

Revisão sistemática da interação *in vitro* do parasito patogênico humano *Trichomonas vaginalis* com células hospedeiras

Matheus Santos Rabetine¹ e Victor Midlej^{1,*}

¹Universidade Santa Úrsula, Rua Fernando Ferrari, 75 – Botafogo - CEP: 22231-040. Rio de Janeiro, Brasil.

*Autor correspondente: victor.midlej@usu.edu.br

RESUMO:

O protozoário *Trichomonas vaginalis* é o agente causador da tricomoníase, infecção no trato urogenital humano, sendo a IST não viral mais prevalente. Este trabalho apresenta uma revisão sistemática da interação de *T. vaginalis* com células hospedeiras a partir de um viés ultraestrutural *in vitro*. O tema foi escolhido devido a importância deste parasito que infecta 180 milhões de pessoas por ano e é capaz de gerar sequelas nos hospedeiros, como o aumento em até seis vezes a predisposição para infecção pelo vírus HIV. Para a realização deste trabalho foram determinadas sequências de palavras-chave, as quais foram utilizadas para pesquisas em repositórios como Pubmed, Scielo e Medline. Os resultados analisados apontaram a necessidade de adesão do parasito sobre célula-alvo para estabelecer os efeitos citotóxicos, gerar danos e abrir passagem para outros patógenos oportunistas. Além disso, o parasito pode se associar com outros organismos, aumentando sua citotoxicidade o que evidencia respostas das células hospedeiras como a necrose. Esses dados mostram que tricomonas é um parasito tão versátil quanto agressivo, podendo infectar células de diversas linhagens. Os efeitos da tricomoníase podem gerar morbidades de grande impacto para a saúde pública, por isso esta patologia necessita de mais atenção.

Palavras-Chave: *T. vaginalis*, célula hospedeira, citotoxicidade, ultraestrutura, interação

ABSTRACT:

The protozoan *Trichomonas vaginalis* is the causative agent of trichomoniasis, an infection in the human urogenital tract, with the most prevalent non-viral STI. This work presents a systematic review of the interaction of *T. vaginalis* with host cells from an *in vitro* ultrastructural view. The theme was chosen due to the importance of this

parasite, which infects 180 million people a year and is capable of generating sequelae in the hosts, such as an increase in up to six times the predisposition to infection by the HIV virus. To carry out this work, sequences of keywords were determined, which were used for research in repositories such as Pubmed, Scielo and Medline. The resulting results showed the need for the parasite to adhere to the target cell to establish cytotoxic effects, generate damage and open the way to other opportunistic pathogens. Furthermore, the parasite can associate with other organisms, causing the lysis of host cells and their offspring to necrosis more easily, due to the increase in their cytotoxicity caused by this association. These data show that trichomonas is a parasite that is as versatile as it is aggressive, and it can infect cells of different strains. The effects of trichomoniasis can generate morbidities with a great impact on public health, which is why this pathology requires more attention.

Keywords: T. vaginalis, host cell, cytotoxicity, ultrastructure, interaction

1. Introdução

O protozoário *Trichomonas vaginalis* (Donné, 1836) é o agente causador da tricomoníase, infecção no trato urogenital humano, sendo a Infecção Sexualmente Transmissível (IST) não viral mais prevalente (Petrin *et al.* 1998). As infecções podem ser assintomáticas ou altamente inflamatórias de acordo com fatores associados com o hospedeiro e a citotoxicidade da cepa (Nievas *et al.*, 2017). A descoberta que a infecção gerada por *T. vaginalis* também está associada a outras condições como câncer de próstata e cervical, maior probabilidade de infecção por HIV e condições adversas da gravidez aumentou o interesse em tratar pacientes portadores da infecção (Edwards *et al.*, 2014).

A mulher é quem mais sofre com a doença, podendo haver consequências como corrimento mefítico, comichão, inflamação genital e infecção aguda na região pélvica (Secor, 2012), o que se intensifica no período menstrual devido a presença do ferro, que é um elemento fundamental no crescimento e na sobrevivência do protozoário, desempenhando um papel crítico na interação com o hospedeiro, modulando expressões de fatores de citotoxicidade neste parasito (Batista de Jesus *et al.*, 2007). As mulheres infectadas que se encontram em processo gestacional possuem maior predisposição à

um rompimento antecipado da placenta, parto prematuro e gestação de bebês abaixo do peso (Hirt, 2013). Nos homens, *T. vaginalis* geralmente é assintomática, utilizando-os apenas como hospedeiro portador, mas em alguns casos pode gerar inflamação na uretra, na próstata e causar infertilidade (Seo *et al.*, 2014).

Uma estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS) é que mais da metade dos 180 milhões de novos casos de infecção por *T. vaginalis* a cada ano, ocorrem em homens (OMS, 2011). Em 2017, havia 357.2 milhões de novos casos globais de quatro doenças com cura no mundo, clamídia (130.8 milhões), gonorreia (78.2 milhões), sífilis (5.5 milhões) e entre elas a tricomoníase, com 142.6 milhões de casos, dentre essas, é a IST com mais casos no mundo (Unemo *et al.*, 2017). As diferenças marcantes na incidência e prevalência da infecção por *T. vaginalis* é a diferença biológica entre homens e mulheres, já mencionadas acima (Poole & McClelland, 2014). Foi relatada em 1999 apenas uma incidência geral de 54 casos por 1000 pessoas-ano (OMS, 2001). No Brasil a quantidade de novos casos de tricomoníase é ainda mais preocupante, podendo chegar a aproximadamente 4,3 milhões por ano (Von Glehn, 2016). Entre as gestantes, pesquisas tem apontado predominância de 7,7% (Miranda *et al.* 2014), sendo no Rio de Janeiro de 3,7% (Gatti *et al.* 2017).

O protozoário *T. vaginalis* exibe apenas a forma de trofozoíto sem demonstrar estado cístico (Petrin *et al.* 1998). Os quatro flagelos anteriores são responsáveis pela sua mobilidade e um flagelo posterior que forma a borda externa da membrana ondulante. As tricomonas possuem um feixe de microtúbulos que passa através da célula ao longo de seu eixo anterior-posterior, para o meio extracelular, denominado axóstilo que participa na locomoção, na adesão celular e na cariocinese durante a mitose (Ribeiro *et al.* 2000). *T. vaginalis* também possui hidrogenossomo, uma estrutura análoga às mitocôndrias que têm como função a produção de energia (Sogin, 1997). Sem mitocôndrias e com estruturas peculiares como os hidrogenossomos, o sistema pelta-axostilar e a costa, *T. vaginalis* é um interessante modelo para estudo ultraestrutural (Benchimol *et al.* 2004).

O parasito inicia o processo de adesão, em seguida aumenta a superfície de contato com o tecido hospedeiro e começa a fagocitar, estabelecendo assim os efeitos citotóxicos, que tem relação com o quadro clínico apresentado pelo portador da patologia (Arroyo *et al.*, 1993). A interação entre o parasito e a célula hospedeira é

primordial para o estabelecimento da infecção (Arroyo *et al.*, 1993). Outros tricomonádídeos como *Trichomonas tenax* tem a capacidade de se comportar como *T. vaginalis*. Esse comportamento foi observado quando há a interação com células hospedeiras como células Renais Caninas *Madin-Darby* (MDCK) e células de linhagem de tumor cervical (HeLa) (Ribeiro *et al.* 2015). A *T. tenax* pode se mostrar mais agressiva que algumas cepas de *T. vaginalis*, conseguindo destruir muito mais rápido culturas *in vitro* de células MDCK (Ribeiro *et al.* 2015). A *Tritrichomonas foetus* tem a capacidade de se aderir firmemente com sua região posterior onde se encontra o axóstilo. A sua interação com células hospedeiras bovinas provoca sinais de destruição mais tardiamente. Os danos gerados por *T. foetus* mostraram sinais de morte por apoptose como borbulhamento de membrana, cromatina condensada, vacuolização intensa e necrose celular (Midlej *et al.*, 2009).

