

**Dissertação de Mestrado**

**Interação de *Trichomonas vaginalis* e *Tritrichomonas foetus* com diferentes tipos celulares**

RICARDO CHAVES VILELA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

RIO DE JANEIRO  
2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**Ricardo Chaves Vilela**

Interação de *Trichomonas vaginalis* e *Tritrichomonas foetus* com diferentes tipos celulares.

Dissertação: Mestrado em Ciências Biológicas - Biofísica  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, IB, CCS, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Biofísica  
Rio de Janeiro, 2010-08-25 Xv, pp. 90.  
Orientadora: Marlene Benchimol

1. *Tritrichomonas foetus*. 2. *Trichomonas vaginalis*. 3. Interação parasito-célula hospedeira. 4. Fibroblastos humanos. 5. Células musculares.

**INTERAÇÃO DE *Trichomonas vaginalis* E *Tritrichomonas foetus* COM  
DIFERENTES TIPOS CELULARES**

RICARDO CHAVES VILELA

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ  
como parte das exigências para a  
obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Biológicas

Orientadora: Dra. Marlene Benchimol

RIO DE JANEIRO  
2010

# **INTERAÇÃO DE *Trichomonas vaginalis* E *Tritrichomonas foetus* COM DIFERENTES TIPOS CELULARES**

**RICARDO CHAVES VILELA**

Dissertação submetida ao corpo docente do programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Biofísica, Instituto de Biofísica Carlos chagas filho- IBCCF, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

**Aprovada por:**

---

Prof.<sup>a</sup> Márcia Attias  
Instituto de Biofísica – UFRJ

---

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

---

Prof.<sup>a</sup> Cláudia Mermelstein  
Programa de Ciências Morfológicas – ICB/UFRJ

---

Prof.<sup>a</sup> Silvana Allodi (Revisora)  
Programa de Ciências Morfológicas – ICB/UFRJ

---

Prof.<sup>a</sup> Rossiane Vommaro (Suplente)  
Instituto de Biofísica – UFRJ

---

Prof.<sup>a</sup> Marlene Benchimol (Orientadora)  
Instituto de Biofísica – UFRJ

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 Antonio Carlos da Rocha Vilela e Maria Emília Chaves Vilela como fruto de todo esforço dedicado à minha formação profissional, ética e moral.**

## **AGRADECIMENTOS**

**A Deus** pelo dom de viver, pelo ar que eu respiro. Por tudo o que aconteceu e não aconteceu. Tu és o único Senhor e Salvador da minha vida.

**Aos meus pais** pela educação que me deram. Por toda luta para que eu alcançasse o sucesso. Antonio e Emília, eu agradeço pelo apoio incondicional. Vocês dois são meus heróis ! Isso aqui é graças a vocês ! Te amo Pai, te amo Mãe. Obrigado.

**À minha irmã Thaís** por ser a minha segunda mãe. Mana não me canso de dizer do imenso orgulho que sinto de ter o mesmo sangue que você. Essa pessoa linda, simpática e bondosa! Amo você e essa nossa cumplicidade, coisa de irmão!

**À minha noiva Mychelle**, Minha companheira, minha inspiração. Amo dividir minha vida com você. Obrigado por tudo que faz por mim, com você eu sou muito feliz! Deus foi muito bom de ter te colocado no meu caminho. Meu sonho realizado!

**A Professora Silvana Allodi**, pela revisão deste trabalho. Obrigado por reservar seu tempo para mim. A senhora tem uma eficiência e elegância admirável.

**Aos professores** Márcia Attias, Cláudia Mermelstein, Fernando Costa e Silva e Rossiane Vommaro por terem aceitado o convite para fazer parte da banca examinadora.

**À Professora Helene Barbosa e Erick Vaz** pela ajuda com as células musculares

**A professora Ana Paula e suas alunas Flávia, Tatiana, Ana Beatriz** pelo auxílio nos experimentos e discussões sobre as citocinas

**A todos os professores e alunos do Laboratório de Ultraestrutura celular Hertha Meyer**, por todo apoio nos momentos em que precisei

**A Sandra e Gabriela** da secretaria de PG, por me atenderem com eficiência quando precisei

**Aos meus amigos:**

**Victor Midlej**, primeiro desculpas pelas brincadeiras diárias que você teve que agüentar! Como diz aquele ditado "A gente só brinca com quem a gente gosta". Você foi um parceiro mesmo, e o resultado está nos artigos que publicamos juntos. Muito obrigado pela ajuda, pela amizade dentro e fora do laboratório.



**Antonio**, (Hai!) trabalhar com você é aliar trabalho com descontração, na dose certa. Você tem uma inteligência admirável. Muito obrigado pela ajuda sempre que necessário.

**Ivone**, a formiguinha do laboratório, uma pessoa doce e que está sempre achando tempo para ajudar mais um. Coração de Ivone é igual coração de mãe, sempre cabe mais um.

**Débora**, pequenininha, meiguinha. Obrigado por me mostrar esse sorriso e bom humor todas as manhãs. Obrigado também pela sua ajuda.

**Isadora**, por aturar minhas implicâncias com seu cabelo (Ele é muito bonito, viu?). Obrigado pelos papos descontraídos e pelas risadas.

**Ligia**, pela amizade e pela ajuda na impressão desta dissertação. Você me auxiliou em um momento muito importante. Obrigado!

**Fernanda**, pelo apoio e pela amizade. Tua ajuda foi muito importante para este trabalho. Tu podes contar com a minha também.

**Gabriella**, minha aluna mais que especial, você tem uma personalidade única! Agora, os fibroblastos, células musculares, queratina acabaram. Pode se concentrar nos cupins, e também nas tricomonas!

**Erika**, seu trabalho está presente nesta dissertação. Obrigado pela eficiência na hora de processar as imagens.

**Cássio**, seu trabalho também está aqui. Parabéns pela dedicação e obrigado pelos bate papos futebolísticos

**Victor Melo e Artur**, também pelos papos futebolísticos. Vocês são a cereja do bolo do laboratório. Pessoas que eu pudesse comentar sobre os resultados do **Fluminense**, tricolores de coração como eu.

**Diego**, meu grande e eterno amigo. Mesmo longe torcemos e demos força um para o outro na derrota e na vitória. Valeu irmão que eu escolhi!

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

A minha orientadora, professora Marlene Benchimol. A pessoa mais importante desta dissertação, obrigado pela idéia e por ceder a estrutura do laboratório para o nosso trabalho. Obrigado por ter me aceitado em sua equipe, por confiar em mim e me ensinar a ser um profissional de primeira. Obrigado também pelo empurrão no meu crescimento profissional. Além orientadora você foi minha mãe científica, dando os puxões de orelha sempre que necessário. Obrigado também pelos assuntos e histórias descontraídas nas horas de seminário. Eu não me canso de escutar as suas histórias! Obrigado por tudo.

*“Todas as coisas devem ser feitas da forma mais simples possível, porém não mais simples que o possível”*

(Albert Einstein)

<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 Tricomonádídeos</b>	1
<b>1.2 Epidemiologia e Importância Médica, Veterinária e Econômica</b>	5
<b>1.3 Morfologia</b>	9
1.3.1 Superfície Celular	9
1.3.2 Hidrogenossomos	10
1.3.3 Retículo Endoplasmático	12
1.3.4 Complexo de Golgi e Filamentos Parabasais	13
1.3.5 Vesículas e lisossomos	14
1.3.6 Citoesqueleto	15
1.3.6.1 Complexo Pelta-Axostilar	16
1.3.6.2 Costa	17
1.3.6.3 Centrossomos e Fuso mitótico	17
1.3.7 Núcleo e Divisão	18
<b>1.4 Interação-parasito hospedeiro</b>	18
<b>1.5 Objetivos</b>	27
1.5.1 Geral	27

1.5.2	Específicos	27
<b>2-</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>28</b>
2.1	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Tritrichomonas foetus</i> e de <i>Trichomonas vaginalis</i>	29
2.2	Cultura primária de células epiteliais de oviduto bovino	29
2.3	Cultivo da linhagem 3T3 de fibroblastos de camundongo	29
2.4	Cultivo da linhagem de células epiteliais MDCK	31
2.5	Cultura primária de fibroblastos humanos	31
2.6	Cultivo da linhagem L6 muscular esquelética de ratos	32
2.7	Experimentos de interação	33
2.7.1	Experimentos de coincubação e ensaios de adesão	33
2.7.2	Ensaio de citotoxicidade	33
2.7.3	Detecção de Citocinas	34
2.8	Análise do potencial de membrana mitocondrial	34
2.9	TUNEL	35
2.10	Microscopia eletrônica de varredura	36
2.11	Microscopia eletrônica de transmissão	36
2.12	Interação de tricomonas com queratina de epiderme humana	37
2.13	Ensaio de espécie-especificidade	38
<b>3-</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>38</b>
3.1	Interação de tricomonádídeos com fibroblastos humanos	38
3.2	Interação de tricomonádídeos com fibroblastos 3T3 de camundongo	44
3.3	Interação de tricomonádídeos com células musculares	49
3.4	Interação de tricomonádídeos com diversos modelos celulares	55
3.5	Secreção de citocinas na interação de tricomonas com células epiteliais de oviduto bovino	61

<b>4- DISCUSSÃO</b>	63
<b>4.1 Tricomonas interagem com fibroblastos humanos e de camundongo</b>	63
<b>4.2 Interação de tricomonas com monocamadas de diversas origens</b>	65
<b>4.3 As tricomonas induzem a secreção de citocinas em células hospedeiras</b>	67
<b>5- CONCLUSÕES</b>	71
<b>6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	72

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

Corrêa, G., **Vilela, R.**, Menna-Barreto, R., Midlej, V., Benchimol, M.  
Cell death induction in *Giardia lamblia*: effect of beta-lapachone and starvation. **Parasitology International**. , v.58, p.424 - 437, 2009.

Midlej, V., **Vilela, R.**, Burla Dias, A., Benchimol, M.  
Cytopathic effects of *Tritrichomonas foetus* on bovine oviduct cells. **Veterinary Parasitology** v.165, p.216 - 230, 2009.

**Vilela, R.**, Menna-Barreto, R.F.S., Benchimol,, M.  
Methyl jasmonate induces cell death and loss of hydrogenosomal membrane potential in *Trichomonas vaginalis*. **Parasitology International**. v.59, p.387-393, 2010.

## RESUMO

*Tritrichomonas foetus* e *Trichomonas vaginalis* são protistas parasitos do trato urogenital bovino e humano, respectivamente. *T. vaginalis* é o agente causador da tricomonose humana, a mais freqüente doença sexualmente transmissível não viral no mundo e tem sido associada ao maior risco de aquisição do vírus HIV em humanos. A infecção por *T. foetus* provoca perdas significantes na indústria pecuária mundial devido à infertilidade e ao aborto. Muitos estudos indicam uma íntima associação entre tricomonadíneos e as células epiteliais do trato urogenital. No entanto, pouco é conhecido no que concerne a interação de tricomonas com células de tecidos mais profundos como fibroblastos e células musculares. O objetivo deste estudo também foi verificar se *T. foetus* e *T. vaginalis* ativam a liberação de citocinas em uma cultura de células epiteliais bovina. Estudos anteriores sobre interação parasito-célula hospedeira são controversos no que concerne a habilidade de *T. foetus* e *T. vaginalis* em interagir e danificar células de diferentes origens e espécies. Uma cultura primária de fibroblastos humanos de biópsias de abdômen foi obtida de cirurgia plástica. Os fibroblastos 3T3 de camundongo e L6 de mioblastos de rato também foram cultivados como modelo de célula-alvo. Para verificar a resposta inflamatória induzida pelos parasitos, foi obtida uma cultura primária de células epiteliais de oviduto bovino e os sobrenadantes das interações foram coletados com 12 horas de interação. Para verificar se *T. foetus* era capaz de infectar células humanas, a interação de *T. foetus* com células epiteliais vaginais humanas coletadas com “swabs” foi realizada. As interações foram processadas para microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. O marcador de apoptose TUNEL, que detecta DNA fragmentado e o JC-1, que mede o potencial de membrana mitocondrial foram usados para observar se os parasitos induziram morte celular por apoptose nas células-alvo. O Ensaio colorimétrico cristal violeta foi realizado para analisar a citotoxicidade exercida pelos parasitos. Os resultados obtidos mostraram que *T. vaginalis* e *T. foetus* aderem e são citotóxicas a fibroblastos e às células musculares. Nas análises por JC-1 foi observado que os parasitos induziram morte celular por apoptose. A interação de *T. foetus* com células vaginais humanas mostrou-se positiva, com vários parasitos fortemente aderidos. Foi encontrado um grande aumento na concentração da citocina IL-10 nos sobrenadantes de interação entre *T. foetus* e células epiteliais de oviduto bovino. No entanto, *T. vaginalis* induziu apenas um pequeno aumento na liberação de IL-10 após interação com as células bovinas. Ambos *T. vaginalis* e *T. foetus* foram capazes de interagir com fibroblastos e células musculares, indicando que a infecção é possível nos tecidos conjuntivos e musculares o que pode causar sérios riscos ao hospedeiro infectado. Além disso, a interação de *T. foetus* com células vaginais humanas mostrou que a interação tricomonas-célula hospedeira não é espécie-específica. Embora a adesão e citotoxicidade dos parasitos não seja espécie-específica, parece que a resposta inflamatória da célula hospedeira depende de reconhecimento específico, como foi mostrado em nosso estudo, onde apenas *T. foetus* e mas não *T. vaginalis* induziu a liberação de IL-10 em células bovinas.



## ABSTRACT

*Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus* are parasitic protists of human and bovine urogenital tracts, respectively. *T. vaginalis* is the causative agent of human trichomoniasis, the most prevalent non-viral sexually transmitted disease worldwide and it has been associated to an increased risk for HIV-1 acquisition in humans. The infection by *T. foetus* provokes significant losses in beef industry worldwide due to infertility and abortion. Several studies have indicated intimate association between trichomonads and epithelial cells of the urogenital tract. However, little is known concerning the interaction of trichomonads with cells from deeper tissues such as fibroblasts and muscle cells. The aim of this study was also verify whether *T. foetus* and *T. vaginalis* activate cytokines release in a culture of bovine epithelial cells. Previous studies on parasite-host cell interaction are controversy concerning the ability of *T. foetus* and *T. vaginalis* to interact and damage cells of different origins and species. A primary culture of human fibroblasts from abdomen biopsies was obtained from plastic surgery. The 3T3 mice fibroblasts and L6 rat myoblasts, were also grown as models of target cells. To verify the inflammatory response induced by parasites, it was obtained a primary culture of bovine oviduct epithelial cells and the supernatant of interaction was collected within 12 hours. To verify whether *T. foetus* was able to infect human cells, the interaction of *T. foetus* with human vaginal epithelial cells collected with "swabs" was performed. The interactions were processed for scanning and transmission electron microscopy. The apoptosis marker TUNEL, which detects fragmented DNA and the JC-1, which measures the mitochondrial membrane potential were used to observe whether the parasites induced target cell death by apoptosis. The colorimetric assay violet crystal was performed to analyze the cytotoxicity exerted by the parasites. The results obtained showed that *T. vaginalis* and *T. foetus* adhere to and are cytotoxic to fibroblasts and muscle cells. In the JC-1 analysis it was observed that the parasites induced cell death by apoptosis. The interaction of *T. foetus* with human vaginal cells was positive, with several parasites strongly adhered. It was found a large increase in the concentration of IL-10 cytokine in supernatants of the interaction between *T. foetus* and bovine oviduct epithelial cells. However, *T. vaginalis* induced only a small increase in the release of IL-10 after interaction with the bovine cells. Both *T. vaginalis* and *T. foetus* were able to interact with fibroblasts and muscle cells, indicating that could be possible the infection to the connective and muscle tissue causing serious risks to the infected host. Furthermore, the interaction of *T. foetus* with human vaginal cells showed that trichomonas-host cell interaction is not species-specific. Although the adhesion and cytotoxicity of parasites are not species-specific, it seems that the inflammatory response of the host cell depends on specific recognition, as was shown in our study where only *T. foetus* but not *T. vaginalis* induced release of IL-10 in bovine cells.

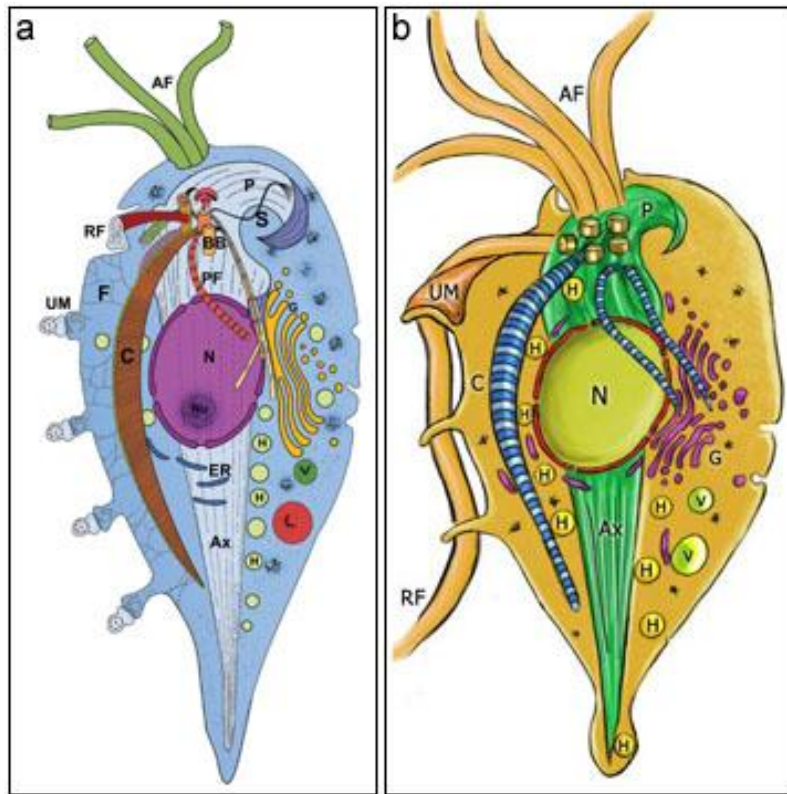
## ABREVIATURAS

– AIDS	“ <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> ” – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
– ATP	“ <i>Adenosine Triphosphate</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
– CP-30	Cisteíno-protease de 30 KDa
– DIC	“ <i>Differential interference contrast</i> ” – Contraste interferencial diferencial
– DNA	“ <i>Deoxyribonucleic acid</i> ” – Ácido desoxirribonucleico
– 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 fluoresceína
– 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> ” – Células de rim de cachorro
– mRNA	“ <i>messenger Ribonucleic acid</i> ” – Ácido ribonucleico mensageiro
– NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
– PBS	“ <i>Phosphate buffer saline</i> ” – Salina tamponada com fosfato
– PCR	“ <i>Polimerase 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>Tumor growth factor</i> ” – Fator de crescimento tumoral
– 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 Mundial de Saúde

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Tricomonadídeos

*Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) e *Trichomonas vaginalis* (Donné, 1836) são protistas parasitos extracelulares pertencentes ao Filo Parabasalia e à Família Trichomonadidea. Os tricomonadídeos (Figs. 1- 2) são organismos que se caracterizam pela presença de quatro a seis flagelos (um sempre recorrente), de um aparato parabasal, que corresponde ao 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 amitocôndriais, 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; L, Lisossomos; F, Filamento de ligação entre a costa e o flagelo recorrente. (Segundo 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 de bovinos e, recentemente, encontrado também no trato intestinal de felinos e caninos (Tolbert & Gookin 2009).

