



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Interacción *in vitro* de trampas
extracelulares de neutrófilos (NET) con
el parásito *Trichomonas vaginalis*

Tesis que para obtener el título de
BIÓLOGO

PRESENTA:
Yordan Jhovani Romero Contreras

TUTOR (A):
Dra. Eva Edilia Ávila Muro



Puebla, Pue. Diciembre 2014

“Con todo mi cariño y amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento”

anónimo



AGRADECIMIENTOS

No encuentro las palabras suficientes para agradecer a todas las personas que formaron parte de mi formación como ser humano y profesionista.

*Quiero agradecer especialmente a mi familia. A mi madre **Candelaria** por todo su amor, paciencia y estar conmigo en cada momento, por prestarme su hombro en los momentos de llanto, por los besos y abrazos que me hacen sentir lo especial que es estar a su lado. Por convertir los problemas, en momentos de reflexión, pero sobre todo gracias por consentirme hasta hoy como tu niño. A mi padre **Roberto**, por tus cuidados y consejos que me brindas día con día para ser una mejor persona, por guiar mis pasos haciéndome alcanzar más allá de mis límites y que sin importar las adversidades siempre mantener la cabeza en alto, gracias por ser más que mi padre, mi amigo, mi ejemplo, mi apoyo.*

*Agradezco a mis hermanos **Roxana, Berenice, Fátima y Paulo**, que más que mis hermanos, son mis verdaderos amigos. Gracias por todo su apoyo, estando siempre conmigo en las buenas y en las malas, por todos esos jalones de orejas que merecía y que en su momento no entendía. Por las alegrías y tropiezos de los cuales fuimos triunfadores, y a ustedes hermanas por darme la alegría de ser tío de unos pequeños maravillosos -**Brian y Joshua**, son mi más grande felicidad. Esto es por ustedes mi familia **ROCO**, a quienes amo más que a nada en el mundo, GRACIAS por todo.*

*Agradezco a cada uno de los profesores que formaron parte de mi formación académica, no solo universitaria, sino de toda la vida, gracias por su paciencia, dedicación y entusiasmo, que sin importar la relación estudiante-profesor me ofrecieron su amistad y confianza. A mis profesores revisores **M.C. Dalia Molina y M.C. Héctor García**, gracias por el apoyo que me brindaron durante mi proyecto, pero sobre todo gracias por permitirme formar parte de su alumnado. Agradezco a la BUAP, porque gracias a él descubrimos todo un mundo de maravillas y conocimientos, por permitirme conocer mis fortalezas y debilidades, pero sobre todo por prepararme contra las adversidades de la vida y vivirla a plenitud.*

*Agradezco a la **Dr. Eva Ávila** de la Universidad de Guanajuato por aceptarme como parte de su grupo de trabajo, por todos sus conocimientos transmitidos, por los consejos que me ayudaron a realizar un excelente trabajo, por el entusiasmo y dedicación que me*

brindo día con día, pero sobre todo gracias por enseñarme que no existe obstáculo que nos permitan realizar nuestros objetivos.

*A mis amigos, a esas personas que sin importar mis defectos estuvieron siempre conmigo, compartiendo todos esos momentos de alegría. A ti **Valerdillo** por estar en los momentos difíciles, por aguantar los desplantes, por los regañones, por los concejos, por las aventuras que nos hacen reír como unos tontos, por eso y mucho más gracias por estar siempre ahí. A ti **Marianillas**, que me tendiste la mano cuando más lo necesite, por tu paciencia, consuelo y afecto; pero sobre todo gracias por dejarme compartir todos esos momentos en los que pasábamos horas y horas hablando de nuestras aventuras en compañía de una rica cena echa por tu mamá Blanquita. A ti **Katts** por escuchar siempre mis quejas y enojos, por aguantar mis tonterías, pero sobre todo gracias por los momentos llenos de diversión y risas hasta morir. Gracias también a ustedes amigos **Carlitos, Fernanda, Fernando, Alonso, Gerardo, Abbi, Ebram, Hiram, Leo, Pako y todos aquellos compañeros** que sin importar las diferencias que llegamos a tener, siempre supimos hacer a un lado las cosas malas y disfrutar el momento “Los quiero mucho”. Y son muchas las personas a las que quisiera agradecerles, todo su afecto, amistad y apoyo, en cada parte de mi vida; algunas aun conmigo y otras en mis recuerdos, pero sin importar donde estén o si llegaran a leer esto quiero decirles “Gracias”.*

*Agradezco a mis compañeros de laboratorio (CICM), **Rafael, Yair, Simón, Cathy y Rox**, Trabajar con ustedes fue todo un placer.*

*Finalmente agradezco a mis compañeros del Departamento de Biología de la Universidad de Guanajuato. A **Yoli** por la paciencia y entusiasmo de enseñarme poco a poco esos conocimientos que aprendiste a lo largo de tu carrera, por los ánimos y alegrías que compartimos, sin importar el tiempo de habernos conocido. Agradezco a **Mayra, Marco y Luis Mario**, por la disposición y apoyo que me brindaron para sacar adelante mi proyecto. A ti **MaryCruz**, por apoyarme en esos momentos difíciles y alegrar mis días con tus deliciosos postres. Y finalmente a ustedes compañeros **Lulu, Ruth, Erika y Orlando**, gracias por hacer mi estancia en Guanajuato una experiencia satisfactoria.*

El siguiente proyecto fue realizado en el Laboratorio de Inmuno-
Microbiología Molecular del Departamento de Biología de la Universidad de
Guanajuato, Campus Guanajuato, Gto., bajo la dirección de la Dra. Eva Edilia
Ávila Muro.

ÍNDICE

ABSTRACT	I
RESUMEN	II
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i>	1
1.1.1 Clasificación taxonómica	1
1.1.2 Morfología.....	3
1.1.3 Ciclo de vida	4
1.1.4 Sintomatología.....	5
1.1.5 Diagnóstico	6
1.1.6 Epidemiología	7
1.1.7 Tratamiento.....	8
1.1.8 Respuesta inmune ante el parásito.....	9
1.2 RESPUESTA INMUNE.....	10
1.2.1 Neutrófilos.....	10
1.2.2 Péptidos antimicrobianos.....	11
1.2.3 Agentes citotóxicos de neutrófilos.....	12
1.2.4 Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs).....	13
1.2.5 Formación de NETs.....	15
1.2.6 Papel de las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) en la formación de NET.....	17
2. HIPÓTESIS	19
3. OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	20
3.1.1 OBJETIVOS PARTICULARES	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1 CULTIVO Y COSECHA DE TROFOZOÍTOS DE <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i>	21
4.2 AISLAMIENTO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS.....	21

4.3 INDUCCIÓN DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NET)	22
4.4 INTERACCIÓN DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS CON <i>T. VAGINALIS</i>	22
4.5 CUANTIFICACIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>T. VAGINALIS</i> EN INTERACCIÓN CON NETs ...	23
4.6 OBSERVACIÓN POR MICROSCOPIA CONFOCAL.....	23
4.7 INTERACCIÓN DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS CON CÉLULAS PRE- TEÑIDAS DE <i>T. VAGINALIS</i>	24
4.8 INTERACCIÓN DE NEUTRÓFILOS CON <i>T. VAGINALIS</i> A DIFERENTES RELACIONES	24
4.9 ACTIVIDAD PINOCÍTICA DE <i>T. VAGINALIS</i>	25
4.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
5. RESULTADOS	26
5.1 CULTIVO Y COSECHA DE TROFOZOÍTOS DE <i>T. VAGINALIS</i>	26
5.2 PINOCITOSIS DEL TROFOZOÍTO <i>T. VAGINALIS</i>	27
5.3 AISLAMIENTO DE NEUTRÓFILOS.....	28
5.4 FORMACIÓN DE NETs POR EL ACTIVADOR PMA	28
5.5 ACTIVIDAD PINOCITICA DE <i>T. VAGINALIS</i> EN INTERACCIÓN CON NET	30
5.6 INTERACCIÓN DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETs) INDUCIDAS CON PMA CON EL TROFOZOÍTO <i>T. VAGINALIS</i>	31
5.7 INTERACCIÓN DE NEUTRÓFILOS SIN EL INDUCTOR PMA CON <i>T. VAGINALIS</i>	34
5.8 CUANTIFICACIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>T. VAGINALIS</i> EN INTERACCIÓN CON NETs ...	39
5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL CRECIMIENTO DE <i>T. VAGINALIS</i>	40
6. DISCUSIÓN	42
7. CONCLUSIONES.....	45
8. PERSPECTIVAS.....	46
9. BIBLIOGRAFÍA	47
10. ANEXOS	54
10.1 MEDIOS	54
10.1.1 Medio RPMI + 2% albúmina sérica humana.....	54
10.1.2 Medio TYI-S-33 con 6% de Suero Bovino.	54
10.1.3 Medio TYI-S-33 Modificado con 16% de Suero Bovino.	55

10.2 SOLUCIONES.....	55
10.2.1 Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS).....	55
10.2.2 Solución PMA.	56
10.3 TINCIONES.....	56
10.3.1 Tinción de <i>T. vaginalis</i>	56
10.3.2 Tinción microscópica.	56
10.4 LAVADOS	57
10.4.1 Lavado de cubreobjetos y portaobjetos para el montaje de muestras.	57
10.5 ABREVIATURAS.....	57

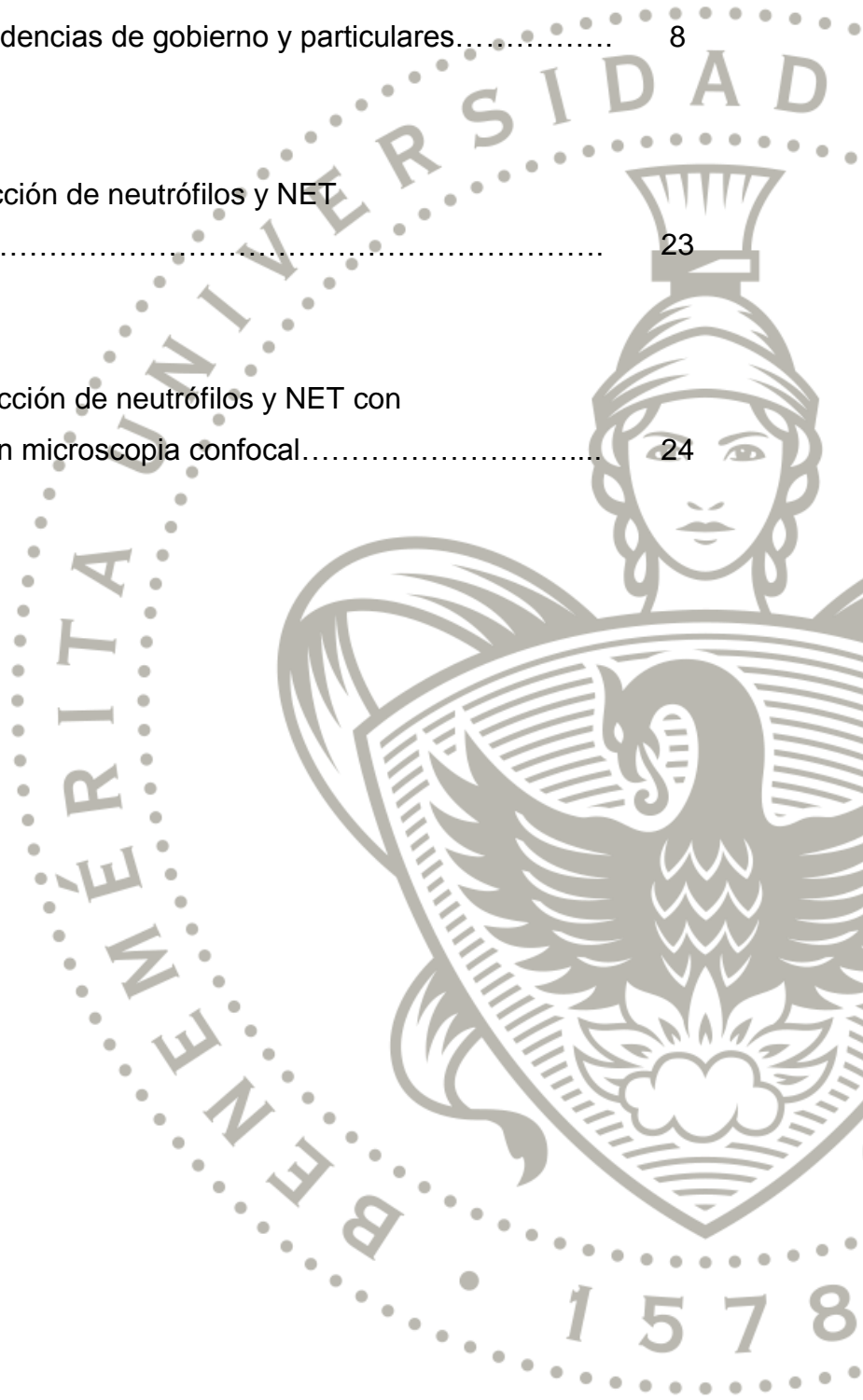


ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de <i>Trichomonas vaginalis</i>	1
Figura 2. Estructura morfológica del trofozoíto <i>Trichomonas vaginalis</i>	4
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Trichomonas vaginalis</i>	5
Figura 4. Componentes intracelulares de los gránulos de Neutrófilos.....	13
Figura 5. Trampas Extracelulares de Neutrófilo.....	15
Figura 6. Formación de Trampas Extracelulares de Neutrófilo.....	16
Figura 7. Inducción de la formación de NET en neutrófilos humanos.....	17
Figura 8. Morfología de <i>T. vaginalis</i> marcadas con el colorante PKH26.....	26
Figura 9. Actividad pinocítica de <i>T. vaginalis</i>	27
Figura 10. Aislamiento de Neutrófilos de Sangre Periférica Humana.....	28
Figura 11. Inducción de la formación de NETs por acción del PMA.....	29
Figura 12. Actividad pinocítica de <i>T. vaginalis</i> en interacción con NETs.....	30
Figura 13. Interacción de NETs con <i>T. vaginalis</i>	32
Figura 13.1. Interacción de NETs con <i>T. vaginalis</i>	33
Figura 14. Interacción de Neutrófilos con <i>T. vaginalis</i> a una relación 1:20.....	35
Figura 15. Interacción de Neutrófilos con <i>T. vaginalis</i> a una relación 1:10.....	37
Figura 16. Interacción de Neutrófilos con <i>T. vaginalis</i> a una relación 1:5.....	38
Figura 17. Cuantificación del crecimiento de <i>T. vaginalis</i> posterior a la interacción con NETs en presencia y ausencia de inhibidores.....	40
Figura 18. Análisis estadístico del crecimiento de <i>T. vaginalis</i> posterior a la interacción con NETs en presencia y ausencia de inhibidores.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Censo realizado a dependencias de gobierno y particulares.....	8
Tabla 2. Condiciones de la interacción de neutrófilos y NET con <i>T. vaginalis</i>	23
Tabla 3. Condiciones de la interacción de neutrófilos y NET con <i>T. vaginalis</i> para la observación en microscopía confocal.....	24