Por tudo que foi mencionado acima, se faz necessário compreender a patologia da infecção, principalmente no que se refere ao impacto causado pelo parasito no tecido humano. O parasito tem a capacidade de modificar o complexo juncional dos tecidos e promover a ruptura dos mesmos. Além disso, *T. vaginalis* também possui o artifício de se associar a outros organismos, o que pode fazer com que se torne mais agressivo e conferir maior resistência à medicamentos (Vancini *et al.*, 2007). Dessa forma o parasito pode gerar mais danos ao tecido hospedeiro, facilitar a colonização e dificultar o tratamento e conseqüentemente a recuperação do paciente (Vancini *et al.*, 2007)

Para evidenciar os mecanismos usados pelo parasito durante a infecção, o objetivo desse trabalho foi fazer uma revisão sistemática de dados acerca da interação de *T. vaginalis* com células hospedeiras a partir de um viés ultraestrutural.

2. Metodologia

O método utilizado para a realização deste trabalho consistiu na determinação de sequências de palavras-chave, em inglês, devido ao padrão das respectivas revistas onde foram publicados os trabalhos. Foram utilizadas essas três sequências de palavras a seguir: (1) “*T. vaginalis, host cell, cytotoxicity, ultrastructure*”; (2) “*Trichomonas vaginalis, host cell, cytotoxicity*”; (3) “*Trichomonas vaginalis, interaction, ultrastructure*”. É importante ressaltar que não foi estipulado nenhum critério de tempo para a seleção dos artigos e foram analisados somente estudos originais.

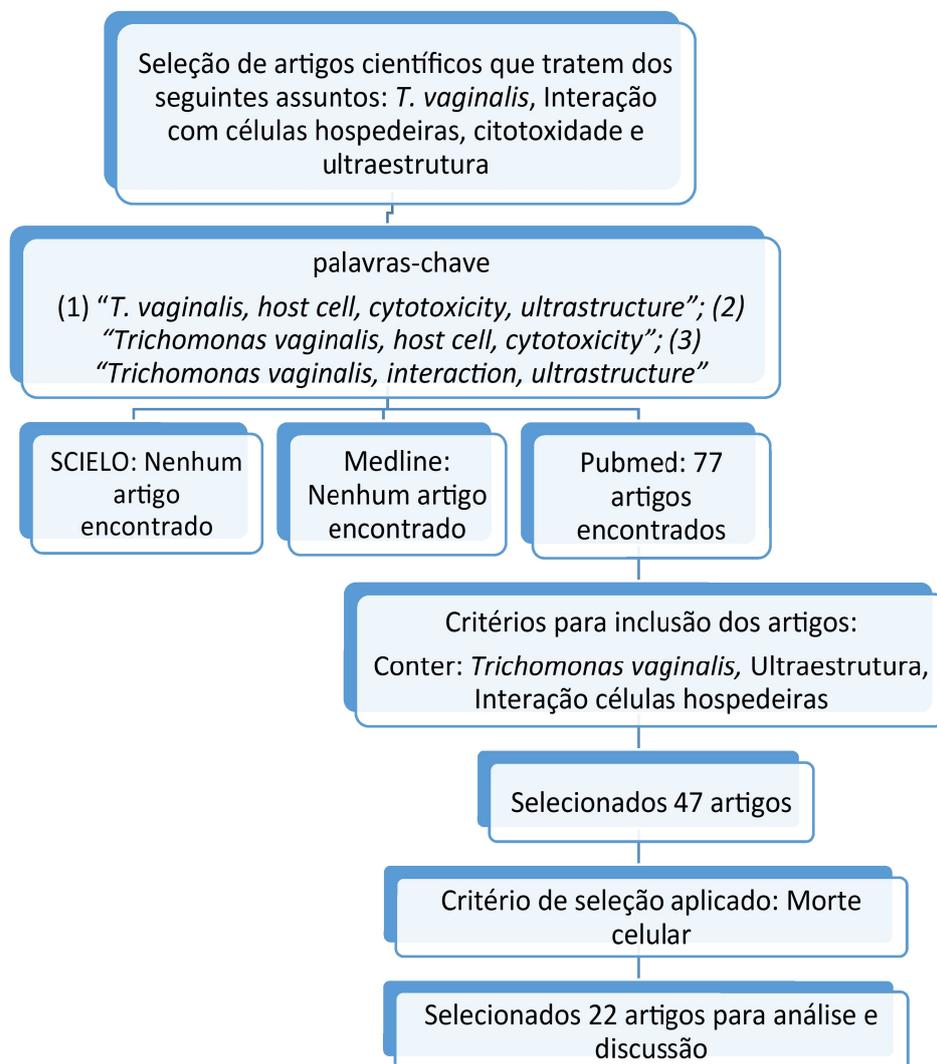


Figura 1. Fluxograma da linha de raciocínio tomada para as pesquisas feitas nos repositórios a partir das palavras-chave: O primeiro quadrante mostra a determinação das palavras-chave e dos assuntos abordados pelos artigos que seriam inclusos neste trabalho. Em seguida, a aplicação das palavras-chave nos 3 repositórios de busca, onde só um deles gerou resultado, o Pubmed. Ao aplicar as 3 seqüências de palavras-chave "*T. vaginalis, host cell, cytotoxicity, ultrastructure*"; "*Trichomonas vaginalis, host cell, cytotoxicity*"; "*Trichomonas vaginalis, interaction, ultrastructure*" foram encontrados 77 trabalhos, nos quais aplicamos os critérios de inclusão e exclusão. Nestes critérios, os artigos deveriam abordar todos os assuntos ao mesmo tempo. Assim, ao aplicar os critérios, restaram ainda 47 trabalhos. Portanto, adicionamos um último critério, o de morte celular. Foram excluídos mais 25 artigos onde restaram 22 utilizados para a realização deste trabalho.

2.1 Repositório

As pesquisas com as palavras-chave acima foram realizadas em três repositórios sendo eles: Pubmed, Scielo e Medline. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> ; <https://www.scielo.org/> ; www.medline.com/ .

2.2 Compilação de dados

Após as pesquisas nos repositórios, foram organizados os resumos de todos os artigos disponíveis usando o software *Wordpad* (Microsoft, EUA), esses foram divididos pelas palavras-chave utilizadas em cada pesquisa. Após isso os trabalhos encontrados foram dispostos em uma tabela criada a partir do *software* Excel (Microsoft, EUA) e divididos a partir das palavras-chave usadas, número de artigos encontrados e pelo assunto discutido.

2.3 Filtragem dos artigos

A filtragem dos artigos encontrados foi feita a partir de um critério de inclusão e exclusão: foi determinado que apenas trabalhos que tratassem a respeito de *T. vaginalis*, interação com célula hospedeira, ultraestrutura e morte celular seriam analisados. Foram construídas tabelas apresentando apenas os trabalhos que atenderam aos critérios estipulados e um gráfico apresentando os tipos de células hospedeiras utilizadas nos artigos selecionados. Tanto o gráfico quanto a tabela foram realizadas utilizando o *software* Excel (Microsoft, EUA).

2.4 Levantamento de dados

O levantamento de dados para análise foi baseado nos seguintes assuntos: (1) mecanismos de ação de *T. vaginalis*; (2) resposta da célula hospedeira e (3) resultados ultraestruturais da interação.

3. Resultados

Após a análise dos 77 artigos foram selecionados 22 que abordaram a temática a respeito da *T. vaginalis* e seus artifícios para o estabelecimento da patologia e citotoxicidade do ponto de vista ultraestrutural. Esses trabalhos foram publicados nas mais diversas revistas gerando impacto nos âmbitos da medicina humana e veterinária,

microbiologia e parasitologia. Isto é medido pelo “Fator de impacto” das revistas, sendo um método de revisão sistemática para avaliar a importância de periódicos científicos em suas respectivas áreas, uma medida que reflete o número médio de citações de artigos científicos publicados em determinado período. Além disso, das publicações analisadas, a maioria (10) são do período de 2010 a 2020, outras (6) do período de 2000 a 2010 e (6) mais antigas, 1988 e 1998, abrangendo perspectivas, conhecimento e experiência de diversas partes do mundo e relativamente recentes. Do total, 9 artigos do Brasil, 3 da Coreia, 2 dos EUA, 2 da Austrália, 2 do México, 1 da China 1 das Filipinas, 1 da Nova Zelândia e 1 da Dinamarca mostrando a força dos pesquisadores nacionais no tema estudado (Tabela 1).