Apesar de ainda não estar claro o grau de parentesco entre as diversas espécies de tricomonadídeos, estudos moleculares de filogenia indicam que

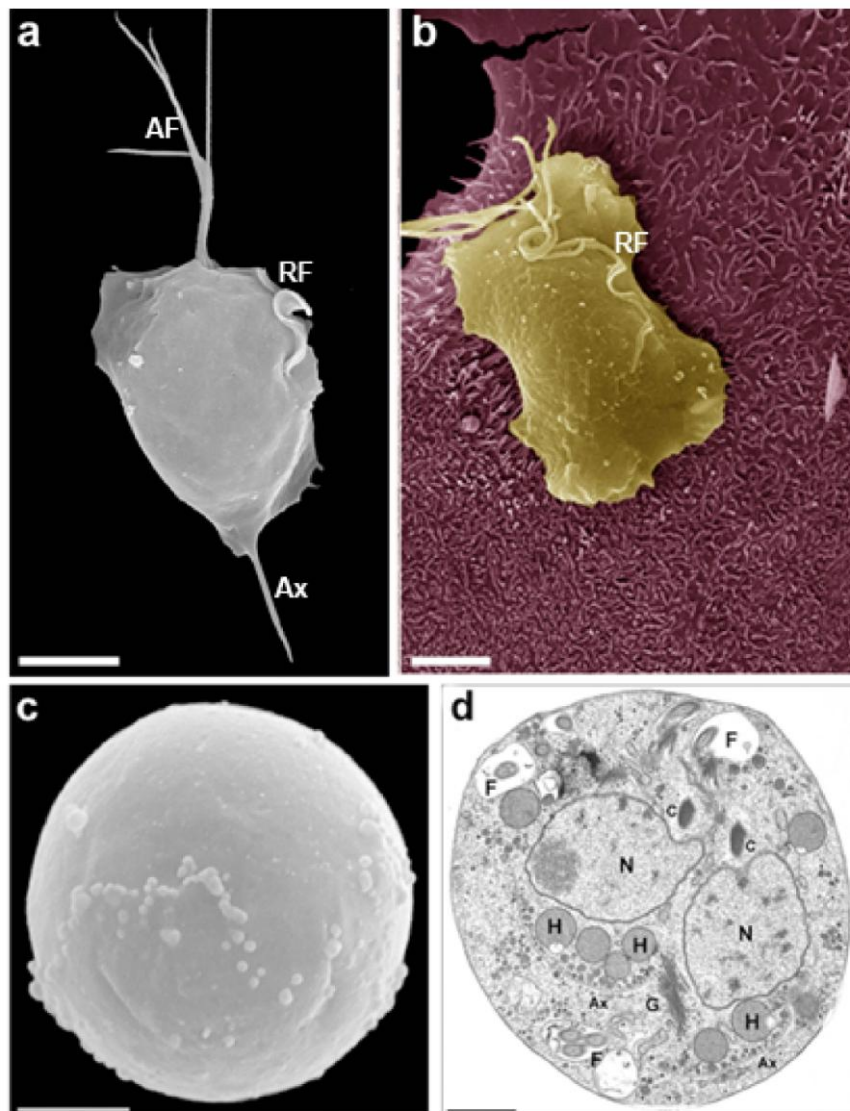
esses organismos encontram-se entre os eucariotos mais primitivos (Viscogliosi *et al.*, 1993).

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

*T. vaginalis* é responsável pela tricomonose humana, a DST não viral mais frequente no planeta (Van Der Pol, 2007). 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 (Fiori *et al.*, 1996; WHO, 1995). Alguns autores relatam que a tricomonose humana pode estar associada à predisposição ao vírus da imunodeficiência adquirida (Laga *et al.*, 1991, 1993; Wasserheit, 1992; Kissinger *et al.*, 2009).

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 e um flagelo recorrente que percorre todo o corpo celular, enquanto que a *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 (Fig.1) (Benchimol, 2004).

Além do formato oval (Fig. 2a), que é a mais comum em meios de cultura axênicos, as tricomonas podem ainda assumir duas outras morfologias distintas: a amebóide (Fig. 2b), mais freqüente quando o parasita interage com suas células-alvo e a de pseudocisto (Fig.2c-d), uma forma 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) e após adesão em célula hospedeira (b.) *T. foetus* em pseudocisto (c-d) observados por microscopia eletrônica de varredura (a-c) e de transmissão (d). Note que nos pseudocistos os flagelos estão internalizados (F), e o parasito não possui uma parede cística. Na figura d, é vista uma célula em divisão, cujas organelas já se encontram duplicadas. N, núcleo; F, flagelo; H, hidrogenossomo; Ax, axóstilo; G, complexo de Golgi; C, costa. Barras Figs. a- b, 5  $\mu$ m; Fig. C, 3  $\mu$ m; Fig. D, 1  $\mu$ m. (Figura c, Pereira-Neves et al., 2003; figura d, Cortesia: Pereira-Neves).

## 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 à gestação de bebês de baixo peso (Petrin *et al.*, 1998). A infertilidade também pode ser relacionada à tricomonose (Grodstein *et al.*, 1993).

A Organização Mundial de saúde tem dado grande importância à tricomonose humana, por ser considerada de alto risco, uma vez que o parasito poderia ser um facilitador para a entrada de alguns vírus, como o HIV (Cohen *et al.*, 1999; Moodley *et al.*, 2002). Além disso, associações entre a presença de tricomonas e uma maior incidência de câncer do colo uterino e à presença de HPV foram relatadas (Frost, 1962; Kharsany *et al.*, 1993; Zhang & Begg, 1994), aumentando ainda mais a importância deste parasito no âmbito da medicina humana.

A contaminação por tricomonas 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 possibilidade de contágio mesmo em 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. Embora casos assintomáticos sejam muito comuns em homens são 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 a hiperplasia do epitélio cervical, podendo aparecer até complicações nas glândulas de Bartholin. A vagina torna-se avermelhada, sendo frequente a presença de diversas pontuações, conhecidas com *colpitis macularis* ou cérvix em morango (Heine & McGregor, 1993). Durante a menstruação ou na gravidez, esses sintomas tornam-se ainda mais fortes, pela presença de ferro e por flutuações hormonais (Ryu *et al.*, 2001).

Embora a maioria dos homens seja considerada portadores assintomáticos, eles 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 às tricomonas (Khaw & Panosian, 1995). Este parece ser um dos fatores responsáveis pela curta duração da infecção nos homens ou mesmo para a explicação dos casos assintomáticos.



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 eficiente.

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 de pacientes 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 à formação de radicais livres que oxidam a molécula de DNA do parasito, com quebras simples ou duplas dessa 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 nas Américas do Norte e Sul, bem como em outras regiões do mundo onde o controle sanitário é deficiente, 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 terneiros 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 se se manterem portadores permanentes, uma vez que, com a idade, há aumento da profundidade das criptas prepúciais (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 confinados 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 cura 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 tricomonadídeos 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 criofatura 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 à 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 como 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 (Carlton *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); (8) e a única enzima do Ciclo de Krebs, a succinil- CoA sintetase. 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: (1) citocromos, (2) a grande maioria das enzimas do ciclo de Krebs, (3) atividade de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPase, (4) material genético ou (5) 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), e não são sensíveis aos inibidores metabólicos de cadeia transportadora de elétrons, como o cianeto e a rotenona. A produção de ATP ocorre por

fosforilação ao nível de substrato e não por fosforilação oxidativa, como ocorre nas mitocôndrias.

Diversas hipóteses foram levantadas com o intuito de se estabelecer graus de parentesco evolutivo entre mitocôndrias e hidrogenossomos. Alguns grupos acreditam na possibilidade dos hidrogenossomos e mitocôndrias terem evoluído de um ancestral comum a partir da mesma organela progenitora (Embley, 2006). Recentemente, o projeto genoma de tricomonas identificou alguns genes homólogos de proteínas transportadoras mitocondriais e proteínas mitocondriais solúveis (Carlton *et al.*, 2007).

### **1.3.3. Retículo Endoplasmático**

Assim como as células de eucariotos superiores, em *T. vaginalis* e *T. foetus*, o retículo endoplasmático (RE) é normalmente observado 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 o RE 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 tricomonádídeos. 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 sequestro 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 filamentos parabasais (Benchimol, 2004). O aparelho parabasal fica localizado na região anterior, próximo ao núcleo. *T. vaginalis* e *T. foetus* possuem um único Golgi, que é muito desenvolvido, podendo alcançar cerca de 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).

Quanto ao processo de Golgicinese, 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 (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). Tem sido sugerida a existência de conexões filamentosas comunicando a cisterna *cis* do Golgi com os filamentos parabasais (Benchimol *et al.*, 2001).

Como os filamentos parabasais parecem ser nucleados a partir dos corpúsculos basais (cinetossomos), existiria, portanto, a possibilidade de haver uma conexão entre o complexo de Golgi e os cinetossomos através de fibrilas (Benchimol *et al.*, 2001). Esta hipótese explicaria a 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 tricomonadídeos 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 sugere 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 tricomonadídeos encontram-se: (1) o complexo pelta-axóstilo, formado por microtúbulos estáveis (Benchimol, 2005; Ribeiro *et al.*, 2000; 2002a; 2002b;), (2) os flagelos (*T. foetus* possui três anteriores enquanto *T. vaginalis* possui quatro anteriores e ambos possuem um flagelo recorrente formando a membrana ondulante) (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). Há diversas estruturas, como os filamentos sigmóides e os corpos infra e supra cinetossomal, que 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 filamentos de actina no citoesqueleto de várias espécies de tricomonadídeos (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 mostraram a modificação da morfologia do protozoário durante a atividade fagocítica ou quando aderido à célula hospedeira (Brugerolle *et al.*, 1996; Pereira-Neves & Benchimol, 2007; Midlej *et al.*, 2009; Midlej & Benchimol, 2010). Desse modo, foi possível constatar uma reorganização do citoesqueleto (principalmente dos filamentos 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 células de mamíferos (Brugerolle *et al.*, 1996; Pereira-Neves & Benchimol, 2007). Em *T. foetus*, observou-se também a reorganização do citoesqueleto durante a sua transformação em pseudocistos (Granger *et al.*, 2000; Pereira-Neves *et al.*, 2003).

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

#### **1.3.6.1.Complexo Pelta-Axostilar**

O axóstilo de tricomonádídeos 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).

#### **1.3.6.2. 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 nº 2 e nº 3 (Honigberg *et al.*, 1971).

#### **1.3.6.3. Centrossomos e Fuso mitótico**

Os centrossomos dos tricomonadídeos são formados pelos corpúsculos basais e pelo atractóforo, que é um centro organizador de microtúbulos (Honigberg & Brugerolle, 1990).

Durante a divisão celular, os atractóforos se tornam responsáveis pela nucleação dos microtúbulos que constituirão o fuso mitótico. Os tricomonadídeos apresentam um tipo de mitose muito peculiar chamado de pleuromitose, 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 polo-a-polo e de polo-a-núcleo (Brugerolle, 1975; Ribeiro *et al.*, 2000; 2002a).

### **1.3.7. Núcleo e Divisão**

Os tricomonadídeos, quando não se encontram em divisão, apresentam um único núcleo localizado 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.

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

Devido à alta incidência de tricomonas em diversas espécies animais, busca-se desvendar os mecanismos de interação parasito-hospedeiro. Até pouco tempo acreditava-se que as tricomonas não penetravam em tecidos mais profundos do aparelho genital, mantendo contato apenas à superfície da célula-hospedeira, sendo considerados parasitos não-invasivos. Porém, algumas mulheres que sofrem de tricomonose apresentam aftas no canal vaginal (Kassem & Majoud, 2006) o que nos leva a pensar que as tricomonas podem atingir mais de uma camada de células em um órgão. Além disso, um estudo recente que usou camundongos como modelo mostrou que a presença de *T. vaginalis* no aparelho genital murino causou alterações em células do tecido conjuntivo (Escario *et al.*, 2009). Estas conseqüências sugerem que os parasitos não só podem atingir tecidos mais profundos, mas também podem atingir regiões superiores do trato urogenital feminino, como útero e oviduto.

Sabendo-se que as mucosas do útero e oviduto são mais simples por não possuírem várias camadas de células epiteliais, os parasitos ali presentes conseguiriam ter mais facilidade para atingir a camada submucosa e muscular, provocando as sérias consequências supracitadas. Um antigo estudo relatou a presença de *T. vaginalis* em tratos urogenitais superiores corroborando a hipótese de que *T. vaginalis* não é um parasito exclusivamente vaginal (Aburel *et al.*, 1957). Outro fato importante que ainda não foi esclarecido é a região do hospedeiro que as tricomonas têm preferência por colonizar, se são regiões queratinizadas, como na vagina normal, ou as regiões menos protegidas, com pouca ou nenhuma queratinização. Sabe-se que o parasito assume uma mudança drástica de forma após a adesão, tornando-se amebóide, sendo este considerado um sinal de virulência (Arroyo *et al.*, 1993). Esta mudança de forma poderia estar relacionada 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 (González-Robles *et al.*, 1995; Burgess *et al.*, 1990; Singh *et al.*, 2004). Até pouco tempo atrás se acreditava que proteases e outros produtos metabólicos seriam

liberados pelos parasitos no meio (Garber & Lemchuk-Favel, 1989; Pindak *et al.*, 1993). Entretanto, 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. Estas adesinas reconheceriam proteínas específicas do hospedeiro através de uma interação tipo ligante-receptor (Arroyo & Alderete, 1992; Arroyo *et al.*, 1993). Porém, o fato de as adesinas serem consideradas ligantes exclusivos do processo de adesão nas células epiteliais vaginais recebeu críticas. Foi demonstrado que estas proteínas 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 observado que a adesão do parasito foi intensificada pela laminina (Silva Filho & De Souza, 1988).

Há também evidências de a 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). Um estudo relatou a grande quantidade de lipofosfoglicanos presentes na membrana de *T. vaginalis* e *T. foetus* (Singh *et al.*, 1994), e como estas moléculas foram encontradas em quantidade significativa, os autores afirmaram que estas seriam importantes para a biologia do parasito. Os lipofosfoglicanos induziriam a ativação de proteínas envolvidas na transcrição de genes codificadores de citocinas nas células vaginais humanas. Além disso, os autores também verificaram a presença de citocinas liberadas durante a interação de lipofosfoglicanos de tricomonas com células vaginais humanas (Fichorova *et al.*, 2006). 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), tal como uma de 30 kDa (CP-30) 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). Há evidências de que esta proteína agiria 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, e esta ligação aumentaria quando os parasitos são tratados com alta concentração dos íons ferro e cálcio (Crouch *et al.*, 2001). Sendo assim, as tricomonas assumiriam um caráter mais invasivo, provocando a esfoliação das camadas mais superficiais e tendo acesso à camadas mais profundas. 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 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), e também são capazes de atuar contra a resposta imunológica do hospedeiro, internalizando seus



anticorpos após sua ligação (Granger & Wardwood, 1996). Trabalhos anteriores relatam que *T. vaginalis* não apresentam toxicidade a 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 afirmaram haver uma interação espécie-específica entre os parasitos e seus hospedeiros, divulgando que *T. vaginalis* não seria capaz de infectar células epiteliais do trato reprodutivo bovino e vice-versa.

Outra fonte importante de discussão é se as células hospedeiras quando na presença de tricomonas desencadeariam algum tipo de resposta, com o intuito de evitar o progresso do parasito. O conhecimento acerca da imunopatogênese da tricomonose e os mecanismos moleculares explorados por tricomonas com o intuito de evitar o sistema imune ainda são muito escassos. Estudos anteriores mostraram que mulheres tricomonas-positivas apresentavam níveis aumentados da citocina IL-1 $\beta$  e neutrófilos quando comparados com mulheres sem esta infecção (Cauci & Culhane, 2007). Níveis aumentados de IL-8 na região cervical também foram encontrados em mulheres grávidas infectadas (Simhan *et al.*, 2007). As respostas inflamatórias à *T. vaginalis* e *T. foetus* em modelos *in vitro* foi feita com lipofosfoliglicanos destes parasitos com células epiteliais vaginais e cervicais, onde os autores encontraram um aumento da expressão da citocina IL-8 (Bastida-Corcuera *et al.*, 2005; Fichorova *et al.*, 2006). Além disso, em outro estudo foi feita a

interação com trofozoítos de *T. vaginalis* e células HeLa onde a citocina IL-8 também foi secretada, e foi visto um aumento da transcrição de TNF-alfa e a participação de TLR2, 4 e 9, importantes receptores envolvidos na cascata de reconhecimento de patógenos (Chang *et al.*, 2006). Experimentos de interação também foram realizados com macrófagos e neutrófilos, tipos celulares constituintes do sistema imunológico, onde foi vista também a liberação das citocinas IL-8 e IL-10 (Chang *et al.*, 2006; Ryu *et al.*, 2004; Shaio *et al.*, 1995).

