

INTRODUÇÃO

Trichomonas vaginalis é o protozoário flagelado que habita o trato urogenital causando a tricomonose, que é a doença sexualmente transmissível não-viral mais comum no mundo¹. Estudos têm mostrado que a tricomonose aumenta a suscetibilidade ao vírus HIV², causa problemas na gravidez³ predisposição ao câncer cervical⁴ e doença inflamatória pélvica⁵. O fármaco de escolha para o tratamento da tricomonose é o metronidazol. Considerando o sério impacto da tricomonose na saúde pública, é importante investigar os aspectos bioquímicos do parasito. Nucleotídeos extracelulares são liberados pelas células devido ao metabolismo ativo e em situações de estresse. O ATP extracelular pode atuar como um sinalizador nos mecanismos citolíticos, sendo que o mesmo pode ser inativado por hidrólise via ectonucleotidases. Enzimas da família E-NTPDase são capazes de hidrolisar ATP e ADP, enquanto a ecto-5'-nucleotidase hidrolisa AMP produzindo adenosina, que pode ser recaptada pelo parasito. Assim, essas enzimas podem estar envolvidas em sinalização purinérgica durante a tricomonose e, possivelmente, nos mecanismos patogênicos do parasito. Os objetivos deste trabalho foram determinar o perfil de hidrólise de nucleotídeos extracelulares e a sensibilidade ao metronidazol dos isolados clínicos de *T. vaginalis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

CINÉTICA ENZIMÁTICA

1) Os isolados clínicos TVLACH1, TVLACH2, TVLACM1, TVLACM2 e TVLACM3 e o isolado da ATCC TV30326 (*American Type Culture Collection*) foram cultivados em meio tripticase-extrato de levedo-maltose (TYM) pH 6,0⁶ suplementado com 10% (v/v) de soro bovino inativado, a 37° C. 2) Os parasitos foram lavados com solução salina (0,9%) glicosada (0,2%) e mantidos na mesma solução durante os experimentos. 3) A quantificação protéica total foi realizada pelo método de Bradford⁷. 4) O meio reacional para os substratos ATP ou ADP e AMP continha tampão TRIS 7,2 e CaCl₂ 5,0 mM e tampão TRIS 7,5 e MgCl₂ 3,0 mM, respectivamente. 5) A curva de proteína foi realizada com uma variação de 0,2 a 0,8 mg proteína/ml e a curva de tempo foi testada no intervalo de 10 a 60 minutos. 6) A reação foi iniciada com a adição do substrato ATP e ADP 1,0 mM e AMP 3,0 mM e interrompida pela adição de ácido tricloro acético 10% (TCA) e banho de gelo. 8) A fim de descontar a hidrólise espontânea dos substratos, foi adicionado aos controles a mesma alíquota da suspensão de trofozoítos após a interrupção da reação. 9) A quantificação de fosfato inorgânico foi realizada através de método colorimétrico, utilizando verde de malaquita⁸.

SENSIBILIDADE AO METRONIDAZOL

Os parasitos foram lavados três vezes com tampão PBS e o pellet foi ressuspenso com meio TYM e a densidade no volume final de 200 µl foi ajustada para 5,0x10⁵ trofozoítos/ml. Utilizando placas de 96 poços, os trofozoítos foram expostos a concentrações seriadas de metronidazol (0,28 µM a 9300 µM) em meio TYM. Controles sem o metronidazol foram realizados nas mesmas condições dos testes. A placas foram incubadas durante 24 h a 37°C. Após o tempo de incubação, as placas foram observadas em microscópio invertido para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do metronidazol⁹.

CONCLUSÕES

- Todos os isolados clínicos de *T. vaginalis* apresentaram atividade de hidrólise extracelular de ATP, ADP e AMP;
- Os parâmetros cinéticos enzimáticos avaliados apresentaram linearidade;
- Os isolados de *T. vaginalis* apresentaram heterogeneidade na atividade de hidrólise de nucleotídeos;
- Todos os isolados de *T. vaginalis* testados foram sensíveis ao metronidazol, com exceção do isolado clínico TVLACM2;
- Esses resultados sugerem a participação da NTPDase e da ecto-5'-nucleotidase na patogênese do *T. vaginalis*.

RESULTADOS

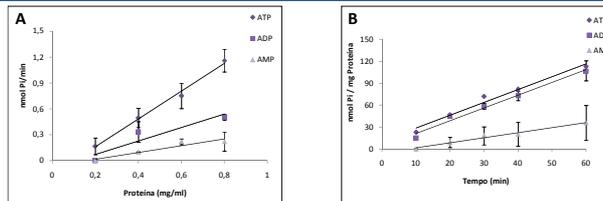


Figura 1. Isolado TVLACH1: A) Curva de proteína e B) Curva de tempo para a hidrólise de ATP, ADP e AMP. Para os demais experimentos a concentração de 0,4 mg/ml de proteína e o tempo de 30 min. foram escolhidos.

