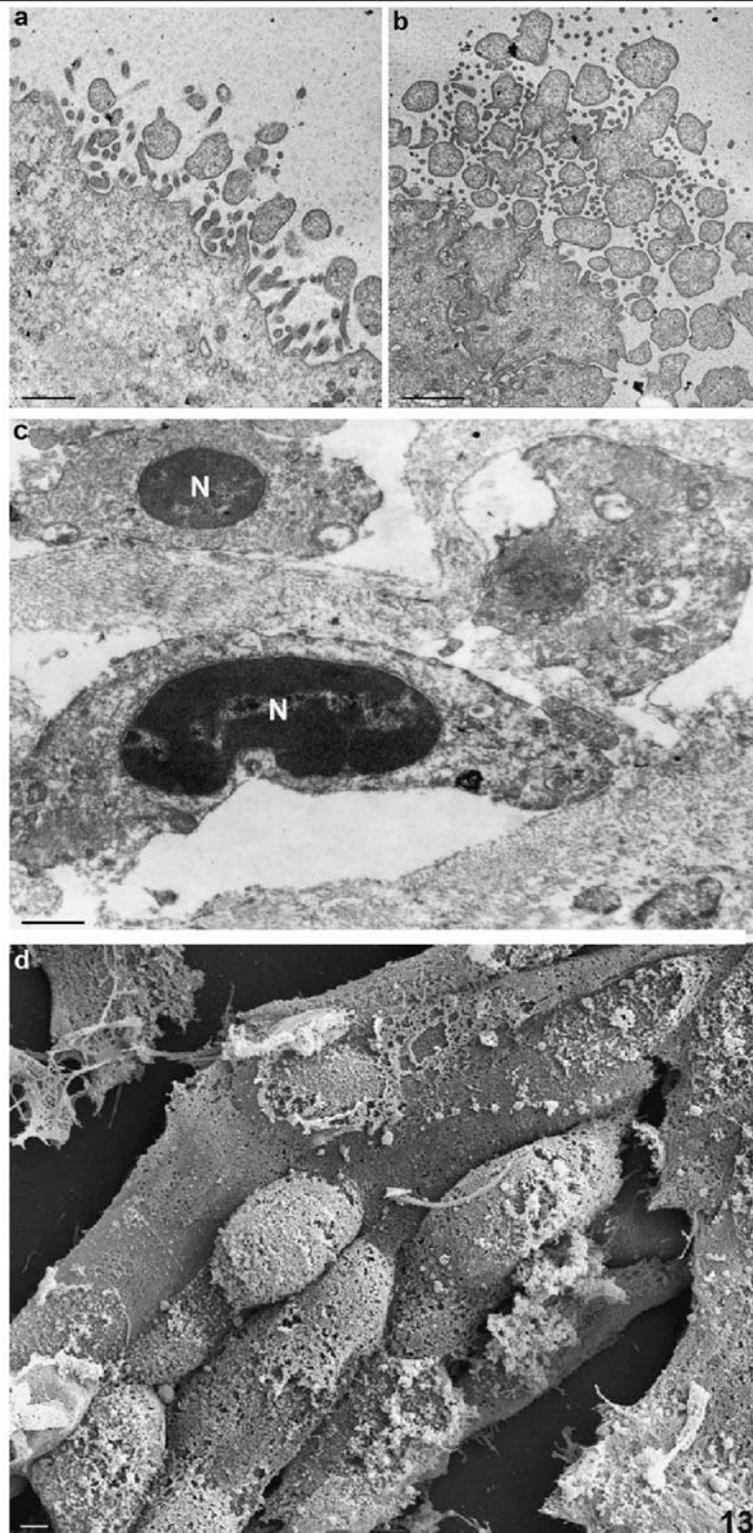


Fig. 13. Morphological signs of cell death by apoptosis (a–c) in oviduct cells after the interaction of BOECs with *T. foetus* for 12–24 h. Transmission electron microscopy shows intense membrane blebbing and vacuolization, which is observed after 12 h (a) and 18 h (b) of interaction. Chromatin condensation is clearly seen within the nucleus (N) after 12 h of interaction (c). Scanning electron microscopy shows the secondary necrosis of BOECs after 24 h of parasite interaction (d). Bars, 500 nm.

and filopodia that seem to increase the contact surface of the host cells. To demonstrate the tight adhesion of parasites to the cell cultures, a thorough washing of the cultured monolayers was performed after exposure to parasites. The observed polarity is especially intriguing and is distinct from the adhesion data published by others (Corbeil et al., 1989), who stated that *T. foetus* usually adhered first by the posterior flagellum and then by the cell body when scraped bovine vaginal epithelial cells were used in co-incubation experiments. In addition, studies performed by Silva-Filho and Bonilha (1992) and Christian et al. (1963) confirmed adhesion by the *T. vaginalis* axostyle tip, whereas our group using *T. vaginalis* demonstrated that both anterior and recurrent flagella are active structures during the interaction of the parasite with epithelial cells (Da Costa et al., 2005) and yeasts (Pereira-Neves and Benchimol, 2007). We also demonstrated that both *T. foetus* and *T. vaginalis* (Pereira-Neves and Benchimol, 2007) establish a tight adhesion to host cells, mostly through sites that are opposite to the undulating membrane. The controversial results may be due to the following factors:

(1) discrepancies in the methods for image collection; specifically one group made observations at low magnifications using light microscopy (Corbeil et al., 1989), whereas we took advantage of videomicroscopy and scanning electron microscopy to clearly distinguish that the first point of adhesion to oviduct cells is the posterior axostyle tip and not the posterior flagellum as previously published (Corbeil et al., 1989) or (2) the cell model used. Here, we worked with BOECs, whereas other groups used different cell types. It is well known that different sugars contribute to the process of adhesion (Silva-Filho and Bonilha, 1992). Thus, BOECs are being studied to determine the sugars present on the cell surface.

*T. foetus* did not change its pear-shaped form to a thin, flattened, and amoeboid shape, as described for *T. vaginalis* when it adhered to MDCK cells (Anderson et al., 1996; Gonzalez-Robles et al., 1995) or human vaginal epithelial cells (Gilbert et al., 2000) (see figure on the cover of Science, January 11th, 2007). It is important to point out that *T. foetus*, while interacting with BOECs, did not form a pseudocyst, a cell form in which the flagella are internalized (Pereira-Neves et al., 2003). Significantly, this situation is frequently found when trichomonas parasites are under stress (Pereira-Neves et al., 2003), and thus *T. foetus* was not stressed during the process of interaction.

The observation that adhered *T. foetus* parasites can undergo cell division may indicate that trichomonads can continue to divide during adhesion or that dividing cells are able to infect host cells. Our group is studying the division process in more details.

#### 4.1.2. Changes in the host cells (BOECs)

Physical lesions in the microvillous border of epithelial cells were induced by *T. foetus* and appeared as mirror images of the parasite. The imprints left on epithelial cells are similar to those previously described for the intestinal epithelium caused by *Giardia intestinalis* (Erlandsen and Chase, 1974). Microvilli on the BOECs gradually decreased in number and size, thereby changing the shape of the cells, which formed long cell extensions and exhibited

membrane blebbing. In addition, *T. foetus* initially did not form clumps, and each cell adhered to the BOECs as a single cell. The clumping of *T. foetus*, which forms multiple foci of agglutinated trophozoites, was observed only when the BOECs displayed advanced characteristics of cell death. These cell aggregates detached from the culture dish and were seen floating in the culture medium. If a similar event occurs *in vivo*, serious problems could result for a cow's reproductive cycle.

#### 4.2. *T. foetus*-provoked apoptosis

Morphological evidence of apoptosis, such as membrane blebbing, cell detachment, chromatin condensation, vacuolization and secondary necrosis, was observed when *T. foetus* interacted with BOECs. Previously, other authors have demonstrated that *T. foetus* (Singh et al., 2004) and *T. vaginalis* (Sommer et al., 2005) induce apoptotic cell death in vaginal epithelial cell cultures and in epithelial cell cultures of the bovine uterus (Singh et al., 2005). Some workers have claimed that cysteine proteases released from parasites play a role in the pathogenic effects on bovine host cells (Singh et al., 2004, 2005; Talbot et al., 1991) and that these enzymes could be inducers of apoptosis. However, these investigators did not examine the morphological details of host cells damaged by the parasite. Here, we show how damaged cells gradually detach from their neighbors, forming thin extensions with intensifying membrane blebbing, chromatin condensation and secondary necrosis. In addition, evidence of DNA breaks by the TUNEL technique and the exposure of PS were observed during *T. foetus* interaction. Some markers for apoptosis require the use of living cells because early in the apoptotic cascade of events PS residues flip from the internal to external leaflet of the plasma membrane. Accordingly, annexin-V, which binds specifically to PS residues, was used to probe the apoptotic host cells after parasite infection to confirm cell death. In addition, a decrease in the mitochondrial membrane potential of BOECs was measured using the fluorescence probe JC-1, confirming mitochondrial damage, which is one of the first signs of organelle death and in many cases cell death. The cytotoxicity was confirmed by the crystal-violet test (Alderete and Pearlman, 1984), which is a very useful method for detecting monolayer destruction, either by visualization using the naked eye to gauge the intensity of the staining left in the plates (Fig. 11) or by measuring absorbance via a spectrophotometric analysis.

Taken together, all of these methods provide evidence of the apoptotic events that take place after the interaction of trichomonads with BOECs. It is well known that apoptosis in mammalian cells occurs in response to infections, as observed with the invasive protozoa *Entamoeba histolytica* (Boettner and Petri, 2005) and non-invasive microbial pathogens like the intestinal parasite *Giardia lamblia*, which is able to induce apoptosis in the HCT-8 cell line (Panaro et al., 2007). Another study (Rocha-Azevedo et al., 2005) showed that during the interaction of *Acanthamoeba polyphaga* with human osteoblastic cells *in vitro*, filopodial extensions resulted in an apoptotic morphology in the host cell. This situation is similar to the one observed here for *T. foetus* on BOECs.

However, in those prior works, the steps contributing to host cell damage were not presented.

In conclusion, we have shown that a primary culture of epithelial oviduct cells is a good model with which to study the interactions between *T. foetus* and host cells. We showed that *T. foetus* is able to adhere to, damage and cause detachment of bovine oviduct cells, leading to cell death. These results imply that apoptosis is involved in the pathogenesis of *T. foetus* infection, which may have important implications for therapeutic interference, as the oviduct is the natural passage for the early stage of embryo development. Our findings raise the possibility that trichomonads are able to attack the oviduct and thus could contribute to infertility in cows.