Na figura 2, o gráfico representa a quantidade e tipos de células hospedeiras utilizadas nesses estudos. Essa análise mostra um resultado bem variado onde foram usadas pelo menos 18 células de linhagens diferentes, tendo sido realizados ensaios com células de carcinoma do colo do útero e câncer cervical, gengiva, próstata, espermatozoides, fibroblastos, células urogenitais, células pulmonares, células do oviduto bovino, ectocervicais, musculares, células renais e hemácias. Essa diversidade é importante para compreender se existe uma especificidade de interação do parasito, o quanto ele pode ser agressivo, como ocorre sua interação com os mais distintos tipos de tecidos humanos e também como diferentes hospedeiros respondem à infecção pelo parasito, além de possíveis danos permanentes em variados tecidos ao hospedeiro. Já na Fig. 3 são mostrados os mecanismos utilizados por *T. vaginalis* durante o processo de infecção celular e quantas vezes esses mecanismos foram vistos nos trabalhos analisados nesta revisão, é importante esclarecer que os mecanismos relatados nessa revisão estão relacionados aos artigos analisados e não se trata de um padrão ou frequência da utilização destes tais mecanismos pelo parasito. Os autores mostraram o parasito aderindo às células hospedeiras, exibindo uma forma amebóide para aumentar a superfície de contato, podendo liberar exossomos, que são vesículas utilizadas na comunicação e sinalização intercelular com diâmetros variando de 100 a 1000 nm e diferentes formas (Nievas *et al.*, 2017). Além disso, as tricomonas podem projetar sua membrana para fagocitar partes das células hospedeiras, podem se associar com outros organismos e seus efeitos citotóxicos podem levar a célula hospedeira a morte (Vancini *et al.*, 2007).

Também foi analisado como as células hospedeiras respondem à infecção pelas tricomonas (Fig. 4). Encontramos sete tipos de respostas diferentes provocadas pela interação com o parasito em questão, sendo estas, microvilosidades retraídas (19%), bolhas de membranas (19%), vacuolização (16%), ruptura de membrana (15%), condensação da cromatina (8%), descolamento da monocamada (19%) e descolamento da membrana basal (4%). O parasito também consegue deformar as células hospedeiras e como resultado de sua interação induzir a geração de bolhas em sua membrana, vacuolização e condensação da cromatina, características iminentes de morte celular por apoptose (Midlej *et al.*, 2009). As tricomonas podem ser muito agressivas e levar as células hospedeiras a morte de formas distintas: (1) apoptose, uma morte controlada, dependente de energia que pode afetar indivíduos ou grupos de células sem extravasamento do conteúdo intracelular (kerr *et al.*, 1972). (2) Necrose, é a morte das células ou tecidos de forma descontrolada causados por uma lesão onde há extravasamento do conteúdo celular e geralmente afeta outras células (kerr *et al.*, 1972). (3) Autofagia, é um processo de autodegradação celular a partir de enzimas dos lisossomos (Shintani e Klionsky., 2004), porém não foi citada em nenhum dos trabalhos utilizados.

Apresentamos nas figuras 5 e 6 micrografias do processo de adesão e alguns mecanismos de ação exercidos pelo parasito. A partir da microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Fig. 5 e Fig. 6a) é possível entender o processo de adesão do parasito e uma interação mais íntima com as células epiteliais vaginais humanas. Em células que não foram expostas a tricomonas (Fig. 5a) observa-se uma cultura confluenta, apresentando abundante vilosidades, com alguns locais de separação, possivelmente provocados pelo processamento da técnica de varredura. A infecção pelo parasito (Figs. 5b-d) mostra um epitélio mais lesionado, com perda de várias características observadas numa cultura controle (Fig. 5a). É possível notar que os parasitos se organizam em conjunto (*clusters*) na adesão à célula hospedeira (Figs. 5b-d), aumentando a plasticidade celular, onde assume a morfologia ameboide quando em contato com o epitélio vaginal (Figs. 5c-d). Danos severos às células vaginais são observados na figura 5d, uma possível necrose na célula hospedeira é evidenciada quando infectada por *T. vaginalis*.

Danos ultraestruturais após infecção do parasito em células vaginais são mostrados por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Fig. 6). Facilmente identificamos características de atividade fagocítica do parasito em relação à célula hospedeira (Fig. 6). O processo de emissão de pseudópodes em direção a célula vaginal é observado por MEV (Fig. 6a) e por MET (Fig. 6b). Evidenciamos o processo fagocítico na figura 6b, onde é possível verificar uma parte do citoplasma da célula vaginais sendo incorporada pelo parasito. Danos severos também são evidenciados por MET (Figs. 6c-d), a morte por necrose da cultura vaginal é mostrada na figura 6c. Conseguimos evidenciar o momento exato onde o parasito interage com a célula hospedeira e a mesma tem sua membrana rompida e o material citoplasmático extravasado (Fig. 6d).

Há na literatura trabalhos que abordam a interação de *T. vaginalis* com algumas células alvo diferentes, sendo essas células da gengiva humana (Ribeiro *et al.*, 2015), células do oviduto bovino (BOECs) (Midlej *et al.*, 2009) e células vaginais epiteliais humanas (hVECs) (Vancini *et al.*, 2007). Essa interação ocorre em diferentes circunstâncias com os parasitos co-incubados com outros organismos como no caso *Mycoplasma hominis* (Vancini *et al.*, 2007), ou o parasito isolado sem outro organismo presente. Os trabalhos mostram a capacidade da tricomonas ser agressiva e causar grandes danos como a retração celular, bolhas de membrana, cromatina condensada dentro do núcleo, vacuolização e figuras semelhantes a mielina são estas características morfológicas indicadoras de morte celular (Midlej *et al.*, 2009).

T. vaginalis interage com células HeLa durante 1, 3 e 5 min sendo observado o processo de adesão e transformação da forma piriforme para sua forma citotóxica ou forma ameboide (Arroyo *et al.*, 1993). Já no trabalho de Ribeiro e colaboradores (2015),

a tricomonas aparece fagocitando partes da célula MDCK e seus vacúolos estão preenchidos com fragmentos destas células.

Tabela 1: Artigos selecionados para revisão sistemática. Os artigos abaixo foram selecionados a partir dos critérios de inclusão e exclusão descritos na metodologia e utilizados para análise da interação parasito-hospedeiro

	Artigos	Revistas	Fator de impacto	ano de publicação	local de publicação
--	---------	----------	------------------	-------------------	---------------------

1	Cytopathic effects of <i>Trichomonas foetus</i> on bovine oviduct cells	Veterinary Parasitology	2.009	2009	Brasil
2	Electron microscopy of <i>Trichomonas vaginalis</i> Donn�: interaction with vaginal epithelium in human trichomoniasis	Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica	2.026	2009	Dinamarca
3	<i>Trichomonas vaginalis</i> harboring <i>Mycoplasma hominis</i> increases in vitro cytopathogenicity	European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases	3.267	2007	Brasil
4	Is <i>Trichomonas tenax</i> a parasite or commensal?	Protist	1.989	2015	Brasil
5	An electron microscope study of the interaction between <i>Trichomonas vaginalis</i> and epithelial cells of the human amnion membrane	The Journal Parasitology Research	1.843	1995	Austrália
6	<i>Trichomonas vaginalis</i> kills and eat - evidence for phagocytic activity as cytophatic effect	Parasitology	2.783	2009	Brasil
7	Vaginal dysbiotic bacteria act as pathobionts of the protozoal pathogen <i>Trichomonas vaginalis</i>	Microbial Pathogenesis	2.914	2020	Nova Zel�ndia
8	<i>Trichomonas vaginalis</i> contact-dependent cytolysis of epithelial cells	Infection and Immunity	3.256	2013	EUA