#### **1.4.6. Modelos Experimentais**

Os primeiros estudos sobre interação de tricomonas com possíveis hospedeiros foram realizados com fragmentos de fetos e embriões de galinha (Hogue, 1943). Mas os estudos sobre interação de tricomonas com células hospedeiras têm evoluído junto com o aperfeiçoamento de técnicas de cultura de células. A partir do momento em que linhagens celulares passaram a ser cultivadas *in vitro*, a interação com tricomonas passou a ser estudada mais facilmente.

Nos últimos anos, muitos avanços foram alcançados no entendimento da interação entre os 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. Foram utilizadas linhagens celulares como a MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) (González-Robles *et al.*, 1995), células HeLa (adenocarcinoma cervical humano) (Alderete *et al.*, 1995; Krieger, 1990), células McCoy de camundongo (Brasseur & Savel, 1982), células Vero provenientes de rim de macaco

(Alderete & Pearlman, 1984; Burgess *et al.*, 1990), células RK-13 de rim de coelhos (Heath, 1981), testículos de babuínos (Alderete & Pearlman, 1984), células amnióticas humanas – WISH (Honigberg, 1989) e células CHO - ovário de hamster chinês (Krieger *et al.*, 1985), para estudar o efeito citotóxico da tricomonas e os danos causados pelo parasito.

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 (Gilbert *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 1999; Sommer *et al.*, 2005; Corbeil *et al.*, 1989). Recentemente, células epiteliais de útero bovino foram utilizadas como modelo de interação com *T. foetus*, nas quais foi observado que o parasito se estabelece e é citotóxico (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 à vagina, causando a vaginite e alguns autores relatam que as tricomonas seriam capazes de se moverem até o útero e o oviduto (Singh *et al.*, 2004), uma vez que estudos *in vivo* demonstraram a presença do parasito nesses dois órgãos (Parsonson *et al.*, 1976). Estudos comparando a interação de tricomonas com fibroblastos humanos e células epiteliais mostraram que os parasitos apresentam aderência e citotoxicidade reduzidas quando fibroblastos foram utilizados como células-alvo. Gilbert e colaboradores (2000) realizaram a interação de *T. vaginalis* com fibroblastos obtidos de vagina humana e concluíram que os parasitos apenas aderiam à monocamada, mas não provocavam sua destruição. Logo, esses estudos *in vitro* mostraram que tricomonas seria um parasito restrito aos tecidos epiteliais,

não tendo sucesso em interações com células constituintes do tecido conjuntivo. Em virtude das controvérsias que existem acerca do conhecimento sobre a interação tricomonas-célula hospedeira é de suma importância verificar se as tricomonas têm a infecção restrita aos tecidos epiteliais ou se estes parasitos são capazes de infectar células de tecidos conjuntivos e musculares.

## 1.5. Objetivos

### 1.5.6. Geral

- Comparar o comportamento de *Tritrichomonas foetus* e *Trichomonas vaginalis* frente a células que constituem o tecido epitelial, conjuntivo e muscular.

### 1.5.7. Específicos

- Induzir a interação dos parasitos *T. vaginalis* e *T. foetus* com células epiteliais de oviduto bovino, fibroblastos de duas origens (humanos e 3T3) e mioblastos de ratos
- Verificar se há processo de citoadesão e citotoxicidade com ambas tricomonas frente aos fibroblastos e células musculares
- Verificar se no processo de interação com ambas tricomonas-epitélio há a liberação de citocinas
- Caracterizar se ambas tricomonas induzem morte celular nos fibroblastos e células musculares
- Verificar se as tricomonas aderem em fragmentos de vagina bovina queratinizados
- Verificar se as tricomonas têm preferência por superfícies revestidas ou não por queratina
- Observar se a viabilidade da célula hospedeira seria imprescindível no momento da interação

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Cultivo *in vitro* de tricomonadídeos

A 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. A cepa JT de *T. vaginalis* foi isolada no Hospital Universitário da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil e tem sido mantida em cultura desde 1980. Os trofozoítos, tanto *T. foetus* K, como *T. vaginalis* JT 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 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.

O meio TYM utilizado foi composto de 22 mg/ml de triptose, 11 mg/ml de extrato de levedura, 5,6 mg/ml de maltose, 1 mg/ml de *L*-cisteína, 0,2 mg/ml de ácido ascórbico, 0,9 mg/ml de fosfato de potássio monobásico e 0,9 mg/ml de fosfato de potássio dibásico. Após adicionar os componentes acima, o pH foi ajustado para 6,2 e o meio, 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 e obtenção de explantes vaginais bovinos**

Ovidutos de vacas foram removidos inteiros em um abatedouro comercial, imersos em PBS estéril contendo 0,05 g/l de sulfato de gentamicina e transportados para o laboratório em até duas horas. As fímbrias foram removidas, e os istmos e as ampolas foram usados para a realização dos experimentos.

Os istmos e as ampolas dos ovidutos foram usados como fonte de células epiteliais tal como descrito previamente (Joshi, 1988; Walter, 1995, Midlej *et al.*, 2009, Midlej & Benchimol 2010). A região luminal do órgão foi lavada com PBS gelado, o epitélio foi 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 após várias lavagens e transferidas para o meio de cultura 199 (M-5017, Sigma, USA).

As células dos ovidutos foram mantidas em meio 199 (SIGMA) e suplementado com penicilina e estreptomicina (0,08 mg/ml cada) em garrafas de 25 cm<sup>2</sup>, incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar. O epitélio se estabeleceu em uma semana de cultivo. Os fibroblastos e células epiteliais foram separados por tripsinização diferencial (Gilbert *et al.*, 2000). O purificado de células epiteliais foi determinado usando um anticorpo monoclonal anti-multicitoqueratina contra fibroblastos humanos (IC004, Dako, Dinamarca).

Para os testes de viabilidade, as células foram cultivadas em placas de 24 poços, e os experimentos foram realizados quando uma confluência de 70-80% das células foi alcançada. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias. A proliferação foi controlada por microscopia óptica. Para o crescimento das células foram usadas garrafas plásticas e/ou lamínulas de vidro (12 mm de diâmetro). Explantes vaginais bovinos medindo 2 cm de diâmetro foram obtidos de vaginas retiradas de vacas nos matadouros e transportadas para o laboratório. Os explantes foram retirados e colocados em placas de 35 mm e os parasitos adicionados para interação com *T. vaginalis* e *T. foetus* por até 4 dias.

### **2.3. Cultivo da linhagem 3T3 de fibroblastos de camundongo**

A linhagem celular de fibroblastos 3T3 de camundongo foi criada por Todaro e Green (1962) a partir de culturas primárias de fibroblastos de embriões murinos. Estas células foram plaqueadas na proporção de  $3 \times 10^5$  células por poço e atingiram uma alta capacidade proliferativa sendo chamada de linhagem celular 3T3. Os fibroblastos 3T3 foram retirados do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e mantidos em laboratório com meio DMEM suplementado de soro fetal bovino a 10%. O cultivo foi realizado em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> e as células foram incubadas em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Para os testes de viabilidade, as células foram cultivadas em placas de 24 poços, e os experimentos, realizados quando atingida uma confluência de 70-80%. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias. A proliferação foi controlada por um microscópio óptico invertido. Garrafas plásticas e/ou



lamínulas de vidro (12 mm de diâmetro) foram utilizadas para o crescimento das células.

#### **2.4. Cultivo da linhagem de células epiteliais MDCK**

A cultura da linhagem de células epiteliais MDCK foi escolhida pelo fato de a literatura já ter obtido resultados satisfatórios para o estudo da interação parasito-célula hospedeira com as MDCKs. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino em estufa úmida em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem uma confluência de aproximadamente 70%. Com este tipo celular foram realizadas interações onde as MDCKs, após atingirem a confluência acima, foram fixadas em uma solução de etanol a 90% por 15 minutos. Posteriormente, foram feitas diversas lavagens para a retirada de todo o etanol e em seguida, foi feita a interação com as tricomonas. O objetivo deste procedimento foi verificar se as tricomonas só interagiriam com células vivas ou se seriam capazes de aderir às células hospedeiras inertes.

#### **2.5. Cultura primária de fibroblastos humanos**

Fibroblastos humanos foram doados pelo Dr. Radovan Borojevic (Universidade Federal do Rio de Janeiro), a partir de biópsias retiradas em cirurgias no mesmo hospital, seguindo as normas éticas. Os fibroblastos foram obtidos de pele retirada do abdômen. Depois de coletadas, as amostras foram colocadas em meio DMEM (D5546, SIGMA, USA) suplementado com soro fresco humano e com o antibiótico gentamicina. O material foi cortado em pequenos fragmentos, colocado em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> e incubado em estufa

com 5% de CO<sub>2</sub> por até 10 passagens. No momento em que as células atingiram a confluência de 70 % foram realizados diversos ensaios de interação com o intuito de verificar se as tricomonas poderiam infectar células de outros tecidos, além do epitelial, tal como os fibroblastos presentes no tecido conjuntivo. A citoadesão e a citotoxicidade dos parasitos foi estudada por microscopia eletrônica, ensaios colorimétricos e imunofluorescência para detecção de morte celular.

## **2.6. Cultivo da linhagem L6 muscular esquelética de ratos**

A linhagem muscular esquelética L6 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e mantida em laboratório com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Esta linhagem teve origem a partir de fragmentos musculares do quadríceps de fêmur de ratos. As células L6 se fusionam em cultura quando atingem uma confluência de aproximadamente 70%. O cultivo foi realizado em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> e as células foram incubadas em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Para os testes de viabilidade, as células foram cultivadas em placas de 24 poços e os experimentos, realizados quando uma confluência de 70-80% das células foi alcançada. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias. A proliferação foi controlada por um microscópio óptico invertido. Foram usadas garrafas plásticas e/ou lamínulas de vidro (12 mm de diâmetro) revestidas com gelatina a 0.05% para o crescimento das células.

## **2.7. Experimentos de interação**

### **2.7.1. Experimentos de co-incubação e ensaios de adesão**

Em todos os experimentos onde se realizaram a interação de *T. foetus* e *T. vaginalis* com células hospedeiras, a proporção de células foi de 5:1, enquanto que a proporção dos volumes de meio de cultura foi mantida em meio TYM a 25% e meio DMEM ou 199 a 75%. A citoadesão foi confirmada através de sucessivas lavagens da cultura após exposição das células aos parasitos. Nos experimentos controles, as células hospedeiras foram utilizadas sem a presença de tricomonas. O processo de interação foi seguido em microscopia óptica.

### **2.7.2. Ensaio de citotoxicidade**

As células-hospedeiras foram aderidas em placas de cultura de 24 poços em meio DMEM e mantidas até formar uma monocamada confluenta ( $2 \times 10^5$  células). Os parasitos foram adicionados na proporção mencionada acima e incubados por diferentes tempos a 37°C. Para os experimentos controles, os parasitos não foram adicionados. Ao final dos períodos de incubação, as células que restaram aderidas foram fixadas com paraformaldeído (PF) a 2%, lavadas em PBS e coradas com cristal violeta a 0,13% (Alderete & Pearlman, 1984). 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 SDS a 1% e etanol a 50%. 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 controles.

### **2.7.3. Detecção de Citocinas**

Nosso objetivo foi verificar se as células hospedeiras secretariam citocinas em resposta à infecção por tricomonas. Para verificar os níveis extracelulares de mediadores pró-inflamatórios, os sobrenadantes das interações da cultura epitelial de oviduto com tricomonas foram avaliados, comparando os controles não infectados ou infectados por 12 horas. Os sobrenadantes recolhidos foram centrifugados e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para as dosagens posteriores, foi utilizado o kit de ELISA OptEIA (BD) para a detecção de IL-10 e IL-8, e o kit R&D para a detecção de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , conforme o protocolo dos fabricantes. As leituras foram feitas em leitor de ELISA (BIO-RAD), em 450 nm de absorbância.

### **2.8. Análise da perda do potencial de membrana mitocondrial por fluorescência**

As interações dos parasitos com células hospedeiras foram testadas com o marcador JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide, Molecular Probes, USA) após até 12 horas de interação. Este teste foi usado para medir as mudanças no 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, no qual uma alta taxa de potencial é observada com fluorescência vermelha e uma baixa taxa em fluorescência verde (Reers *et al.*, 1991).

As células infectadas com os parasitos foram incubadas com 5 µg/ml do JC-1 a 37°C, por 1 hora. As análises microscópicas das imagens fluorescentes foram realizadas usando o equipamento mencionado acima, com filtros apropriados: a emissão vermelha do JC-1 foi lida a 546 nm, enquanto a emissão verde, em 520 nm. As amostras foram observadas em um microscópio de fluorescência (Axiphot II – Zeiss-Alemanha). As imagens foram adquiridas usando uma câmera CCD em tempo real Zeiss AxioCam MRc5 (Zeiss - Alemanha).

## **2.9. TUNEL**

Para analisar se houve fragmentação da cromatina nas células hospedeiras após interação das tricomonas, utilizamos o método do TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP Nick-end labeling*) com o teste “*In Situ Cell Death Detection Kit*” (Roche Diagnostics, Meylan, França). Os parasitos foram incubados com as células hospedeiras por 12 horas, fixadas à temperatura ambiente em PF a 2% (v/v), em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) e subsequentemente lavadas em PBS. Logo após, as células foram permeabilizadas com Nonidet-40 a 3% (Sigma, St. Louis, USA) por 40 minutos. As amostras foram embebidas em cloreto de amônio 50 mM e albumina bovina a 3% (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).

## **2.10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

No processamento de rotina para microscopia eletrônica de varredura, as amostras coletadas após diversos tempos de interação foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,2 por 2 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas em PBS e pós-fixadas por 30 minutos em OsO<sub>4</sub> a 1% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,2. A seguir, as células foram lavadas em PBS e desidratadas em porcentagens 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 e, em seguida, montadas em suportes metálicos apropriados. A metalização foi feita com ouro na espessura de 25 nm. As amostras foram observadas no microscópio eletrônico de varredura Jeol 5800.

## **2.11. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

A interação de tricomonas com fibroblastos e células musculares foi realizada em garrafas de poliestireno de 25 cm<sup>2</sup>. Após o tempo de interação, que variou de 3h até 12h, as interações foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M por, no mínimo, 2 horas, à temperatura

ambiente. Em seguida, as células foram retiradas das garrafas pelo método de raspagem com o auxílio do Rubber policeman. Posteriormente, foram lavadas em PBS e pós-fixadas por 30 minutos em de OsO<sub>4</sub>, a 1% contendo CaCl<sub>2</sub> a 5 µM e ferricianeto de potássio a 0,8% em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2. Em seguida, as 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 (Epon), por 72 horas. Após a polimerização, os blocos de resina foram cortados no ultramicrotomo, obtendo-se cortes ultrafinos prateados e coletados em grades de cobre de 300 *mesh*. As grades contendo os cortes foram contrastadas com acetato de uranila a 5% por 30 minutos e citrato de chumbo a 10% por 10 minutos para posterior observação ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1210.

## **2.12. Interação de tricomonas com queratina de epiderme humana**

Com o intuito de testar se os parasitos interagiriam com queratina, lamínulas foram imersas em 5 µg/mL de queratina epidérmica humana (Sigma, USA) diluída em água destilada. As lamínulas foram revestidas e colocadas em estufa a 37 °C por 1 hora. Depois de toda água evaporada, os parasitos foram adicionados a lamínulas recobertas com queratina e o tempo de interação foi de 1 hora. As amostras foram processadas para MEV como descrito no item 2.9. A interação dos parasitos com queratina em suspensão também foi realizada por 1 hora e o material foi processado para microscopia eletrônica de transmissão, conforme mencionado no item 2.11. Para confirmar que as partículas aderidas e endocitadas pelos parasitos eram de queratina, foi realizada imunofluorescência com anticorpo primário monoclonal anti-

citoqueratina (Sigma, USA). O anticorpo secundário fluorescente utilizado foi o anti-camundongo (anti-mouse) conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, USA), diluído 1:100.

### **2.13. Ensaios de espécie-especificidade**

Para verificar se a interação era espécie-específica, foram obtidos explantes vaginais de vacas em matadouros e *T. vaginalis* foram imediatamente adicionados. Após 48 horas de interação os explantes foram processados para MEV como descrito no item 2.10. O contrário foi feito para *T. foetus*, células vaginais humanas foram obtidas a partir de raspagem vaginal com swabs de doadoras saudáveis. As células isoladas foram lavadas com PBS pH 7,2, e postas em interação por 20 minutos e processadas para MEV.

