ARTÍCULO ORIGINAL

Adherencia de Trichomonas muris in vitro

CLAUDIA GABRIELA ECHENIQUE* y HORTENSIA MARÍA MAGARÓ*

ADHERENCE OF *Trichomonas muris* IN VITRO

*Microorganisms adherence depends on the microorganism, on the epithelial cells and on environmental factors. The objective was to study the action of metronidazole, CO₂ atmosphere and pH on the adherence of **Trichomonas muris** to buccal epithelial cells. The epithelial cells were obtained by hysopping the inner faces of a healthy donor's cheeks. The cells were placed with 1,5 ml of PBS (100 cells / ml). **T. muris** obtained from the faecal matter of adult Rockland mice, were cultured in TYI - S -33 medium supplemented with bile and antibiotics, having a replication every 48 hours. Gibbons and van Houte technique was employed with some modifications. **T. muris** adhered to 100 epithelial cells, were counted. The assay was carried out with 0,1 mg metronidazole and added to PBS in a CO₂ atmosphere, incubating the tubes at 37° C during 60 minutes with the following pH values: 3,5,7 and 10. 10% of **T. muris** adhered with metronidazole and 7% with CO₂. At pH 3 they were dead, to pH 5 and 7, 25% adhered and to pH 10, adhered 13%. At pH 7, 37°C, in CO₂ atmosphere, 27% of **T. muris** adhered to epithelial cells.*

Key words: *Trichomonas muris*, protozoan, metronidazole.

INTRODUCCIÓN

Un proceso infeccioso surge como consecuencia del encuentro e interacción entre un microorganismo, con una capacidad invasiva y agresiva determinada, que llamamos virulencia y un hospedero con un conjunto de barreras y mecanismos internos, naturales o adquiridos de protección frente a la invasión microbiana.

Los microorganismos ejercen su virulencia mediante toxinas, enzimas proteolíticas, adherencia celular, mecanismos inmunológicos o inducción a resistencias. La adherencia microbiana se considera del todo esencial para la expresión del potencial de patogenicidad ya que implica el reconocimiento de las células del hospedero por medio de las adhesinas, moléculas

presentes en la superficie del microorganismo y la existencia de receptores a nivel de las células del hospedero que se denominan ligandos¹.

La adherencia de microorganismos a superficies biológicas es un importante paso en el proceso de colonización e infección de membranas animales por algunos organismos. Ella impide a las células que sufren ese ataque, realizar las funciones de secreción, excreción, alimentación, etc. A su vez, el microorganismo se beneficia por tener mayor disponibilidad de substratos para su supervivencia, constituyendo éste un importante factor de patogenicidad. El fenómeno de adherencia depende del microorganismo, de las células epiteliales y de factores ambientales².

El objetivo del presente trabajo fue estudiar

* Area Parasitología. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531. Rosario. 2000. República Argentina.

E-mail: cgechenique@yahoo.com.ar

E-mail: hmagaro@yahoo.com.ar

la acción de la temperatura, pH, atmósfera de CO₂ y el efecto del metronidazol sobre la adherencia de *Trichomonas muris* a células epiteliales bucales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las células epiteliales se obtuvieron por hisopado de la cara interna de las mejillas de un dador sano. Se colocaron en tubos de centrifuga con 1,5 ml de PBS para lograr un concentración de 100 cél/ml.

Las *T. muris* se obtuvieron de heces de ratones Rockland adultos machos y fueron cultivadas en medio de TYI-S-33 suplementado con bilis, repicándose cada 48 h.

Para la prueba de adherencia se siguió la técnica de Gibbons y van Houte⁷, con algunas modificaciones.

Una concentración de 1 x 10⁵ *T. muris*/ml, se incubó con 100 células epiteliales en 1 ml. de medio de cultivo a 37°C durante 60 minutos en agitación constante. El mismo ensayo se repitió a temperatura ambiente (15-20°). Luego se filtró

con papel Whatman N°1. De esa manera son eliminadas las *T. muris* no adheridas a las células. El material adherido al papel se traspasó a un portaobjeto y se tiñó con May Grünwald Giemsa. Se contaron las *T. muris* adheridas a 100 células epiteliales.

El ensayo con metronidazol se realizó de la misma manera pero agregando 0,1 mg de metronidazol (cantidad subinhibitoria) al PBS.

Se repitió el ensayo de la misma manera, incubando los tubos a 37°C, durante 60 minutos, en atmósfera de CO₂; a su vez se realizó la misma técnica con los siguientes valores de pH: 3, 5, 7 y 10, usando HCl e NaOH 1M.