9	Observation of membrane fusion on the interaction of <i>Trichomonas vaginalis</i> with human vaginal epithelial cells	Parasitology Research	1.641	1998	Brasil
10	Morphologic study of the effect of iron on pseudocyst formation in <i>Trichomonas vaginalis</i> and its interaction with human epithelial cells	Mem Inst Oswaldo Cruz	1.592	2017	Brasil
11	<i>Trichomonas vaginalis</i> induces cytopathic effect on human lung alveolar basal carcinoma epithelial cell line A549	Experimental Parasitology	1.690	2014	Filipinas
12	Signalling of <i>Trichomonas vaginalis</i> for amoeboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence	Molecular Microbiology	3.418	1993	EUA
13	Interaction between <i>Trichomonas vaginalis</i> and the prostate epithelium	Korean j Parasitology	1.411	2017	Coréia
14	Adherence of <i>Trichomonas vaginalis</i> to SiHa cells is inhibited by <i>diphenyleneiodonium</i>	microorganisms	4.167	2020	Coréia
15	the patogenesis of human cervical epithelium cells induced by interacting with <i>Trichomonas vaginalis</i>	PLoS One	2.740	2015	China
16	An electron microscope study of the interaction between <i>Trichomonas vaginalis</i> and epithelial cells of the human amnion membrane	Parasitology Research	1.641	1996	Austrália

17	HeLa cell nucleus, a source of thymidine for <i>Trichomonas vaginalis</i> growing in vitro	The International Journal of Biochemistry & Cell Biology	3.673	2005	México
18	The interaction of <i>Trichomonas vaginalis</i> and <i>Tritrichomonas foetus</i> with epithelial cells in vitro	Cell Structure and Function	2.429	1988	Brasil
19	<i>Trichomonas</i> adhere and phagocytose sperm cells: adhesion seems to be a prominent stage during interaction	Parasitology Research	1.641	2007	Brasil
20	<i>Trichomonas vaginalis</i> : ultrastructural bases of the cytopathic effect	The Journal of Eukaryotic Microbiology	2.143	1995	México
21	The effect of iron on <i>Trichomonas vaginalis</i> TvCP2: a cysteine proteinase found in vaginal secretions of trichomoniasis patients	Parasitology	2.783	2020	México
22	<i>Trichomonas vaginalis</i> and <i>Tritrichomonas foetus</i> : interaction with fibroblasts and muscle cells - new insights into parasite-mediated host cell cytotoxicity	Mem Inst Oswaldo Cruz	1.592	2012	Brasil

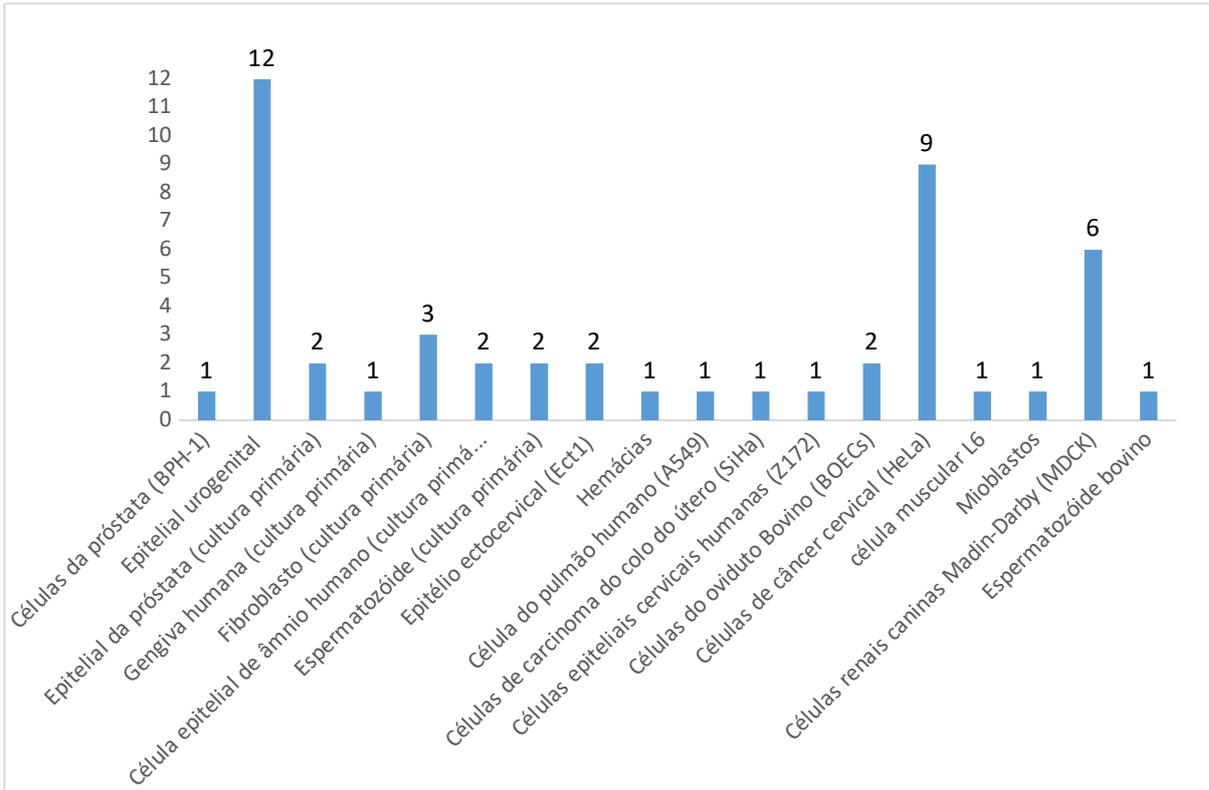


Figura 2. Gráfico de frequência de utilização de células como modelo de estudo. As células hospedeiras presentes no gráfico foram mencionadas nos artigos da tabela 1. Este gráfico mostra os tipos celulares utilizados e a frequência que essas células apareceram nos artigos utilizados.

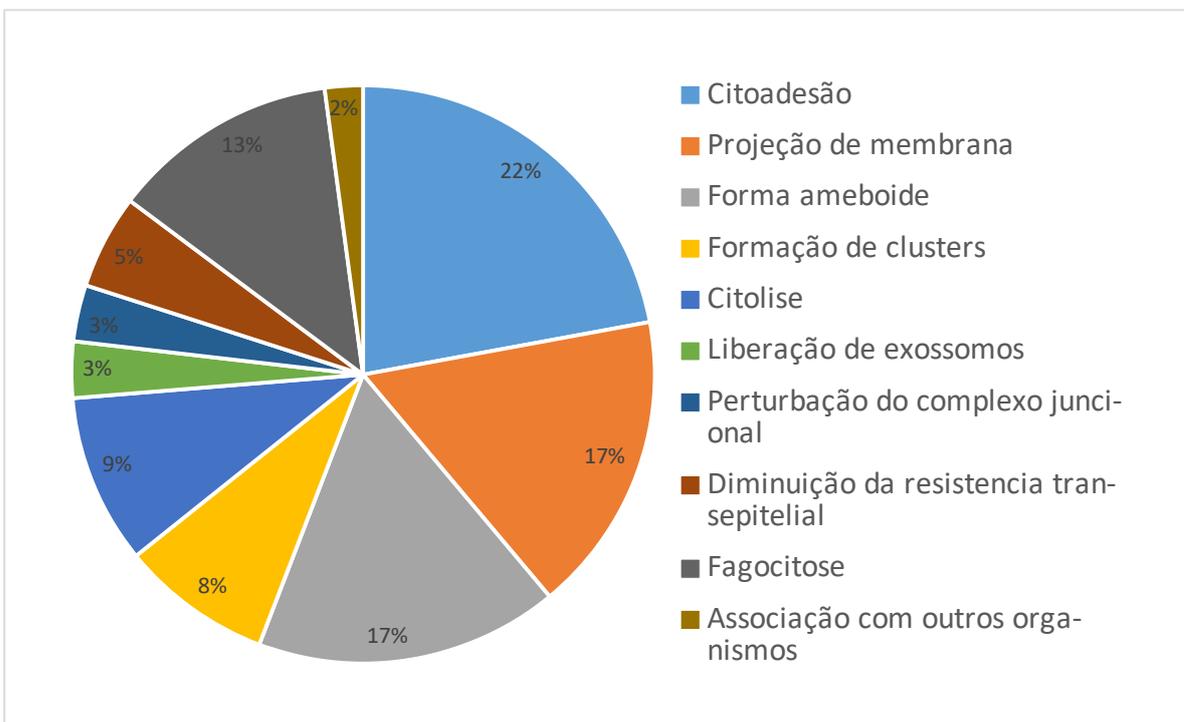


Figura 3. Mecanismos de ação utilizados por *T. vaginalis* relatados nos trabalhos analisados. Este gráfico apresenta os diversos mecanismos citotóxicos utilizados pelo parasito durante interação com diferentes tipos de células hospedeiras. Além disso, também é analisado a proporção que esses mecanismos foram observados nos artigos citados na tabela 1.