#### Acknowledgements

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), PRONEX (Programa de Núcleo de Excelência), FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro), FENORTE (Fundação do Norte Fluminense) and AUSU (Associação Universitária Santa Ursula).

#### References

- Alderete, J.F., Pearlman, E., 1981. Pathogenic *Trichomonas vaginalis* in epithelial cell cultures. *Br. J. Vener. Dis.* 57, 106–117.
- Alderete, J.F., Pearlman, E., 1984. Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers. *Br. J. Vener. Dis.* 60, 99–105.
- Anderson, M.L., Bondurand, R.H., Corbeil, R.R., Corbeil, L.B., 1996. Immune and inflammatory responses to reproductive tract infection with *Trichomonas foetus* in immunized and control heifers. *J. Parasitol.* 82, 594–600.
- Bartlett, D.E., 1947. *Trichomonas foetus* infection and bovine reproduction. *Am. J. Vet. Res.* 8, 343–353.
- Benchimol, M., Dias, A.J.B., Fontes, R.S., 2006. Interaction of *Trichomonas foetus* and the bovine oviduct in an organ culture model. *Vet. Parasitol.* 140, 244–250.
- Benchimol, M., Fontes, R.S., Dias, A.J.B., 2007. *Trichomonas foetus* damages bovine oocytes in vitro. *Vet. Res.* 38, 399–408.
- Benchimol, M., Rosa, A.I., Fontes, R.S., Dias, A.J.B., 2008. *Trichomonas* adhere and phagocytose sperm cells. Adhesion seems to be a prominent stage during interaction. *Parasitol. Res.* 102, 597–604.
- Bielanski, A., Ghazi, D.F., Phipps-Toodd, B., 2004. Observations on the fertilization and development of preimplantation bovine embryos in vitro in the presence of *Trichomonas foetus*. *Theriogenology* 61, 821–829.
- Boettner, D.R., Petri, W.A., 2005. Entamoeba histolytica activates host cell caspases during contact-dependent cell killing. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 289, 175–184.
- Brasseur, P., Savel, J., 1982. Evaluation de la virulence des souches de *Trichomonas vaginalis* par l'étude de l'effect cytopathogène sur culture de cellules. *C. R. Soc. Biol.* 176, 849–860.
- Burguess, D.E., Knoblock, K.F., Daugherty, T., Robertson, N.P., 1990. Cytotoxic and hemolytic effects of *Trichomonas foetus* on mammalian cells. *Infect. Immun.* 58, 3627–3632.
- Christian, R.T., Miller, N.F., Ludovici, P.P., Riley, G.M., 1963. A study of *Trichomonas vaginalis* in human cell culture. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 85, 947–954.
- Clark, B.L., 1972. Venereal disease of cattle. *Vet. Rev.* 1, 5–26.
- Corbeil, L.B., Hodgson, J.L., Jones, D.W., Corbeil, R.R., Widders, P.R., Stephens, L.R., 1989. Adherence of *Trichomonas foetus* to bovine vaginal epithelial cells. *Infect. Immun.* 57, 2158–2165.
- Da Costa, R.F., de Souza, W., Benchimol, M., Aderete, J.F., Margado-Díaz, J.A., 2005. *Trichomonas vaginalis* perturbs the junctional complex in epithelial cells. *Cell. Res.* 9, 704–716.
- Daliri, M., Rao, K.B., Kaur, G., Garg, S., Patil, S., Totev, S.M., 1999. Expression of growth factor ligand and receptor genes in preimplantation stage water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos and oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fertil.* 109, 61–70.
- Erlandsen, S.L., Chase, D.G., 1974. Morphological alterations in the micro-villous border of villous epithelial cells produced by intestinal micro-organisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 27, 1277–1286.
- Gabler, C., Lauer, B., Einspanier, A., Schams, D., Einspanier, R., 1997. Detection of mRNA and immunoreactive proteins for acidic and basic fibroblast growth factor and expression of the fibroblast growth factor receptors in the bovine oviduct. *J. Reprod. Fertil.* 109, 213–221.
- Gentry, G.A., Lawrence, N., Lushbaugh, W., 1985. Isolation and differentiation of herpes simple virus and *Trichomonas vaginalis* in cell culture. *J. Clin. Microbiol.* 22, 199–204.
- Gilbert, R.O., Elia, G., Beach, D.H., Klaessig, S., Singh, B.N., 2000. Cytopathogenic effects of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultured in vitro. *Infect. Immun.* 68, 4200–4206.
- González-Robles, A., Lazaro-Haller, A., Espinosa-Castellano, M., Anaya-Velazquez, F., Martínez-Palomo, A., 1995. *Trichomonas vaginalis*: ultrastructural bases of the cytopathic effect. *J. Eukaryot. Microb.* 42, 641–651.
- Grodstein, F., Goldman, M.B., Cramer, D.W., 1993. Relation of tubal infertility to history of sexually transmitted diseases. *Am. J. Epidemiol.* 137, 577–584.
- Heath, J.P., 1981. Behavior and pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* in epithelial cell cultures: a study by light and scanning electron microscopy. *Br. J. Vener. Dis.* 57, 106–117.
- Joshi, M.S., 1988. Isolation, cell culture and immunocytochemical characterization of oviduct epithelial cells of the cow. *J. Reprod. Fertil.* 83, 249–261.
- Korbecki, M., Dwyer, E., 1976. Application of cell cultures to produce large populations of vaginal trichomonads. *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol.* 24, 259–261.
- Krieger, J.N., Poisson, M.A., Rein, M.F., 1983. Beta-hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* correlates with virulence. *Infect. Immun.* 41, 1291–1295.
- Kulda, J., 1967. Effect of different cell species of trichomonads on monkey kidney cell cultures. *Folia Parasitol.* 14, 295–310.
- Panaro, M.A., Gianciulli, A., Mitolo, V., Mitolo, C.I., Acquafredda, A., Brandonio, O., Cavalho, P., 2007. Caspase-dependent apoptosis of the HCT-8 epithelial cell line induced by the parasite *Giardia intestinalis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 51, 302–309.
- Parsonson, I.M., Clark, B.L., Duffy, J.H., 1976. Early pathogenesis and pathology of *Trichomonas foetus* infection in virgin heifers. *J. Comp. Pathol.* 86, 59–66.
- Pereira-Neves, A., Benchimol, M., 2007. Phagocytosis by *T. vaginalis*: new insights. *Biol. Cell* 99, 87–101.
- Pereira-Neves, A., Ribeiro, K.C., Benchimol, M., 2003. Pseudocysts in trichomonads—new insights. *Protist* 154, 313–327.
- Rocha-Azevedo, B., Menezes, G.C., Silva-Filho, F.C., 2005. The interaction between *Acanthamoeba polyphaga* and human osteoblastic cells in vitro. *Microbiol. Pathogen.* 40, 8–14.
- Silva-Filho, F.C., Bonilha, V.L., 1992. Effect of estrogens on the adhesion of *Trichomonas vaginalis* to epithelial cells in vitro. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 25, 9–18.
- Silva-Filho, F.C., de Souza, W., 1988. The interaction of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas foetus* with epithelial cells in vitro. *Cell Struct. Funct.* 13, 301–310.
- Singh, B.N., Hayes, G.R., Lucas, J.J., Beach, D.H., Gilbert, R.O., 2005. In vitro cytopathic effects of a cysteine protease of *Trichomonas foetus* on cultured bovine uterine epithelial cells. *Am. J. Vet. Res.* 66, 1181–1186.
- Singh, B.N., Lucas, J.J., Beach, D.H., Shin, S.T., Gilbert, R.O., 1999. Adhesion of *Trichomonas foetus* to bovine vaginal epithelial cells. *Infect. Immun.* 67, 3847–3854.
- Singh, B.N., Lucas, J.J., Hayes, G.R., Kumar, I., Beach, D.H., Frajblat, M., Gilbert, R.O., 2004. *Trichomonas foetus* induces apoptotic cell death in bovine vaginal epithelial cells. *Infect. Immun.* 72, 4151–4158.
- Skirrow, S.Z., Bon Durant, R.H., 1990. Induced *Trichomonas foetus* infection in beef heifers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196, 885–889.
- Sommer, U., Costello, C.E., Hayes, G.R., Beach, D.H., Gilbert, R.O., Lucas, J.J., 2005. Identification of *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases that induce apoptosis in human epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 280, 23853–23860.
- Talbot, J.A., Neilsen, K., Corbeil, L.B., 1991. Cleavage of proteins of reproductive secretions by extracellular proteinases of *Trichomonas foetus*. *Can. J. Microbiol.* 37, 384–390.
- Walther, I., 1995. Culture of bovine oviduct epithelial cells (BOEC). *Anat. Rec.* 243, 347–356.

# Trichomonas vaginalis kills and eats – evidence for phagocytic activity as a cytopathic effect

V. MIDDLEJ<sup>1,2</sup> and M. BENCHIMOL<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Santa Ursula, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup> Pós-graduação em Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

(Received 3 May 2009; revised 28 June 2009; accepted 30 June 2009; first published online 2 September 2009)

## SUMMARY

This study reports that the cytopathic effect of *Trichomonas vaginalis*, an important human parasite of the urogenital tract, occurs due to mechanical stress and subsequent phagocytosis of the necrotic cells. The investigation was done using a primary culture of bovine oviduct epithelial cells (BOECs), grown either in monolayers or as floating cells. Trophozoites displaying different virulence levels were co-incubated with BOECs for times varying between 1 min and 48 h. Analyses were performed using videomicroscopy, scanning and transmission electron microscopy, colourimetric assays and cyto-chemistry. Injury was observed as early as 1 h after incubation, while after 12 h the host cells were severely damaged when a fresh trichomonad isolate was used. Trichomonads attack the host cells by clustering around them. Mechanical stress on the microvilli of the host cells was observed and appeared to induce plasma membrane damage and cell death. After membrane injury and lysis, fragments of the necrotic cells were ingested by trichomonads. Phagocytosis occurred by trichomonads avidly eating large portions of epithelial cells containing the nucleus and other organelles, but living or intact cells were not ingested. Necrotic fragments were rapidly digested in lysosomes, as shown by acid phosphatase and ruthenium red assays where only the BOECs were labelled. The lytic capacity of the trichomonads was more pronounced in host cell suspensions.

Key words: *Trichomonas vaginalis*, phagocytosis, oviduct cells, host cell interaction, cytopathic mechanism.