Abstract

Trichomoniasis is a non-viral sexually transmitted disease, caused for the parasite *Trichomonas vaginalis*. In Mexico, trichomoniasis ranks in the sixteenth place among communicable diseases. *T. vaginalis* activates the migration of neutrophils, which may eliminate parasites by phagocytosis, by degranulation and by the recently discovered Neutrophil Extracellular Traps (NET). The formation of traps is activated by pathogens such as fungi, bacteria and parasites and microbial and immune components such as bacterial LPS, IL-8, IFN- γ , etc. *In-vitro*, phorbol myristate acetate (PMA) is the best inducer of NET formation through the release of reactive species of oxygen (EROS). Neutrophils were separated from human peripheral blood and Extracellular Traps were induced with phorbol myristate acetate. *T. vaginalis* was cultivated in TYI-S-33 during 24 h, trophozoites were placed into 24-wells culture plates that contained NET and incubated during 3 hours. The results observed with confocal microscopy show that *T. vaginalis* was captured by NET. These results contribute to the knowledge of the interaction between different pathogenic microorganisms with NET.

Keywords: *Neutrophil Extracellular Traps, Neutrophils, Trichomoniasis*

Resumen

La tricomoniasis es una infección de transmisión sexual no viral causada por el parásito *Trichomonas vaginalis*, en México ocupa el décimo sexto lugar entre las enfermedades transmisibles más comunes. La infección activa la migración de neutrófilos al sitio de infección, los cuales pudieran eliminar al trofozoíto por fagocitosis, degranulación y por las Trampas Extracelulares de Neutrófilo o NET, recientemente descubiertas. La formación de estas trampas, es activada por patógenos como hongos, bacterias y parásitos y por componentes microbianos o inmunes, tales como LPS bacteriano, IL8, IFN- γ , etc. *In vitro* el acetato de forbol miristato es el inductor más eficiente de la formación de NET a través de la liberación de especies reactivas de oxígeno (EROS). Para este estudio se aislaron neutrófilos a partir de sangre periférica humana y se indujo la formación de NET con acetato de forbol miristato. El parásito *T. vaginalis* se cultivó en medio TYI-S-33 durante 24 h, los trofozoítos se colocaron en cajas de cultivo de 24 pozos donde se encontraban las trampas y se incubaron 3 h. Los resultados observados por microscopía confocal arrojaron que durante la interacción las NET atrapan a los trofozoítos de *T. vaginalis*. Estos resultados contribuyen al conocimiento sobre la interacción de microorganismos patógenos con NET.

Palabras Clave: Trampa Extracelular de Neutrófilo, Neutrófilo, Tricomoniasis.

1. Introducción

1.1 *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis fue descrita por primera vez en el año de 1836 por el investigador médico francés Alfred F. Donné y por mucho tiempo ha sido considerada como una infección vaginal, sin embargo, fue hasta el año de 1916 que el investigador Hohne asignó el nombre de “Tricomoniasis” para describir dicha infección (citados en Upcroft y Upcroft, 2001; Ryu y Min, 2006; Hirt, 2013). La tricomoniasis es una enfermedad de transmisión sexual (ETS) causada por el parásito unicelular *Trichomonas vaginalis* (Figura 1). En mujeres la infección se encuentra en la vagina, mientras que en los hombres se presenta generalmente en las vías urinarias y/o próstata (Schwebke y Burgess, 2004, Carrada-Bravo, 2006; Van Der Pol, 2007).

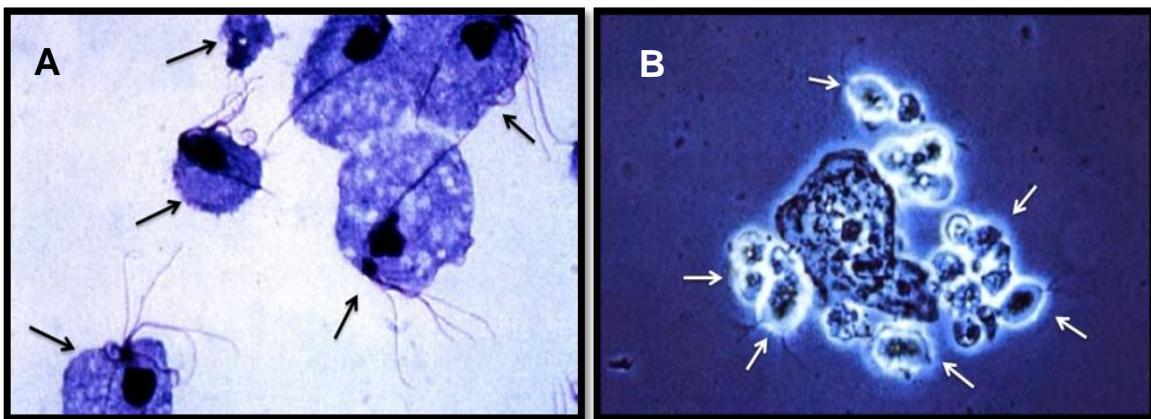


Figura 1. Morfología de *Trichomonas vaginalis*. La imagen A (Tinción de Giemsa, 4,200X) muestra los cuatro flagelos y el axostilo que atraviesa el cuerpo del parásito y que sale por el externo posterior que caracterizan al parásito. Imagen B, se observa en el centro una célula epitelial, plana y poligonal rodeada por parásitos ameboides y flagelados (400X) (Tomada de Carrada-Bravo, 2006).

1.1.1 Clasificación taxonómica

La clasificación de *Trichomonas vaginalis* fue propuesta en el año de 1980 por Levine y colaboradores (reportado en Nogal-Ruíz, 1999). Sin embargo, se ha

tomado con mayor importancia la clasificación de Dye descrita en 1990 (reportado en Schwebke y Burgess, 2004). El descubrimiento del parásito es atribuido al investigador médico francés Alfred F. Donné y designado con este nombre por Enrenberg en 1838 (reportado en Fraga, 2012).

Trichomonas vaginalis se ha ubicado en el reino “Protista”, tomando la clasificación de los organismos descrita por Haeckel en 1866, sin embargo, a principios del siglo XX, se dio una disputa por la clasificación de los seres vivos, ubicándolos en el reino animal, fue hasta el año de 1997 que la clasificación de Whittaker los ubico nuevamente en el reino “Protista”. Se encuentra en el filo “Zoomastigina”, término atribuido a Calkins en 1909, debido a la presencia de un aparato locomotor bien desarrollado denominado flagelos (reportado en Nogal-Ruíz, 1999).

En 1973, Honigberg realizó estudios sobre el parásito observando la presencia de membranas parabasales prominentes del Aparato de Golgi, de la estructura denominada “axostilo” y de estructuras denominadas hidrogenosomas, por ello se le asignó la clase “Parabasalia” (reportado en Schwebke y Burgess, 2004). Sin embargo, estudios filogenéticos del gen 16S del ARNr, demuestran que los hidrogenosomas no son estructuras primitivas, sino que pudieron haber surgido a partir de la involución de mitocondrias. Una prueba de ello es la similitud de proteínas como las chaperoninas que existen entre mitocondrias e hidrogenosomas (Reportado en Nogal-Ruíz, 1999).

Debido a que no presentan formación de quiste y cuya reproducción por fisión binaria, se han clasificado en el orden “Trichomonadida”, término atribuido a Kyrbi en 1947. Waynon en 1926, lo ubicó en la familia “Trichomonadidae”, para describir el axostilo en la parte posterior de la célula y de la presencia de citostomas (reportado en Schwebke y Burgess, 2004). Sin embargo, el género y especie “*Trichomona vaginalis*” es atribuido a partir de las observaciones realizadas por Donné citando lo siguiente ““...*animalículos en los materiales purulentos y en los productos de secreción de los órganos genitales del hombre y de la mujer...*” (Reportado en Nogal-Ruíz, 1999).

Con el paso de los años, se descubrirían nuevas especies, que invadirían los tractos digestivos, como *Trichomonas tenax* (cavidad bucal), *Trichomonas foetus* (tracto genital bovino) y *Trichomonas hominis* (tracto intestinal). Estos difieren uno de otros respecto al tamaño, número de flagelos, núcleo y membranas. La clasificación de *T. vaginalis* se muestra a continuación (Schwebke y Burgess, 2004).

REINO: Protista (Haeckel, 1866; Whittaker, 1997)

FILO: Zoomastigina (Calkins, 1909).

CLASE: Parabasalia (Honigberg, 1973).

ORDEN: Trichomonadida (Kyrbi, 1947).

FAMILIA. Trichomonadidae (Wanyon, 1926)

GÉNERO: *Trichomonas* ((Donné 1836).

ESPECIE: *Trichomonas vaginalis* (Donné 1836; Enrenberg, 1838).

1.1.2 Morfología

Trichomonas vaginalis es un parásito trofozoíto aerobio unicelular que mide de 23 - 39 μm de largo y de 5 – 8 μm de ancho. Posee un penacho de cuatro flagelos en la parte superior que en conjunto miden de 8 – 15 μm y un flagelo en la parte inferior denominado *axostilo* que mide de 3 – 14 μm . Como se muestra en la Figura 2, *T. vaginalis* es morfológicamente piriforme; sin embargo, también se pueden presentar en forma ameboide u ovoide (Pereira y Pérez, 2013; Ryu y Min, 2006; Schwebke y Burgess, 2004).

Posee una membrana ondulante que se extiende en dos tercias partes del cuerpo. Presenta en su membrana externa distintos antígenos, relacionados con su patogenicidad, lo que permite diferenciar diversos biotipos. En lugar de mitocondrias, *T vaginalis* posee gránulos cromáticos llamados hidrogenosomas que producen energía (ATP) e hidrógeno como producto final de la reacción metabólica (Figura 2). El cariotipo se ha descrito como haploide con seis

cromosomas y diploide con 12 cromosomas. (Upcroft y Upcroft, 2001; Cancelo y col. 2005; Ryu y Min, 2006; Harp y Chowdhury, 2011).

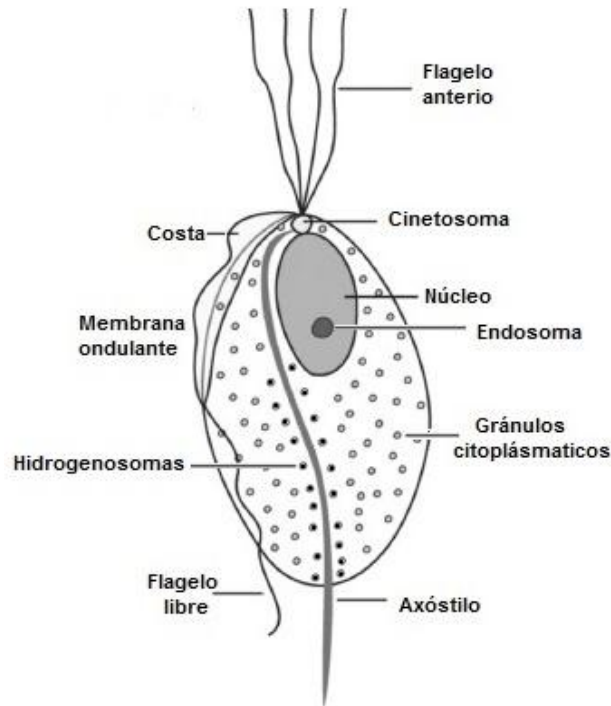


Figura 2. Estructura morfológica del trofozoíto *Trichomonas vaginalis*. La imagen muestra los componentes intracelulares y extracelulares del Parásito (Tomada de Harp y Chowdhury, 2011).

1.1.3 Ciclo de vida

El grupo de edad más afectado por la tricomoniasis es el de los 16 a 35 años de edad, debido a que es el periodo de mayor actividad sexual (Pereira y Pérez, 2013). Se transmite principalmente por contacto sexual; sin embargo, pueden también transferirse por orina o por contacto con toallas y/o esponjas húmedas; pero el contagio por estas vías es poco probable. Se considera al hombre como portador del parásito, que transfiere a la mujer por contacto sexual. En el caso de mujeres el parásito puede ser transferido de mujer a mujer o de mujer a hombre. Se reproduce en la mucosa del tracto urogenital en ambos sexos, hasta el momento no se ha descrito la formación de quistes. Su división es por fisión binaria y tiene un periodo de incubación de 4 a 28 días. Las siguientes

características se muestran en la Figura 3 (Schwebke y Burgess; 2004, Botero, 2006).