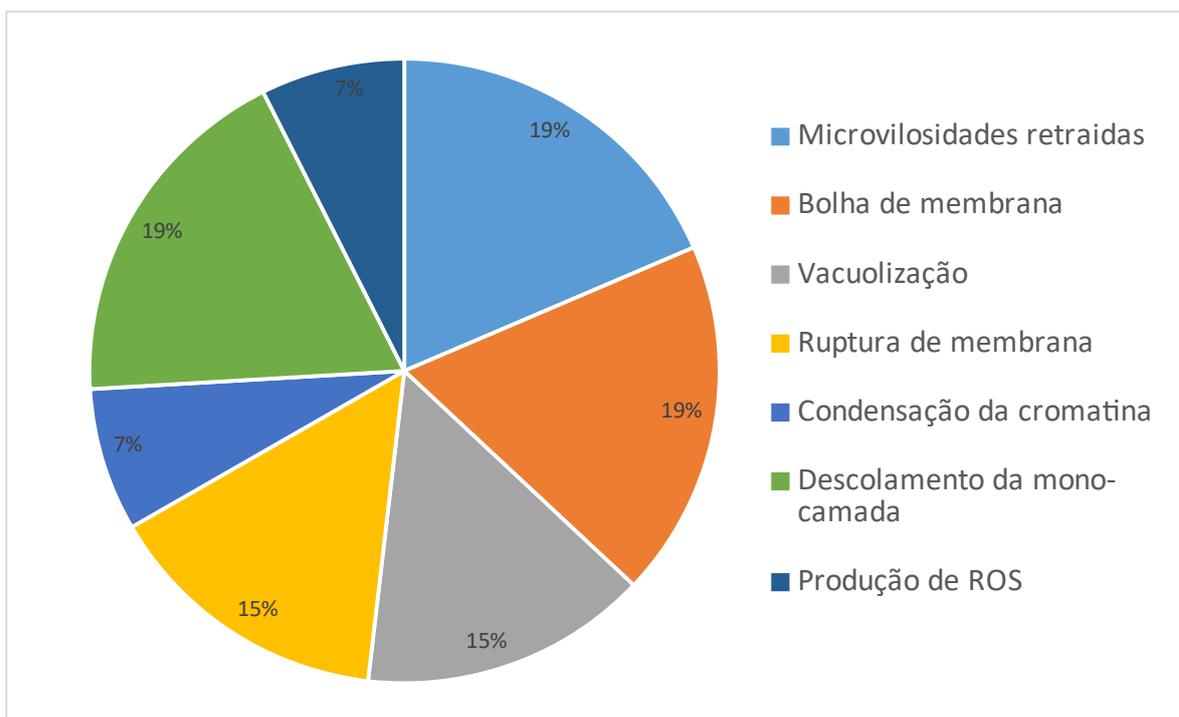


Figura 4. Resposta das células hospedeiras após infecção por *T. vaginalis* relatados nos trabalhos analisados. Esse gráfico apresenta como as células hospedeiras são afetadas e respondem à infecção por *T. vaginalis* e a proporção que essas respostas foram observadas.

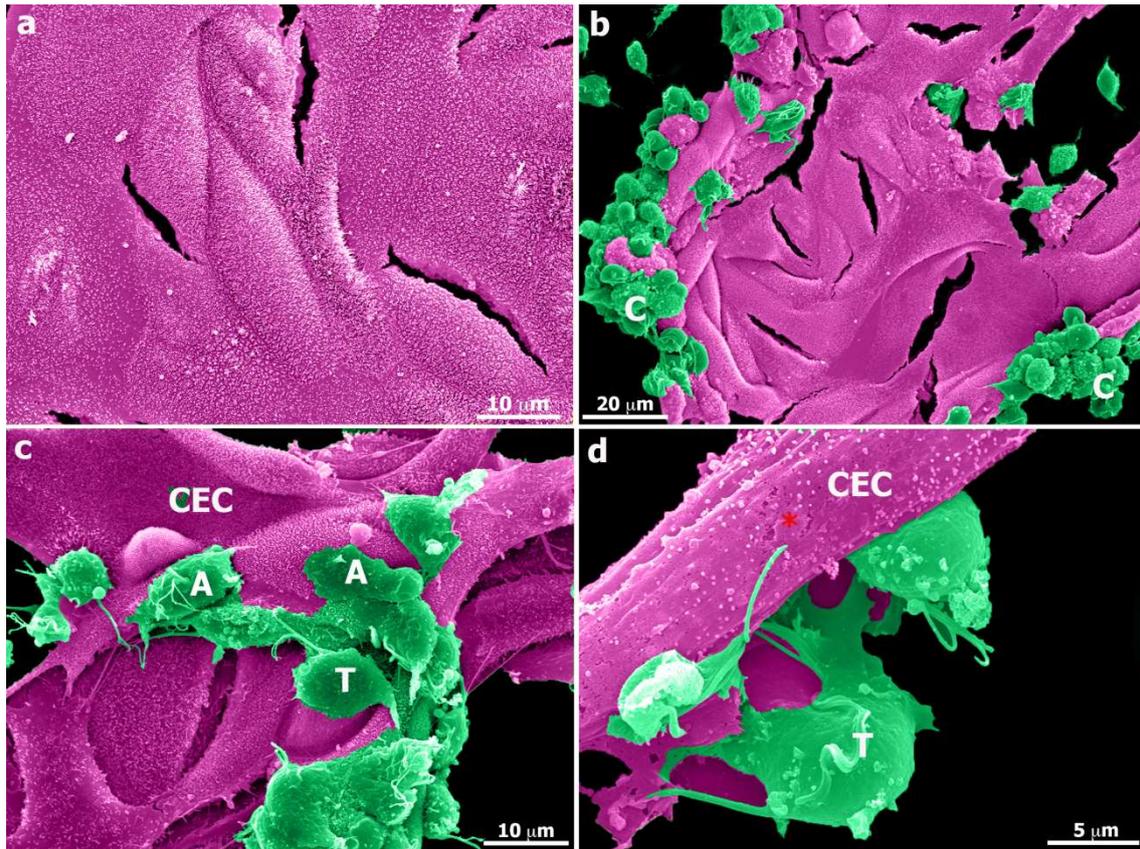


Figura 5. Interação entre *T. vaginalis* e células epiteliais cervicais. Microscopia eletrônica de varredura do processo de adesão do parasito às células hospedeiras. (a) Monocamada de células apresentando algumas fissuras. (b) Monocamada exibe danos provenientes da interação com o parasito, atenção para formação de *clusters* de tricomonas e para a retração das células hospedeiras. (c) Tricomonas exibe sua forma ameboide, formando grupos no processo de adesão às células hospedeiras. (d) Tricomonas induz as células hospedeiras a morte causando redução de suas microvilosidades e necrose. A, parasito amebóide; CEC, células epiteliais cervicais; (*), ruptura de membrana; C, clusters;