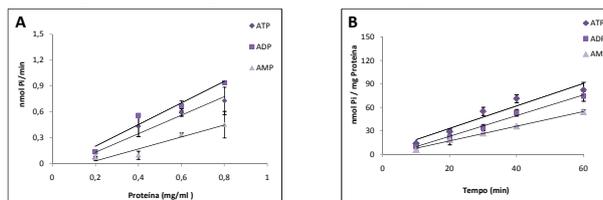


Figura 2. Isolado TVLACH2: A) Curva de proteína e B) Curva de tempo para a hidrólise de ATP, ADP e AMP. Para os demais experimentos a concentração de 0,6 mg/ml de proteína e o tempo de 30 min. foram escolhidos.

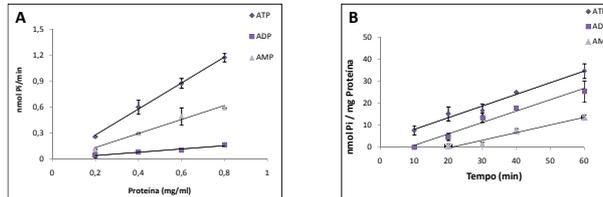


Figura 3. Isolado TVLACM1: A) Curva de proteína e B) Curva de tempo para hidrólise de ATP, ADP e AMP. Para os ensaios subsequentes a concentração de 0,4 mg/ml de proteína para ADP e AMP e 0,6 mg/ml para ATP e o tempo de 40 min. para ATP, ADP e AMP, foram escolhidos.

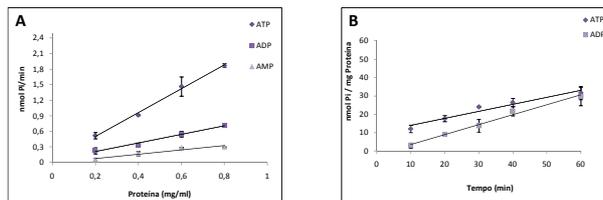


Figura 4. Isolado TVLACM2: A) Curva de proteína e B) Curva de tempo para hidrólise de ATP e ADP. Para os ensaios subsequentes a concentração de 0,4 mg/ml de proteína para ATP e 0,6 mg/ml para ADP e AMP e os tempos de 30 min. para ATP e ADP.

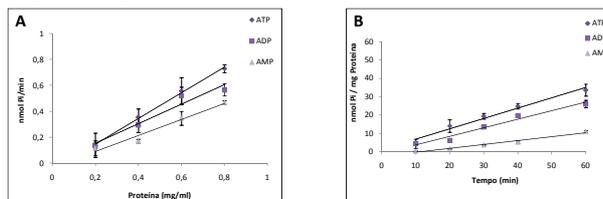


Figura 5. Isolado TVLACM3: A) Curva de proteína e B) Curva de tempo para hidrólise de ATP, ADP e AMP. Para os ensaios subsequentes a concentração de 0,4 mg/ml de proteína para ATP e ADP e 0,6 mg/ml para AMP e os tempos de 30 min. para ATP e ADP e 60 min. para AMP foram escolhidos.

Tabela. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do metronidazol e perfil de hidrólise de nucleotídeos extracelulares de isolados de *T. vaginalis*.

Isolado	Tipo	CIM (µM)	Atividade específica (nmol Pi / min / mg proteína)*		
			ATP	ADP	AMP
TV30326	ATCC	8	1,1 ± 0,05	1,0 ± 0,03	0,69 ± 0,07
TVLACH1	Clínico	4,56	2,35 ± 0,05	1,8 ± 0,02	0,56 ± 0,05
TVLACH2	Clínico	1,83	1,40 ± 0,04	1,12 ± 0,18	0,91 ± 0,03
TVLACM1	Clínico	73	0,65 ± 0,09	0,44 ± 0,01	0,2 ± 0,02
TVLACM2	Clínico	580	0,96 ± 0,21	0,49 ± 0,04	0,38 ± 0,08
TVLACM3	Clínico	18,3	0,62 ± 0,05	0,42 ± 0,07	0,12 ± 0,05

* Valores representam média ± desvio padrão de, no mínimo, três experimentos (diferentes culturas).

Referências bibliográficas

1. WHO - World Health Organization. Overview and Estimates, Geneva, Switzerland, 2001; 2. Sorvillo L. et al. Emerg Infect Dis. 7: 927-32, 2001; 3. Klebanoff MA, et al. N Engl J Med 345: 487-493, 2001; 4. Viikki et al. Acta Obstet Gynecol Scand. 79: 576-9, 2000; 5. Cherpas TL, et al. Sex Transm Dis 33: 747-752, 2006. 6. Diamond, L.S. J. Parasitol. 43: 488-490, 1957. 7. Bradford M.M. Anal. Biochem. 72, 218-254, 1976. 8. Chan, K., Delfert, D., Junger, K.D. Anal. Biochem. 157, 375-380, 1986. 9. Tasca T. et al. FEMS Microbiol. Let. 226: 379-384, 2003.