## **3. Resultados**

### **3.1. Interação de tricomonádídeos com fibroblastos humanos**

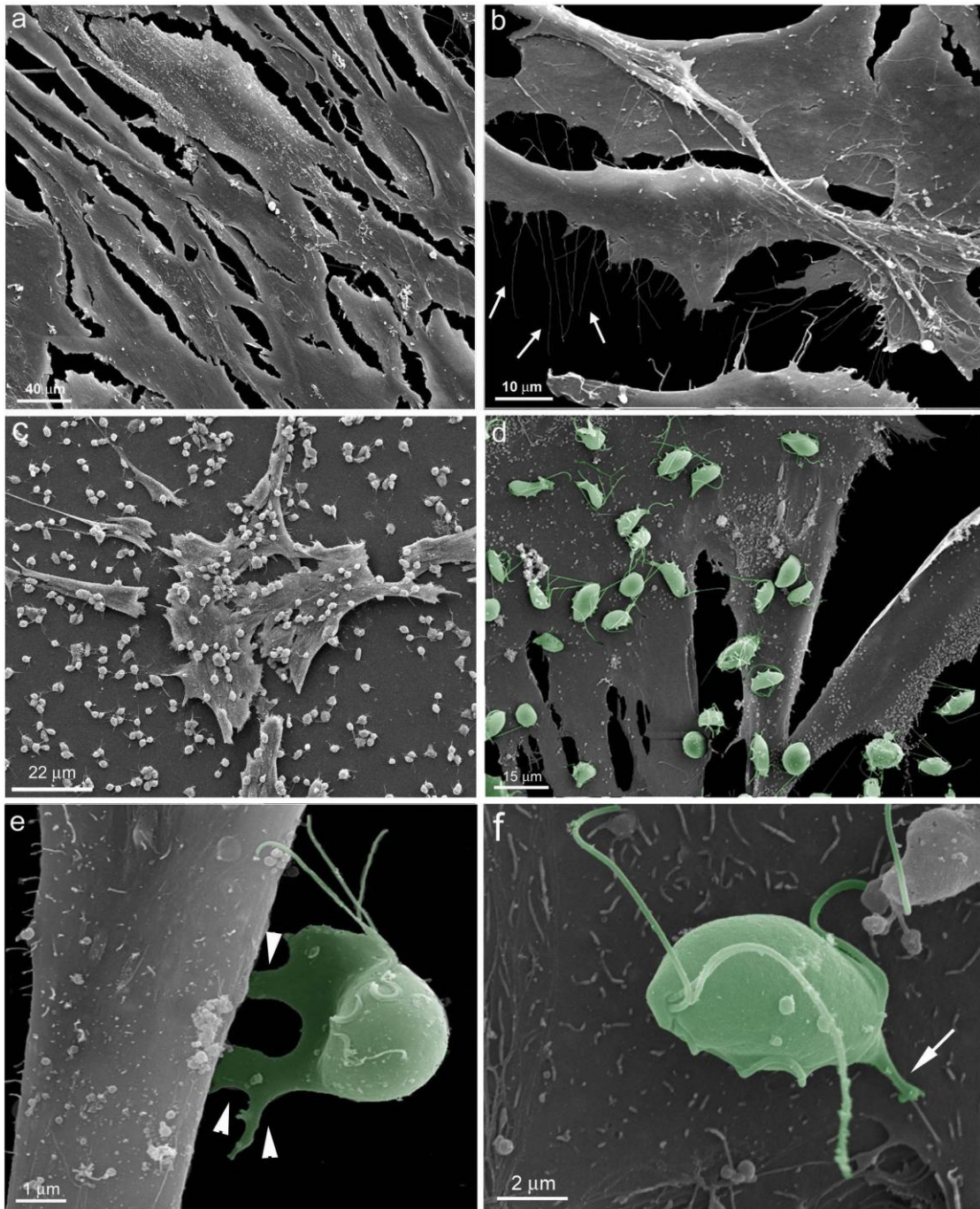
No intuito de investigar os efeitos citotóxicos dos tricomonádídeos em células que constituem tecidos mais profundos do trato reprodutivo, um sistema de cultura primária de fibroblastos humanos foi desenvolvido. Depois de aderidas, as células exibiram morfologia e crescimento característicos, com a formação de uma monocamada achatada não confluenta (Fig. 3a). Os fibroblastos apresentaram projeções fibrosas, que partiam da periferia das células (Fig. 3b). Os experimentos de interação foram feitos nas concentrações de 5:1 parasitos:células alvo, em intervalos de tempos variáveis entre 1 hora e 6 horas. Experimentos de co-incubação dos fibroblastos com os tricomonádídeos demonstraram que *T. vaginalis* e *T. foetus* foram capazes de



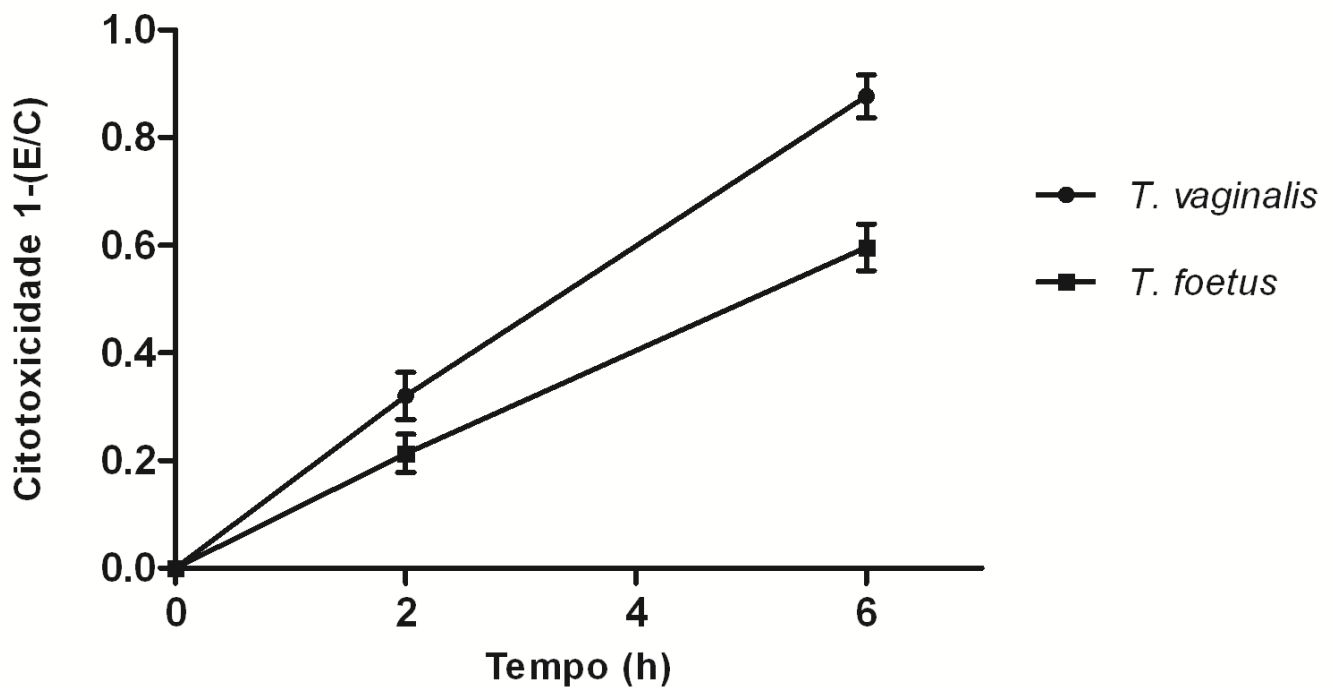
aderir à monocamada (Figs. 3c-d), porém de modos distintos. Enquanto *T. vaginalis* assumiu uma morfologia amebóide, propiciando assim um aumento da superfície de contato com a célula hospedeira (Fig. 3e), *T. foetus* aderiu preferencialmente pelo axóstilo (Fig. 3f). Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com o intuito de analisar e quantificar a capacidade dos parasitos em arrancar as os fibroblastos humanos aderidos do substrato. Como mostrado na figura 4, ambos parasitos danificaram a monocamada de fibroblastos rapidamente, sendo que *T. foetus* destruiu quase 60% dos fibroblastos humanos enquanto que *T. vaginalis* destruiu a quase totalidade das células alvo em apenas 6 horas.

O ensaio de viabilidade mitocondrial foi realizado através do teste do JC-1. Na Figura 5a está representada a imagem de DIC dos fibroblastos humanos controle, sem a adição dos parasitos, onde se nota que os fibroblastos apresentaram corpo alongado. A fluorescência do marcador JC-1 varia de acordo com o potencial de membrana mitocondrial. Por exemplo, se o potencial de membrana da organela for mantido, as mitocôndrias marcadas fluorescem vermelho, como visto na fluorescência do controle (Fig. 5b), e não fluorescem verde (Fig 5c). No caso de as mitocôndrias perderem seu potencial de membrana, irão emitir fluorescência verde e perderão a fluorescência vermelha. *T. vaginalis* foram colocadas em interação com os fibroblastos humanos por 6h e pôde-se observar o arredondamento celular resultante da retração dos fibroblastos após interação com *T. vaginalis* (Fig. 5d) e a perda da fluorescência vermelha das células hospedeiras quando os parasitos estavam presentes (Fig. 5e) e o aparecimento da fluorescência verde (Fig. 5f),

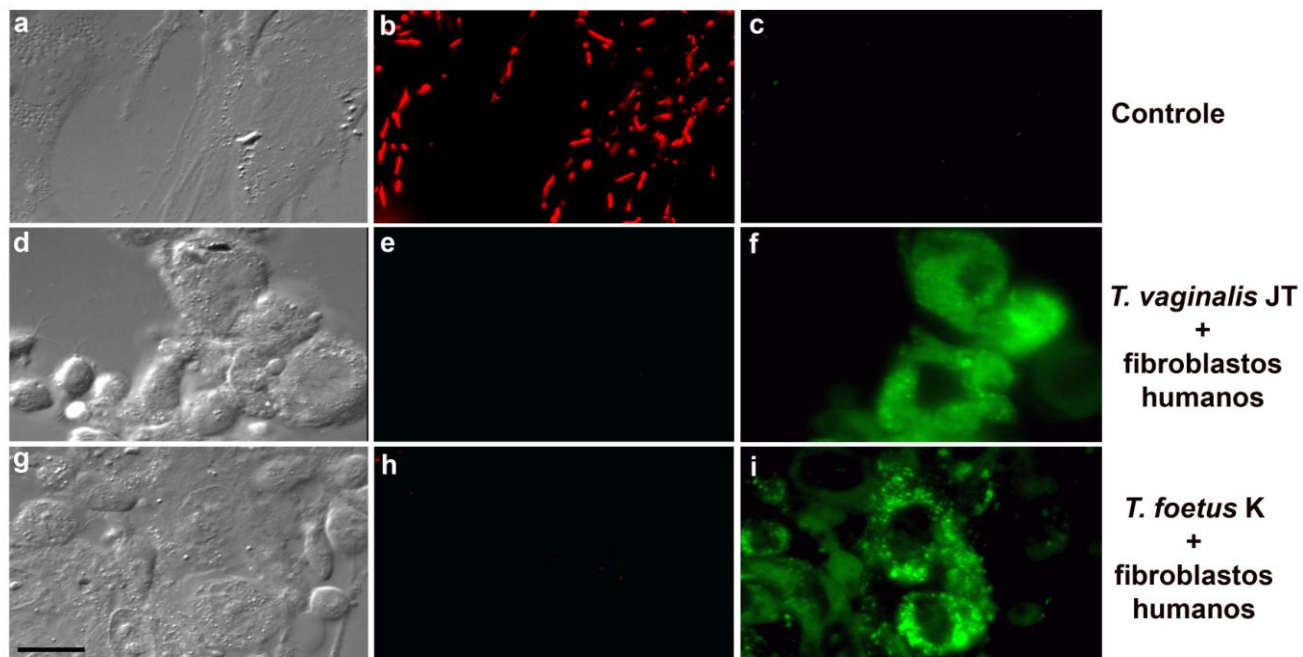
o mesmo aconteceu na interação com *T. foetus* representada na imagem em DIC (Fig. 5g) que induziu a perda da marcação vermelha nas mitocôndrias dos fibroblastos humanos (Fig. 5h), e o aparecimento da fluorescência verde (Fig. 5i). O ensaio de viabilidade, JC-1, sugere que *T. vaginalis* e *T. foetus* induziram os fibroblastos humanos a uma morte celular por apoptose.



**Figura 3.** Microscopia eletrônica de varredura da interação de *T. vaginalis* e *T. foetus* com fibroblastos humanos por 3 horas. Nos controles (**a-b**) os parasitos não foram adicionados. Na figura (**a**) nota-se a formação de uma monocamada não confluyente, típica de fibroblastos. É possível observar um alto número de filopódios emitidos por estas células (**b, setas**). Após 3 horas de interação, *T. vaginalis* (**c**) e *T. foetus* (**d**) aderiram aos fibroblastos humanos. Na figura (**e**) observa-se que *T. vaginalis* apresenta projeções (**cabeças de setas**) de sua membrana em direção à célula alvo. A adesão de *T. foetus* ocorre pelo axóstilo (**f, seta**).



**Figura 4.** Gráfico exibindo a citotoxicidade exercida por *T. foetus* e *T. vaginalis* quando em interação com a cultura primária de fibroblastos humanos. Foi realizado ensaio de espectrofotometria usando a técnica do cristal violeta. Os danos causados nas monocamadas de fibroblastos foram observados depois da incubação com os parasitos. Note que ambos os parasitos apresentaram alta citotoxicidade mesmo em tempos curtos. Note que *T. vaginalis* foi mais citotóxica que *T. foetus* destruindo quase 100% da monocamada em 6h. 1- (E/C), onde **E** representa as medidas das amostras experimentais e **C** as amostras controle.



**Figura 5.** Análise do potencial de membrana mitocondrial durante a interação de *T. vaginalis* e *T. foetus* com fibroblastos humanos, usando o marcador fluorescente JC-1. Os fibroblastos humanos controle estão representados por DIC em **a**. A fluorescência vermelha define a existência do potencial de membrana, como encontrado em **b** e a ausência da fluorescência verde confirmou que os fibroblastos controle não perderam seu potencial de membrana mitocondrial **c**. A infecção por *T. vaginalis* (**d**) promoveu a perda do potencial de membrana mitocondrial dos fibroblastos humanos após 6 horas de interação, como visto a ausência da fluorescência vermelha (**e**) e presença da fluorescência verde (**f**). A interação com *T. foetus* (**g**) também induziu a perda da fluorescência vermelha (**h**) note o aparecimento da fluorescência verde (**i**), indicando a morte celular por apoptose dos fibroblastos humanos na presença dos parasitos. Barra, 20  $\mu\text{m}$ .

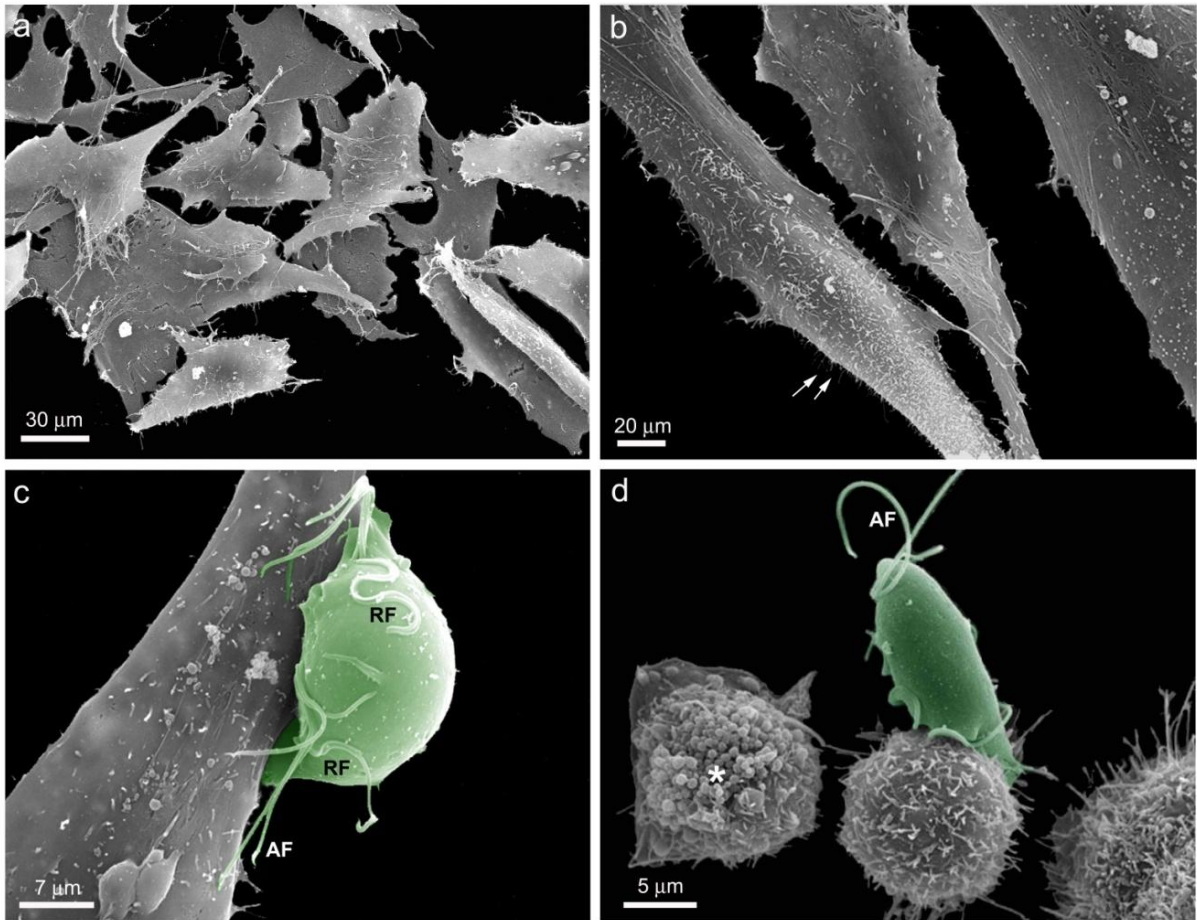
### 3.2. Interação de tricomonadídeos com fibroblastos 3T3 de camundongo

Ainda existem controvérsias a respeito da habilidade das tricomonas de interagir com monocamadas de diferentes espécies. Alguns autores acreditam que a interação seja espécie-específica, ou seja, *T. vaginalis* só apresentariam citotoxicidade em células humanas e *T. foetus* em células bovinas. Assim, neste trabalho foi realizada a interação dos parasitos com a linhagem 3T3 de fibroblastos de camundongo, com o objetivo de comparar os resultados obtidos na interação de fibroblastos humanos. Por microscopia eletrônica de varredura, os fibroblastos murinos controle apresentaram uma monocamada não confluyente, algumas vezes com a superfície lisa (Fig. 6a) e outras com microvilos (Fig. 6b). Foi possível observar durante a interação, a adesão de *T. vaginalis*, mesmo quando o parasito encontrava-se em divisão (Fig. 6c). Na interação com *T. foetus*, os parasitos aderiram preferencialmente pela parte posterior e já foi possível observar alterações morfológicas como retração celular e *blebbings* (Fig. 6d).