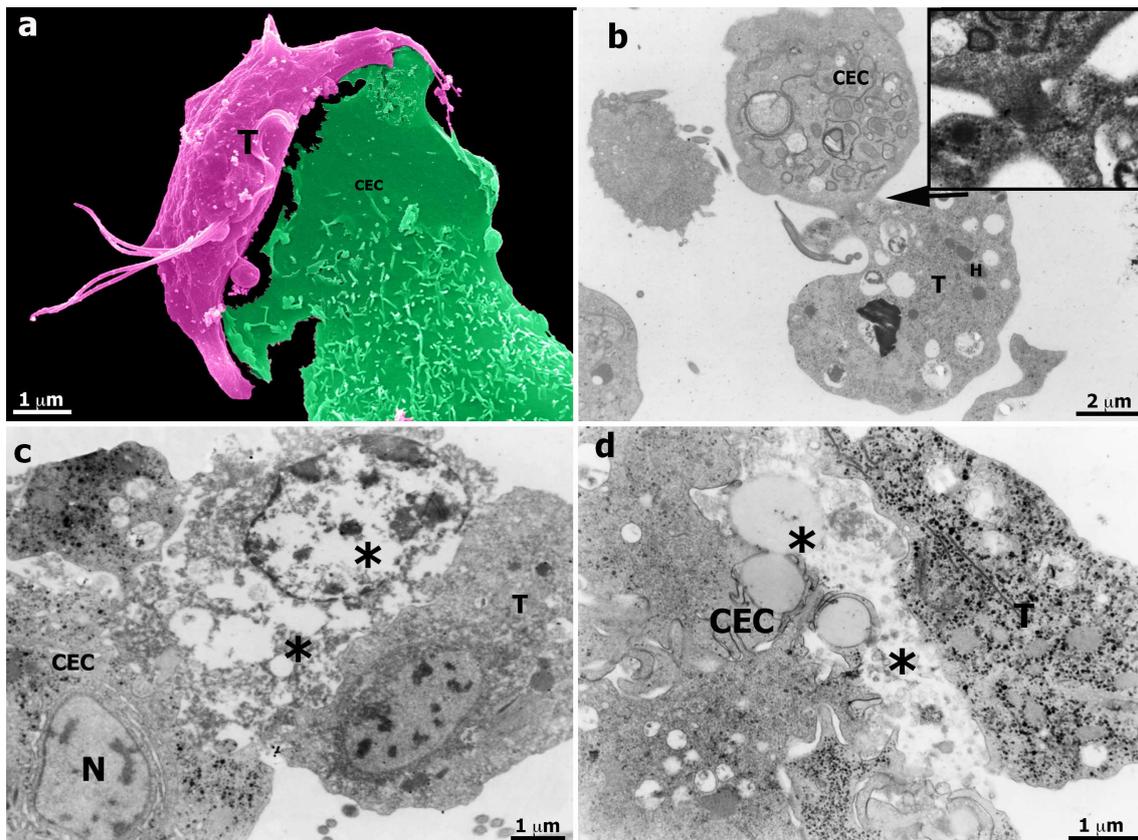


Figura 6. Atividade fagocitária de *T. vaginalis* frente às células epiteliais cervicais. Microscopia eletrônica de varredura (Fig. a) e de transmissão (Figs. b-d) da interação parasito – hospedeiro. (a) É possível notar o parasito projetando sua membrana em direção a célula hospedeira, num provável evento de fagocitose. (b) Nota-se o momento de internalização de uma porção do citoplasma da VEC pelo parasito (seta), a interação do parasito com a célula hospedeira é melhor observada no *inset*. Nas imagens (c-d) tricomonas rompe a membrana das células hospedeiras causando lise celular e eventualmente necrose, neste tipo de morte celular é possível ver o extravasamento do conteúdo interno das células hospedeiras. (Fig. c) Célula hospedeira necrótica (**asteriscos**) (Figs. d) local de ruptura da membrana da célula hospedeira (**asteriscos**). **T**, *T. vaginalis*; **CEC**, células epiteliais cervicais; **H**, hidrogenossomos; **N**, núcleo

4. Discussão

O protozoário *T. vaginalis* estabelece sua patologia a partir de três etapas onde depende do contato com a célula hospedeira: adesão, fagocitose e morte celular (Midlej *et al.* 2009; Midlej *et al.* 2010), e sabe-se que a morfologia desse parasito tem ligação com os efeitos citotóxicos (Honigberg. 1978). A partir da análise dos trabalhos citados na tabela 1 e seus relatos, foi visto que *T. vaginalis* pode gerar danos irreversíveis em

diversos tipos de células como fibroblastos, células epiteliais genitais, células de rim de cachorro (MDCK), células pulmonares, espermatozoides, células do oviduto bovino, musculares, de linhagens tumorais como apontado no gráfico da figura 2. Todos os tipos celulares encontrados nos trabalhos utilizados neste artigo são fundamentais para entender até onde vai a capacidade do parasito de gerar danos, permanentes ou não, de acordo com o tecido afetado e a especificidade deste protozoário. Entretanto, vemos que células do sistema genital (células epiteliais urogenitais e células HeLa) são mais frequentemente utilizadas como hospedeiras na interação com *T. vaginalis*. Esse dado faz referência à localização do parasita no hospedeiro humano. Em seguida às células do sistema genital, células MDCK foram muito utilizadas como modelo de célula hospedeira nos artigos analisados, julgamos que essa escolha se dê não somente ao fato de mostrar a habilidade do parasito infectar diferentes tipos celulares, mas a facilidade de utilizar esse tipo celular nos laboratórios, devido ao seu manejo e caracterização.

Para gerar danos, as tricomonas dependem da adesão e da mudança para forma ameboide onde uma possível razão para essa transformação é aumentar a superfície de contato com a célula hospedeira (Arroyo *et al.* 1993). Isto é necessário para um parasitismo mais estável e eficiente, em seguida o parasito começa a gerar danos mecânicos lisando as células hospedeiras (Figura 3). A aptidão das tricomonas para matar e fagocitar células hospedeiras pode ter relação com os sintomas apresentados pelo portador da patologia, como vaginite e pontos de hemorragia (Arroyo *et al.* 1993; Midlej *et al.* 2009). Quando os mecanismos de patogenicidade dos parasitos são analisados nos artigos selecionados nota-se que a adesão é requerida como principal fator de citotoxicidade. Seguindo da projeção de membrana e transformação para um formato ameboide e a fagocitose. É importante ressaltar a relação da mudança morfológica e da citotoxicidade. No estudo de Vancini e colaboradores (2008) os autores relatam que isolados com uma maior taxa de transformação ameboide foram os que causaram mais danos em células epiteliais vaginais humanas e por isso são considerados mais citotóxicos. No trabalho de Midlej e autores é mostrado a capacidade de *T. vaginalis* de pinçar a célula-alvo puxando suas microvilosidades até rompê-las causando necrose (Midlej *et al.* 2009). Nas análises mostramos que esses mecanismos de ação estão presentes em grande parte dos artigos analisados corroborando com as informações relatadas no presente estudo. Este tipo de comportamento também foi

descrito em amebas, porém, as amebas conseguem ingerir células mesmo sem terem sido previamente rompidas (Martinez-Palomo *et al.* 1985). O parasito também tem a capacidade de atingir células mais profundas nos tecidos dependendo de sua citotoxicidade (Krieger *et al.* 1985) e a capacidade de romper células da monocamada (González-Roble *et al.* 2006). Dito isso, é importante lembrar da interação com células do oviduto bovino, que é apenas uma monocamada de epitélio simples, então caso o parasito atinja o local pode gerar graves consequências (Midlej *et al.* 2009). Alguns autores demonstraram a capacidade dos parasitos se deslocarem até o oviduto e o útero (Singh *et al.* 2005). Esta infecção causa inflamação na vagina devido ao dano constante gerado pelo parasito e tem sido associada a adversidades na gestação, aquisição do vírus HIV, câncer pélvico, cervical e infertilidade (Kissinger, 2005). Já no sexo masculino o efeito de *T. vaginalis* no sêmen humano causa diferenças quanto a locomoção e quantidade de espermatozoides segundo o trabalho de Daly e autores (1989), o que entra em contradição com os achados de (Tuttle *et al.*, 1977) que mostram alteração negativa significativa quanto a motilidade e (Benchimol *et al.*, 2007) que também mostram a aglutinação do sêmen e diminuição da motilidade dos espermatozoides e queda da viabilidade em 75% após 1h de interação com *T. vaginalis*. Além do mesmo ter conseguido fagocitar células inteiras em quanto *T. foetus* apenas fragmentos. *T. foetus* e *T. vaginalis* causam esses danos *in vitro*, e seria aceitável supor também existir a possibilidade de ocorrer *in vivo*, o que poderia explicar a infertilidade em seus respectivos hospedeiros (Benchimol *et al.*, 2007). Também em uma publicação de (Janssenswillen *et al.* 1997) foi relatado um caso clínico de um paciente foi diagnosticado com uma azoospermia não obstrutiva, resultante da infecção por tricomonas, sugerindo que *T. vaginalis* poderia ter sido a causa da azoospermia.