## INTRODUCTION

*Trichomonas vaginalis* is the causative agent of trichomoniasis, one of the most prevalent sexually transmitted diseases in humans. Trichomoniasis, caused by *T. vaginalis*, is the primary nonviral sexually transmitted infection associated with adverse consequences for women's health (World Health Organization, 2001). Infected women experience fetid discharge, abdominal pain, irritation and severe discomfort. Complications from trichomoniasis are associated with an enhanced risk of HIV transmission (Sorvilho et al. 2001). The infection varies from a mild vaginitis or cervicitis to endometritis, transient or permanent infertility and abortion, causing significant economic losses and decline in health. Although *T. vaginalis* is the most intensely studied trichomonad and is the world's most common cause of nonviral STDs, the exact mechanisms of its pathogenesis have not been clearly elucidated. Several in vitro studies have reported that adhesion of *T. vaginalis* to the target cell is essential for the maintenance of infection and cytopathogenicity (Alderete and Pearlman, 1984; Alderete et al. 1995;

González-Robles et al. 1995). Contact-independent cytolytic mechanisms have also been demonstrated and attributed to substances secreted by the parasite in the culture medium (Arroyo and Alderete, 1989; Fiori et al. 1996; Kummer et al. 2008). Some authors have also indicated that cytophagocytosis may constitute another pathogenic mechanism displayed by *T. vaginalis* (Honigberg, 1990; Alderete et al. 1995; Mirhagani and Warton, 1996). Other authors have suggested that *T. vaginalis* adheres to host cells and damages them through a contact-dependent process, displaying a host-parasite specific cytotoxic mechanism (Gilbert et al. 2000). Also, *T. vaginalis* has been reported to contribute to pathogenesis when soluble cytotoxins, which play a role in virulence and adherence, are released onto the host mucosal surface (Mendoza-Lopez et al. 2000; Crouch and Alderete, 1999). However, almost all previous studies have concentrated on the adhesion phase, whereas the precise consequences of the parasite on host cells remain largely unexamined (González-Robles, 1995; Heath, 1981; Kummer et al. 2008).

In the present work, a fresh primary culture of bovine oviduct epithelial cells (BOECs) was co-incubated with trichomonads displaying different virulence levels. The behaviour of both cell types during the entire interaction process was analysed.

\* Corresponding author: Rua Jornalista Orlando Dantas, CEP 222-31-010, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel/Fax: +55 21 2237 0440. E-mail: marlenebenchimol@gmail.com

As previous studies on host-trichomonad interactions did not produce a conclusive description of the parasite's cytolytic activity, we decided to use an experimental system presenting the following advantages: (1) monolayers as well as floating cells of a primary mammalian cell culture of epithelial origin were used instead of an established cell line;

(2) direct and detailed observations were made using videomicroscopy, SEM and TEM; and (3) quantitative analyses of cytotoxic effects on target cells by trichomonads allowed us to correlate morphological modifications during the interaction between *T. vaginalis* with target cells.

#### MATERIALS AND METHODS

##### Microorganisms

The JT strain of *Trichomonas vaginalis* was isolated at the Hospital Universitário, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil and has been maintained in culture since the 1980s. The FMV1 strain is a fresh isolate kindly provided by Dr J. Baptista (Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil), and the fresh isolate T068 was kindly provided by John F. Alderete (University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA). Concerning the strains T068 and JT, they were obtained from female patients presenting symptomatic trichomoniasis, whereas the FMV1 strain was isolated from an asymptomatic patient. Based on the ability to destroy cells in culture, JT was previously classified as a low cytotoxic strain whereas FMV1 and T068 were defined as cytotoxic strains (Jesus et al. 2004; Vancini and Benchimol, 2008). Parasites were cultivated in trypticase – yeast extract – maltose (TYM) medium (Diamond, 1957) supplemented with 10% foetal calf serum. The cells were grown for 36–48 h at 37 °C, which corresponds to the logarithmic growth phase.

##### Culture of bovine oviduct epithelial cells (BOECs)

Bovine oviducts were collected at a slaughterhouse, immersed in sterile phosphate balanced salt solution (PBS) containing 0.05 g/L gentamicin sulfate and transported to the laboratory within 2 h. The isthmus and ampulla of the oviducts were used as sources of epithelial cells. The luminal region of the organ was flushed with cold PBS and the epithelium was gently pressed with forceps and washed again in order to isolate cells, which were obtained after several washes, transferred to 199 culture medium (M-5017, Sigma) in 25 cm<sup>2</sup> bottles and incubated at 37 °C, under 5% CO<sub>2</sub> in air. Epithelium was allowed to grow for 1–2 weeks. Fibroblasts and epithelial cells were separated by differential trypsinization as previously described (Gilbert et al. 2000). The purity of epithelial cells was determined with an anti-multicytokeratin mAb

(FK-Biotec, RS, Brazil). Contamination of fibroblasts was controlled by staining with a mAb against human fibroblasts (Dako).

##### Co-incubation and attachment assay

For interaction analyses, either the confluent cultures or non-adherent, floating BOECs were exposed to *T. vaginalis* at a cell ratio of 5 : 1 parasites : BOECs, for periods ranging from 1 min to 48 h at 37 °C. The cells were equilibrated in incubation medium containing 2

parts complete DMEM (pH 7.2) and 1 part Diamond's medium (W/D 2 : 1) for 15 min at 37 °C (5% CO<sub>2</sub>) prior to the addition of parasites. Adhesion was confirmed by thorough washing of the cultured monolayers after exposure to parasites. In control experiments, parasites were omitted. The interaction process was followed from the first minute of interaction by videomicroscopy and phase-contrast microscopy using a Zeiss Axiophot II (Germany). Images were acquired using a chilled C5985-10 CCD camera (Hamamatsu, Japan).

##### Scanning electron microscopy (SEM)

After parasite-cell interaction occurred, the cultures were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, post-fixed for 15 min in 1% OsO<sub>4</sub>, dehydrated in ethanol, critical point-dried with CO<sub>2</sub> and sputter-coated with gold-palladium. The samples were examined with a JEOL 5800 scanning electron microscope.

##### Transmission electron microscopy (TEM)

Cells were fixed in 2.5% (v/v) glutaraldehyde, post-fixed for 15 min in 1% OsO<sub>4</sub>, dehydrated in acetone and embedded in Epon. Ultra-thin sections were observed with a JEOL 1210 transmission electron microscope.

##### Cell floating assays

Both floating cells obtained from BOEC primary culture after trypsinization and cells obtained just after removal from oviducts, when clumps of cells are not adhesive, were used in the experiments. The epithelial cells were suspended in DMEM, washed once and adjusted to 2 × 10<sup>5</sup> cells/ml. The cells were maintained in suspension by light shaking and co-incubated with the parasites at a cell ratio of 5 : 1 parasites : host cells.

##### Cytotoxicity assays

For cytotoxicity analysis, the BOECs were grown until confluency, about 2 × 10<sup>5</sup> cells, on 24-well plates and exposed to different *T. vaginalis* isolates at a cell

ratio of 5 : 1 parasites : BOEC. The cells were analysed from the first minute of exposure to 1, 3, 17, 24, or 48 h after at 37 °C. The target cells were equilibrated in incubation medium containing 2 parts of

complete DMEM (pH 7.2) and 1 part of Diamond's medium (W/D 2 : 1) for 15 min at 37 °C (5% CO<sub>2</sub>) prior to the addition of parasites. In control experiments, parasites were omitted. At the end of the incubation period, the wells were gently washed 3 times with warm PBS and the remaining cells still adhering to the well bottoms were fixed with 2% (w/v) freshly prepared formaldehyde in phosphate buffer for 15 min at room temperature. The wells were washed

with PBS and stained with 0.13% crystal violet dissolved in a 5 : 2 (v/v) ethanol-formaldehyde solution. The stained cells were subsequently washed twice with distilled water, air dried and solubilized in 1% (w/v) SDS in 50% (v/v) ethanol. The staining intensity was determined in a spectrophotometer at a wavelength of 570 nm. Each experiment was performed in triplicate and the mean of the data is presented. Cytotoxicity was calculated as  $1 - (E/C)$ ; i.e. all measurements of experimental (E) samples ( $A_{570}$ ) were indexed to those of control (C) samples ( $E/C$ ), which showed no loss of cells from the well, and subtracted from 1.0 (Alderete and Pearlman, 1984).

#### Cytochalasin D treatment

Before the interaction assays, *T. vaginalis* was incubated in 60  $\mu$ M cytochalasin D (CytD) (Sigma, USA) diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) for 2 h at 37 °C. Controls were performed using cultures

with no added drugs and/or with only 0.5% DMSO, the same maximum concentration found in the solutions containing the drug.

#### Cytochemistry: acid phosphatase

Acid phosphatase cytochemistry was carried out with a modified Robinson and Karnovsky method (1983), using sodium  $\beta$ -glycerophosphate as substrate as previously described (Anonso et al. 1994).

#### Ruthenium Red (RR)

Cells were fixed in 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.1% cacodylate buffer plus 7% sucrose containing 5 mg/ml of RR (British Drug Houses, Ltd) for 2 h, washed in buffer and post-fixed with 1% OsO<sub>4</sub> in cacodylate buffer containing 5 mg/ml of RR for 2 h in the dark (Luft, 1971).

## RESULTS

We developed a primary culture of BOECs in order to study the cytopathic effects of *T. vaginalis* in

a model closer to in vivo cells rather than transformed cells. Parasites of low virulence (JT strain) and high virulence (T068 and FMV1) were used in interaction assays. Samples were analysed by videomicroscopy, SEM and TEM (Figs 1–10).

#### Isolated oviduct cells

A primary monolayer cell culture of BOECs was established and used in the experiments. Cell suspensions obtained after the first mechanical cell isolation were also used and are here referred to as floating cells. These floating cells were easily identified since they formed clumps of ciliated and non-ciliated cells presenting intense movement. These living cells were identified, isolated and used in interaction assays before seeding in order to check if the parasites have a special preference when adhering to the host cells. In addition, in the early literature it has been demonstrated that trichomonads were frequently seen as free cell suspensions, in in vivo experiments.

#### Establishment of bovine oviduct epithelial cell culture

After the monolayers formed (Fig. 1c) between day 5 and day 15 after isolation from the bovine oviduct, successive trypsinizations were carried out in order to transfer the cultures to be used for the interaction experiments.