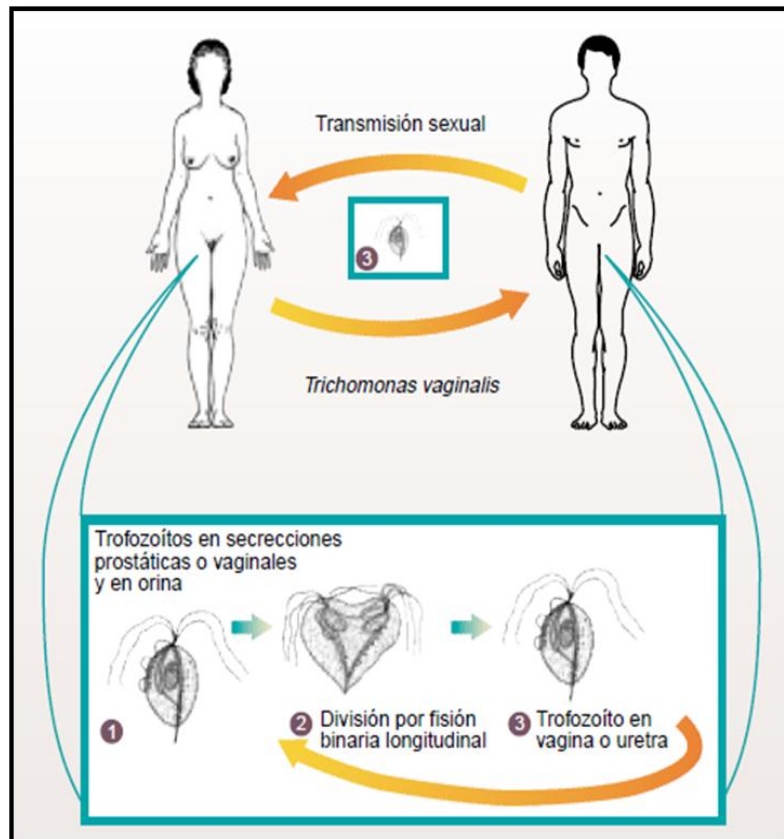


Figura 3. Ciclo biológico de *Trichomonas vaginalis*. El parásito se transmite por contacto sexual a través de secreciones prostáticas, vaginales u orina. Invade la cavidad vaginal y uretral. Una vez establecido, se reproduce por fisión binaria, obteniendo nutrientes a partir de bacterias presentes en el medio. (Tomada de Pereira y Pérez, 2003).

1.1.4 Sintomatología

T. vaginalis se puede presentar como una infección asintomática tanto en hombres como en mujeres. Aproximadamente el 25 al 50% de las mujeres infectadas no presentan sintomatología, debido a que el pH vaginal entre 3.8 y 4.2 limita el crecimiento de *T. vaginalis*; sin embargo, los síntomas suelen aparecer seis meses posteriores a la infección. En mujeres se presentan síntomas como prurito, dispareunia, malestar al orinar, dolor en los muslos, perineo y vulva y secreciones vaginales con mal olor, espumosas y de coloración amarillo-verdoso (Adad, 2005; Hernández y col, 2005; Trejos, 2012). En hombres por lo general la

infección transcurre con menor o nula sintomatología, para ello se ha clasificado en tres estados: asintomática, aguda y leve. Cuando la infección es sintomática se presentan síntomas como: secreción maloliente, ardor al orinar, prurito y dispareunia (Harp y Chowdhury, 2011; Cancelo y col, 2005; Hernández y col, 2005).

La sintomatología clínica de *T. vaginalis* es similar a otras infecciones provocados por microorganismos como: *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis* y *Gardnerella vaginalis*, provocando en mujeres vaginitis, cervicitis, uretritis y en hombres prostatitis (Hernández y col, 2005; Cancelo y col, 2005; Perazzi y col, 2007; Perea, 2010; Maciques y Alonso, 2002).

Se ha demostrado que pacientes infectados con *T. vaginalis* aumentan la predisposición de contraer los Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y del Papiloma Humano (VPH). Además, incrementa el riesgo de infecciones por otras enfermedades de transmisión sexual y el desarrollo de cáncer de próstata (Browden y Garnett, 2000; Moodley y col, 2002; Hernández y col. 2009; Ramos y col, 2011; Hirt, 2013; Kissinger y Adamski, 2013).

Cuando la infección está presente en mujeres embarazadas, propicia un incremento de rotura prematura de membranas, parto prematuro, bajo peso del neonato al nacer e incremento del riesgo de infertilidad. Además, la infección por *Trichomonas* puede ser transferido al hijo cuando pasa a través del canal uterino, ocurriendo esto en el 5% de los hijos nacidos de madres infectadas (Soper, 2004; Cancelo y col. 2009; Perea, 2010; Ramos y col, 2011).

1.1.5 Diagnóstico

Existen varias técnicas que permiten determinar la presencia de *T. vaginalis*. Una de las más utilizadas para observar la presencia y movilidad del parásito, es la microscopia directa del exudado en fresco por técnica de campo

oscuro o de contraste de fases. Sin embargo, en pacientes asintomáticos es poco probable determinar la presencia del parásito. Otro método es el cultivo del exudado en medios selectivos que dan un resultado de mayor exactitud, considerado un método de alto costo y de mayor tiempo (Carrada-Bravo, 2006, Perea, 2010, Maciques y Alonso, 2002). La técnica de Papanicolaou o tinción de Giemsa ha sido ampliamente aceptado como una prueba de detección de *T. vaginalis*. Informes recientes han sugerido algunas limitaciones para la prueba, debido a que posee una baja sensibilidad y altas tasas de falsos negativos, que han obligado a muchos a reconsiderar la utilidad de la citología como primer recurso (Kalantari y col, 2014). También se han utilizado pruebas de inmunofluorescencia para identificar el antígeno presente en la superficie del parásito (Cancelo y col, 2005).

1.1.6 Epidemiología

Tricomoniasis (A59.0) es una de las infecciones de transmisión sexual con mayor incidencia en México. En el año 2011 ocupó el duodécimo lugar dentro de las veinte principales causas de enfermedades de transmisión sexual (ETS), reportando 113,843 casos. Sin embargo, se observó un descenso del 49% al compararlo con el 2002, año en que se registró la cifra más alta del periodo analizado. Durante el mes de Diciembre 2013 la cifra descendió reportando 100,039 casos, siendo el grupo más afectado correspondió al de 25 a 44 años con 52,306 casos. El siguiente grupo afectado corresponde al de 19 a 24 años con incidencia de 19,220 casos. A nivel estatal Veracruz es el estado con mayor número de pacientes por tricomoniasis reportando un total de 12,493; en segundo lugar el Edo de México con 11,212 y Puebla en tercer lugar con un total de 10,683 casos que se muestran en la tabla 1 (<http://www.epidemiologia.salud.gob.mx>).

Casos probables de Tricomonirosis urogenital (A59.0) por fuente de notificación										
Estados Unidos Mexicanos 2013										
Poblacion General										
Estado	Institucion									Total
	Salud	IMSS-Ord	ISSSTE	IMSS-Op	DIF	PEMEX	SEDENA	SEMAR	Otras	
Aguaascalientes	757	102	16	S.R.	0	S.R.	0	S.R.	99	974
Baja California	434	240	6	7	S.R.	S.R.	1	1	94	783
Baja California Sur	197	45	8	S.R.	S.R.	S.R.	0	0	S.R.	250
Campeche	354	85	15	71	0	0	0	0	1	526
Coahuila	433	459	2	439	15	S.R.	0	S.R.	117	1465
Cotima	454	13	1	S.R.	6	S.R.	0	0	89	563
Chiapas	1 471	203	29	3 224	S.R.	0	0	0	207	5 134
Chihuahua	1 071	245	21	634	S.R.	S.R.	0	S.R.	67	2 038
Distrito Federal	218	156	1 450	122	106	0	0	10	4	2 066
Durango	671	75	1	2 026	0	S.R.	S.R.	0	111	2 884
Guanajuato	3 516	121	748	128	S.R.	0	0	S.R.	507	5 020
Guerrero	2 784	101	207	70	S.R.	S.R.	0	1	0	3 163
Hidalgo	2 012	30	66	1 036	0	0	0	S.R.	0	3 144
Jalisco	1 539	316	11	115	25	0	0	0	460	2 466
Mexico	9 888	472	92	129	520	S.R.	2	S.R.	109	11 212
Michoacan	1 825	184	45	2 387	S.R.	S.R.	0	7	S.R.	4 448
Morelos	1 962	134	9	19	S.R.	S.R.	0	S.R.	S.R.	2 124
Nayarit	524	56	77	714	23	S.R.	0	0	19	1 413
Nuevo Leon	976	453	156	9	S.R.	2	0	S.R.	587	2 183
Oaxaca	1 937	148	215	2 891	8	13	0	0	90	5 302
Puebia	2 089	131	216	8 143	6	0	0	S.R.	98	10 683
Queretaro	134	14	6	29	0	S.R.	0	S.R.	31	214
Quintana Roo	227	386	320	S.R.	S.R.	S.R.	0	0	0	933
San Luis Potosi	1 623	121	11	1 117	S.R.	0	0	S.R.	19	2 891
Sinaloa	387	340	79	717	112	0	0	0	15	1 650
Sonora	398	237	3	0	S.R.	S.R.	0	1	369	1 008
Tabasco	2 115	178	22	S.R.	S.R.	6	0	0	29	2 350
Tamaulipas	2 123	331	105	1 232	4	5	0	0	694	4 494
Tlaxcala	2 653	46	8	32	59	S.R.	0	S.R.	0	2 798
Veracruz	5 051	819	153	6 441	16	9	1	3	0	12 493
Yucatan	164	73	2	700	7	S.R.	0	0	0	946
Zacatecas	1 505	44	56	798	0	S.R.	0	S.R.	18	2 421
TOTAL GLOBAL	51 492	6 358	4 156	33 230	907	35	4	23	3 834	100 039

FUENTE: SINAVE/DGE/Salud/Sistema de Notificación Semanal de Casos Nuevos de Enfermedades.
S.N.- Sin notificación de casos.
S.R.- Sin representación de la institución en la entidad federativa.

Tabla 1. Censo realizado a dependencias de gobierno y particulares, reportando el número de casos de infecciones por tricomoniasis en el mes de Diciembre 2013. (<http://www.epidemiologia.salud.gob.mx>).

1.1.7 Tratamiento

El metronidazol (1-β-hidroxietilo-2-metilo-5-nitroimidazol) es un compuesto 5-nitro-imidazol, que se empezó a usar en el año de 1959 por Cosar y Julou para el tratamiento de infecciones producidas por *T. vaginalis* (citado en Vázquez y col, 2001). Para el tratamiento de la tricomoniasis se recomienda la administración vía oral de una dosis diaria de 500 mg de metronidazol por un periodo de siete días, o bien 250 mg vía oral tres veces al día durante siete días, o puede suministrarse una sola dosis de 2 g de metronidazol (Perea, 2010; Vicente y Pérez-Tallero, 2014). Se ha demostrado un efectividad de 86 a 97% (Carr y col, 1998; Schwebke y Burgess, 2004). Se recomienda no ingerir alcohol durante el tratamiento ya que puede provocar un efecto antabús. (Cancelo y col, 2005).

Aunque sigue habiendo cierta controversia sobre la seguridad de metronidazol durante el embarazo, nunca ha habido un caso documentado de malformación fetal atribuido a su uso, incluso cuando se utiliza en el primer trimestre. En este caso se recomienda una sola administración de 2 g vía oral (Carr y col, 1998; Schwebke y Burgess, 2004; Vicente y Pérez-Tallero, 2014).

Estudios recientes han demostrado que el parásito cada vez demuestra mayor resistencia a metronidazol, para ello se han desarrollado otros 5-nitroimidazoles de características farmacocinéticas y con actividad microbicida similar. Para pacientes con resistencia a metronidazol se recomienda la administración vía oral de Tinidazol en una sola dosis de 2 g (Schwebke y Burgess, 2004; Schwebke y Barrientes, 2006; Trejos, 2012).

1.1.8 Respuesta inmune ante el parásito

T. vaginalis posee diferentes mecanismos de colonización para adherirse al epitelio urogenital. Esta interacción de parásito-célula se debe principalmente a cuatro proteínas que se localizan en la membrana y que actúan como adhesinas (AP65, AP51, AP33 y AP23) que facilitan el establecimiento de la infección y la patogenicidad del mismo. Una vez que el trofozoíto se establece en el epitelio vaginal, es capaz de sobrevivir mediante la obtención de nutrientes a partir de las bacterias presentes (Arroyo y Alderete, 1989; Harp y Chowdhury, 2011).

T. vaginalis induce la respuesta inmune del hospedero, dicho sistema se encarga de la eliminación de microorganismos patógenos. En la respuesta inmune innata, el parásito activa la producción de interleucinas proinflamatorias que desencadena la migración de neutrófilos al sitio de infección. También se ha reportado la presencia de anticuerpos en el suero, principalmente IgG, IgA e IgM como una vía de protección. (Schwebke y Burgess, 2004). La vía alternativa de complemento es otro de los mecanismos de protección que a diferencia de la vía clásica no requiere de anticuerpos, esto comprende la unión de la convertasa C3 con los componentes C5, C6, C7, C8 y C9 para formar el complejo de ataque a la

membrana que abre poros en la superficie celular y lleva a la lisis de las células (Gillin y Sher, 1981, Alderete y col, 1995).

T. vaginalis posee mecanismos que le permiten evadir la respuesta inmune. Uno de estos mecanismos es mediante la liberación de proteínasas que degradan a inmunoglobulinas y que además permite la obtención de nutrientes mediante la degradación de hemoglobina. Otro mecanismo es la evasión del sistema de complemento mediante la degradación de C3b para impedir la formación del complejo de ataque a la membrana (Figueroa y col. 2012). Finalmente otro de los mecanismos de evasión es la inducción de apoptosis de neutrófilos por Caspasa-3 dependiente de especies reactivas de oxígeno (Song y col. 2008).