A infecção gerada por tricomonas lesiona as células epiteliais cervicais até levá-las a morte por meio de um mecanismo dependente de contato (Lusting *et al.*, 2013). Em contradição, Garber e Lemchuk (1989), e Pindak e colaboradores (1993) mostraram que proteases e outros produtos metabólicos seriam liberados pelos parasitos no ambiente vaginal, e estes causariam dano nas células hospedeiras a partir de seus efeitos citotóxicos sem haver necessidade do parasito entrar em contato com as células vaginais (Garber & Lemchuk-Favel, 1989; Pindak *et al.*, 1993). Entretanto utilizando uma membrana permeável entre os parasitos e o hospedeiro em experimentos de interação

foi confirmado que é necessário o contato para haver efeitos citotóxicos (Gilbert *et al.*, 2000).

As lesões causadas pelo parasito geram manchas hemorrágicas no tecido da cervical e da mucosa vaginal, além de causar dor no ato sexual e pode levar as células a morte (Midlej *et al.*, 2009). As tricomonas destroem e fagocitam células *in vivo* o que gera lesões que acabam por abrir portas de entrada para outros patógenos como HIV-1 (Sorvillo *et al.* 2001). Um experimento *in vivo* de Chen e colaboradores (2004) mostra que *T. vaginalis* atingiu camadas mais profundas da vagina através de espaços intercelulares e outro trabalho mostra a capacidade de *T. vaginalis* de perturbar o complexo juncional de células epiteliais enquanto reduz a resistência transepitelial (Madeiro da Costa *et al.*, 2005). Mostramos que pequena parte dos artigos analisados abrangem a perturbação das junções celulares como mecanismos de ação do parasito. Foi mostrado que o ferro, que está presente no sangue, regula de forma positiva o gene da adesina, importante proteína com função na adesão (Lehker *et al.* 1991). Desta forma, além das lesões, o ciclo menstrual da mulher também favorece o parasito devido a descarga de ferro que muda o ambiente da vagina resultando em um aumento na gravidade dos sintomas clínicos e o rápido crescimento populacional de protozoários (Lin *et al.*, 2015). Além disso, foi demonstrado o papel do ferro na proliferação do parasito e na regulação de sua morfologia, (Dias-lobes *et al.*, 2017; Jesus *et al.*, 2007). Esses trabalhos mostram que a depleção do ferro no meio de cultura de *T. vaginalis* reduz a expressão de proteínas fundamentais para a regulação do protozoário (Jesus *et al.*, 2007). Assim, o ferro presente no meio facilita a colonização, eventualmente a formação de *clusters*, que são aglomerados de parasitos, e a possibilidade de comunicação entre os parasitos. A formação de *clusters* também foi evidenciado em dos trabalhos analisados. Essa relação dos parasitos forma uma extensa interdigitação ocorrendo entre organismos adjacentes, assim, gerando mais dano ao tecido o que complica ainda mais a relação parasito-hospedeiro (Arroyo *et al.*, 1993).

O protozoário também está associado a dificuldades respiratórias pois pode causar efeitos citopáticos em células pulmonares (Salvador-membreve *et al.*, 2014), onde uma possível causa de contaminação seria o sexo oral (Rebhun *et al.*, 1964). *T. vaginalis* pode atrasar a apoptose de neutrófilos humanos e isso sugere que o parasito tem a capacidade de regular apoptose das células hospedeiras (Song *et al.*, 2010). O dano

gerado pelo parasito nas células pulmonares pode provocar dificuldades respiratórias (Salvador-membreve *et al.*, 2014).

5. Conclusão

A partir dos artigos analisados podemos compreender a necessidade de *T. vaginalis* de contato com células alvo para estabelecer a patologia. Mais ainda, vimos a capacidade de gerar danos em diversos tipos de células, de danificá-las gravemente e até mesmo gerar sequelas para o portador da tricomoníase. O que mostra a versatilidade e agressividade do parasito, que pode levar a uma suscetibilidade à outras doenças devido aos danos no tecido. Por isso a tricomoníase é uma doença que necessita de muita atenção devido as perdas que pode gerar para a saúde pública.

6. Referências

- Arroyo, R., González-Robles, A., Martínez-Palomo, A., & Alderete, J. F.** Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence: *Mol. Microbiol.* 1993; 7(2), 299–309.
- Benchimol M.** Trichomonads under Microscopy. *Microsc. Microanal.* 2004; 10(5), 528–550.
- Benchimol, M., de Andrade Rosa, I., da Silva Fontes, R., & Burla Dias, A. J.** *Trichomonas* adhere and phagocytose sperm cells: adhesion seems to be a prominent stage during interaction. *Parasitol. Res.* 2008; 102(4), 597–604.
- Brasil.** Manual de Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis. 4. ed. Brasília. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids.: 2006; 140p.
- Chen, W. L., Chen, J. F., Zhong, X. R., Liang, P., & Lin, W.** Ultrastructural and immunohistochemical studies on *Trichomonas vaginalis* adhering to and phagocytizing genitourinary epithelial cells: *Chin. Med. J.* 2004; 117(3), 376–381.
- Daly JJ, Sherman JK, Green L, Hostetler TL** (1989) Survival of *Trichomonas vaginalis* no sêmen humano. *Genitourin Med* 65: 106–108

- De Jesus, J. B., Cuervo, P., Junqueira, M., Britto, C., Silva-Filho, F. C., Soares, M. J., et al.** A further proteomic study on the effect of iron in the human pathogen *Trichomonas vaginalis*: *Proteomics* 2007; 7(12), 1961–1972.
- Dias-Lopes, G., Saboia-Vahia, L., Margotti, E. T., Fernandes, N. S., Castro, C., Oliveira, F. O., et al.** Morphologic study of the effect of iron on pseudocyst formation in *Trichomonas vaginalis* and its interaction with human epithelial cells: *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2017; 112(10), 664–673.
- Edwards, T., Burke, P., Smalley, H., & Hobbs, G.** *Trichomonas vaginalis*: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis: *Crit. Rev. Microbiol.* 2016; 42(3), 406–417.
- Fowke, J. H., Han, X., Alderete, J. F., Moses, K. A., Signorello, L. B., & Blot, W. J.** A prospective study of *Trichomonas vaginalis* and prostate cancer risk among African American men: *BMC: Res. notes* 2016; 9, 224.
- Furtado, M. B., & Benchimol, M.** (1998). Observation of membrane fusion on the interaction of *Trichomonas vaginalis* with human vaginal epithelial cells: *Parasitol Res.* 1998; 84(3), 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.
- Gatti, F. A., Ceolan, E., Greco, F. S., Santos, P. C., Klafke, G. B., de Oliveira, G. R., et al.** The prevalence of trichomoniasis and associated factors among women treated at a university hospital in southern Brazil: *PLoS One* 2017; 12(3), e0173604.
- Gilbert, R. O., Eli a, G., Beach, D. H., Klaessig, S. and Singh, B. N.** (2000). Cytopathogenic effects of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultured in vitro. *Infect. Immun* 68, 4200–4306.
- González-Lázaro, M., González-Robles, A., Hernández-Gutiérrez, R., & Arroyo, R.** HeLa cell nucleus, a source of thymidine for *Trichomonas vaginalis* growing in vitro: *Int. J. biochem. Cell Biol.* 2005; 37(1), 166–176.
- González-Robles, A., Lázaro-Haller, A., Espinosa-Cantellano, M., Anaya-Velázquez, F., & Martínez-Palomo, A.** *Trichomonas vaginalis*: ultrastructural bases of the cytopathic effect: *J. Eukaryot. Microbiol.* 1995; 42(5), 641–651.
- Hinderfeld, A. S., & Simoes-Barbosa, A.** Vaginal dysbiotic bacteria act as pathobionts of the protozoal pathogen *Trichomonas vaginalis*: *Microb. Pathog.* 2020; 138, 103820.