RESULTADOS

En la Tabla 1 figura el número de *T. muris* adheridas a 100 células epiteliales, a dos temperaturas distintas, con y sin metronidazol.

En la Tabla 2 se observa el número de *T. muris* adheridas a 100 células epiteliales, incubadas a 37°C y a pH: 3, 5, 7,10 con y sin atmósfera de CO₂.

En la Tabla 3 se muestra el número de *T. muris* adheridas a 100 células epiteliales,

Tabla 1. Número de *Trichomonas muris* adheridas a 100 células epiteliales con y sin metronidazol a dos temperaturas distintas

N° de <i>T. muris</i> adheridas / 100 CEB		
Droga Temperatura	Con metronidazol	Sin metronidazol
37°C	29	10
	30	10
	27	8
	27	6
	25	10
	26	8
X	27	13
15-20°C	24	4
	25	5
	26	6
	23	4
	26	8
	25	6
X	25	6

Referencias: CEB: células epiteliales bucales; x = Valores promedio de 6 determinaciones realizadas en diferentes días.

Tabla 2. Número de *Trichomonas muris* adheridas a 100 células epiteliales adistintos pH con y sin atmósfera de CO₂

N° de <i>T. muris</i> adheridas/ 100 CEB				
pH CO ₂	3	5	7	10
Con	lisis	26	29	13
		28	25	12
		24	27	14
CO ₂	lisis	23	30	12
		25	27	14
		25	27	13
Sin CO ₂	lisis	25	28	13
		22	24	10
		19	25	12
X		21	22	9
		18	23	13
		20	26	10
		20	26	10
		20	25	11
		20	25	11

Referencias: CEB: células epiteliales bucales; x = Valores promedio de 6 determinaciones realizadas en diferentes días.

incubadas a 37°C, pH 7, con y sin atmósfera de CO₂ y metronidazol.

DISCUSIÓN

Los microorganismos expresan su potencial patógeno por producción de toxinas, enzimas proteolíticas, adherencia a células, etc. Entre los mecanismos generales de los parásitos citados como causa de enfermedad, se menciona la acción mecánica directa de los mismos o el efecto de sustancias tóxicas secretadas sobre cultivos celulares.

La adherencia microbiana se considera del todo esencial para la expresión del potencial patógeno, implicando el reconocimiento de las células del hospedero por la adhesinas, moléculas presentes en la superficie del microorganismo y la presencia de ligandos en las células del hospedero. La existencia de ligandos especiales para el reconocimiento de las células del hospedador podría explicar el efecto citotóxico.^{1,3}

El fenómeno de adherencia de microorganismos a células epiteliales depende de varios

factores, entre los que se encuentran: temperatura, pH, atmósfera de CO₂, acción de drogas, como también del agente en estudio y de las células epiteliales.

A partir de la Tabla 1, habiéndose cumplido los supuestos de normalidad e igualdad de variancias, se realizó un Análisis de la Variancia (ANOVA) para el número de *T. muris* adheridas a 100 células epiteliales, a dos temperaturas distintas, con y sin metronidazol. Se encontró que la interacción entre ambas condiciones (temperatura y droga) no es estadísticamente significativa. Al agregar metronidazol, se obtienen menores valores de la variable en estudio, para ambas temperaturas consideradas. El tratamiento que provoca mayores adherencias es el que consiste en 37°C de temperatura y sin metronidazol ($p < 0,02$).

En la Tabla 2 nuevamente se comprobó el cumplimiento de los supuestos necesarios para aplicar la técnica paramétrica. En consecuencia, se realizó un Análisis de la Variancia, resultando no significativa la interacción entre el pH y la presencia de atmósfera de CO₂. Pero sí son significativos los efectos de cada factor individualmente ($p = \sim 0$). Se obtienen mayores valores de la variable número de *T. muris* adheridas a 100 células epiteliales con atmósfera de CO₂ (debido al metabolismo del parásito que es anaeróbico o aerotolerante), 4 y con el valor intermedio de pH usado 5 y 7.

La Tabla 3 muestra los resultados del estudio de la adherencia manteniendo constantes dos variables: temperatura y pH, con metronidazol y atmósfera de CO₂. Habiéndose cumplido los supuestos necesarios, se analizaron los datos mediante Análisis de la Variancia. Se encontró una interacción significativa entre ambos factores, presencia de CO₂ y de metronidazol, ($p = \sim 0$). En atmósfera de CO₂, se obtienen mayores adherencias sin metronidazol, mientras que con metronidazol solamente la adherencia es mayor sin atmósfera de CO₂.