#### Interaction assays

Co-incubation experiments of trichomonads in combination with oviduct cells, either in primary monolayer culture or cell suspension, were followed by videomicroscopy, SEM (Figs 2a–b, 3 and 4) and TEM (Figs 6–10). *T. vaginalis* were shown to be firmly adhered to BOECs but presented externalized flagella with the recurrent flagellum on the up-side (Figs 2a–b). The adherence was tight as successive washes did not detach the parasites. After a few hours of interaction, most trophozoites of the fresh isolates (FMV1 and JT) were clustered around the BOECs (Fig. 2b), in close contact with either the monolayer or with the floating host-cells (Fig. 3). However, parasites of the less virulent strain (JT) exhibited few clusters and less host cell damage (Figs 2a and 11). *T. vaginalis* was seen to act either as a single cell (Figs 2a and 4) or, more frequently, by making contact with other parasites to form a multicellular barrier against the target cell (Figs 2b and 3a).

Just a few minutes after the addition of the trophozoites to the culture, a hit-and-run effect was observed. The parasite first attached to the target cell and then displaced the host cell by pulling it up (Fig. 4). Release of the BOECs from the cell monolayers was observed after co-incubation with

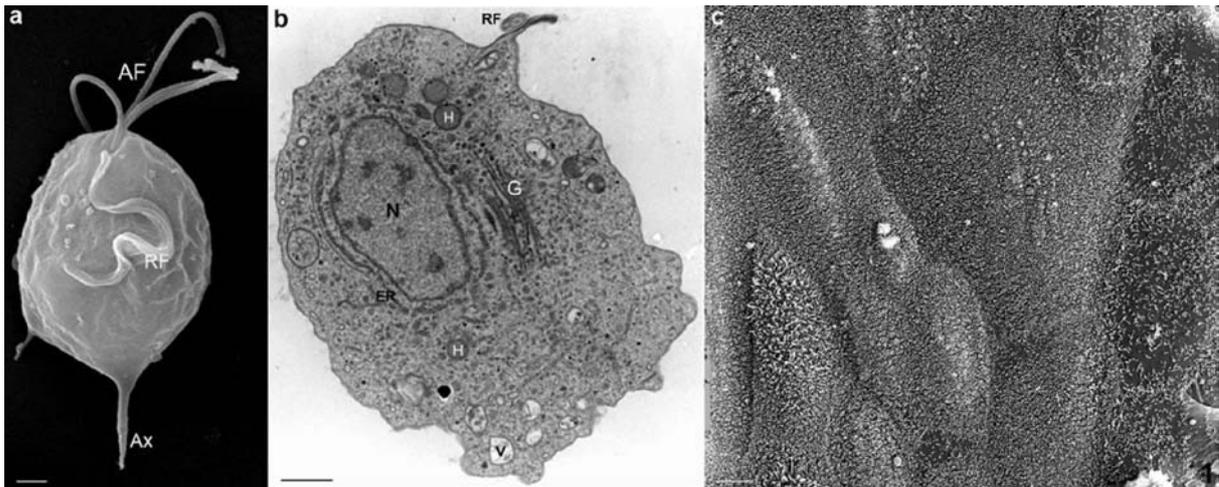


Fig. 1. General view of *Trichomonas vaginalis* by SEM (a) and TEM (b) before interaction with a confluent primary culture of bovine oviduct monolayer (c). Ax, axostyle, AF, anterior flagella, G, Golgi complex, N, nucleus, RF, recurrent flagellum. Scale bars, (a–b), 1  $\mu$ m; (c), 5  $\mu$ m.

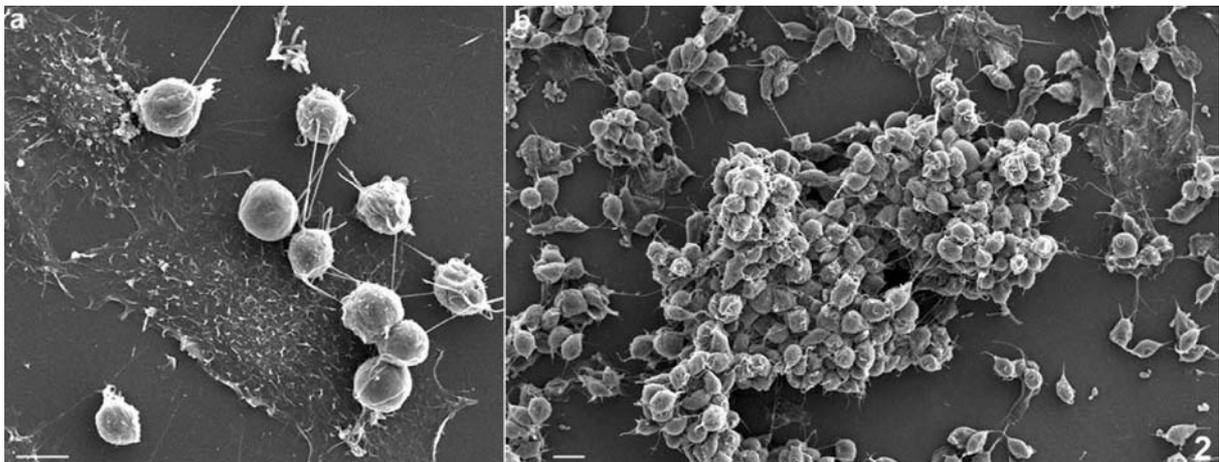


Fig. 2. SEM observation of a primary culture after interaction with *Trichomonas vaginalis* strains of different virulence levels: (a) a long-term cultured JT strain and (b) the fresh isolate FMV1. The incubation time was 8 h. Note the differences in pathogenicity between the two strains, since the primary culture is still apparent and few trichomonads are clustered in the JT strain interaction. *Trichomonas* maintain their tear drop shape and exhibit free flagella.

In (b) the cells are clustered to form large aggregates and the host cell is no longer visible under the parasite attack. Scale bars, (a), 5  $\mu$ m; (b) 10  $\mu$ m.

*T. vaginalis* and was monitored microscopically using phase-contrast light microscopy and video-microscopy (not shown). After adhesion, *T. vaginalis* formed a tight contact with BOECs through filopodia and digitopodia (Figs 5a–b and 6a). In addition, an electron-lucent cortical layer, already described as containing actin filaments, was seen in the contact area between host and parasite cells (Figs 5a–b and 6a).

Trichomonads were seen clustered together in large cell aggregates that could adhere to the host cells (Figs 2b, 3a and 5a–b). By TEM it was possible to note that some trichomonads presented a high electron density (Fig. 5a).

During the interaction of the trichomonads with the monolayers, the first morphological modifications

observed in the target cells were microvilli distortion and gradual monolayer displacement and collapse. The cells became detached and were attacked by many trichomonads (Figs 2b, 6b–d and 7b–d). The same occurred with the floating cells (Figs 3a, 5a–b, 6a and 7a). Within 2 h of interaction the majority of host cells were still viable and presented a healthy appearance, but after this time, signs of cell death were detected, including intense vacuolization, plasma membrane rupture and cell viability loss (Fig. 7). The extrusion of particulate cytoplasmic components of the host cells was observed by TEM and SEM (Figs 3a and 7c) as clear signs of target cell necrosis (Figs 5a–b and 7–8).

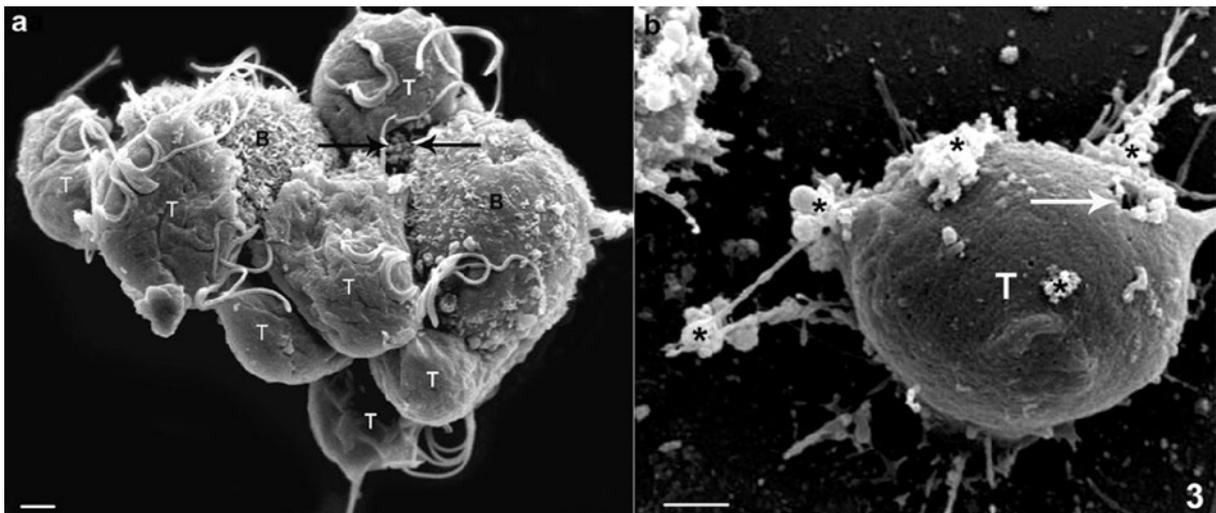


Fig. 3. SEM of interaction of *Trichomonas vaginalis* strain FMV1 (T) with bovine floating cells (B) for 2 h (a) and 18 h (b). The host cells became rounded and presented regression and even absence of microvilli. Note in (a) that several trichomonads attacked two BOECs at the same time. Arrows point to places where it is possible to note trichomonads in the process of phagocytosing cell fragments (asterisks). Scale bars, 1 mm.

Observations made by TEM allowed us to detect small ‘forceps’ around both adhered and floating BOECs (Fig. 6a–d). Although we were working with static images, mechanical stress was inferred (Figs 4–6) and microvilli appeared to be pulled up by a ‘pinching-o’ process (Fig. 6a–d). As a result, the host cell clearly showed apoptotic (Fig. 10) and necrotic signals (Figs 7 and 8) of damage. Abundant necrotic BOECs (Figs 7 and 8) and some apoptotic cells (Fig. 10) were seen after *T. vaginalis* interaction.

#### Cell phagocytosis

Cell debris was unmistakably incorporated by the parasites (Figs 7a–d, 8a–d and 9a–b). The sequence of events described above ended with almost total monolayer destruction after 8–12 h with fresh, virulent isolates and 18 h with long-term isolates. Phagocytosis of necrotic and/or damaged target cells was clearly observed (Figs 7c–d and 8 a–d). Different phases of the cytolytic effects were found concurrently in diverse cells of the same culture. The long-term JT strain provoked less damage to BOECs than fresh trichomonad isolates (Figs 2a–b and 11).