- Hirt R. P.** *Trichomonas vaginalis* virulence factors: an integrative overview. *Sex. Transm. Infect.* 2013; 89(6), 439–443.
- Honigberg, B.M.** Trichomonads of importance in human medicine. In *Parasitic Protozoa*, vol. 2 Kreier. J.P, (ed). New York: Academic Press 1978; Inc., pp, 276-454
- . Janssenswillen, C., Tournaye, H., Pierard, D., Devroey, P., & Van Steirteghem, A.** (1997). Microsurgical epididymal sperm aspiration with motile trophozoite cells but no spermatozoa. *Hum Reprod* 12(10), 2217–2219. doi:10.1093/humrep/12.10.2217
- Joseph Davey, D. L., Shull, H. I., Billings, J. D., Wang, D., Adachi, K., & Klausner, J. D.** Prevalence of Curable Sexually Transmitted Infections in Pregnant Women in Low- and Middle-Income Countries From 2010 to 2015: A Systematic Review. *Sex. Transm. Dis.* 2016; 43(7), 450–458.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972)** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4): 239–57.
- Kim, J. H., Han, I. H., Kim, S. S., Park, S. J., Min, D. Y., Ahn, M. H. et al.** Interaction between *Trichomonas vaginalis* and the Prostate Epithelium: *Korean J. Parasitol.* 2017; 55(2), 213–218.
- Kim, Y., Lee, Y. H., Choi, I. W., Heo, B. Y., Kang, J. G., Yuk, J. M., et al.** Adherence of *Trichomonas vaginalis* to SiHa Cells is Inhibited by Diphenyleneiodonium: *Microorganisms* 2020; 8(10), 1570.
- Lin, W. C., Chang, W. T., Chang, T. Y., & Shin, J. W.** The Pathogenesis of Human Cervical Epithelium Cells Induced by Interacting with *Trichomonas vaginalis*: *PLoS One* 2015; 10(4), e0124087.
- Midlej, V., & Benchimol, M.** *Trichomonas vaginalis* kills and eats--evidence for phagocytic activity as a cytopathic effect: *Parasitol.* 2010; 137(1), 65–76.
- Midlej, V., Vilela, R., Dias, A. B., & Benchimol, M.** Cytopathic effects of *Trichomonas foetus* on bovine oviduct cells. *Vet. Parasitol* 2009; 165(3-4), 216–230.
- Miranda, A. E., Pinto, V. M., & Gaydos, C. A.** (2014). *Trichomonas vaginalis* infection among young pregnant women in Brazil: *Brazilian J. Infect. Dis : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 2014; 18(6), 669–671.
- Mirhaghani, A., & Warton, A.** An electron microscope study of the interaction between *Trichomonas vaginalis* and epithelial cells of the human amnion membrane: *Parasitol. Res.* 1996; 82(1), 43–47.

- Nielsen, M. H., & Nielsen, R.** Electron microscopy of *Trichomonas vaginalis* Donn : interaction with vaginal epithelium in human trichomoniasis: *APMIS Section B, Microbiol.* 1975; 83(4), 305–320.
- Nievas, Y. R., Coceres, V. M., Midlej, V., de Souza, W., Benchimol, M., Pereira-Neves, A., et al.** Membrane-shed vesicles from the parasite *Trichomonas vaginalis*: characterization and their association with cell interaction: *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 2018; 75(12), 2211–2226.
- OMS,** Global Incidence and Prevalence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections: 2008, Organiza o Mundial da Saúde, Departamento de Saúde Reprodutiva e Pesquisa, 2012, pp, 207 – 209. **OMS,** estimates 2014 summary tables: DALY by cause, age and sex, by WHO region, 2000–2012. Geneva: World Health Organization, 2014
- Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., & Garber, G.** Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*: *Clin Microbiol. Rev.* 1998; 11(2), 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.
- Poole, D. N., & McClelland, R. S.** Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*: *Sex. Transm. Infect.* 2013. 89(6), 418–422.
- Ribeiro, L. C., Santos, C., & Benchimol, M.** Is *Trichomonas tenax* a Parasite or a Commensal?: *Protist* 2015; 166(2), 196–210.
- Rivera-Rivas, L. A., Lorenzo-Benito, S., Sánchez-Rodríguez, D. B., Miranda-Ozuna, J. F., Euceda-Padilla, E. A., Ortega-López, J., et al** The effect of iron on *Trichomonas vaginalis* TvCP2: a cysteine proteinase found in vaginal secretions of trichomoniasis patients: *Parasitol.* 2020; 147(7), 760–774.
- Rowley, J., Vander Hoorn, S., Korenromp, E., Low, N., Unemo, M., Abu-Raddad, L. J., et al** Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016: *Bull. World Health Organ.* 2019; 97(8), 548–562P.
- Salvador-Membreve, D. M., Jacinto, S. D., & Rivera, W. L.** *Trichomonas vaginalis* induces cytopathic effect on human lung alveolar basal carcinoma epithelial cell line A549: *Exp. Parasitol* 2014; 147, 33–40.
- Secor W. E.** *Trichomonas vaginalis*: treatment questions and challenges: *Expert Rev. anti-infe* 2012; 10(2), 107–109.

- Seo, M. Y., Im, S. J., Gu, N. Y., Kim, J. H., Chung, Y. H., Ahn, M. H., et al.** Inflammatory response of prostate epithelial cells to stimulation by *Trichomonas vaginalis*: *The Prostate* 2014; 74(4), 441–449.
- Shintani, T., & Klionsky, D. J.** Autophagy in health and disease: a double-edged sword: *Science (New York, N.Y.)* 2004; 306(5698), 990–995.
- Sorvillo, F., Smith, L., Kerndt, P., & Ash, L.** *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans: *Emerg. Infect. Dis.* 2001; 7(6), 927–932.
- Silva Filho, F. C., & de Souza, W.** The interaction of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus* with epithelial cells in vitro: *Cell Struct. Funct.* 1988; 13(4), 301–310.
- Sogin M. L.** Organelle origins: energy-producing symbionts in early eukaryotes?: *Curr. Biol.* 1997; CB, 7(5), R315–R317.
- Tuttle, J. P., Holbrook, T. W., & Derrick, F. C.** (1977). Interference of Human Spermatozoal Motility by *Trichomonas Vaginalis*. *J. Urol*, 118(6), 1024–1025.
- Vancini, R. G., Pereira-Neves, A., Borojevic, R., & Benchimol, M.** (2008). *Trichomonas vaginalis* harboring *Mycoplasma hominis* increases cytopathogenicity in vitro. *European J. Clin. Microbiol. Infect. dis: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 2008; 27(4), 259–267.
- Von Glehn MP.** Prevalence of *Trichomonas vaginalis* in women of childbearing age assisted by a family health team in the Federal District Brasília: Universidade de Brasília (UNB) 2016.
- Unemo, M., Bradshaw, C. S., Hocking, J. S., de Vries, H., Francis, S. C., Mabey, D., et al.** Sexually transmitted infections: challenges ahead: *Lancet Infect. Dis.* 2017; 17(8), e235–e279.
- Vilela, R. C., & Benchimol, M.** *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*: interaction with fibroblasts and muscle cells - new insights into parasite-mediated host cell cytotoxicity: *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2012; 107(6), 720–727.