1.2 RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa contra microorganismos patógenos mediada por fagocitos, incluyendo macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (DC's) (Akira y col. 2006). Su función principal es impedir la proliferación de patógenos del sitio de infección, evitando la diseminación sistémica (Camicia y de Larrañaga, 2012). Este tipo de respuesta no posee memoria inmunológica, por lo que no se modifica a lo largo de la vida del individuo. Sin embargo, cuando los mecanismos de la inmunidad innata son insuficientes, se activan los mecanismos de la inmunidad adaptativa (Cocom-Góngora y col. 2004). Estos actúan específicamente sobre moléculas expresadas por el Patógeno llamadas Antígenos (Ag), mediante la producción de Anticuerpos (Ac) por linfocitos B y de linfocitos T (Cañas, 2001; Gabelloni y col. 2013).

1.2.1 Neutrófilos

Los leucocitos se originan a partir de células madre hematopoyéticas pluripotentes en la medula ósea, bajo la influencia de varios estímulos externos como citocinas, proteínas de la matriz y células accesorias. Las células madre se transforman a progenitoras hematopoyéticas de varios linajes como: progenitor

común linfocito y progenitor común mielocítico, este último da lugar a los monocitos y granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) (Stock y Hoffman, 2000).

Los neutrófilos o Polimorfonucleares (PMN), fueron descubiertas por el científico Ellie Metchnikoff en 1883, a partir de observaciones realizadas en estrellas de mar, como consecuencia de la inflamación producida por espinas insertadas. Debido a sus observaciones y definir a la fagocitosis como un mecanismo esencial para la supervivencia de los organismos, es considerado hoy en día como padre de la inmunología innata (reportado en Rojas-Espinoza y Arce-Paredes, 2003; Kumar y Sharma, 2010; Gabelloni y col. 2013). Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en la sangre, comprenden un 65 a 70% del total de las células blancas. Se caracterizan principalmente por poseer un núcleo con cromatina compactada distribuido de 3 a 5 lóbulos unidos entre sí por DNA libre. (Brinkmann y col. 2004; Mayer-Scholl, y col. 2004; Guimaraes-Costa, y col. 2011). Una vez que se han producido y han madurado, viajan a través del torrente sanguíneo por un periodo de 6 – 8 horas antes de migrar hacia tejido donde pueden permanecer de 2 – 3 días, de igual forma cuentan con un período de vida corta posterior a la infección. (Yam-Puc, y col. 2012).

1.2.2 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PAM) son moléculas efectoras del sistema inmune innato constituidas por 15 a 45 residuos de aminoácidos, son anfipáticos y con carga positiva, por ello se denominan péptidos catiónicos. Su función principal es la lisis de microorganismos patógenos; sin embargo, también se han descrito propiedades quimiotácticas que modulan el sistema inmune innato para así crear un puente de modulación con la inmunidad adaptativa. Además, se han descrito mecanismos como la inhibición de la síntesis proteica y de ácidos nucleicos (Rivas-Santiago y col. 2006; Téllez y Castaño, 2010).

En el ser humano, los PAM se clasifican tomando en cuenta su estructura secundaria, composición de aminoácidos y puentes de disulfuro, en Defensinas,

Catelicidinas e Histidinas (Escovar y col. 2004, Rivas-Santiago y col. 2006, Téllez y Castaño, 2010).

Las defensinas son péptidos catiónicos, con alto contenido en arginina y con un peso molecular entre 3.5 y 4.5 kDa, caracterizados principalmente por poseer tres puentes de disulfuro. Éstos a su vez han sido clasificados como α -defensinas que son péptidos que contienen de 29 – 35 aminoácidos, aisladas por primera vez en el año de 1985 y las β -defensinas descubiertas en el año de 1995 a partir de la lengua de vaca. Fueron denominadas como β debido a que los puentes de disulfuro difieren en espacio respecto a las α , poseen de 36 a 42 aminoácidos (Reportado en Escovar y col. 2004).

Dentro de los péptidos antimicrobianos también se encuentran las Catelicidinas que están constituidos de 16 a 80 aminoácidos. Fueron descubiertos en bovinos y puercos en el año de 1992 (reportado en Escovar y col. 2004). Estos PAMS se caracterizan por tener una secuencia conservada y una heterogeneidad en el dominio C-terminal que codifica para péptidos maduros, el más conocido es el LL-37 o también denominado hCAP-18. Y por último se encuentra el grupo de Histatinas que están constituidos de 24 a 38 aminoácidos, localizados principalmente en saliva, con actividad microbicida principalmente para hongos (Castrillón y col. 2007).

1.2.3 Agentes citotóxicos de neutrófilos

Intracelularmente, los neutrófilos destruyen a los microorganismos fagocitados, mediante agentes tóxicos de los gránulos de los neutrófilos que se fusionan con el fagosoma. Estos agentes citotóxicos se encuentran divididos en oxígeno-independientes y oxígeno-dependientes como se muestra en la figura 4 (Kobayashi y col, 2005). En los primeros se encuentran enzimas, proteasas, proteínas y péptidos antimicrobianos clasificados en los tres tipos de gránulos del neutrófilo, éstos son: Gránulos Azurofílicos (contienen Defensinas, Elastasa de Neutrófilo, Lisozima, Captesina G y MPO), Gránulos Específicos (Lactoferrina y Lisozima) y Gránulos de Gelatinasa (Gelatinasa, Lisozima, Acetil-transferasa). Los

agentes oxígeno-dependientes resultan del estallido oxidativo de los neutrófilos que endocitaron microorganismos. El complejo NADPH-oxidasa se ensambla en la membrana fagosomal produciendo especies reactivas de oxígeno que contribuyen a la destrucción del patógeno fagocitado (Mayer -Scholl, y col. 2004; Camicia y de Larrañaga, 2012).

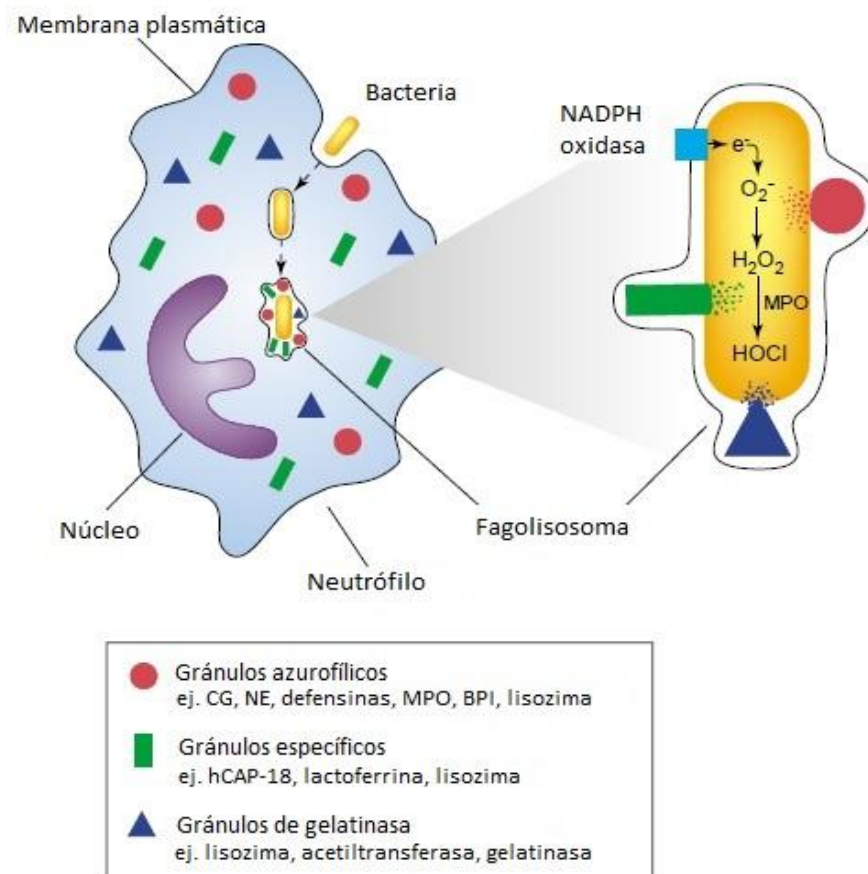


Figura 4. Componentes intracelulares de los gránulos de Neutrófilos. La imagen representa los componentes oxígeno-dependientes y los oxígeno-independientes. Los oxígeno-independientes se encuentran agrupados en gránulos azurofílicos, específicos y de gelatinasa. En los oxígeno-dependientes se muestra el mecanismo del complejo NADPH-oxidasa que se ensambla a la membrana fagosomal para la producción de O_2^- (Tomada de Mayer-Scholl y col, 2004).

1.2.4 Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs)

Brinkman y col, en el 2004 descubrieron que los neutrófilos además de eliminar a los patógenos por actividad fagocítica y degranulación de agentes

microbicidas, poseen un mecanismo denominado formación Trampas Extracelulares de Neutrófilos o NETs (del inglés, *Neutrophil Extracellular Traps*). Estos son estructuras compuestas por cromatina nuclear descondensada, que pueden estar asociados a histonas como H1, H2A, H2B, H3, H4 y gránulos proteicos que son liberados al medio extracelular en forma de redes que miden de 25 – 28 nm de diámetro. Sin embargo, proteínas de membrana y componentes citoplasmáticos tales como: Anexina I, Actina y Tubulina se encuentran ausentes en NETs. La formación de NETs conduce a la muerte celular de los neutrófilos mediante el proceso denominado NETosis, el cual es diferente a la apoptosis y la necrosis (Brinkman, y col, 2004; Fuchs y col, 2007; Wartha, y col, 2007; Medina, 2009; Yost, y col, 2009; Meijer y col. 2012; Yam-Puc, y col, 2012; Iba, y col, 2013).

Las NET se pueden formar y liberar en los sitios de inflamación, 10 minutos posteriores a la activación (Meijer y col. 2012). Las redes de ADN de las NETs tienen como función atrapar a las proteínas catiónicas nucleares (histonas) y péptidos antimicrobianos granulares (defensinas, hCAP-18). Estos a su vez capturan a los microorganismos debido a la interacción de las cargas - de la superficie de los patógenos con las cargas + de los péptidos antimicrobianos, encerrándolos en el sitio de infección y previniendo su diseminación (Brinkman, y col., 2004), ejemplo de esto se muestra en la figura 5. Las NET interactúan con bacterias Gram negativas (-) (*Shigella flexneri*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas luminescens*) Gram positivas (+) (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*), hongos (*Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*) y parásitos (*Plasmodium falciparum*, *Leishmania amazonensis* y *Eimeria bovis*) (Medina, 2009; Arazna y col. 2013; Bonne-Année y col., 2014).

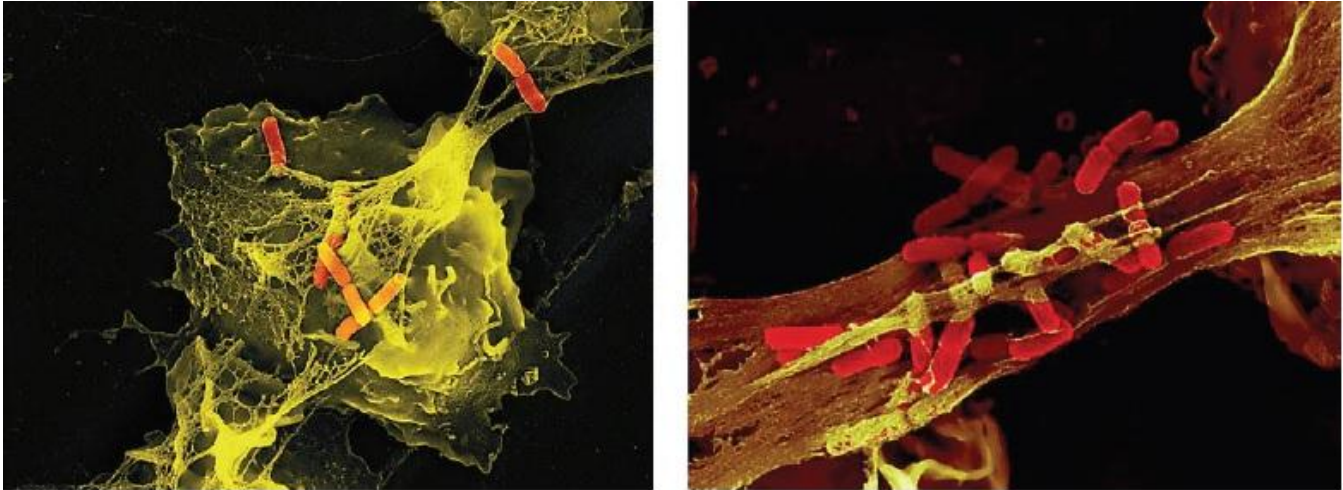


Figura 5. Trampas extracelulares de neutrófilo. Fotografías tomadas por microscopía electrónica de barrido. La imagen muestra a los bacilos de *Shigella flexneri* (rojo) atrapados en las NETs (amarillo). Proviene de V. Brinkmann, Department of Cellular Microbiology, Max Planck Institute for Infection Biology, Berlin, Germany (Citado en Medina, 2009).

1.2.5 Formación de NETs

El proceso de NETosis consiste en la muerte programada de Neutrófilos, estimulado por bacterias, virus, hongos, parásitos y factores derivados de ellos como el lipopolisacárido bacteriano (LPS), y/o del sistema inmune como IL-8, TNF, IFN- γ (Urban y col, 2006; Guimarães y col, 2009; Saitoh, y col. 2012; Goldman y Medina, 2013; Almyroudís y col. 2013). En estudios *in vitro* la NETosis se puede inducir por Acetato de Forbol Miristato (PMA) (Geffner y col. 1991, Remijsen, y col. 2011b), ejemplo de ello se muestra en la figura 7.

Durante la NETosis los núcleos del neutrófilo pierden la forma lobular, por lo tanto la eucromatina y la heterocromatina se homogenizan. La membrana nuclear se rompe y los gránulos citoplasmáticos se fusionan permitiendo que los componentes nucleares y granulares se mezclen. Finalmente la membrana celular pierde su integridad y todos los componentes se liberan al medio extracelular dando como resultado *Trampas Extracelulares de Neutrófilos*, como se muestra en la Figura 6 (Fuchs et al., 2007; Yam-Puc, et al. 2012).