Com o objetivo de observar se os parasitos induziriam morte celular das células hospedeiras, foi utilizado o marcador JC-1. O ensaio foi feito em 12 horas na presença ou ausência dos parasitos e pôde-se observar que o controle apresentou células viáveis (Figs. 7a-c). Foi observado que a infecção provocou a perda do potencial mitocondrial com *T. vaginalis* (Figs. 7d-f) e *T. foetus* (Figs. 7g-i). A atividade de endonucleases na interação também foi avaliada pela técnica do TUNEL. A atividade do marcador foi testada no controle positivo com DNase onde pode se notar marcação (Figs. 8a,b). Não foi observada marcação do TUNEL no controle (Figs. 8c,d). Nos ensaios de interação com *T. vaginalis*, a linhagem 3T3 sofreu morte celular por apoptose

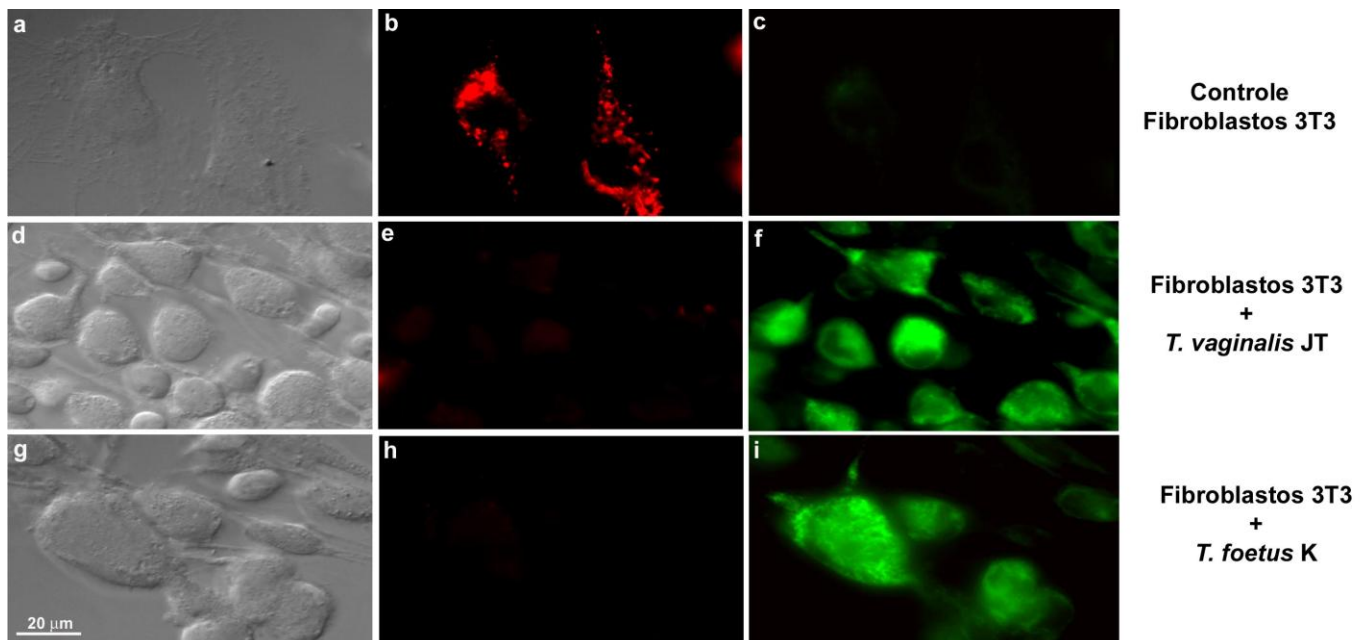
após 12 horas de infecção, indicada pela marcação positiva do TUNEL (Figs. 8e,f). Não foi possível notar marcação positiva para TUNEL na interação com *T. foetus* (Figs. 8g,h). O ensaio de citotoxicidade realizado mostrou que apenas *T. vaginalis* apresentou citotoxicidade, enquanto *T. foetus* mostrou ser pouco agressiva à linhagem 3T3 (Fig. 9).



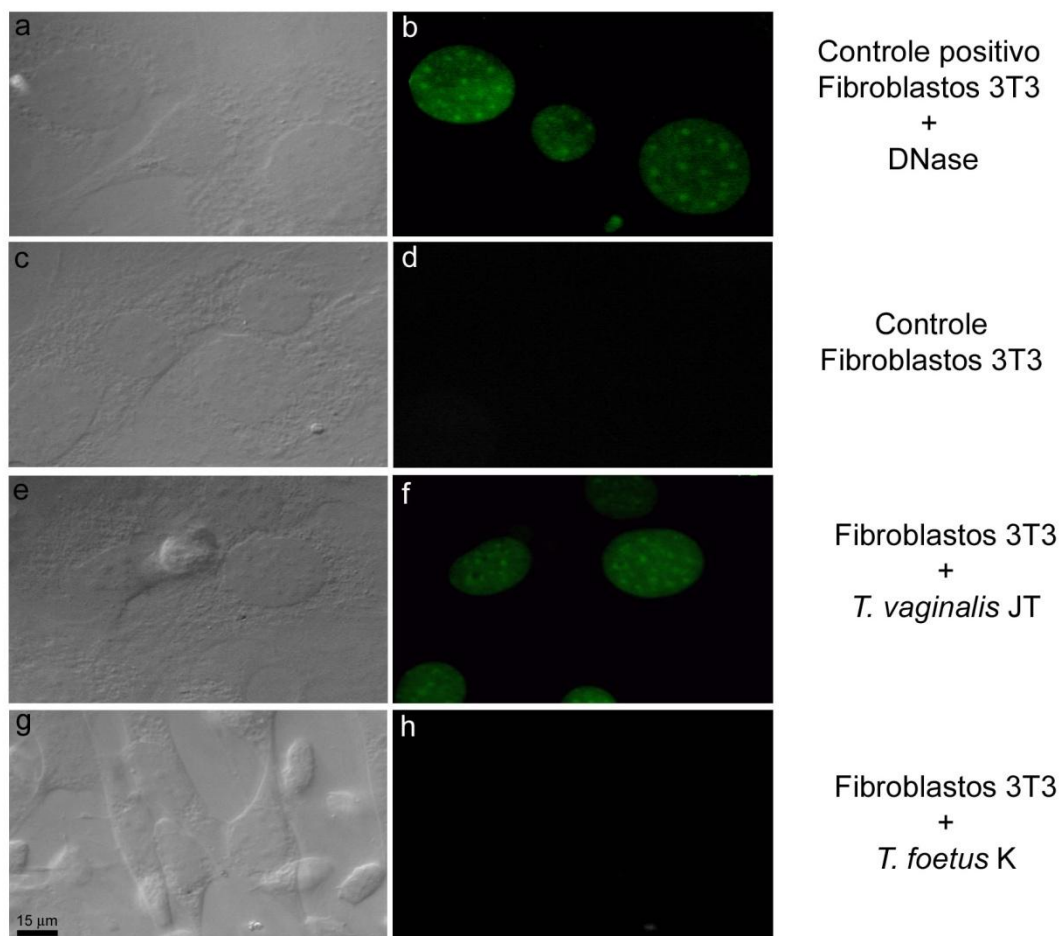


**Figura 6.** Microscopia eletrônica de varredura da interação de *T. vaginalis* e *T. foetus* com fibroblastos de camundongo por 12 horas. Nos controles (**a**, **b**) os parasitos não foram adicionados. Em (**a**) é possível notar a formação de uma monocamada não confluyente, típica de fibroblastos, Em **b** foi observada a formação de microvilos (**setas**). Após 12 horas de interação, *T. vaginalis* (**c**) e *T. foetus* (**d**) aderiram aos fibroblastos murinos. Na figura (**c**) foi notado que *T. vaginalis* se manteve aderida mesmo quando estava em divisão. A adesão de *T. foetus* ocorreu pela parte posterior e já foi possível observar a retração da célula alvo e “blebbings” de membrana (**d**, \*).

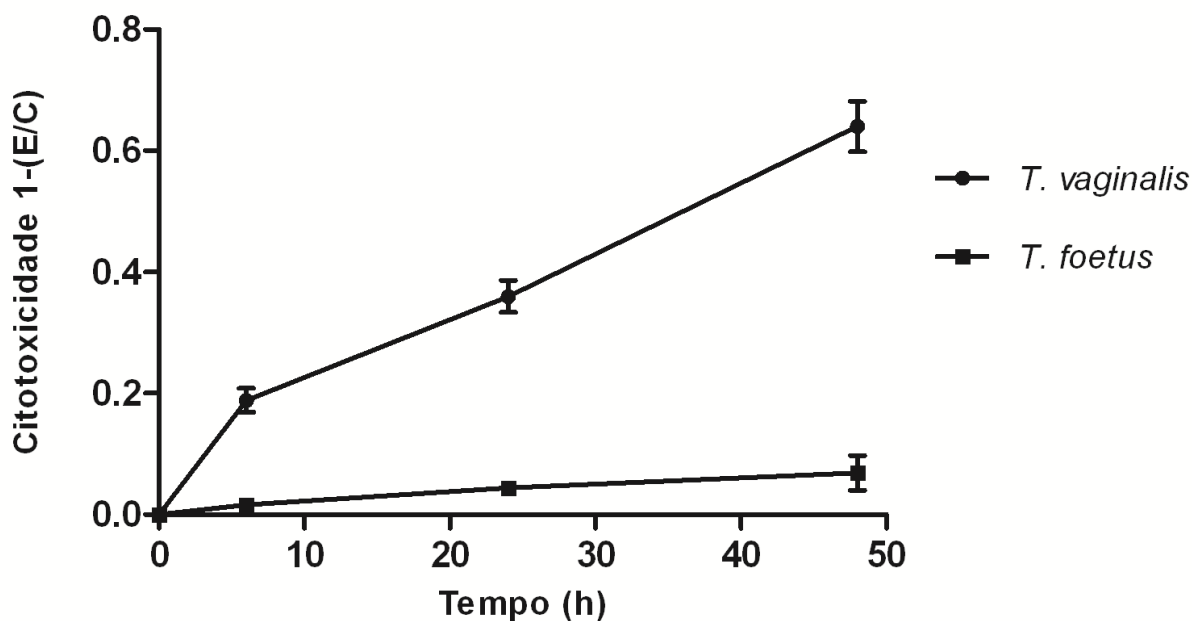




**Figura 7.** Análise do potencial de membrana mitocondrial durante a interação de *T. vaginalis* e *T. foetus* com fibroblastos 3T3 de camundongo, usando o marcador fluorescente JC-1. Os fibroblastos de camundongos controle estão representados por DIC em **a**. A fluorescência vermelha define a existência do potencial de membrana, como encontrado em **b** e a ausência da fluorescência verde confirmou que os fibroblastos controle não perderam seu potencial de membrana mitocondrial, **c**. A infecção por *T. vaginalis* (**d**) promoveu a perda do potencial de membrana mitocondrial dos fibroblastos de camundongo após 12 horas de interação, como visto a ausência da fluorescência vermelha (**e**) e presença da fluorescência verde (**f**). A interação com *T. foetus* (**g**) também induziu a perda da fluorescência vermelha (**h**) note o aparecimento da fluorescência verde (**i**), indicando a morte celular por apoptose dos fibroblastos de camundongo na presença dos parasitos.



**Figura 8.** Interação de fibroblastos murinos com *T. vaginalis* e *T. foetus* por um período de 12 horas. Após este período, os parasitos e fibroblastos 3T3 são observados por microscopia óptica em DIC (painéis do lado esquerdo), e por fluorescência quando foram marcados com TUNEL (painéis do lado direito). Em **a-b** são observados fibroblastos tratados com DNase I, sem exposição aos parasitos. Na linha **c-d**, os fibroblastos murinos controle sem infecção com parasitos. A marcação no núcleo das células hospedeiras foi observada quando estas foram co-incubadas com *T. vaginalis* (linha **e-f**). No entanto, quando as *T. foetus* (linha **g-h**) foram co-incubadas com as células alvo, não se observou marcação.



**Figura 9.** Gráfico mostrando a citotoxicidade exercida por *T. foetus* e *T. vaginalis* na linhagem 3T3 de fibroblastos usando a técnica do cristal violeta. Note que somente *T. vaginalis* (♦) apresentou citotoxicidade enquanto que *T. foetus* (■) foi muito pouco agressiva à monocamada. 1- (E/C), onde **E** representa as medidas das amostras experimentais e **C** as amostras controle.

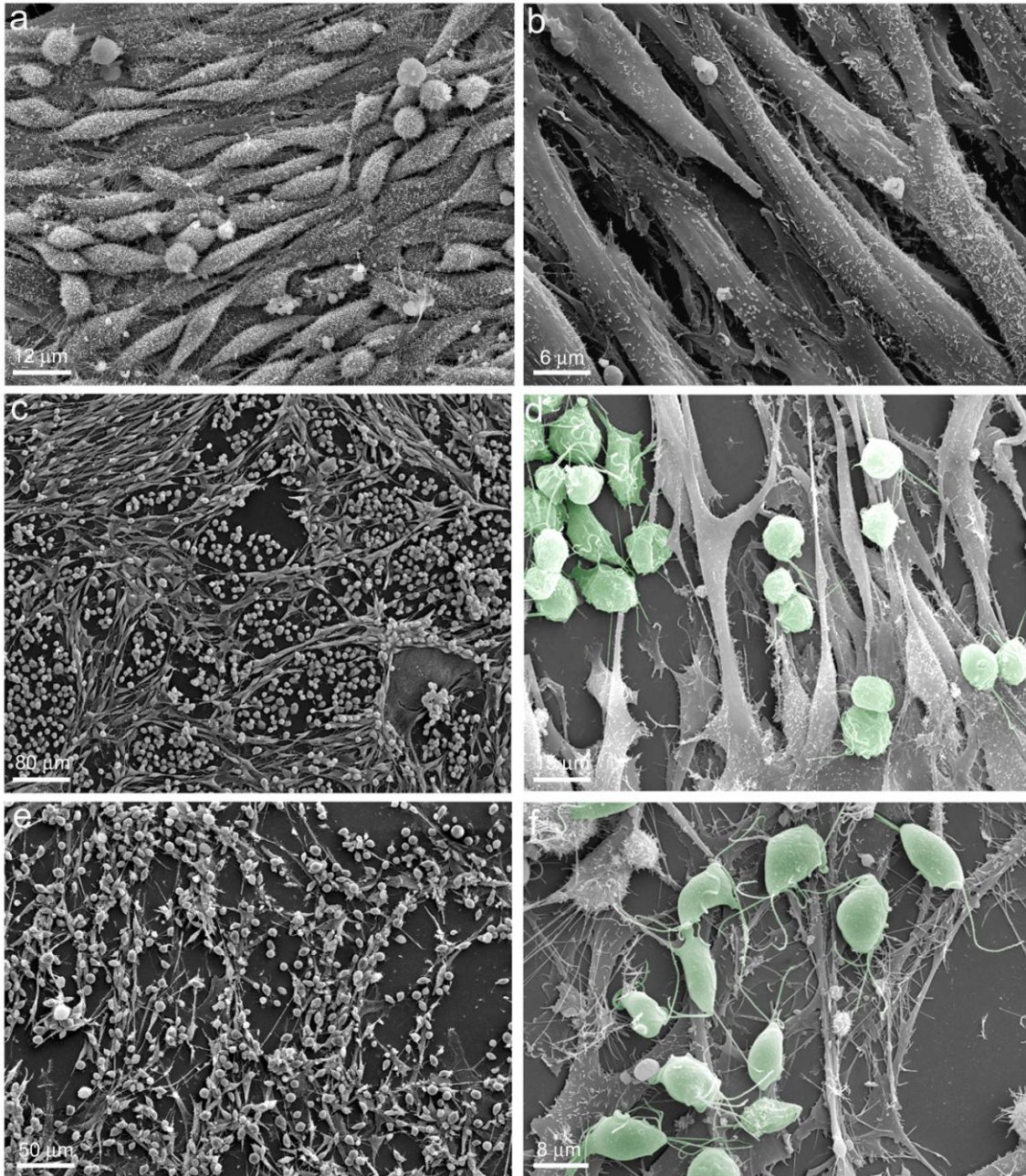
### 3.3. Interação de tricomonadídeos com células musculares

No intuito de investigar os efeitos citotóxicos dos tricomonadídeos em células que constituem o tecido muscular, foi obtida uma cultura da linhagem L6 de mioblastos de camundongo. Depois de aderidas, as células ficaram alongadas e justapostas (Figs. 10 a-b). Quando atingida a confluência desejada, os parasitos foram adicionados e após 6 horas de incubação estavam aderidos à monocamada que, com este tempo de interação, já