*T. vaginalis* was able to simultaneously phagocytose different necrotic or damaged target cells with different parts of its body (Fig. 8c), showing no preferential region for endocytic activity, contrary to observations made by Brugerolle (1971). In the present study, we did not find any viable or whole BOECs being phagocytosed by trichomonads. However, necrotic cells presenting recognizable cell organelles such as the nucleus were frequently seen (Fig. 8). BOEC cell debris was seen incorporated in several intracellular vacuoles in *T. vaginalis* (Figs 7–9). In order to determine whether the cell

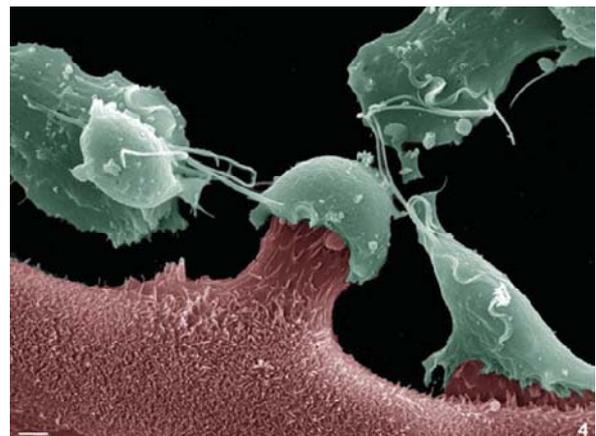


Fig. 4. SEM of a 1-h interaction between the virulent FMV1 strain with confluent monolayer of bovine oviduct epithelial cells. Note that the epithelial cells are being pulled up by *Trichomonas vaginalis*. Scale bar, 2 mm.

fragments were sorted to lysosomes, cytochemistry for acid phosphatase was performed after the interaction of *T. vaginalis* with BOECs (Fig. 9a). In addition, in order to confirm that the intra-vacuolar material observed in trichomonads originated from the host cells, BOECs were labelled with ruthenium red (RR) (Fig. 9b) before the interaction. Positive reactions were found for acid phosphatase (Fig. 9a) and RR in the vacuoles containing ingested material (Fig. 9b).

#### Detection of host cell cytotoxic activity

To measure the cytotoxic effects of *T. vaginalis* on primary oviduct cells, we used a previously described

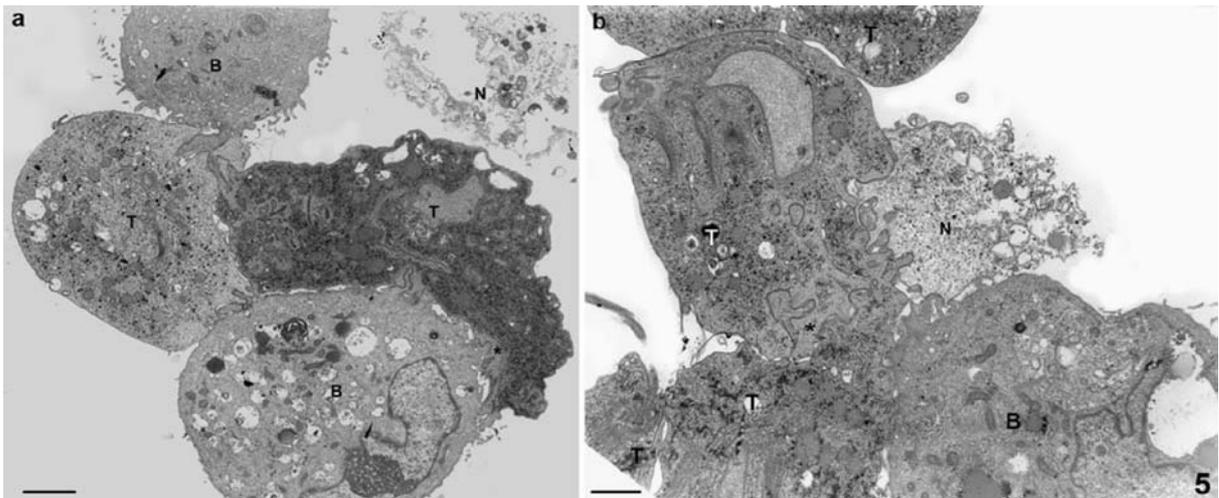


Fig. 5. TEM of *Trichomonas vaginalis* (T), strain FMV1, after a 6-h interaction with floating BOECs (B). Note the membrane specialization in the adhesion region of *T. vaginalis*, which resembles a cortical layer of actin (asterisks). Filopodia and digitopodia are numerous, providing a tight adhesion among the cells. The parasites are clustered around the host cell (B) and all flagella are free. It is important to note that one trichomonad in (a) presented a higher electron density when compared with the other parasites. Scale bars, 1 μm.

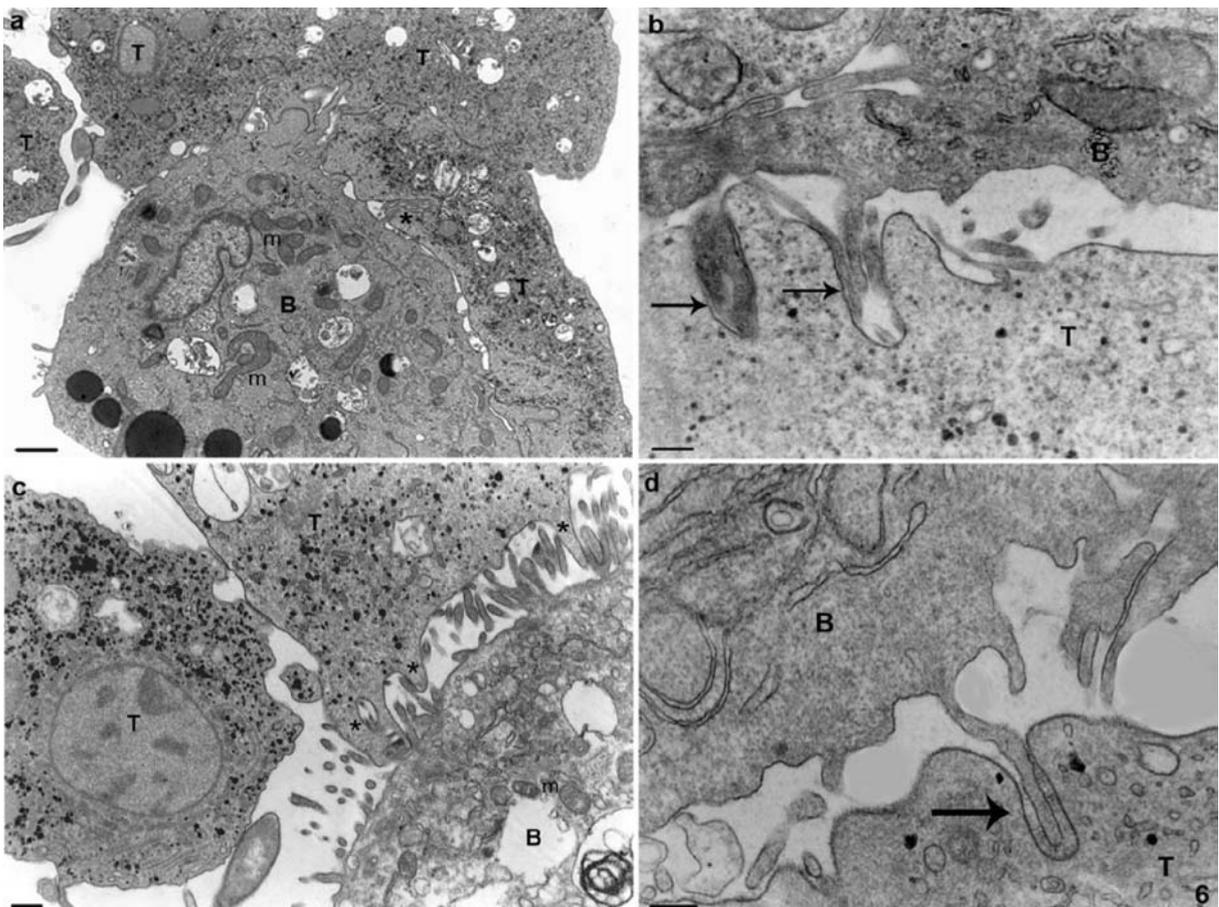


Fig. 6. TEM of interaction between BOECs (B) and *Trichomonas vaginalis* (T). (a) *T. vaginalis* strain FMV1 after interaction with floating BOECs for 3 h. Note that a BOEC is surrounded by several *T. vaginalis* that are tightly adhered. Both types of cells presented a healthy aspect, with the BOEC showing several normal mitochondria (m) and other cell organelles. One important observation is marked with an asterisk, where a microvillus of the epithelial cell is being pulled up by one of the trichomonad cells. Scale bar, 1 μm. (b) High magnification of a 3-h interaction between *T. vaginalis*, strain T068, and BOECs. Arrows point to an early endocytic event in which microvilli from the BOEC were