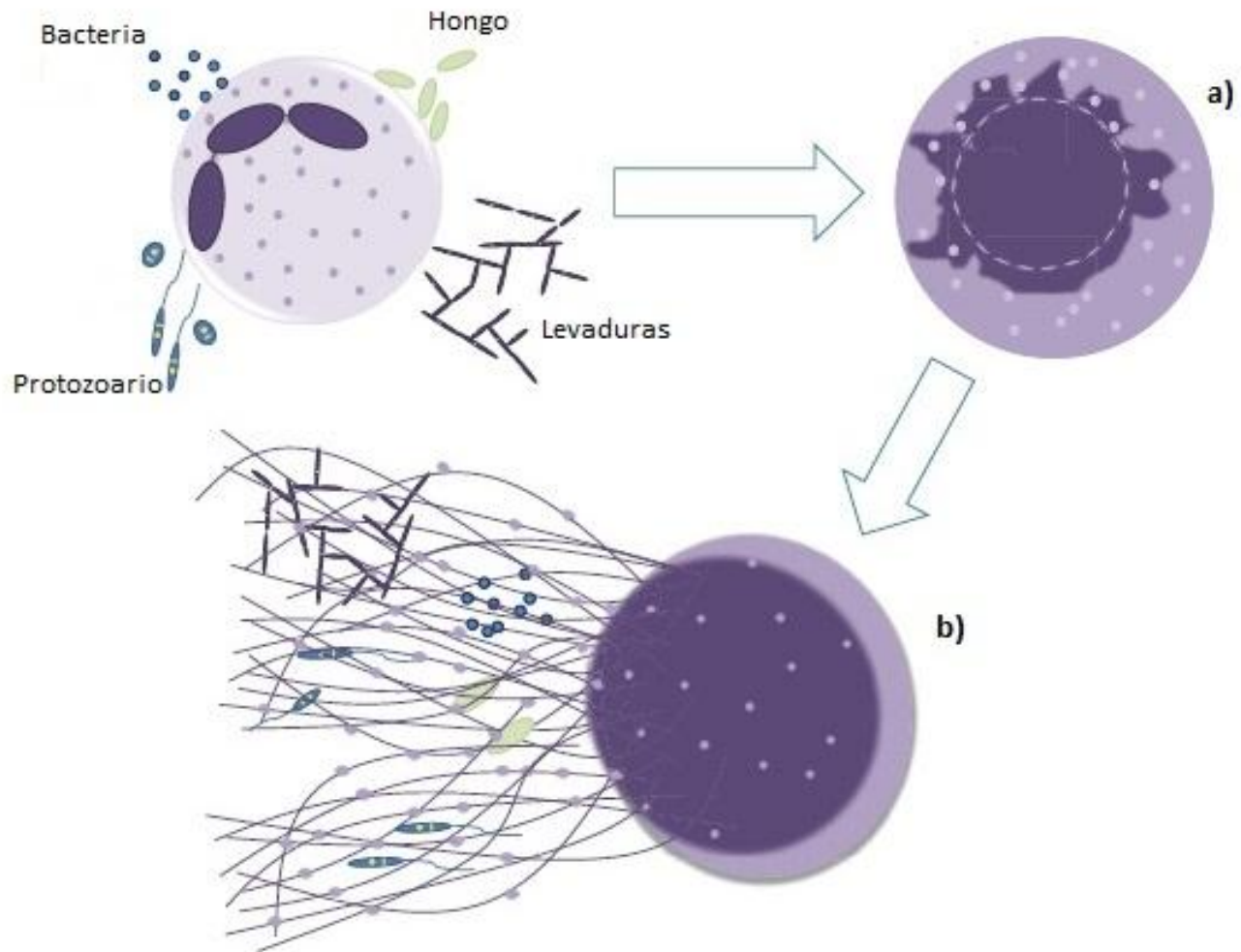


Figura 6. Formación de Trampas Extracelulares de Neutrófilo. Las Trampas Extracelulares de Neutrófilos son inducidas *in vivo* por microorganismos como bacterias, protozoarios y hongos. A) Durante la formación, el DNA se descondensa fusionándose con los gránulos citoplasmáticos, B) rompiendo la integridad de la membrana celular para liberar las redes de DNA. (Tomada de Guimarães y col, 2009)

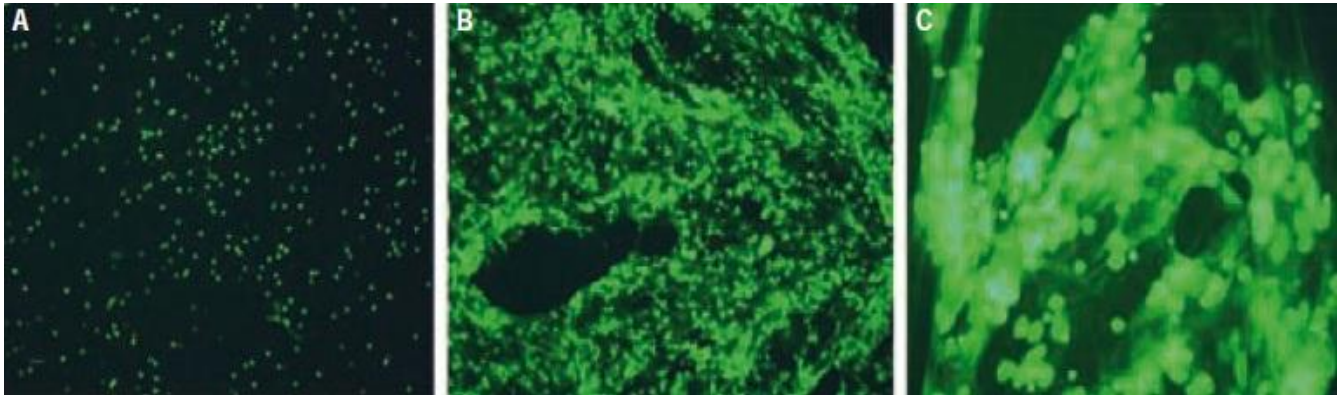


Figura 7. Inducción de la formación de NET en neutrófilos humanos: La imagen A (10x) muestra a los granulocitos en ausencia de PMA, la imagen B y C (40x) muestra la formación de NET en presencia de PMA durante 4 h. Posterior a la incubación se tiñeron con SytoxGreen y se observaron por microscopía de fluorescencia (Tomada de Yam-Puc y col. 2012).

1.2.6 Papel de las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) en la formación de NET

Los inductores de la formación de NET desencadenan la activación del complejo enzimático NADPH-oxidasa que libera especies reactivas de oxígeno (Angosto, 2005; Papayannopoulos y Zychlinsky, 2009; Almyroudis, y col. 2013). Se ha demostrado que los neutrófilos de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, no liberan especies reactivas de oxígeno, por lo tanto no se desencadena la formación de NET. Esto se debe a mutaciones que ocurren en los genes que codifican para algunos componentes de la NADPH-oxidasa, en consecuencia no se producen especies reactivas de oxígeno (Angosto, 2005; Fuchs y col, 2007; Metzler, y col, 2011; Remijsen y col. 2011a).

Para la formación de NET, el complejo NADPH-oxidasa se ensambla en la membrana fagosomal del Neutrófilo incrementado el consumo de O_2 , proceso denominado “*estallido oxidativo*”. Los componentes del complejo NADPH-oxidasa se separan en el citosol (p40phox, p47phox, p67phox, Rac2) y la membrana (Flavocitocromo b558, Rap1A). Durante la fagocitosis los componentes del citosol se traslocan a la membrana del fagosoma y se fusionan con el Flavocitocromo.

Éste cataliza la transferencia de un electrón desde el NADPH hacia el O_2 con la formación del radical o anion superóxido (O_2^-). El O_2^- se convierte en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($OH\cdot$) y ácido hipocloroso ($HOCl$). Éstos, junto a las especies reactivas derivadas del nitrógeno y a las enzimas proteolíticas de los gránulos, constituyen el mecanismo fundamental microbicida de las NET (Mayer-Scholl, y Col. 2004; Angosto, 2005; Quinn y col, 2007; Paravicini y Touyz, 2008; Camicia y de Larrañaga, 2012; Song y Ryu, 2013).

Estudios recientes elaborados en el laboratorio, han demostrado la importancia de las NETs, que poseen péptidos antimicrobianos, sobre el parásito *Entamoeba histolytica*, arrojando como resultado una leve disminución del crecimiento del parásito después de la interacción. Sin embargo, actualmente no se cuenta con estudios suficientes que permitan entender de qué manera estas NETs actúan sobre los diferentes tipos de microorganismo patógenos como hongos, bacterias y sobre todo parásitos. Por ello, la finalidad del proyecto es entender el funcionamiento de las trampas sobre el trofozoíto *Trichomonas vaginalis*, responsable de la infección Tricomoniasis, principal enfermedad de transmisión sexual no viral en México.

2. Hipótesis

Se ha reportado que las Trampas Extracelulares de Neutrófilos tienen un efecto microbicida. La hipótesis de este estudio es que las trampas extracelulares interaccionan con *T. vaginalis*, disminuyendo el crecimiento del parásito.

3. Objetivos

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Analizar el efecto de trampas extracelulares de neutrófilos en la interacción con *Trichomonas vaginalis*.

3.1.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la interacción de *Trichomonas vaginalis* con Trampas Extracelulares de Neutrófilo mediante microscopia confocal.
- Determinar la interacción de neutrófilos con el trofozoíto *T. vaginalis* en diferentes relaciones celulares.
- Cuantificar el crecimiento de *Trichomonas vaginalis* en diferentes condiciones después de la interacción con Trampas Extracelulares de Neutrófilo.

4. Materiales y Métodos

4.1 Cultivo y Cosecha de trofozoítos de *Trichomonas vaginalis*

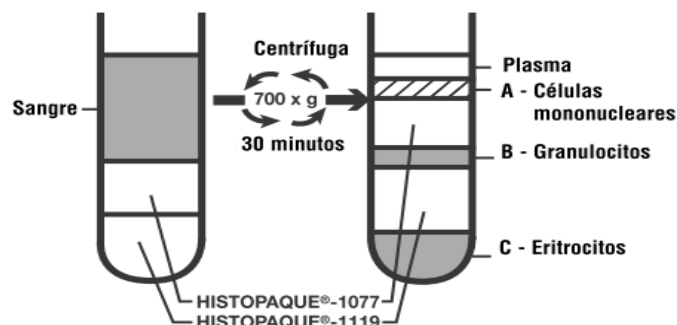
La cepa GT-13 de *Trichomonas vaginalis* fue aislada en el laboratorio del Dr. Fernando Anaya V. a partir de exudados vaginales de pacientes femeninas infectadas, en el Estado de Guanajuato, México (Padilla Vaca y Anaya Velázquez, 1997). Se cultivó en 5 ml de medio líquido TYI-S-33 adicionado con 6% de suero bovino a un pH de 7.0 por un periodo de 24 h a 36.5°C. Posterior al tiempo de cosecha se colocó el volumen de cultivo en un tubo cónico estéril de 15 ml centrifugando a 389 g durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en medio RPMI con 2% de albúmina sérica humana.

Para el conteo de células por microscopía óptica, se tomaron 10 μ l de la suspensión celular llenando la cámara de Neubauer, tomando el promedio de cuatro rejillas para leucocitos y multiplicando por 1×10^4 para obtener la cantidad de células/ml.

4.2 Aislamiento de Neutrófilos Humanos

Se seleccionaron a donadores de sangre voluntarios sanos entre 22 y 30 de años de edad de ambos sexos de la ciudad de Guanajuato, Gto. El aislamiento de neutrófilos Humanos se realizó de acuerdo al protocolo reportado por el proveedor de los reactivos (www.sigma-aldrich.com). Para ello se recogieron 6 ml de sangre periférica en tubos con heparina o EDTA sin conservantes, colocándolos en gradientes de 3 ml de los HISTOPAQUE 1119 (Sigma-Aldrich, Cap: 11191) y 1077 (Sigma-Aldrich, Cap: 10771) de diferente densidad, colocando uno sobre el otro cuidadosamente. Posteriormente se centrifugó a 700 g por 30 minutos a temperatura ambiente. Con ayuda de una pipeta Pasteur estéril se aspiraron los granulocitos, como se muestra en la siguiente figura:

Las células se colocaron en un tubo nuevo de 15 ml con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) estéril, se lavaron mediante centrifugación a 389 g durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante, resuspendiendo en medio RPMI con 2% de albúmina sérica humana. Posteriormente se realizó un conteo de células por microscopía óptica en cámara de Neubauer tomando el promedio de cuatro rejillas para leucocitos y multiplicando por 1×10^4 para obtener la cantidad de células/ml.



4.3 Inducción de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NET)

A una placa de cultivo de 24 pozos se agregaron 2×10^5 células en medio RPMI adicionado con 2% de albúmina sérica humana incubando durante una hora en cámara de CO_2 al 5% a 37°C . Después de la incubación, se agregó el inductor de la proteína cinasa C (PKC) Acetato de Forbol Miristato (PMA) a una concentración final de 488 nM en cada uno de los pozos marcados como NET. Posteriormente se incubó en cámara de CO_2 al 5% a 37°C por un periodo de 4 h.

4.4 Interacción de Trampas Extracelulares de Neutrófilos con *T. vaginalis*

Posterior a la inducción realizada en el punto 4.3, se agregó la suspensión de *T. vaginalis* a una relación de un trofozoíto por cada 20 neutrófilos inducidos (1:20). En algunos pozos se agregaron los componentes EGTA (0.5 mM) con actividad quelante de iones Ca^{2+} y/o E-64 (10 μM) como inhibidor de Cisteína-Proteasas. Los trofozoítos de *T. vaginalis* se incubaron en presencia de NET en atmósfera microaeróbica (disminución de la tensión de oxígeno) durante 3 h, para ello se emplearon las condiciones que se muestran en la siguiente Tabla 2.