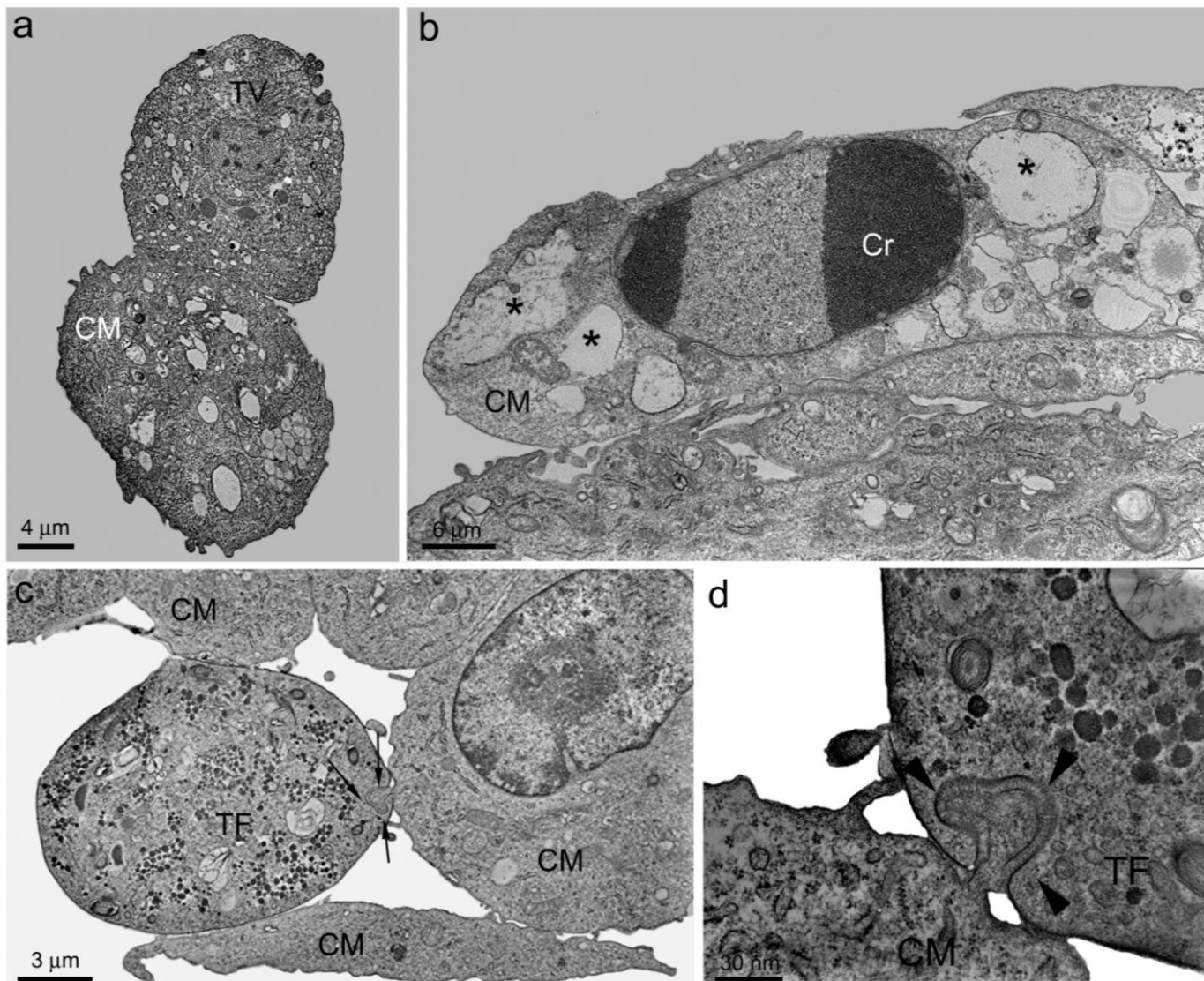
apresentava sinais de destruição tanto com *T. vaginalis* (Fig. 10c) quanto com *T. foetus* (Fig. 10e). *T. vaginalis* induziu aberturas na monocamada e aderiu ao substrato (Fig. 10c) enquanto que *T. foetus*, se manteve aderida sobre as células musculares (Fig. 10e). Em maior aumento foi possível observar a retração da monocamada com os parasitos aderidos (Figs. 10d e 10f). Além disso, os mioblastos submetidos à interação com *T. foetus* apresentaram a formação de filopódios (Fig. 10f). Para acompanhar com mais detalhamento os efeitos dos parasitos sobre as células musculares, a interação acima descrita foi processada para microscopia eletrônica de transmissão. Quando houve interação com *T. vaginalis* foi possível observar o parasito aderido à célula muscular (Fig. 11a) tendo se notado que a célula alvo apresentou sinais de morte celular, como vacuolização do citoplasma e condensação da cromatina (Fig. 11b). Já na figura 11c, na interação com *T. foetus*, o parasito foi flagrado aderido à célula muscular e há evidências dele estar “beliscando” a superfície da mesma (Fig. 11c), fato que é melhor observado na figura 11d. Para confirmar a morte celular causada pelos parasitos, foi utilizado o marcador de potencial mitocondrial JC-1. *T. vaginalis* e *T. foetus* foram colocados em interação com os mioblastos por 6h e pôde-se observar a perda do potencial de membrana mitocondrial das células hospedeiras quando os parasitos estavam presentes (Figs. 12d-i). Nos controles, quando os parasitos não estavam presentes, as mitocôndrias ficaram marcadas na cor vermelha (Fig. 12b). O ensaio de viabilidade com JC-1 confirmou que *T. vaginalis* e *T. foetus* induziram a morte das células musculares. Por fim, para quantificar o potencial citotóxico das tricomonas aqui testadas sobre as células musculares, foram realizados ensaios de citotoxicidade. Como mostrado na figura 13, ambos

parasitos danificaram a monocamada muscular rapidamente, sendo que *T. foetus* destruiu quase 60% da monocamada muscular, enquanto que *T. vaginalis* destruiu quase a totalidade das células alvo em apenas 24 horas.



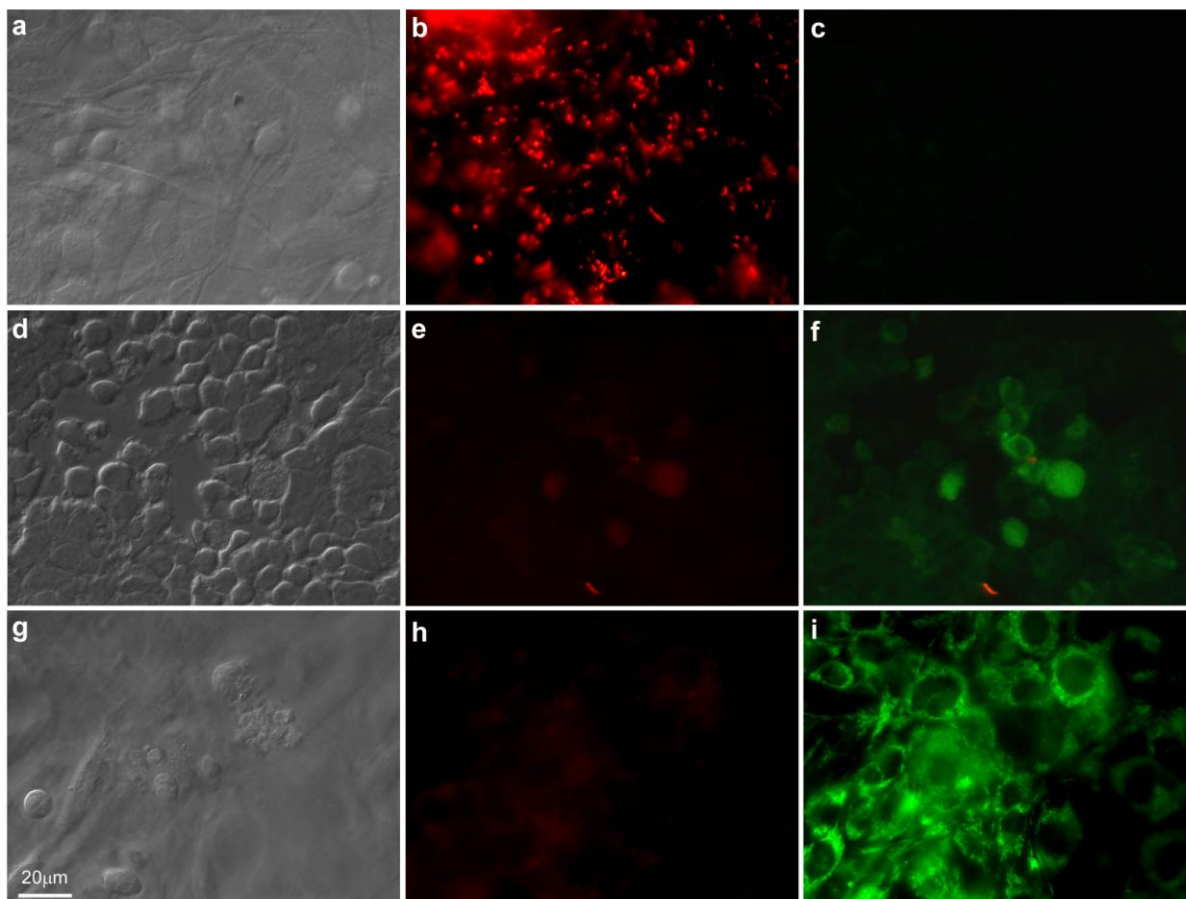


**Figura 10.** Microscopia eletrônica de varredura da interação de *T. vaginalis* e *T. foetus* com células musculares por 6 horas. Nos controles (**a**- **b**) os parasitos não foram adicionados. Em (**a**) nota-se a formação de células alongadas e justapostas. Em maior aumento, é possível observar o contato íntimo entre as células (**b**). Após 6 horas de interação, *T. vaginalis* (**c**) e *T. foetus* (**e**) aderiram à monocamada de células musculares e provocaram a abertura de espaços entre as células musculares. Nas figuras (**d**, **f**) observa-se em maior aumento vários parasitos aderidos e a monocamada retraída. *T. vaginalis* (**d**) e *T.foetus* (**f**).



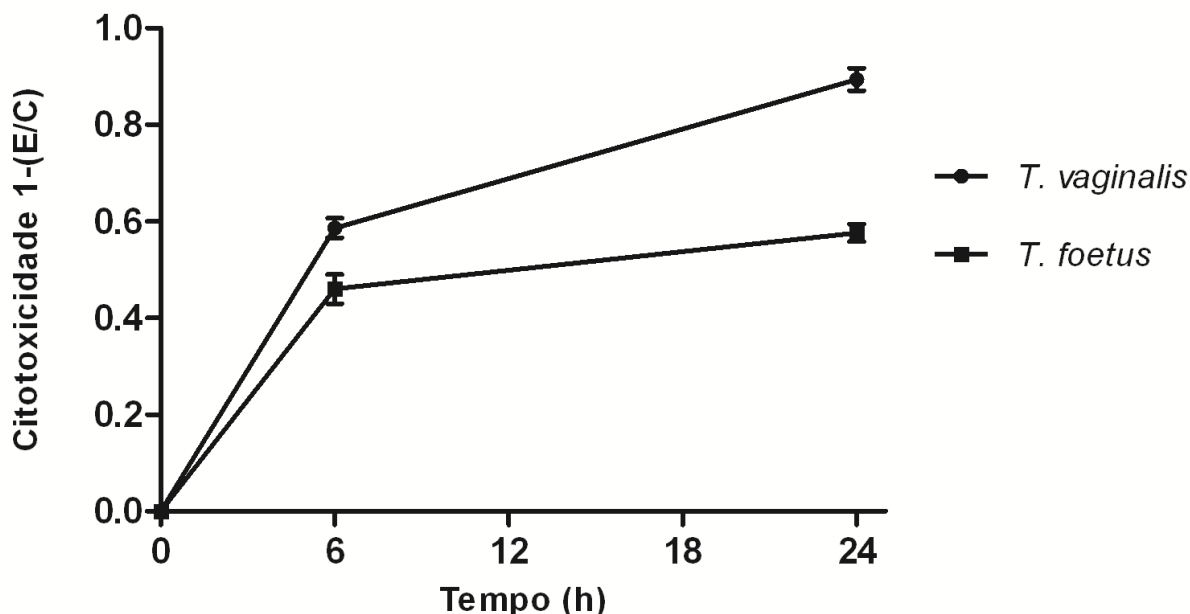
**Figura 11.** Microscopia eletrônica de transmissão da interação de *T. vaginalis* (TV) (a-b) e *T. foetus* (TF) (c- d) com células musculares (CM). Em (a) pode-se observar a adesão de *T. vaginalis* (TV) à célula-alvo muscular (CM). Nota-se uma célula muscular com sinais de apoptose, como condensação da cromatina (b, Cr) e intensa vacuolização citoplasmática (b, \*). Na interação com *T. foetus*, o parasito foi visto aderido simultaneamente a até três células musculares (c); em uma delas parece que o parasito retira um pedaço da membrana (c, setas). Em d, detalhes do parasito endocitando um pedaço da membrana da célula hospedeira (cabeças de seta).





**Figura 12.** Análise do potencial de membrana mitocondrial durante a interação de *T. vaginalis* e *T. foetus* com células musculares, usando o marcador fluorescente JC-1. A fluorescência verde indica a perda do potencial de membrana e a fluorescência vermelha define a existência do potencial de membrana. A infecção por tricomonas promoveu a perda do potencial de membrana mitocondrial dos mioblastos após 6 horas de interação com ambos parasitos. Nas figuras **a-c**, células musculares-controlre, na ausência de parasitos. As células-alvo foram infectadas com *T. vaginalis* (**d-f**) e *T. foetus* (**g-i**). Note a intensa marcação verde quando os parasitos estão presentes.





**Figura 13:** Gráfico exibindo a citotoxicidade exercida por *T. foetus* e *T. vaginalis* quando em interação com a cultura L6 de células musculares. Foi realizado ensaio de espectrofotometria usando a técnica do cristal violeta. Os danos causados nas monocamadas de mioblastos foram observados depois da incubação com os parasitos. Note que ambos parasitos apresentaram citotoxicidade. Note que as *T. vaginalis* foram mais citotóxicas que as *T. foetus*, destruindo quase 100% da monocamada em 24h. 1- (E/C), onde **E** representa as medidas das amostras experimentais e **C** as amostras controle.

### 3.4. Interação de tricomonadídeos com diversos modelos celulares

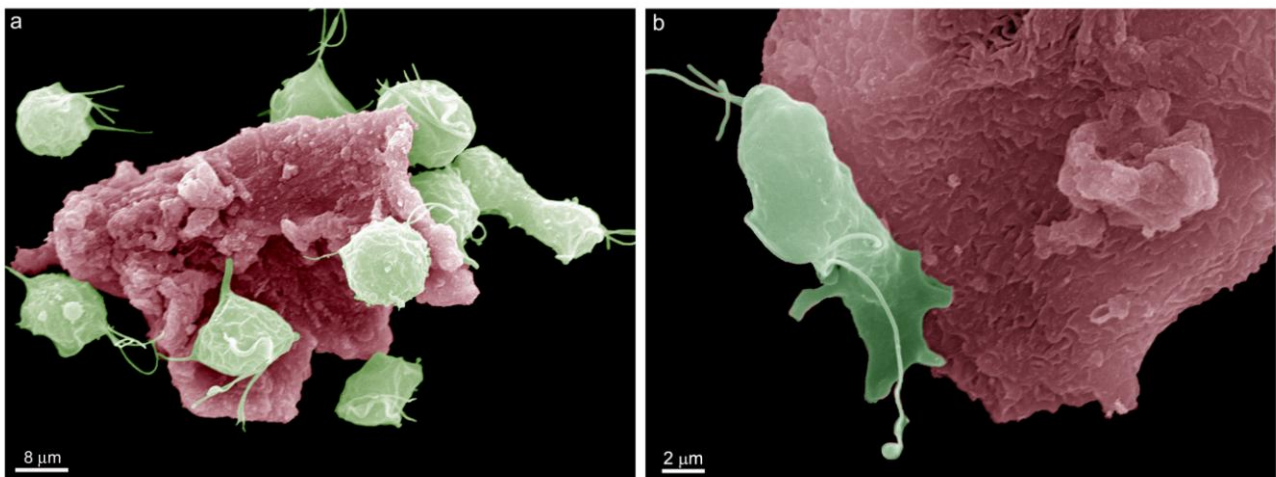
Com o intuito de adicionar mais elementos ao conhecimento sobre a interação de tricomonas com células-hospedeiras, realizamos diversos ensaios de interação com células de organismos diferentes daqueles que *T. vaginalis* e *T. foetus* são conhecidos por provocar doenças. Recentemente, nosso grupo publicou um estudo mostrando que *T. vaginalis* pode interagir e ser mais citotóxica do que *T. foetus* em células epiteliais de oviduto bovino (Midlej *et al.*,2009). Para complementar este trabalho, que tem como objetivo desmistificar a idéia de que a interação seja espécie-específica, foi realizada a interação de *T. foetus* com células vaginais humanas, obtidas a partir da raspagem do epitélio vaginal de doadoras saudáveis. Por microscopia eletrônica de varredura foi possível observar que *T. foetus* interagiu com as células epiteliais vaginais humanas (Fig. 14). Apesar do nosso grupo já ter publicado a interação de *T. vaginalis* com células epiteliais de oviduto bovino,

um órgão encontrado na parte superior do trato genital bovino, foi feita interação de *T. vaginalis* com explantes retirados de vagina bovina. Os explantes foram co-incubados com *T. vaginalis* por até 3 dias e, surpreendentemente, não foi encontrado nenhum parasito aderido ao explante vaginal bovino. Devido à alta queratinização desse explante, supusemos que isto poderia ter impedido a adesão do parasito. Para verificar se as tricomonas teriam problemas de adesão à queratina foi realizada a interação com fragmentos de queratina, isolados da epiderme humana. Diferentemente do que foi encontrado na interação com explantes vaginais bovinos, ambas *T. vaginalis* e *T. foetus* aderiram aos fragmentos de queratina contrariando a idéia inicial de que a queratina impediria a interação (Fig. 15). Além da adesão, evidenciada por MEV, o material foi processado para MET, e a adesão de *T. foetus* foi novamente observada (Fig. 16a). Além disso, foi encontrado material endocitado dentro de vacúolos em *T. foetus* (Fig. 16b). A endocitose de queratina foi evidenciada na interação por *T. vaginalis* (Fig. 16c) e foram observados vacúolos com material endocitado (Fig. 16d). Para confirmar se os fragmentos aderidos aos parasitos bem como se os vacúolos endocíticos continham realmente queratina, foi feita imunofluorescência utilizando anticorpo anti-queratina. Nas imunomarcações foi encontrado resultado positivo para queratina, no qual *T. vaginalis* apresentou diversos fragmentos aderidos à superfície (Figs. 17a-c). Além disso, um pequeno fragmento de queratina foi visto endocitado (visão detalhada, Figs. 17a-c). A interação com *T. foetus* também mostrou que os fragmentos aderidos à membrana do parasito eram de queratina (Figs. 17c-d).