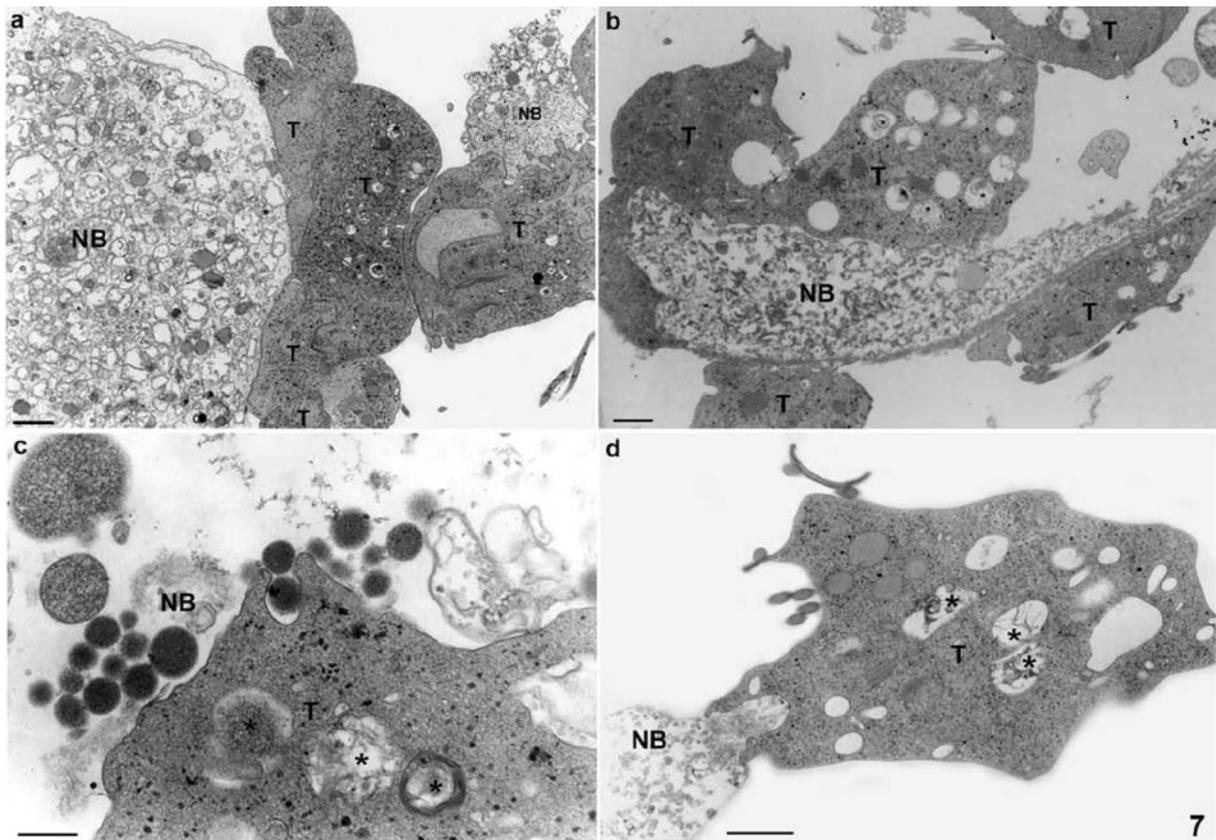


Fig. 7. TEM of a 20-h interaction between BOECs (B) and *Trichomonas vaginalis* T068 (T). Interaction of *T. vaginalis* with floating BOECs (a) or BOECs in a monolayer (b–d). Necrotic BOECs (NB) are observed in both situations and several trichomonads are seen in the process of adherence and ingestion of cell debris. Note that in the trichomonad vacuoles (asterisks), cell debris can also be seen. Scale bars, 1 μm.

method (Alderete and Pearlman, 1984). Interactions of *T. vaginalis* and BOECs were performed on 24-well plates and spectrophotometric analyses were carried out after crystal violet staining. Plates were stained after parasites interacted with epithelial cells for different durations. Figure 11 presents the kinetics of damage to BOECs by trichomonad strains of different virulence. All cytotoxicity measurements of experimental (E) samples were indexed to those of control (C) samples, for which no loss of cells from the microtitre plates was evident under the assay conditions, subtracted from 1.0. The colour intensity reveals the remaining host cells in the wells after the trichomonad interaction. Strains of higher virulence such as FMV1 provoked greater damage to BOECs than the JT strain (Fig. 11). That is, isolates of *T. vaginalis* cultured for several years in the

laboratory, such as the JT isolate, induced less monolayer disruption than the fresh, more virulent isolates (FMV1 and T068).

At the interaction site, the cytoplasm of the adherent trichomonads presented peripheral fibrogranular zones formed by actin-containing components (Figs 5a–b and 6a). However, not all cells exhibited this actin layer (Fig. 7). When trichomonads were treated with cytochalasin D, the adhesion capacity of all three trichomonad strains clearly decreased (Fig. 11a); however, almost no differences were observed concerning cytotoxicity (Fig. 11b).

DISCUSSION

*T. vaginalis* initially adheres to and infects the vagina, causing vaginitis, and some authors stated that the

being incorporated into a *T. vaginalis*. Scale bar, 300 nm. (c) *T. vaginalis* interaction with a monolayer of BOECs. Note that a BOEC is surrounded by more than one *T. vaginalis*, which are tightly adhered. The BOEC does not present a healthy aspect, showing intense vacuolization and a damaged mitochondria (m). One important observation is marked by an asterisk, where it is possible to see that some microvilli of the epithelial cell are being pulled up by one of the trichomonad cells. Scale bar, 600 nm. (d) Detail of an area of contact between *T. vaginalis* and a BOEC. Note that one microvillus of the epithelial cell is in the process of being pulled up by one of the trichomonad cells (arrow). Scale bar, 300 nm.

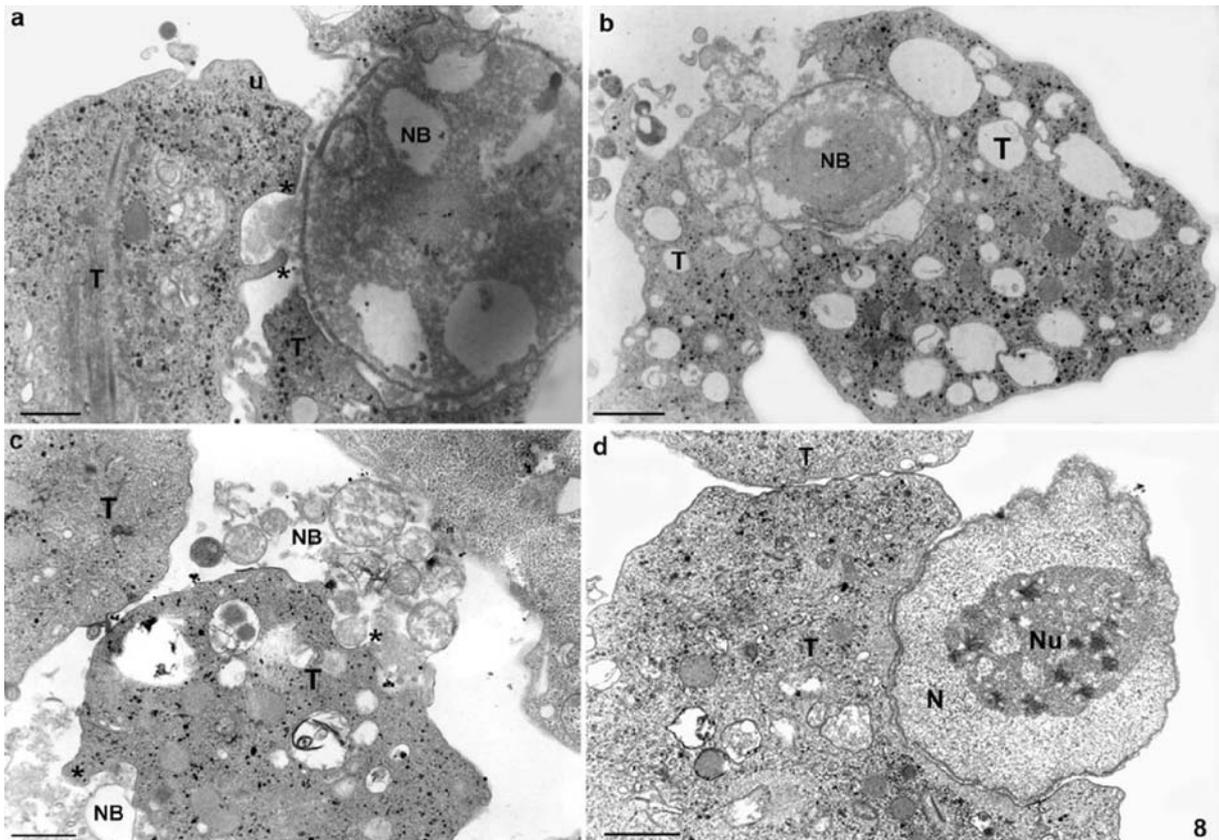


Fig. 8. TEM of a 20-h interaction between BOECs (B) and *Trichomonas vaginalis* FMV1 (T). Necrotic BOECs (NB) are observed in the process of being ingested by *T. vaginalis*. The parasite is able to remove small parts of the necrotic cell as seen in (a). Note that there is cell debris in the trichomonad vacuoles. Large fragments such as a nucleus can be phagocytosed (b, d). Image (c) demonstrates that phagocytosis may occur from any side of the trichomonad cell. Scale bars, 1 μm.

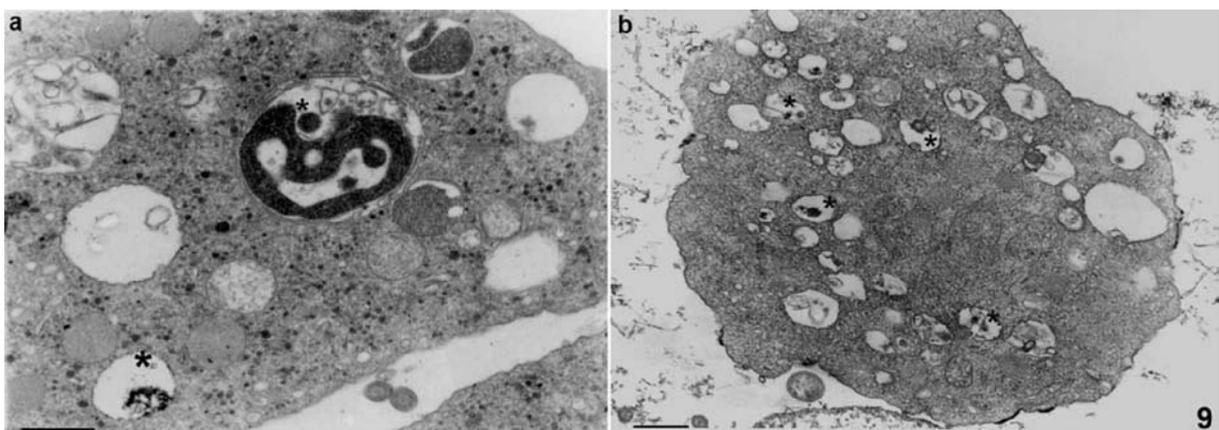


Fig. 9. Cytochemistry for acid phosphatase (a) and ruthenium red (b). *Trichomonas vaginalis* T068 were cytochemically tested for acid phosphatase (asterisks) after interaction with BOECs for 21 h (a). In BOECs labelled with RR before the interaction, a positive reaction for RR was found in *T. vaginalis* vacuoles (asterisks) (b). Scale bars, 500 nm.

parasites are able to move to the uterus and oviduct (Singh et al. 2005). However, there are no studies of trichomonads infection in the cow's oviduct, although this organ is the natural passage of the early stage of embryo development and this is likely to be important in mediating infertility.