		Condición
Controles	1°	<i>T. vaginalis</i>
	2°	<i>T. vaginalis</i> + E-64 (10 µM)
	3°	<i>T. vaginalis</i> + EGTA (0.5 mM)
	4°	<i>T. vaginalis</i> + E-64 (10 µM) + EGTA (0.5 mM)
	5°	Neutrófilos + <i>T. vaginalis</i>
Tratamientos	6°	NET+ <i>T. vaginalis</i>
	7°	NET+ <i>T. vaginalis</i> E-64 (10 µM)
	8°	NET+ <i>T. vaginalis</i> EGTA (0.5 mM)
	9°	NET+ <i>T. vaginalis</i> E-64 (10 µM) + EGTA (0.5 mM)

Tabla 2. Condiciones de la interacción de Neutrófilos y NET con *T. vaginalis*.

4.5 Cuantificación del crecimiento de *T. vaginalis* en interacción con NETs

Después de la interacción realizada en el punto 4.4 se agregó el medio TYS-S-33 Modificado con 16% de Suero Bovino y Kanamicina (Ver anexo 10.1.3). Posteriormente se dejó en incubación en cámara aeróbica, colocando una placa Anaerocult A (Merck cat. 1.13829) por un periodo de 35 h. Al término de la incubación se despegaron los trofozoítos en frío durante 10 min, agregando como agente fijador Glutaraldehído a una concentración final de 1%.

4.6 Observación por microscopía confocal

Se siguió el procedimiento realizado en el punto 4.4, sin embargo, previo a la incubación de los neutrófilos se colocó un cubreobjetos estéril en cada uno de los tratamientos que se muestran en la tabla 3.

		Condición
Controles	1°	<i>T. vaginalis</i>
	2°	Neutrófilos
	3°	NET
	4°	Neutrófilos + <i>T. vaginalis</i>
	5°	NET+ <i>T. vaginalis</i>

Tabla 3. Condiciones de la interacción de neutrófilos y NET con *T. vaginalis* para la observación en microscopia confocal.

Después del periodo de interacción, se montaron los cubreobjetos en portaobjetos lavados y estériles (Ver anexo 10.4) usando ProLong Gold (Life Technologies. Cat. P36930), solución que ayuda a mantener la fluorescencia de las células previamente marcadas con colorantes.

4.7 Interacción de Trampas Extracelulares de Neutrófilos con células preteñidas de *T. vaginalis*

Se realizó una suspensión de *T. vaginalis* marcadas con el colorante PKH26 (Ver anexo 10.3.1), se añadieron a una placa de 24 pozos que contenían NETs inducidas con PMA, empleando una relación de 1 trofozoíto por cada 20 neutrófilos inducidos. Se permitió la interacción por un periodo de 3 h en atmósfera microaerófila, al término de la cual se agregó como agente fijador Paraformaldeído a una concentración final de 4%. Se agregó el colorante Hoechst 33342 a una concentración final de 10 µg/ml para teñir DNA.

4.8 Interacción de Neutrófilos con *T. vaginalis* a diferentes relaciones

Se realizó una interacción de neutrófilos sin el inductor de la proteína cinasa C, Acetato de Forbol Miristato (PMA) con los trofozoítos de *T. vaginalis* marcados con PKH26 a diferentes relaciones: 1:5, 1:10 y 1:20, colocando un cubreobjetos estéril y

lavado, previo a la incubación de neutrófilos para observar la interacción por microscopia confocal.

4.9 Actividad pinocítica de *T. vaginalis*

Se ha reportado que *T. vaginalis* tiene la capacidad de pinocitar medio extracelular, para determinar esta actividad en las condiciones de interacción con NET se realizó el siguiente procedimiento. En una placa de 24 pozos se colocó un cubreobjetos estéril y lavado, posteriormente se indujo la formación de NET descrita en el punto 4.3. Después de la inducción se añadieron los trofozoítos de *T. vaginalis* y Dextran-Rhodamina a una concentración final de 100 µg/ml. Se dejó en incubación en cámara microaerófila por un periodo de 3 h, con la finalidad de permitir que los trofozoítos realicen el proceso de pinocitosis. Posterior a la incubación se fijaron con Paraformaldehído a una concentración final de 4%, añadiendo además el colorante Hoechst 33342 a una concentración final de 10 µg/ml.

4.10 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se realizaron tres experimentos por triplicado. Se calculó el promedio de cada una de las condiciones establecidas en el punto 4.4. Posteriormente se representó en una gráfica de barras en el programa Excel, para comparar el número aproximado de trofozoítos en cada condición con y sin inhibidores (E64 y EGTA) en interacción con NETs. Después se realizó el análisis estadístico ANOVA en el programa GraphPad Prism 4, para analizar si existen diferencias significativas entre cada condición.

5. Resultados

5.1 Cultivo y cosecha de trofozoítos de *T. vaginalis*

Para observar por microscopia confocal los trofozoítos de *T. vaginalis* se utilizó en nuestro ensayo el colorante lipofílico PKH26. Éste se adhiere a las membranas del trofozoíto vivo, marcando la forma anatómica y flagelar que caracterizan al mismo. En la figura 8 se visualiza el resultado obtenido de la cosecha de *T. vaginalis* (Materiales y Métodos 4.1), por contraste de fases y por microscopía confocal. Para observar el núcleo del trofozoíto se utilizó el colorante Hoechst 33342.

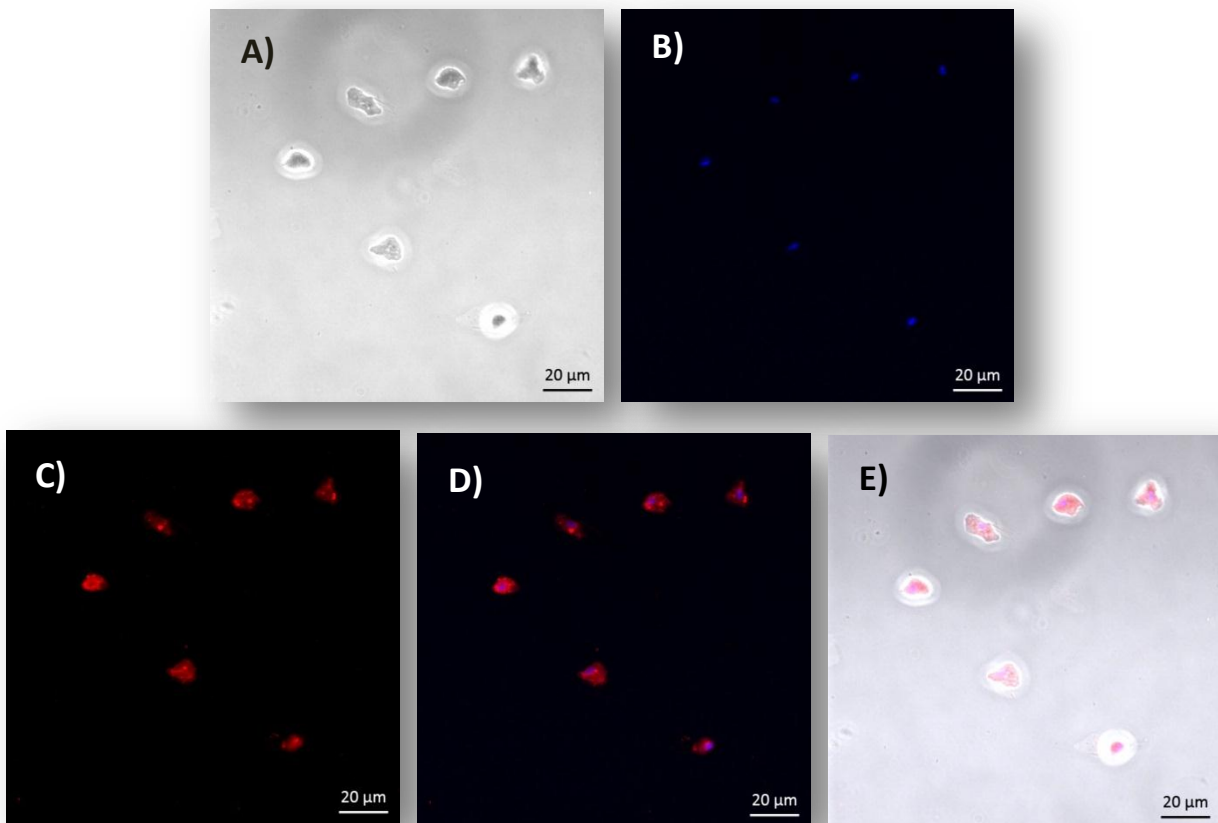


Figura 8. Morfología de *T. vaginalis* marcadas con el colorante PKH26. La imagen A campo observado por contraste de fases. La imagen B muestra en color azul los núcleos de los trofozoítos. La imagen C muestra en color rojo la forma ameboidea y flagelar de *T. vaginalis*. En la imagen D se observa el traslape de ambos colorantes marcando el núcleo y membrana del trofozoíto. La Imagen E permite la observación del acoplamiento de ambos colorantes con el contraste de fases (Microscopia Confocal, 40X).

5.2 Pinocitosis del trofozoíto *T. vaginalis*

Para evaluar la viabilidad de los trofozoítos de *T. vaginalis*, se realizaron pruebas para observar la pinocitosis del parásito descrito en el punto Materiales y Métodos 4.9, utilizando para ello el componente Dextran-Rhodamina en presencia de NETs.

En la figura 9 se observan los resultados obtenidos del control de *T. vaginalis* en ausencia de NET. La primera observación se realizó por contraste de fases, visualizando a los trofozoítos distribuidos en el campo. El color rojo representa el colorante Dextran-Rhodamina, comprobando con ello que *T. vaginalis* pinocita dicho conjugado, sin embargo, también fue aplicado el colorante Hoechst 33342 para observar el núcleo de las células.

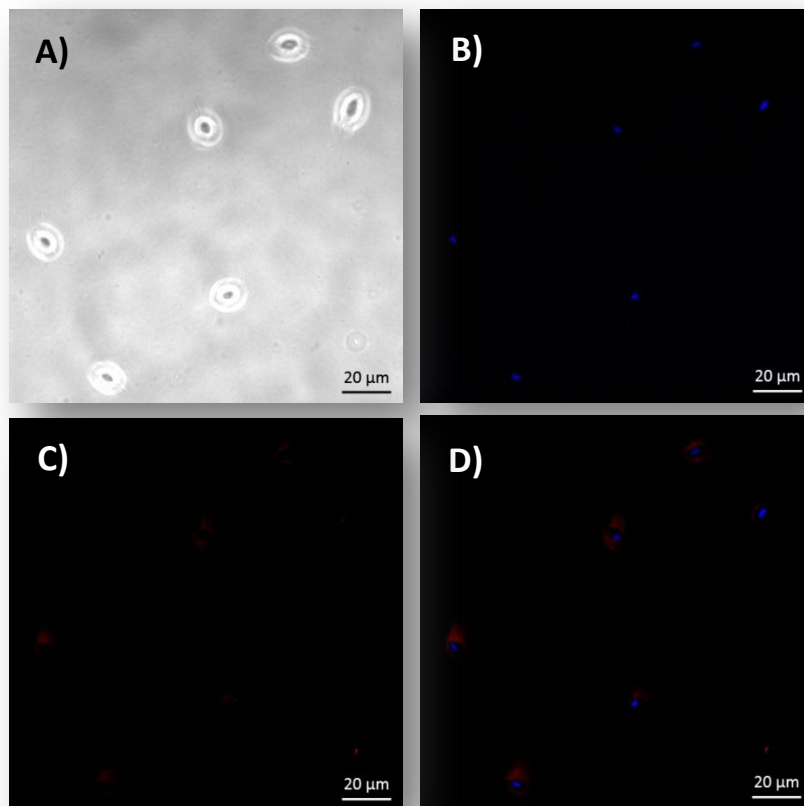


Figura 9. Actividad pinocítica de *T. vaginalis*. La imagen A muestra el campo por contraste de fases, indicando la forma y posición de *T. vaginalis*. En la imagen B se observa en color azul, los núcleos. La imagen C representa la pinocitosis de Dextran-Rhodamina realizada por los trofozoítos. La imagen D representa el traslape de ambos colorantes (Microscopia confocal, 40X).

5.3 Aislamiento de Neutrófilos

Para la obtención de neutrófilos el procedimiento se basó en el uso de gradientes de diferente densidad, que fueron sometidos a centrifugación para garantizar la obtención y diferenciación de células polimorfonucleares de células mononucleares y eritrocitos. Para ello nosotros utilizamos los gradientes de HISTOPAQUE 1119 y 1070 descrito en Materiales y Métodos 4.2.

En la figura 10 se muestra el resultado del aislamiento de Neutrófilos, que fueron observados por microscopia confocal (Materiales y Métodos 4.6) utilizando el colorante Hoechst 33342 para teñir DNA. Se observan los múltiples núcleos de las células que permite caracterizar y diferenciar a los polimorfos o polimorfonucleares de otras células. Se observaron varios campos, lo cual nos arroja como resultado que el 98% de las células corresponden a neutrófilos.