El metronidazol (5 nitroimidazol) penetra en el protozoo por un proceso de difusión pasiva y una vez dentro de la célula su grupo nitro es reducido a un metabolito citotóxico que reacciona con el DNA interrumpiendo la síntesis de ácidos nucleicos, lo que produce la muerte del organismo^{3,8,9}.

Se han citado varios factores que afectan el mecanismo de acción de los 5 nitroimidazoles,

Tabla 3. Número de *Trichomonas muris* adheridas a 100 células epiteliales incubadas a 37°C, pH 7, con y atmósfera de CO₂ y metronidazol

N° de <i>T. muris</i> adheridas / 100 CEB		
Droga atm. de CO ₂	Sin metronidazol	Con metronidazol
Sí	29	6
	26	7
	25	9
	30	8
	24	6
	27	7
X	27	7
	24	10
	25	12
No	23	9
	26	10
	25	9
	25	11
X	25	10

Referencias: CEB: células epiteliales bucales; x = Valores promedio de 6 determinaciones realizadas en diferentes días.

como es la presencia de O₂, que a una determinada presión parcial actúa como detoxificante, reoxidando al grupo nitró para regenerar el compuesto inicial, lo que retardaría la entrada al interior de la célula de más fármaco⁵. Esto explicaría la mayor adherencia que se presenta con metronidazol sin CO₂.

El efecto de la temperatura y el pH sobre la adherencia de *T. muris* es mayor a 37° C y pH 7⁶, como sucede con bacterias y levaduras.

La acción conjunta del metronidazol y atmósfera de CO₂ reduce considerablemente la adherencia de *T. muris* a células epiteliales.

El tratamiento que produce mayores adherencias es con atmósfera de CO₂ y sin metronidazol.

RESUMEN

La adherencia de microorganismos a las células depende del microorganismo, de las células epiteliales y de factores ambientales. El objetivo de este trabajo fue estudiar la acción del metronidazol, atmósfera de CO₂ y pH sobre la adherencia de *Trichomonas muris* a células epiteliales bucales. Las células epiteliales se extrajeron por un hisopado de la cara interna de las mejillas de un dador sano, colocándose en 1,5 ml de PBS (100 células/ml) *T. muris*, obtenida de heces de ratones Rockland adultos, se cultivó en medio TYI-S-33 suplementado con bilis y antibióticos, repicándose cada 48 h.

En la adherencia se utilizó la técnica de Gibbons y van Houte, modificada, contándose las *T. muris* adheridas a 100 células epiteliales. Se realizó con metronidazol agregando 0,1 mg

de metronidazol al PBS; en atmósfera de CO₂ incubando a 37°C, durante 60 minutos, y a valores de pH: 3, 5, 7 y 10. El 10 % de *T. muris* adhirieron con metronidazol y 7% con CO₂. A pH 3 se lisaron; a pH 5 y 7 adhirieron el 25% y 13% a pH 10. A pH 7, 37°C y en atmósfera de CO₂, el 27% de *T. muris* adhirieron a las células epiteliales.

REFERENCIAS

- 1.- TORRES-RODRÍGUEZ J M, CARCELLER A. Factores de patogenicidad en *Candida*. Rev Iberoam Micol 1993; 52-7.
- 2.- SANDIN R L, ROGERS A L, BENEKE E S, FERNÁNDEZ R I. Influence of mucosal cell origin on the *in vitro* adherence of *Candida albicans*. Are mucosal cells from different sources equivalent? Mycopathology 1987; 98: 111-9.
- 3.- SAN MARTÍN DURÁN M L. Avances en Parasitología - Protozoología. 1992. Universidad de Santiago de Compostela, 121-42.
- 4.- DOCAMPO R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. Chem Biol Inter-actions 1990; 73: 1-27.
- 5.- PÉREZ-RAYES E, KALYANARAMAN B, MASON R P. The reductive metabolism of metronidazole and ornidazole by aerobic liver microsomes. Mol Pharmac 1980; 17: 239-44.
- 6.- BIASOLI M S, TOSELLO M E, BOTTAI H, MAGARÓ H M. Efecto de la temperatura y el pH en la adherencia de *Candida albicans* *in vitro*. Rev Iberoam Micol 1999; 16: 46-9.
- 7.- GIBBONS R J, VAN HOUTE J. Bacterial adherence in oral microbiol ecology. Ann Rev Microbiol 1975; 29: 19-44.
- 8.- MÜLLER M. Action of clinically utilized 5-nitroimidazoles on microorganisms. Scand J Infect Dis (Suppl) 1981; 26-31.
- 9.- GARCÍA L S, BRUCKNER D A. Diagnostic Medical Parasitology. Fourth Edition. ASM PRESS. Washington, D.C. 2001.pág. 120-31.