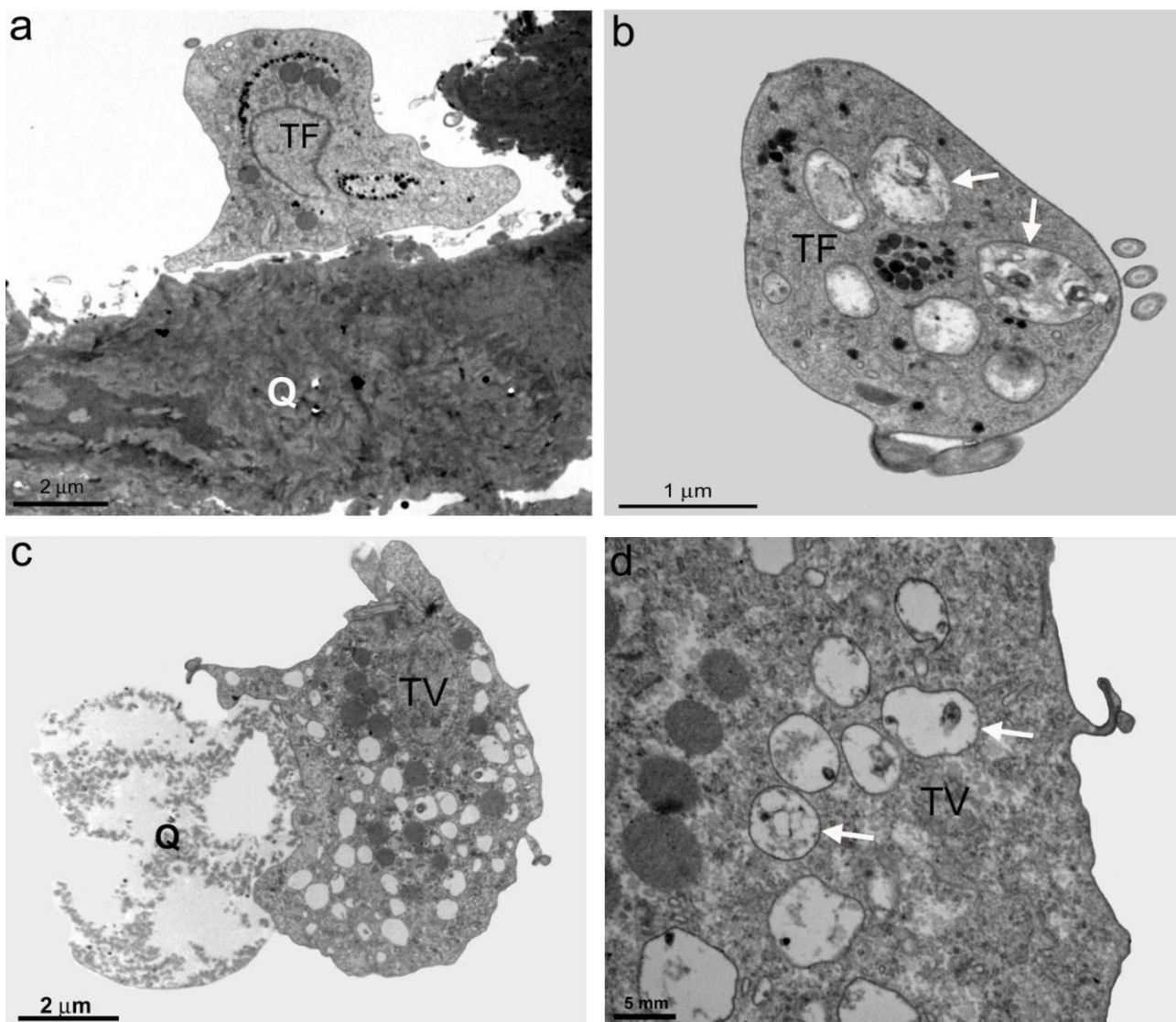
Outra dúvida presente baseia-se no fato de a viabilidade da célula hospedeira ser crucial para que haja interação. Como modelo de célula hospedeira foi utilizado a linhagem celular MDCK tratado com etanol 90% e posteriormente lavado por sete vezes com PBS para a retirada de todo etanol. Foi visto que os parasitos aderiram à monocamada, porém não conseguiram arrancá-la do substrato em que estava aderido. O ensaio de citotoxicidade também foi feito, porém a monocamada manteve-se intacta após a interação.



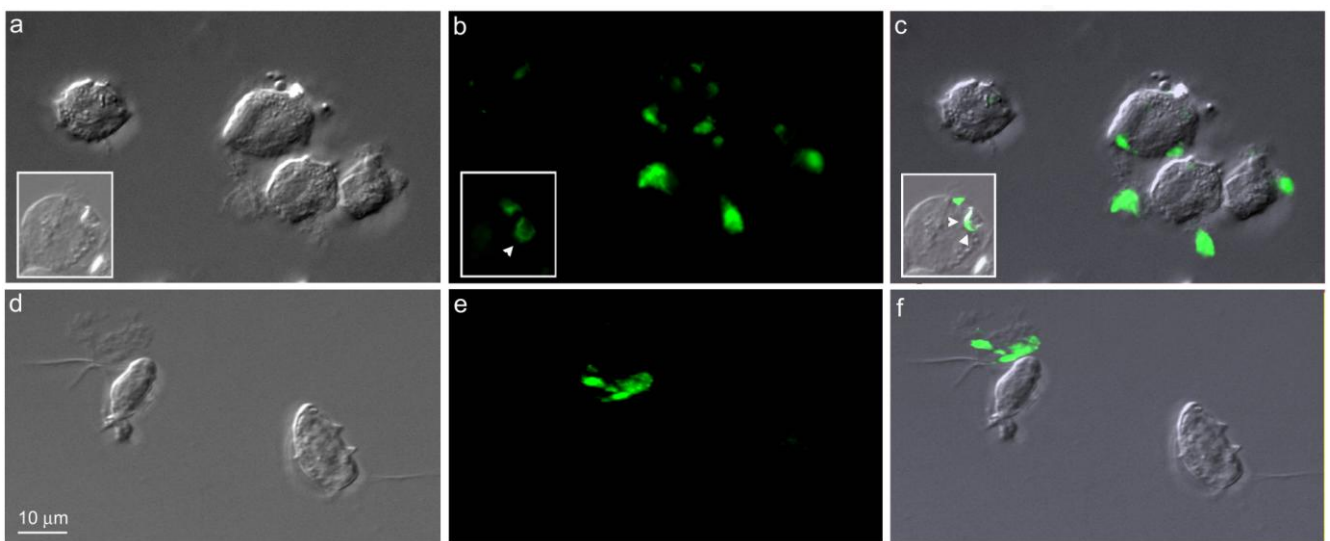
**Figura 14.** Micrografia eletrônica de varredura de *T. foetus* em interação com células vaginais humanas. Foi possível observar os parasitos (verde) fortemente aderidos à superfície das células vaginais (vermelho). Imagem colorida no programa Adobe Photoshop CS3.



**Figura 15.** Micrografia eletrônica de varredura da interação de tricomonas com fragmentos de queratina obtidos da epiderme humana. Note que tanto *T. vaginalis* (a) quanto *T. foetus* (b) aderiram à queratina.



**Figura 16.** Interação de *T. foetus* (a-b) e *T. vaginalis* (c-d) com fragmentos de queratina por MET. A adesão de *T. foetus* (TF) a um fragmento de queratina (Q) é observada em (a) e vacúolos com material endocitado são encontrados em (b). Nota-se que *T. vaginalis* também endocita os fragmentos de queratina (Q) em (c) e apresenta vacúolos com material endocitado (d).

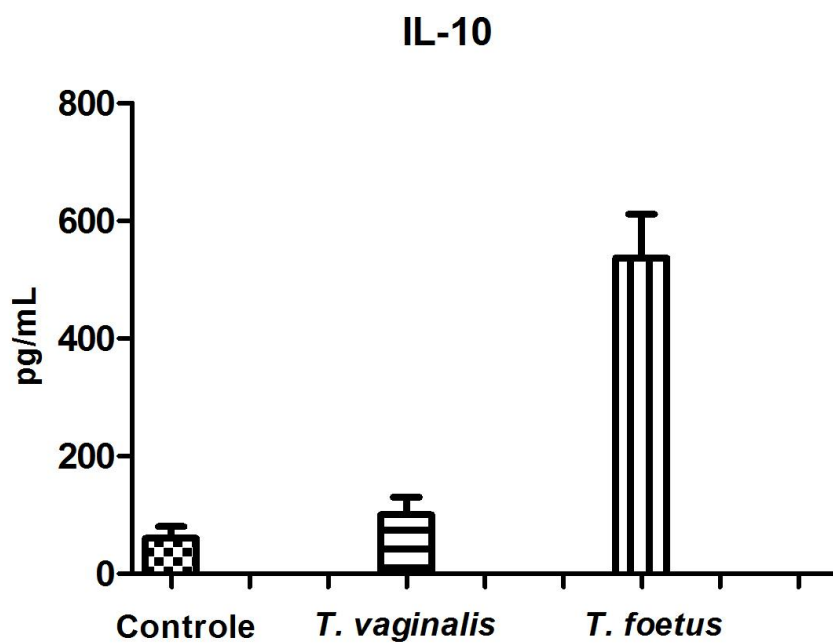


**Figura 17.** Interação de *T. vaginalis* (a-c) e *T. foetus* (d-f) com queratina marcada com o anticorpo monoclonal anti-queratina. Nota-se que os fragmentos aderidos a *T. vaginalis* (b-c) e *T. foetus* (e-f) possuem marcação positiva para queratina. Ainda é possível observar que um pedaço queratinizado é endocitado por *T. vaginalis* (a-c, visão detalhada, cabeças de seta).

### **3.5. Secreção de citocinas na interação de tricomonas com células epiteliais de oviduto bovino**

A atividade de *T. vaginalis* e *T. foetus* em estimular respostas imunes foi analisada com medidas de liberação de citocinas em uma cultura primária de células epiteliais de oviduto bovino. Estas células foram escolhidas como modelo de célula-alvo por ter apresentado um grande número de células secretoras, tal como em um estudo anterior (Midlej *et al.*, 2009). Para medir as citocinas liberadas tricomonas foram adicionadas a uma cultura epitelial por 12 horas e o sobrenadante coletado para a análise da possível liberação das citocinas IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL-1 $\beta$ . A interação com *T. vaginalis* mostrou um leve aumento na liberação de IL-10 em comparação com o controle (Fig. 18). Interessantemente, na interação com *T. foetus* houve um aumento de quase nove vezes na liberação de IL-10 em comparação com o controle. Já os ensaios para detecção das citocinas IL-8, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL-1 $\beta$  não apresentaram resultados positivos com ambos os parasitos e nem quando foi realizado o controle positivo com LPS bacteriano. O LPS é um antígeno não específico, presente nas bactérias, altamente reativo que é constantemente utilizado como controle positivo, em análises de detecção de moléculas inflamatórias, pois se trata de um potente ativador de liberação de moléculas inflamatórias em várias células hospedeiras.





**Figura 18.** Detecção da citocina IL-10 em sobrenadantes de experimentos controles e quando interação com *T. vaginalis* e *T. foetus*. Foi observado um leve aumento na liberação de citocinas quando *T. vaginalis* esteve presente. Diferentemente de *T. vaginalis*, os sobrenadantes de *T. foetus* apresentaram uma quantidade quase 9 vezes maior de citocinas.



## 4. Discussão

No presente trabalho, foi investigada a capacidade de *T. vaginalis* e *T. foetus* aderirem e infectarem células hospedeiras de diferentes origens. Os tipos celulares que podem ser infectados por tricomonas ainda não foram totalmente esclarecidos e os ensaios experimentais realizados até hoje utilizaram células epiteliais como modelo.

### 4.1. Tricomonas interagem com fibroblastos humanos e de camundongo

A tricomonose humana e bovina pode desencadear inúmeros sintomas que acreditamos que sejam consequência de danos causados a tecidos mais profundos que o epitelial, como os tecidos conjuntivos e musculares. A camada epitelial vaginal é bem espessa o que dificultaria o acesso dos parasitos aos tecidos mais profundos. No entanto, se os parasitos são capazes de alcançar o trato genital superior (Aburel *et al.*, 1957), como útero e ovidutos, que são compostos por uma camada epitelial única, esta barreira é mais simples de ser rompida propiciando aos parasitos penetrar em tecidos conjuntivos e musculares mais facilmente.

Estudos anteriores *in vitro* realizaram interação de uma cultura primária de fibroblastos humanos com tricomonas e concluíram que houve adesão, porém citotoxicidade reduzida (Alderete & Garza, 1985; Gilbert *et al.*, 2000). Um estudo recente usou camundongos para fazer ensaios de infecção *in vivo* e observou que *T. vaginalis* causava alterações em células do tecido conjuntivo (Escario *et al.*, 2009). No presente trabalho, foi obtida uma cultura primária de fibroblastos humanos e o mesmo ensaio de citotoxicidade com o cristal violeta

que foi utilizado por Alderete e colaboradores em tricomonas no ano de 1985 foi realizado, porém diferentemente do encontrado no estudo anterior, nosso grupo demonstrou uma alta citotoxicidade dos tricomonádídeos à monocamada de fibroblastos humanos, que foram destruídos eficientemente. Talvez a divergência de resultados encontrada em nosso trabalho e nos de Alderete e colaboradores (1985) e Gilbert e colaboradores (2000), tenha ocorrido devido às cepas utilizadas, pois atualmente sabe-se que diferentes cepas podem se comportar de maneiras distintas (Jesus *et al.* 2004). Além do ensaio de citotoxicidade que relatou a capacidade de *T. foetus* e *T. vaginalis* em arrancar as células hospedeiras do substrato, foi observado que os parasitos induziram o processo de morte celular, confirmado pela técnica do JC-1 que mede a viabilidade mitocondrial. Depois de constatada a capacidade dos parasitos interagirem com a cultura primária de fibroblastos humanos, a citotoxicidade das tricomonas foi comparada quando se utilizou linhagem 3T3 de fibroblastos de camundongo. Sinais de morte celular foram observados por MEV, como retração celular e “blebbings” de membrana. O marcador fluorescente JC-1 também mostrou que os parasitos foram capazes de induzir a morte de células da linhagem 3T3 de fibroblastos. Comparativamente, ambas *T. vaginalis* e *T. foetus* foram menos citotóxicas à linhagem 3T3 do que à cultura primária de fibroblastos humanos. No ensaio de citotoxicidade realizado, *T. foetus* tiveram citotoxicidade muito reduzida, em tempos de até 48 horas de interação. Como visto na técnica do TUNEL que detecta DNA fragmentado nas células hospedeiras, apenas *T. vaginalis* induziu apoptose na linhagem 3T3, em 12 horas. A menor agressividade dos parasitos pode ser atribuída ao fato dos fibroblastos 3T3 serem uma linhagem modificada geneticamente o que poderia

tê-la tornado mais resistente ao ataque dos parasitos. A interação foi realizada também com a linhagem L6 de mioblastos de ratos, pois se sabe que a camada muscular uterina é muito importante no processo de gestação e caso as tricomonas estejam presentes neste tecido, as consequências se tornam muito graves. As análises de MEV mostraram parasitos aderidos e redução do contato íntimo entre as células hospedeiras. As interações processadas para MET mostraram mioblastos com sinais morfológicos de morte celular e o momento em que *T. foetus* “belisca” a membrana da célula hospedeira. Assim como comprovado com os fibroblastos, a citotoxicidade exercida pelos parasitos nas células musculares foi confirmada pelos ensaios JC-1 e cristal violeta. Logo, é possível que as consequências que mulheres grávidas sofrem, tais como partos prematuros e infertilidade poderiam ser desencadeadas por danos na camada submucosa ou até mesmo a muscular do trato genital, já que os parasitos conseguem interagir com qualquer célula destes tecidos.

#### **4.2. Interação de tricomonas com monocamadas de diversas origens**

O presente estudo utilizou células oriundas de diversos tecidos como modelo para interação, sendo elas: explantes vaginais bovinos, células vaginais humanas, células queratinizadas da epiderme humana e a linhagem epitelial MDCK. O objetivo das interações foi estudar o reconhecimento e adesão de *T. foetus* e *T. vaginalis* a células de mamíferos. A primeira dúvida esclarecida foi o fato da adesão e reconhecimento não serem espécie-específicos. Foi verificado se *T. foetus* poderia interagir com células vaginais humanas e pôde-se observar o parasito bovino aderido a esse tipo celular. Em um trabalho anterior os pesquisadores interagiram *T. foetus* com uma

monocamada epitelial vaginal humana (Singh, *et al.*, 2000) e não observaram citotoxicidade de *T. foetus* a estas células. É possível que a discordância encontrada neste trabalho seja pelo fato de *T. foetus* ter menor agressividade quando comparada com *T. vaginalis*, que é capaz de arrancar uma monocamada aderida ao substrato rapidamente. Além de se tratar de um parasito que induz uma morte “silenciosa” e “limpa” por apoptose das células hospedeiras (Singh *et al.*, 2004; Midlej *et al.*, 2009). Os ensaios utilizados por Singh (2000) analisaram a capacidade de disrupção de *T. foetus* e a inibição da proliferação das células hospedeiras mas não a indução de apoptose em células humanas. A adesão e citotoxicidade de *T. vaginalis* em células de outros organismos já foi amplamente estudada e recentemente nosso grupo mostrou que *T. vaginalis* foi até mais citotóxica do que *T. foetus* quando em interação com células bovinas *in vitro* (Midlej & Benchimol, 2010). Tentamos verificar o dano que *T. vaginalis* provocaria em explantes vaginais bovinos, mas não conseguimos encontrar parasitos interagindo com os explantes, diferentemente do resultado encontrado no artigo supracitado, que utilizou células isoladas de oviduto bovino. Supusemos que o explante altamente queratinizado atrapalharia a adesão dos parasitos às células bovinas e assim, realizamos experimentos de interação utilizando frações de queratina epidérmica humana quando verificamos que tanto *T. foetus* e *T. vaginalis* interagem fortemente à queratina sendo capazes de até endocitar frações epidérmicas queratinizadas. Além disso, um estudo anterior havia demonstrado que *T. foetus* tem preferência pelas células queratinizadas vaginais bovinas (Corbeil *et al.*, 1989). Logo, com base nos resultados analisados, supõe-se ter havido algum fator desconhecido que atrapalhou a adesão dos

parasitos ao explante vaginal, talvez o parasito tenha preferência por colonizar uma região já fragilizada do tecido.