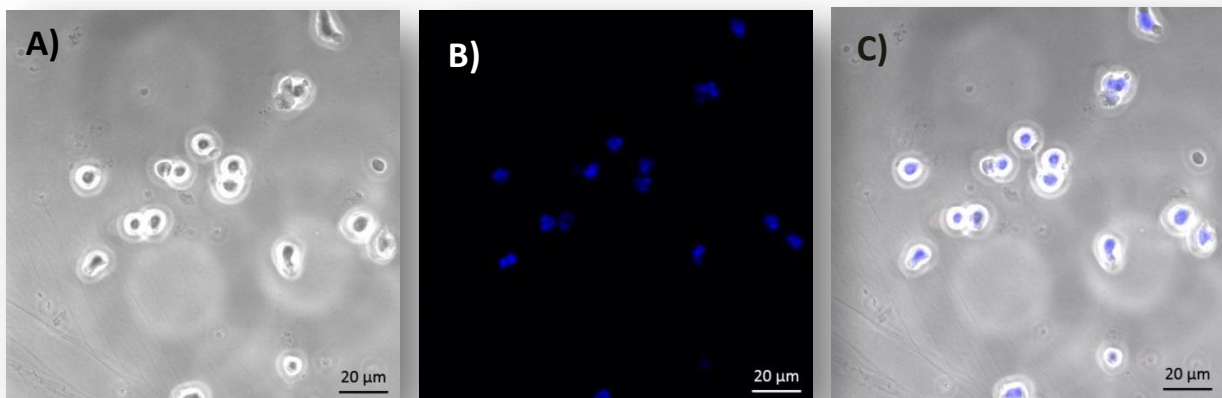


Figura 10. Aislamiento de Neutrófilos de Sangre Periférica Humana. Las imágenes muestran el resultado de la obtención de los polimorfos, observados por Microscopia Confocal en objetivo 40X. En la imagen A se muestra el campo por contraste de fases, la imagen B muestra los núcleos marcados en azul de las células teñidas con el colorante Hoechst 33342 y la imagen C muestra el traslape entre él colorante y el contraste de fases.

5.4 Formación de NETs por el activador PMA

La formación de NETs, se realizó *in vitro* por el activador de la proteína cinasa C (PKC) Acetato de Forbol Miristato o PMA (Materiales y Métodos 4.3). Este activador penetra la membrana celular del neutrófilo ocasionado una serie de

reacciones que activan la liberación de Especies Reactivas de Oxígeno mediante el proceso denominado Estallido Oxidativo que intervienen en la formación de Trampas Extracelulares de Neutrófilos. Las imágenes de la figura 11 muestran los resultados obtenidos, se observan dos series de diferente campo de la misma muestra, visto por contraste de fases y por microscopía confocal utilizando el colorante Hoechst 33342 (permeable a las membranas) para teñir el DNA de las trampas.

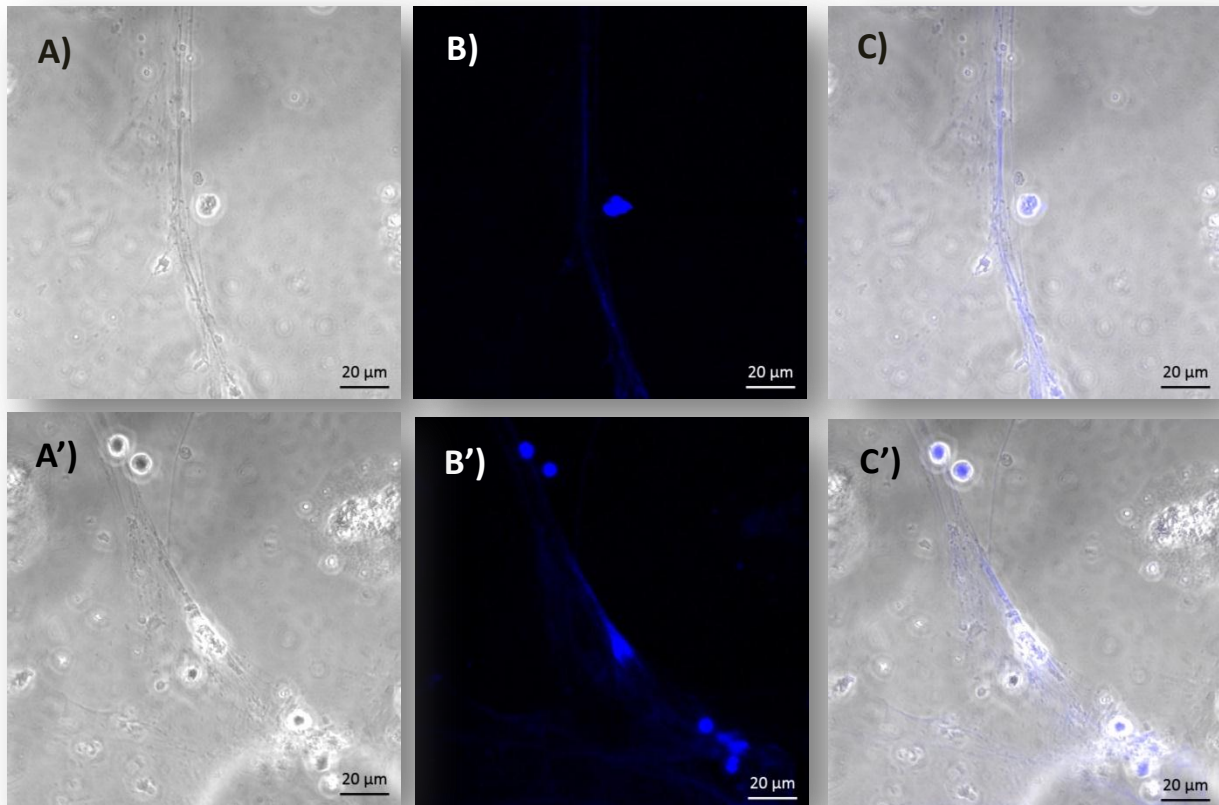


Figura 11. Inducción de la formación de NETs por acción del PMA. Las imágenes A y A' muestran las redes de DNA y neutrófilos por contraste de fases. Las imágenes B y B' muestran en color azul las fibras de DNA, así como los núcleos de las células que no fueron inducidas para la formación de NETs. Las imágenes C y C' muestran el traslape de la tinción con el colorante Hoechst 33342 y el contraste de fases. Todas las imágenes fueron tomadas por Microscopia Confocal en objetivo 40X.

5.5 Actividad pinocítica de *T. vaginalis* en interacción con NETs.

Una vez observada la viabilidad de *T. vaginalis* con el colorante Dextran-Rhodamina se sometieron a interacción con Trampas Extracelulares de Neutrófilos inducidos con PMA (488 nM). La figura 12 muestra los resultados obtenidos de la interacción, observadas por Microscopia Confocal y por Contraste de Fases en objetivo 40X. Se utilizó el colorante Hoechst 33342 para observar las fibras de DNA de las trampas. También es posible visualizar los residuos de *T. vaginalis* (rojo) el cual ha sido degradado por efecto de la interacción con NETs.

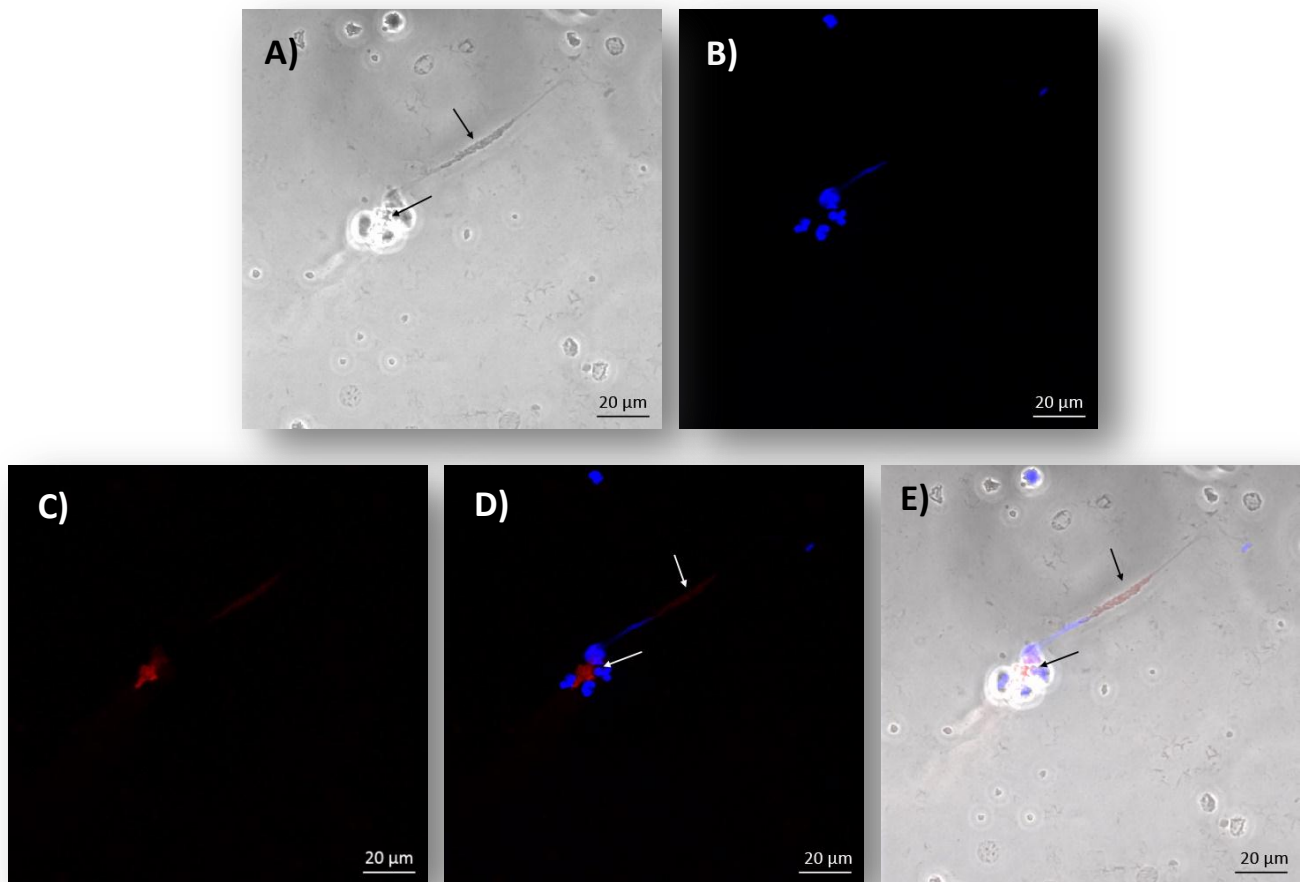


Figura 12. Actividad pinocítica de *T. vaginalis* en interacción con NETs. A) Campo por contraste de fases, indicando la forma y posición de *T. vaginalis* y NETs. B) Se observa en color azul las fibras de DNA. C) Se representa los desechos del trofozoíto, previamente marcada con el colorante Dextran-Rhodamina por proceso de pinocitosis. D) Se presenta el acoplamiento de ambos colorantes, pudiendo observar la continuidad de la trampa con los residuos de *T. vaginalis*. E) Traslape de ambos colorantes y el contraste de fases, corroborando la posición y forma de la trampa con el trofozoíto (Microscopia confocal, 40X).

5.6 Interacción de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs) inducidas con PMA con el trofozoíto *T. vaginalis*

Las Trampas Extracelulares de Neutrófilo tienen como función principal atrapar a los microorganismos patógenos. Durante la formación de NETs los péptidos antimicrobianos catiónicos se adhieren a las fibras de DNA por interacción de carga. Cuando son liberados al medio extracelular, los microorganismos patógenos se adhieren a las redes debido a la carga negativa que posee en su membrana. Para observar dicho mecanismo se realizó el procedimiento descrito en Materiales y Métodos 4.7.

Las imágenes de la figura 13 muestran la interacción de NETs en interacción con *T. vaginalis* por un periodo de 3 h. El color azul representa el DNA de las fibras de las Trampas Extracelulares de Neutrófilo inducidas con PMA (488 nM). Debido al efecto de las NETs sobre los microorganismo patógenos, el color rojo indica los residuos de los trofozoítos marcados previamente con el colorante PKH26.

Esto se sabe ya que previo a la interacción, la suspensión de *T. vaginalis* fue lavado con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) para eliminar los residuos de colorante y resuspendido en medio RPMI con 2% albúmina sérica humana adicionado con suero bovino adulto, este último bloquea la absorción de PKH26 por las célula, impidiendo así el marcaje inespecífico. Para corroborar la interacción de las NETs sobre *T. vaginalis* se tomaron otros campos de observación representados en las imágenes A' a E'.