Despite extensive studies, little is known about the pathogenesis of trichomoniasis and the mechanisms that provoke acute inflammation in the human host. *T. vaginalis* has been considered non-invasive since human biopsies revealed that the parasite did not penetrate the epithelium (Nielsen and Nielsen,

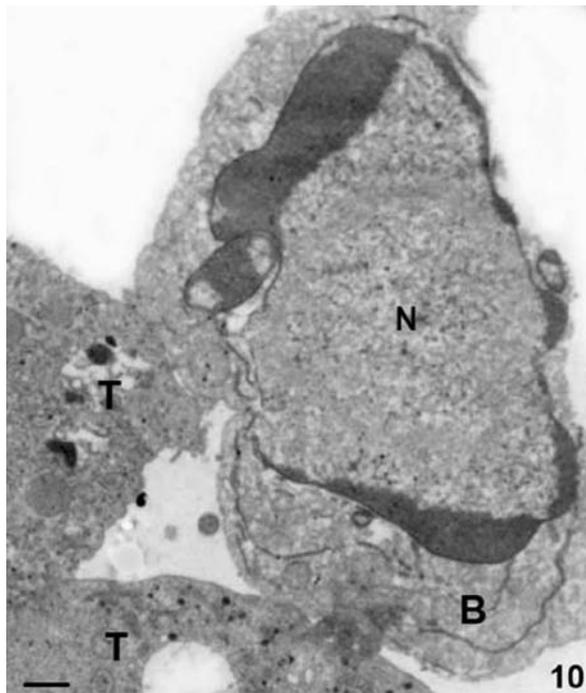


Fig. 10. TEM of a 12-h interaction between BOECs (B) and *Trichomonas vaginalis* FMV1 (T), showing an apoptotic cell with condensed chromatin at the nuclear periphery (N). Scale bar, 300 nm.

1975). However, Krieger et al. (1985) stated that more virulent strains of trichomonads could disrupt epithelial layers and reach deeper cells in tissues. In the present study, we demonstrated that depending on the virulence of the strain, this parasite is able to rapidly destroy and phagocytose fragments of dead host cells.

#### Adherence to the epithelium

We have compared a laboratory strain that has been maintained for more than 20 years in axenic culture with freshly isolated strains. Contrary to the findings of Rasmussen et al. (1986), which showed that long-term laboratory strains did not adhere to epithelial cell monolayers, we found adhesion in all cultures tested. At the interaction site, the cytoplasm of adherent *T. vaginalis* exhibited modifications, such as a cortical zone devoid of organelles, ribosomes and glycogen particles where actin-containing components have been reported (Brugerolle et al. 1996; Pereira-Neves et al. 2007). However, treatment with CytoD decreased the cell-cell adhesion and to a lesser extent the cytopathogenicity. It is possible that microfilaments are important for firm attachment, but less so for cytotoxicity.

#### Cytolysis by mechanical damage

The capability of *T. vaginalis* to kill and phagocytose target cells could be correlated with the clinical

observation that this parasite provokes vaginitis with punctuated haemorrhages. Our findings also correlate with clinical findings that trichomonads are found associated with necrotic cells (Nielsen and Nielsen, 1975; Rasmussen et al. 1986). Previous authors (Krieger et al. 1983; Fiori et al. 1993, 1996, 1997) investigated the mechanisms used by *T. vaginalis* to damage cellular membranes using erythrocytes as target cells and suggested the existence of functional pores in the target membrane, such as haemolysin. We agree that cytolysis may be required to provide nutrients to the parasites.

Here, we demonstrated that *T. vaginalis* is able to mechanically stress the host cell in vitro by pulling up microvilli until the plasma membrane ruptures, which leads to cytoplasm leaking and cell death by secondary necrosis. This type of mechanical stress, resembling a 'pinching-o' of the microvilli of the target cells, has been similarly described in amoebae (Martinez-Palomo et al. 1985) and in macrophages during ingestion of tumour cells (Chambers and Weiser, 1969). Similar observations have been reported in *Acanthamoeba castellanii* and *T. vaginalis* when in interaction with MDCK cell mono-layers (González-Robles et al. 2006, 1995). However, as far as we know, this work presents for the first time clear-cut images of the subsequent stage, when trichomonads ingest and digest cell organelles, nuclei and other less distinguishable cellular fragments.

It is important to note that contact-independent cytolytic mechanisms have been proposed and the major cytolytic effects have been attributed to substances secreted by the parasite in the culture medium (Singh et al. 2004; Kummer et al. 2008).

#### *Trichomonas* phagocytoses the host cell

Here, we closely observed trichomonad behaviour after cell adhesion i.e., the consequences of parasite adhesion. We observed that the target cells were detached from the substrate while dozens of trichomonads were clustered around them, inducing cell death by apoptosis (condensed chromatin, membrane blebbing) and necrosis (plasma membrane rupture, organelle liberation). Organelles, nuclei and other cellular debris were promptly phagocytosed by the trichomonads. These events were observed in cells grown either as monolayers or floating cells, and with all parasite strains tested here, although the cytopathic effects were more pronounced with fresh isolates, such as the FMV1 and T068 strains. In all experiments, only fragments of necrotic cells were ingested; never living or apoptotic cells. This could be explained by the size of mammalian cells, which is many times larger than the parasite, since previous studies have shown that living or dead yeast (Pereira-Neves and Benchimol, 2007) and bacteria (Benchimol and De Souza, 1995; Francioli et al.

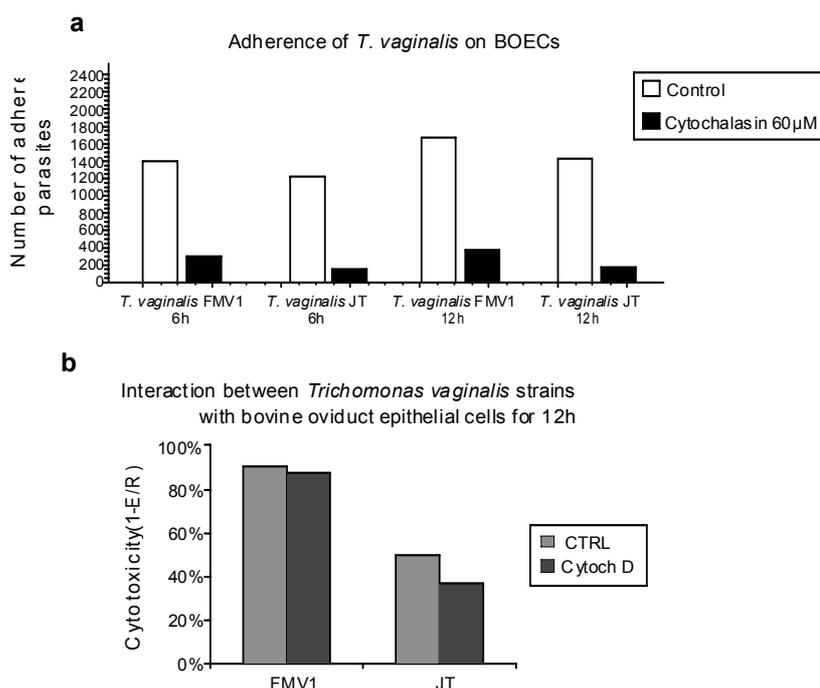


Fig. 11. (a) Kinetics of adherence of *Trichomonas vaginalis* JT and FMV1 strains on BOEC monolayers. The experiments were performed at a parasite : BOEC ratio of 5 : 1 with 60  $\mu$ M cytochalasin D; controls did not receive the drug. The number of adhered parasites was estimated by counting 100 random fields under scanning electron microscopy. (b) Cytotoxicity levels of *T. vaginalis* strains JT and FMV1 on monolayers of bovine epithelial cells (BOECs) with and without CytoD treatment. Spectrophotometric analyses were performed after crystal violet staining. Plates were stained after parasite interaction with epithelial cells for different periods. The colour intensity reveals the remaining host cells in the wells after the trichomonad interaction. Note that the FMV1 strain provoked greater damage to BOECs than the JT strain. The values are the means of 2 independent experiments performed in triplicate.

1983) are promptly ingested by trichomonads. Other cell surface elements might also be involved in cell recognition since some bacterial strains are not ingested by *T. vaginalis* (Pereira-Neves and Benchimol, unpublished observations) whereas in other cell types, fibronectin, carbohydrates and other cell surface molecules are important factors (Benchimol et al. 1986, 1990, 2008; Bonilha et al. 1995). Thus, *T. vaginalis* seems to act differently from amoebae, which are able to ingest epithelial cells regardless of whether they have been previously lysed or not (Martinez-Palomo et al. 1985). The haemolytic and phagocytic activities of the parasites have been correlated with their virulence (Krieger et al. 1983; Dailey et al. 1990; Burgess et al. 1990; Pereira-Neves and Benchimol, 2007) although, it is important to point out, soluble mediators at the vaginal mucosal surface may modify the parasite phagocytic activity. Cytolysis may be an important process that provides nutrients to trichomonads.

In a biochemical study of the interaction between *T. vaginalis* and CHO cells, the authors stated that the parasite kills vertebrate cells without phagocytosis (Krieger et al. 1985). Our results are in agreement with this work in the following respects: (1) contact-dependent interaction is needed and (2) trichomonads kill target cells in culture by an extracellular

process. However, this group found that the parasite kills vertebrate cells without phagocytosis, in contradiction to our results. This discrepancy may be explained by the fact that the Krieger group did not follow up with electron microscopy the events after the target cells interacted with the trichomonads.

#### No preferential site for phagocytosis

Although Brugerolle (1971) reported that phagocytosis of particles by *T. vaginalis* preferentially occurs at the posterior two-thirds of the parasite body, this polarization was not observed in any of the phagocytosis assays used herein. Our data, then, support the results obtained by Francidi et al. (1983), Rendon-Maldonado et al. (1998) and Pereira Neves and Benchimol (2007), who were unable to identify a preferential site for phagocytosis by this parasite. In addition, we observed that the same cell is able to phagocytose multiple fragments of the host cells at different regions of the cell surface at the same time.

#### Sorting to lysosomes

In order to investigate whether phagocytosed BOEC fragments were sorted to lysosomes, acid

phosphatase activity was determined before and after interaction of trichomonads with target cells. BOEC fragments were found in different stages of degradation, thus confirming that the parasite digests the internalized cell fragments. In addition, when the host cells were labelled with ruthenium red before the interaction, this material was found in tricho-monad vacuoles, again verifying the ingestion of host cell debris. Jesus et al. (2002) showed that *T. vaginalis* releases acid phosphatase into the culture medium. This observation could be attributed to the death of some trichomonads that became necrotic and thus leaked lysosomal enzymes or may be a strategy used by trichomonads to attack target cells in order to facilitate cell lysis.