Outra dúvida é se a viabilidade das células hospedeiras seria imprescindível para a interação. Isso responderia se na interação *in vivo* as tricomonas somente interagem com as células viáveis do trato urogenital ou se ocorre uma colonização irrestrita dos tecidos infectados. A linhagem MDCK foi fixada com etanol antes da interação, lavada diversas vezes com PBS e, posteriormente, os parasitos foram adicionados. Quando a adesão dos parasitos à monocamada foi confirmada, ensaios de citotoxicidade com cristal violeta foram realizados para verificar se os parasitos iriam arrancar a monocamada aderida ao substrato. Ambos os parasitos não apresentaram citotoxicidade à monocamada de células fixadas com etanol, apesar de serem capazes de aderir. Confirmando um trabalho anterior (Alderete *et al.*, 1988) que interagiu *T. vaginalis* com monocamadas de células mortas por fixação com glutaraldeído e relatou que houve uma adesão ligeiramente maior quando se usou células hospedeiras fixadas do que a adesão a uma monocamada de células vivas (Alderete *et al.*, 1988).

#### **4.3. As tricomonas induzem a secreção de citocinas em células hospedeiras**

Muito tem se pesquisado sobre as respostas pró-inflamatórias induzidas por protozoários parasitos. Estudos *in vitro* de interação com *T. vaginalis* revelaram a liberação de IL-8 em neutrófilos humanos (Ryu *et al.*, 2004) e monócitos (Shaio *et al.*, 1995). Além disso, estes estudos observaram que a liberação de citocinas era dependente do fator de transcrição NF-κB. As

citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$  também foram liberadas por linfócitos murinos infectados por *T. vaginalis* (Kirch *et al* 2004) e macrófagos humanos secretaram TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 na presença dos parasitos (Han *et al.* 2009). É notório que as células de defesa supracitadas podem secretar diversas citocinas com o intuito de promover uma resposta inflamatória, no entanto sabe-se também que para que ocorra uma infecção deve existir uma sinalização por parte do tecido para que as células de defesa cheguem até o local em que invasor está presente, para que promovam a defesa do organismo. Devido a este fato, foi levantada a hipótese de que as células epiteliais também poderiam secretar citocinas para chamar o primeiro grupo de células do sistema imune. Com isso, no presente estudo, foram feitos ensaios *in vitro* de interação de células epiteliais de oviduto bovino com tricomonas, para a detecção de citocinas liberadas nos sobrenadantes de interação. Este modelo de cultura primária foi escolhido por apresentar um bom número de células secretoras (Midlej *et al.*, 2009). Foi encontrado um pequeno aumento na liberação de IL-10 quando a interação foi feita com *T. vaginalis*. Interessantemente, uma maior quantidade de citocinas IL-10 esteve presente nos sobrenadantes das interações com *T. foetus*. Níveis aumentados de IL-10 já foram encontrados previamente em células dendríticas infectadas com *T. vaginalis* (Scott *et al.*, 2005) e com macrófagos (Ryu *et al.*, 2009) IL-10 é uma importante citocina antiinflamatória secretada por uma grande variedade de células de defesa, tais como macrófagos, monócitos, linfócitos B células dendríticas e linfócitos T. A IL-10 possui efeitos imunomodulatórios e sua presença causa a supressão da liberação de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8 (Moore *et al.*, 2001). No presente estudo não foram encontrados níveis consideráveis das citocinas IL-8, TNF- $\alpha$ ,

TGF- $\beta$  e IL-1 $\beta$ . Uma hipótese levantada seria que a liberação destas citocinas possa ter sido suprimida pela presença de IL-10. Além disso, em um estudo anterior não se detectou a presença de TNF- $\alpha$  em sobrenadantes após a interação de *T. vaginalis* com células humanas (Fichorova *et al.*, 2006). A presença de IL-10 na interação com tricomonas poderia interferir no organismo hospedeiro na resolução da infecção, já que a presença desta citocina leva a uma diminuição drástica no número de células de defesa imunológica como as células dendríticas maduras (Atfeld *et al.*, 2010). Interessantemente, esta citocina também é liberada por células de defesa infectadas quando há infecção pelo vírus HIV, diminuindo o número de células dendríticas maduras e facilitando a infecção viral (Alter *et al.*, 2010). Este dado é relevante porque vários estudos mostram que indivíduos com tricomonas estão mais propensos a adquirir o HIV e umas das hipóteses para a maior propensão a este vírus seria a presença de IL-10 que ativada pelas tricomonas dificultaria o combate ao vírus. Nos experimentos com células bovinas apenas *T. foetus* induziu a liberação de IL-10, um dado semelhante foi encontrado por Fichorova e colaboradores (2006) que relatou que a liberação de citocinas é espécie-específica, quando apenas os lipofosfoglicanos de *T. vaginalis* induziram a liberação de IL-8 em células humanas e que *T. foetus* não induziu tal resposta. Portanto, com base nos resultados encontrados até aqui, a liberação de citocinas parece não ocorrer quando os parasitos bovinos são incubados com células humanas e o mesmo ocorre com o parasito humano em interação com células bovinas. Desta forma, nossos ensaios podem levar à conclusão de que a resposta das células hospedeiras à presença dos parasitos pode ser espécie-

específica, necessitando de um reconhecimento para a liberação de moléculas inflamatórias.



## 5. Conclusões

- *T. vaginalis* e *T. foetus* foram capazes de aderir e provocar morte celular nas culturas tanto de fibroblastos humanos como nos de camundongo e também nas células musculares, sugerindo que a infecção possa atingir tecidos não epiteliais
- Não há espécie-especificidade de *T. foetus*, uma vez que foi observado que estas células interagiram com células vaginais humanas
- A presença de queratina não impede a adesão de *T. foetus* e *T. vaginalis* em células epiteliais
- A viabilidade das células hospedeiras não é imprescindível durante a interação, visto que ambos os parasitos interagem com monocamadas de células mortas
- Há necessidade de um reconhecimento específico por parte das células hospedeiras em relação à produção de citocinas, uma vez que as células bovinas somente produziram IL-10 na presença de *T. foetus* e não do parasito humano *T. vaginalis*.

## 6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUREL, E., OLTET, NICULESCU, SUFRIN. (1957). Presence of *Trichomonas vaginalis* in the upper genital tract. **C. R. Soc. Fr. Gynecol.** v. 27 p. 409-413.
- 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., DEMEŚ, P., GOMBOSOVA, A., VALENT, M., FABUSOVÁ, M., JÁNOSKA, A., STEFANOVIC, J., ARROYO, R. (1988) Specific parasitism of purified vaginal epithelial cells by *Trichomonas vaginalis*. **Infect. Immun.** v. 56, p. 2558-2562.
- ALDERETE, J.F., GARZA, G.E. (1985) Specific nature of *Trichomonas vaginalis* parasitism of host cell surfaces. **Infect. Immun.** v. 50, p. 701-708.
- 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., LEHKER, M.W., ARROYO, R. (1995). The mechanisms and molecules involved in cytoadherence and pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. **Parasitol. Today**, v. 11. p.70-74.
- ALDERETE, J.F. & PEARLMAN, A. (1984). Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers. **Brit. J. Vener. Dis.**, v. 60, p. 99-105.
- 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.

- ALTER, G., KAVANAGH, D., RIHN, S., LUTEIJN, R., BROOKS, D., OLDSTONE, M., VAN LUNZEN, J., ALTFELD, M. (2010) IL-10 induces aberrant deletion of dendritic cells by natural killer cells in the context of HIV infection. **J. Clin. Invest.** v.120, p.1905-1913.
- 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 *Trichomonas foetus* in immunized and control heifers. **J. Parasitol.**, v. 82, p. 594-600.
- 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. & ALDERETE, J.F. (1992). Molecular bases of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. **Mol. Microbiol.**, v. 6, p. 853-862.
- ARROYO, R., GONZÁLEZ-ROBLES, A., MARTINEZ-PALOMO, A., ALDERETE, J.F. (1993). Signalling of *Trichomonas vaginalis* for ameboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence. **Mol. Microbiol.**, v. 7, p. 299-309.
- BARTLETT, W. (1947). Concept of Toxic Goiter. **Ann. Surg.**, v. 125, p. 566-571.
- BASTIDA-CORCUERA, F.D., OKUMURA, C.Y., COLOCOUSSI, A., JOHNSON, P.J., (2005). *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan mutants have reduced adherence and cytotoxicity to human ectocervical cells. **Eukaryot. Cell**, v.4, p.1951–1958.
- 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 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. (1988). *Tritrichomonas foetus*: freeze-fracture cytochemistry using polymyxin B. **Exp. Parasitol.**, v. 66, p. 35-43.
- 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., 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.

- .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.
- 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.
- 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 *Tricomonas 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 morphogénèse 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. & 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- CAUCI, S., CULHANE, J.F., (2007). Modulation of vaginal immune response among pregnant women with bacterial vaginosis by *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and yeast. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v.196, p.131–137.
- CHAMPNEY, W.S., CHITTUM, H.S., SAMUELS, R. (1992). Ribosomes from trichomonad protozoa have prokaryotic characteristics. **Int. J. Biochem.**, v. 24, p. 1125-1133.
- 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.

- CHANG, J.-H., PARK, J.-Y., KIM, S.K., (2006). Dependence on p38 MAPK signalling in the up-regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression in *Trichomonas vaginalis*-treated HeLa cells. **Immunology** v.118, p.164–70.
- 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-ulcerative 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.
- CROUCH, M.L., BENCHIMOL, M., ALDERETE, J.F. (2001) Binding of fibronectin by *Trichomonas vaginalis* is influenced by iron and calcium. **Microb Pathog**. v.31, p.131-144.
- DAHLGREN, S.S., GJERD, B., PETTERSEN, H.Y. (2007). First record of natural *Tritrichomonas foetus* infection of the feline uterus. **J. Small Anim. Pract.**, v. 48, p. 654-657.
- 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 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.
- 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.
- DIAMOND, L.S. (1957). The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. **J. Parasitol.**, v. 43, p. 488-490.
- DONNÉ, A. (1836). Animalcules observes dans lês matiè respurulentes et lê produit dès sécrétions dès organes gênitaux 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.
- 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.

- ESCARIO, A., GÓMEZ BARRIO, A., SIMONS DIEZ, B., ESCARIO, J.A. (2009). Immunohistochemical study of the vaginal inflammatory response in experimental trichomoniasis. **Acta Trop.**, v.114 p.22-30.
- FELLEISEN, R.S. (1999). Host-parasite interaction in bovine infection with *Tritrichomonas foetus*. **Microbes Infect.**, v. 1, p. 807-816.
- FICHOROVA, R.N., TRIFONOVA, R.T., GILBERT, R.O., COSTELLO, C.E., HAYES, G.R., LUCAS, J.J., *et al.*, (2006). *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan triggers a selective upregulation of cytokines by human female reproductive tract epithelial cells. **Infect. Immun.** v.74, p. 5773–5779.
- FIORI, P.L., RAPPELLI, P., ADDIS, M.F., SECHI, A., CAPPUCCINELLI. (1996). *Trichomonas vaginalis* haemolysis: pH regulates a contact and independent mechanism based on pore-forming proteins. **Microbial. Pathogenesis.**, v. 20, p. 109–118.
- 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 in the interaction of *Trichomonas vaginalis* with human vaginal epithelial cells. **Parasitol. Res.**, v. 81, p. 213-220.
- 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.
- 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.**, v. 68, p. 4200-4206.

- GONZALÉS-ROBLES, A., LAZARO-HALLER, A., ESPINOSA-CASTELLANO, M., ANAYA-VELAZQUEZ, F., MARTINEZ-PALOMO, A. (1995). *Trichomonas vaginalis*: ultrastructural bases of the cytophatic effect. **J. Euk. Microb.**, v. 42, p. 641-651.
- GRANGER, B.L. & WARWOOD, S.J. (1996). Rapid internalization and degradation of surface-bound antibodies by *Tritrichomonas 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.
- HAN, I.H., GOO, S.Y., PARK, S.J., HWANG, S.J., KIM, Y.S., YANG, M.S., AHN, M.H., RYU, J.S. (2009) Proinflammatory cytokine and nitric oxide production by human macrophages stimulated with *Trichomonas vaginalis*. **Korean. J. Parasitol.** V.47, p.205-212.
- 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.
- 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, pp. 155-212.
- HONIGBERG, M.B., BRUGEROLLE, G. (1990). Structure. In: Honigberg B.M. (Ed.), *Trichomonads parasitic in humans*, Springer-Verlag, New York, pp. 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, VANNIER-SANTOS, M.A., BRITTO, C., GODEFROY, P., SILVA-FILHO, F.C., PINHEIRO, A.A.S., ROCHA-AZEVEDO, B., LOPES, A.H.C.S., 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. 369-77.
- 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.
- KASSEM H.H., MAJOURD O.A. (2006) Trichomoniasis among women with vaginal discharge in Benghazi city, Libya. **Egypt. Soc. Parasitol.**, v. 36, p.1007-1016.
- KHARSANY, A. B., HOUSEN, 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.
- KIRBY, B. (1951). Observation of the trichomonad flagellates of the reproductive organs of cattle. **J. Parasitol.**, v. 37, p. 445-459.
- KIRCH, A.K., AGOSSOU, A., BANLA, M., HOFFMANN, W.H., SCHULZ-KEY, H. SOBOSLAY, P.T. (2004) Parasite-specific antibody and cytokine profiles in newborns from *Plasmodium falciparum* and *Entamoeba histolytica/ E. dispar*-infected mothers. **Pediat Allergy Immunol** v.15, p.133–141.
- KISSINGER, P., AMEDEE, A., CLARK, R.A., DUMESTRE, J., THEALL, K.P., MYERS, L., HAGENSEE, M.E., FARLEY, T.A., MARTIN, D.H. (2009) *Trichomonas vaginalis* treatment reduces vaginal HIV-1 shedding. **Sex. Transm. Dis.**, v 36 p.11-16.
- KRIEGER, J.N., RAVDIN, J., REIN, M.F. (1985). Contact dependent cytopathogenic mechanisms of *Trichomonas vaginalis*. **Infect. Immun.**, v. 50, p. 768–770.
- KRIEGER, J.N. (1990). Trichomoniasis. In: Warren KS & Mahmoud AAF (Ed), Tropical and Geographical Medicine. **McGraw-Hill**, New York, p. 358-365.
- 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.

- LEHKER, M.W. & SWEENEY, D. (1999). Trichomonads invasion of the mucous layer requires adhesions, mucinases, and motility. **Sex. Transm. Infect.**, v. 75, p. 231-238.
- 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. 245-53.
- 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.
- 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.
- 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.

- MIDDLEJ, V., VILELA, R., DIAS, A.B., BENCHIMOL, M. (2009). Cytophatic effects of *Tritrichomonas foetus* on bovine oviduct cells. **Vet. Parasitol.**, v.165, p.216-230.
- MIDDLEJ, V. & BENCHIMOL, M. (2010). *Trichomonas vaginalis* Kills and eats – evidence for phagocytic activity as a cytophatic effect. **Parasitology**, v.137, p. 65-76.
- 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.
- MOORE, K.W., DE WAAL MALEFYT, R., COFFMAN, R.F., O’GARRA, A. (2001) Interleukin – 10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.** v.19 p. 683-765.
- MÜLLER, M. (1993). The hydrogenosome. **J. Gen. Microbiol.**, v. 139, p. 2879-2889.
- 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. (2007). Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. **Biol. Cell**, v. 99, p. 87-101
- 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., 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.
- 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.
- 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, und klinische bedeutung der beim sporadischem abortus des rindes vorkommenden Trichomonaden. **Zentralbl. Bakteriol.**, v. 108, p. 103-118.
- 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.
- RYU, J.S., KANG, J.H., JUNG, S.Y., SHIN, M.H., KIM, J.M., PARK, H., *et al.*, (2004). Production of interleukin-8 by human neutrophils stimulated with *Trichomonas vaginalis*. **Infect. Immun.** v.72, p.1326–32.
- SCOTT, K., MANUNTA, M., GERMAIN, C., SMITH, P., JONES, M., MITCHELL, P., DESSI, D., BRANIGAN, BAMFORD, K., LECHLER, R.I., FIORI, P.L., FOSTER, G.R., LOMBARDI, G. (2005) Qualitatively distinct patterns of cytokines are released by human dendritic cells in response to different pathogens. **Immunology** v.116 p.245-54.
- 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.
- SHAIO, M.F., LIN, P.R., LIU, J.Y., YANG, K.D., (1995). Generation of interleukin-8 from human monocytes in response to *Trichomonas vaginalis* stimulation. **Infect. Immun.** v. 63, p.3864–70.
- 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., 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. & 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.

- SIMHAN, H.N., ANDERSON, B.L., KROHN, M.A., HEINE, R.P., MARTINEZ DE TEJADA, B., LANDERS, D.V., *et al.*, (2007). Host immune consequences of asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection in pregnancy. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v.196 p.51–55.
- 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., BEACH, D.H. LINDMARK, D. G., COSTELLO, C. E. (1994). Identification of the lipid moiety and further characterization of the novel lipophosphoglycan-like glycoconjugates of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 309, p. 273–280
- 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.
- 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.
- 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.
- TODARO, G.J., GREEN, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. **J. Cell Biol.** v.17, p.299-313.
- TOLBERT MK, GOOKIN J. (2009). *Tritrichomonas foetus*: A new agent of feline diarrhea. **Compend Contin Educ Vet.**, v. 31, p.374-381.
- TURNER, G. & MULLER, M. (1983). Failure to detect extranuclear DNA in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **J. Parasitol.**, v. 69, p. 234-236.
- VAN DER POL, B. (2007) *Trichomonas vaginalis* infection: the most prevalent nonviral sexually transmitted infection receives the least public health attention. **Clin. Infect. Dis.** v.44 p. 23-25.
- VISCOGLIOSI, E., PHILIPPE, H., BAROIN, A., PERASSO, R., BRUGEROLLE, G. (1993) Phylogeny of trichomonads based on partial sequences of large subunit rRNA and on cladistic analysis of morphological data. **J. Eukaryot. Microbiol.** v.40 p. 411-421.
- WALTER, I. (1995). Culture of bovine oviduct epithelial cells (BOEC). **Ant. Rec.**, v.243, p. 347-356.
- WASSERHEIT, 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 *Tritichomonas foetus* – induced colitis in domestic cats. **Vet. Pathol.**, v. 42, p. 797-804.

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

# 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](#)