The cytopathogenic action of *T. vaginalis* could be divided into 4 stages: adhesion, cytolysis following contact, phagocytosis and intracellular digestion. *T. vaginalis* is considered as a non-ulcerative STD. However, in acute symptomatic infections, punctuated haemorrhagic spots on the vaginal and cervical mucosa as well as pain during sexual inter-course may suggest that this infection could be, at least in some cases, an ulcerative infection. If tri-chomonads are able to destroy and phagocytose epithelial cells in vivo, they could provoke lesions in the mucosal surface of the urogenital tract, thus providing portals of entry for pathogens such as HIV-1. In summary, we conclude that *T. vaginalis* destroys cultured epithelial cells using cytolytic mechanisms that include attachment, mechanical damage, phagocytosis and later intracellular lysosomal degradation. These findings open possibilities for further research on the molecular mechanisms of the parasite-host cell interaction, leading to a better understanding of the pathogenicity of this parasite.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr J. Baptista and Dr J. F. Alderete for kindly supplying the FMV1 and T068 strains, respectively. This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), PRONEX (Programa de Núcleo de Excelência), FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) and AUSU (Associação Universitária Santa Ursula).

#### REFERENCES

- Aonso, A., Benchimol, M., Ribeiro, K. C., Lins, U. and De Souza, W. (1994). Further studies on the endocytic activity of *Tritrichomonas foetus*. *Parasitology Research* 80, 403-413.
- Alderete, J. F., Leher, M. W. and Arroyo, R. (1995). The mechanisms and molecules involved in cytoadherence and pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Today* 11, 70-74.
- Alderete, J. F. and Pearlman, A. (1984). Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers. *The British Journal of Venereal Diseases* 60, 99-105.
- Arroyo, R. and Alderete, J. F. (1989). *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infection and Immunity* 57, 2991-2997.
- Benchimol, M., Batista, C. and De Souza, W. (1990). Fibronectin - and lamin - mediated endocytic activity in the parasitic protozoa *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 22, 39-45.
- Benchimol, M., De Andrade Rosa, I., Da Silva Fontes, R. and Burla Dias, A. J. (2008). *Trichomonas* adhere and phagocytose sperm cells: adhesion seems to be a prominent stage during interaction. *Parasitology Research* 102, 597-604.
- Benchimol, M., Da Cunha e Silva, N. L., Elias, C. A. and De Souza, W. (1986). *Tritrichomonas foetus*: ultrastructure and cytochemistry of endocytosis. *Experimental Parasitology* 62, 405-415.
- Benchimol, M. and De Souza, W. (1995). Carbohydrate involvement in the association of a prokaryotic cell with *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Parasitology Research* 81, 459-464.
- Bonilha, V. L., Ciavaglia, M. C., De Souza, W. and Costa e Silva Filho, F. (1995). The involvement of the terminal carbohydrates of the mammalian cell surface in the cytoadhesion of trichomonads. *Parasitology Research* 81, 121-126.
- Brugerolle, G. (1971). Mise en évidence du processus d'endocytose et des structures lysosomiques chez *Trichomonas vaginalis*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* 272, 2558-2560.
- Brugerolle, G., Bricheux, G. and Coe, G. (1996). Actin cytoskeleton demonstration in *Trichomonas vaginalis* and in other trichomonads. *Biology of the Cell* 88, 29-36.
- Burgess, D. E., Knoblock, K. F., Daugherty, T. and Robertson, N. P. (1990). Cytotoxic and hemolytic effects of *Tritrichomonas foetus* on mammalian cells. *Infection and Immunity* 58, 3627-3632.
- Chambers, V. C. and Weiser, R. S. (1969). The ultrastructure of the target cells and immune macrophages during their interaction in vitro. *Cancer Research* 29, 301-317.
- Crouch, M. L. and Alderete, J. F. (1999). *Trichomonas vaginalis* interactions with fibronectin and laminin. *Microbiology* 145, 2835-2843.
- Dailey, D. C., Chang, T. H. and Alderete, J. F. (1990). Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Parasitology* 101, 171-175.
- Diamond, L. S. (1957). The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *Journal of Parasitology* 43, 488-490.
- Fiori, P. L., Rappelli, P., Addis, M. F., Mannu, F. and Cappuccinelli, P. (1997). Contact-dependent disruption of the host cell membrane skeleton induced by *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity* 65, 5142-5148.
- Fiori, P. L., Rappelli, P., Addis, M. F., Sechi, A. and Cappuccinelli, P. (1996). *Trichomonas vaginalis* haemolysis: pH regulates a contact-independent mechanism based on pore-forming proteins. *Microbial Pathogenesis* 20, 109-118.

- Fiori, P. L., Rappelli, P., Rocchigiani, A. M. and Cappuccinelli, P. (1993). *Trichomonas vaginalis* haemolysis: evidence of functional pores formation on red cell membranes. *FEMS Microbiology Letters* 109, 13–18.
- Francioli, P., Shio, H., Roberts, R. B. and Muller, M. (1983). Phagocytosis and killing of *Neisseria gonorrhoeae* by *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of Infectious Diseases* 1, 87–94.
- García-Tamayo, J., Nunez-Montiel, J. T. and García, H. P. (1978). An electron microscopy investigation on the pathogenesis of human vaginal trichomoniasis. *Acta Cytologica* 22, 447–455.
- Gilbert, R. O., Elia, G., Beach, D. H., Klaessig, S. and Singh, B. N. (2000). Cytopathogenic effects of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultured in vitro. *Infection and Immunity* 68, 4200–4306.
- González-Robles, A., Castanon, G., Cristóbal-Ramos, A. R., Lázaro-Haller, A., Omani-Molina, M., Bonilla, P. and Martínez-Palomo, A. (2006). *Acanthamoeba castellanii*: structural bases of the cytopathic mechanisms. *Experimental Parasitology* 114, 133–140.
- González-Robles, A., Lázaro-Haller, M., Espinosa-Castellano, Anaya-Velázquez, F. A. and Martínez-Palomo, A. (1995). *Trichomonas vaginalis*: ultrastructural bases of the cytopathic effect. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 42, 641–651.
- Heath, J. (1981). Behaviour and pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* in epithelial cell cultures. *The British Journal of Venereal Diseases* 57, 106–117.
- Honigberg, B. M. (1990). Host cell-trichomonad interactions and virulence assays in vitro systems. In *Trichomonads Parasitic in Humans* (ed. Honigberg, B. M.), pp. 155–212. Springer-Verlag, New York, USA.
- Jesus, J. B., Podlyska, T. M., Lopes, A. H. C. S., Vannier-Santos, M. A. and Meyer-Fernandes, J. R. (2002). Characterization of an ecto-phosphatase activity in the human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Research* 88, 991–997.
- Jesus, J. B., Vannier-Santos, M. A., Britto, C., Godefroy, P., Silva-Filho, F. C., Pinheiro, A. A., Rocha-Azevedo, B., Lope, A. H. and Meyer-Fernandes, J. R. (2004). *Trichomonas vaginalis* virulence against epithelial cells and morphological variability: the comparison between a well-established strain and a fresh isolate. *Parasitology Research* 5, 369–377.
- Krieger, J. N., Poisson, M. A. and Rein, M. F. (1983). Beta-hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* correlates with virulence. *Infection and Immunity* 41, 1291–1295.
- Krieger, J. N., Ravdin, J. and Rein, M. F. (1985). Contact dependent cytopathogenic mechanisms of *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity* 50, 768–770.
- Kummer, S., Hayes, G. R., Gilbert, R. O., Beach, D. H., Lucas, J. J. and Singh, B. N. (2008). Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron. *Microbial Pathogenesis* 44, 197–203.
- Luft, J. H. (1971). Ruthenium red and violet. I. Cytochemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *The Anatomical Record* 171, 347–368.
- Martínez-Palomo, A., González-Robles, A., Chávez, B., Orozco, E., Fena'dez-Castelo, S. and Cervantes, A. (1985). Structural basis of the cytolytic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Protozoology* 32, 166–175.
- Mendoza-Lopes, M. R., Becerril-García, C., Fattel-Facenda, L. V., Avila-Gonzales, L., Rutz-Tachiquin, M. E., Ortega-Lopes, J. and Arroyo, R. (2000). CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Infection and Immunity* 68, 4907–4912.
- Mirhagani, A. and Warton, A. (1996). An electron microscope study of the interaction between *Trichomonas vaginalis* and epithelial cells of the human amnion membrane. *Parasitology Research* 82, 43–47.
- Nielsen, M. H. and Nielsen, R. (1975). Electron microscopy of *Trichomonas vaginalis* Donne': Interaction with vaginal epithelium in human trichomoniasis. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section B* 83, 305–320.
- Pereira-Neves, A. and Benchimol, M. (2007). Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis* – new insights. *Biology of the Cell* 99, 87–101.
- Rasmussen, S. E., Nielsen, M. H., Lind, I. and Rhodes, J. M. (1986). Morphological studies of the cytotoxicity of *Trichomonas vaginalis* to normal human vaginal epithelial cells in vitro. *Genitourinary Medicine* 62, 240–246.
- Rendon-Maldonado, J. G., Espinosa-Cantellano, M., González-Robles, A. and Martínez-Palomo, A. (1998). *Trichomonas vaginalis*: in vitro phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes and erythrocytes. *Experimental Parasitology* 89, 241–250.
- Robinson, I. M. and Karnovsky, M. J. (1983). Ultrastructural localization of several phosphatases with cerium. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 31, 1197–1208.
- Singh, B. N., Lucas, J. J., Hayes, G. R., Kumar, I., Beach, D. H., Frajblat, M., Gilbert, R. O., Sommer, U. and Costello, C. E. (2004). *Tritrichomonas foetus* induces apoptotic cell death in bovine vaginal epithelial cells. *Infection and Immunity* 72, 4151–4158.
- Singh, B. N., Hayes, G. R., Lucas, J. J., Beach, D. H. and Gilbert, R. O. (2005). In vitro cytopathic effects of a cysteine protease of *Tritrichomonas foetus* on cultured bovine uterine epithelial cells. *American Journal of Veterinary Research* 66, 1181–1186.
- Sorvillo, F., Smith, L., Kerndt, P. and Ash, L. (2001). *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. *Emerging Infectious Diseases* 7, 927–932.
- Vancini, R. G. and Benchimol, M. (2008). Entry and intracellular location of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis*. *Archives of Microbiology* 189, 7–18.
- World Health Organization (2001). *Trichomoniasis. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)