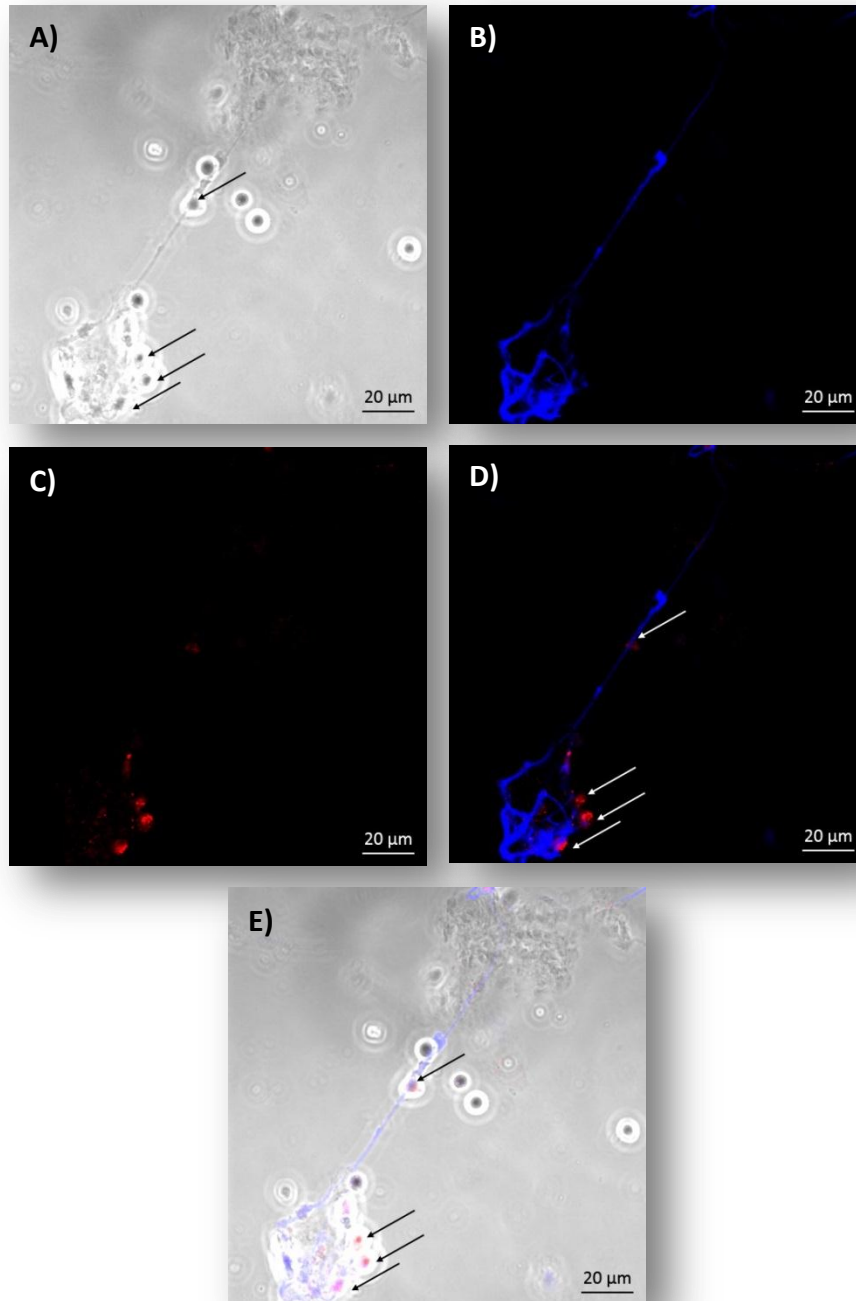


Figura 13. Interacción de NETs con *T. vaginalis*. A) Campo por contraste de fases, indicando la forma y posición de las fibras de DNA y de los trofozoítos. B) En color azul se muestran las fibras de DNA de las trampas inducidas con PMA marcadas con el colorante Hoechst 33342. C) En color rojo se muestran los residuos de los trofozoítos marcados previamente con el colorante HPK26. D) Las flechas indican un cúmulo de residuos de *T. vaginalis* sobre las Trampas Extracelulares de Neutrófilo. E) Se observa el traslape de ambos colorantes y el contraste de fases, corroborando la posición y forma de algunos trofozoítos sobre las fibras de DNA. (Microscopia confocal, 40X).

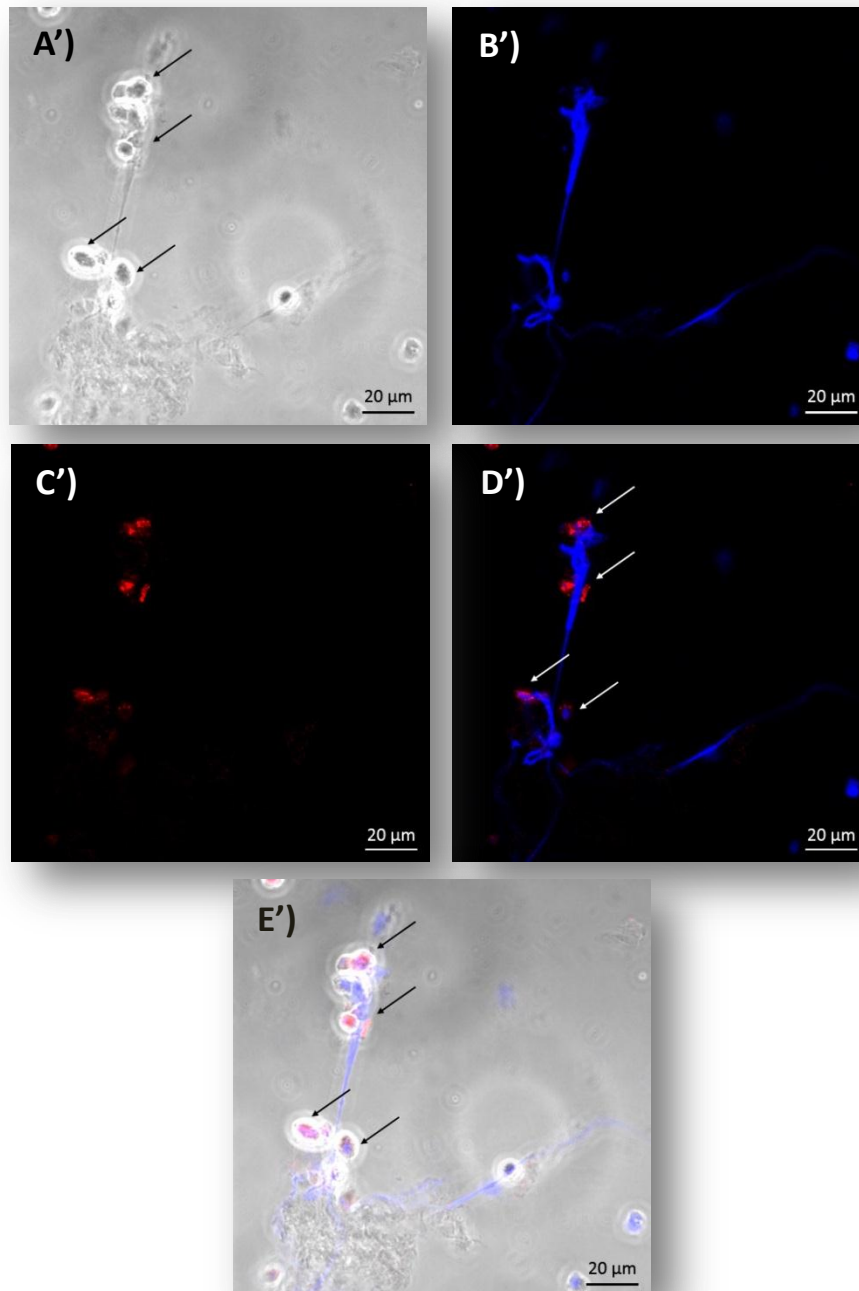


Figura 13.1. Interacción de NETs con *T. vaginalis*. Imagen A' muestra la forma y posición de la trampa y de los trofozoítos. La imagen B' muestra en color azul las fibras de DNA de las trampas inducidas con PMA marcadas con el colorante Hoechst 33342. En la imagen C' se representa en color rojo los residuos de los trofozoítos marcados previamente con el colorante HPK26. Las flechas indican en la imagen D' la posición de los restos de *T. vaginalis* sobre las Trampas Extracelulares de Neutrófilo. La imagen E' representa el traslape de los colorantes y el contraste de fases. (Microscopia Confocal, 40X).

5.7 Interacción de Neutrófilos sin el inductor PMA con *T. vaginalis*

Durante la interacción realizada en el punto Materiales y Métodos 4.6, se observó en uno de los controles que los trofozoítos de *T. vaginalis* inducen la formación de Trampas Extracelulares de Neutrófilo sin la presencia de PMA. Sin embargo, se ha reportado que el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram – inducen la formación de NETs *in vivo* e *in vitro*. Para eliminar esta posibilidad se realizaron pruebas de esterilidad a los medios TYI-S-33 y RPMI 2% HSA requeridos para el ensayo en placas de medio LB para verificar la ausencia de bacterias contaminantes que puedan liberar LPS, que a su vez induzca la formación de NETs, obteniendo como resultado que los medios estaban estériles.

Dicho lo anterior se realizó el procedimiento descrito en el punto Materiales y Métodos 4.8, empleando diferentes relaciones, 1:20, 1:10 y 1:5 de *T. vaginalis*: Neutrófilos. La figura 14 muestra los resultados obtenidos de la primera relación 1:20 observadas por microscopia confocal en objetivo 40X. Se observó por contraste de fases (Imagen A), para identificar la posición y forma de las fibras de DNA de los Neutrófilos en interacción con el trofozoíto. Posteriormente se detectó la señal de ambos colorantes Hoechst 33342 y PKH26, observando al trofozoíto (rojo) atrapado entre dos fibras (azul) que aparentemente provienen de un mismo Neutrófilo. Dicho lo anterior se realizó el acoplamiento por contraste de fases, corroborando que los colorantes corresponden a la forma y posición de *T. vaginalis* y NETs.

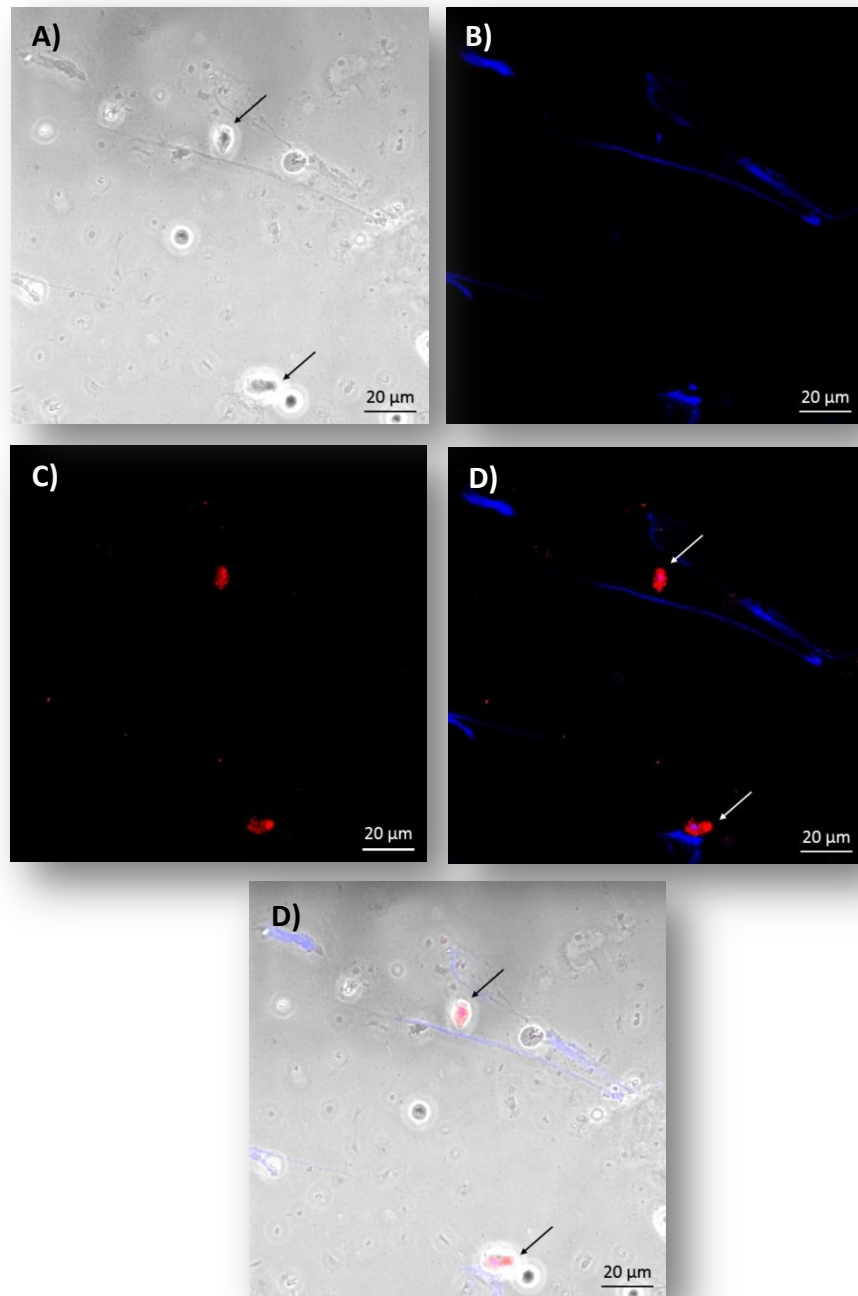


Figura 14. Interacción de Neutrófilos con *T. vaginalis* a una relación 1:20. A) Campo o contraste de fases, indicando la forma y posición de las fibras de DNA de Neutrófilo y *T. vaginalis*. B) El color azul representa las fibras de DNA de las trampas, marcadas con el colorante Hoechst 33342. C) Se muestran en color rojo los trofozoítos marcados previamente con el colorante HPK26. D) Se observa a un trofozoíto encerrado entre dos fibras de las Trampas Extracelulares de Neutrófilo. E) traslape de los colorantes y contraste de fases (Microscopia Confocal, 40X).

Debido a que durante la observación de los Neutrófilos en interacción con *T. vaginalis* (relación 1:20) se formaron Trampas Extracelulares, se procedió a incrementar la cantidad de trofozoítos a una relación 1:10, con el objetivo de observar si el efecto ocurría de igual manera. Los resultados de la interacción se describen a continuación.

En la figura 15 se muestra una serie de imágenes visualizadas por Microscopia Confocal a objetivo 40X, que demuestran la formación de NETs. Al igual que las imágenes anteriores, se utilizaron dos colorantes para detectar la señal de DNA y de los trofozoítos de *T. vaginalis*. La primera observación se realizó por contraste de fases, pudiendo visualizar las redes de DNA. Debido a que no es posible observar los trofozoítos, se detectó la señal del colorante HPK26, pudiendo visualizar los restos de *T. vaginalis* (rojo) entre las fibras de DNA de las trampas (azul) posterior a 3 h de interacción. Por último, se realizó un acoplamiento de ambos colorantes y contraste de fases, corroborando la posición de los residuos del trofozoíto en las Trampas Extracelulares de Neutrófilo.

Por último se procedió a realizar la relación 1:5 de *T. vaginalis* con Neutrófilos, los resultados se representan en la figura 16. En donde podemos observar algunos trofozoítos (en rojo) que no han perdido su integridad, sin embargo, también fue posible visualizar restos celulares de los mismos, que se encuentran adheridas a las Trampas Extracelulares del Neutrófilo.

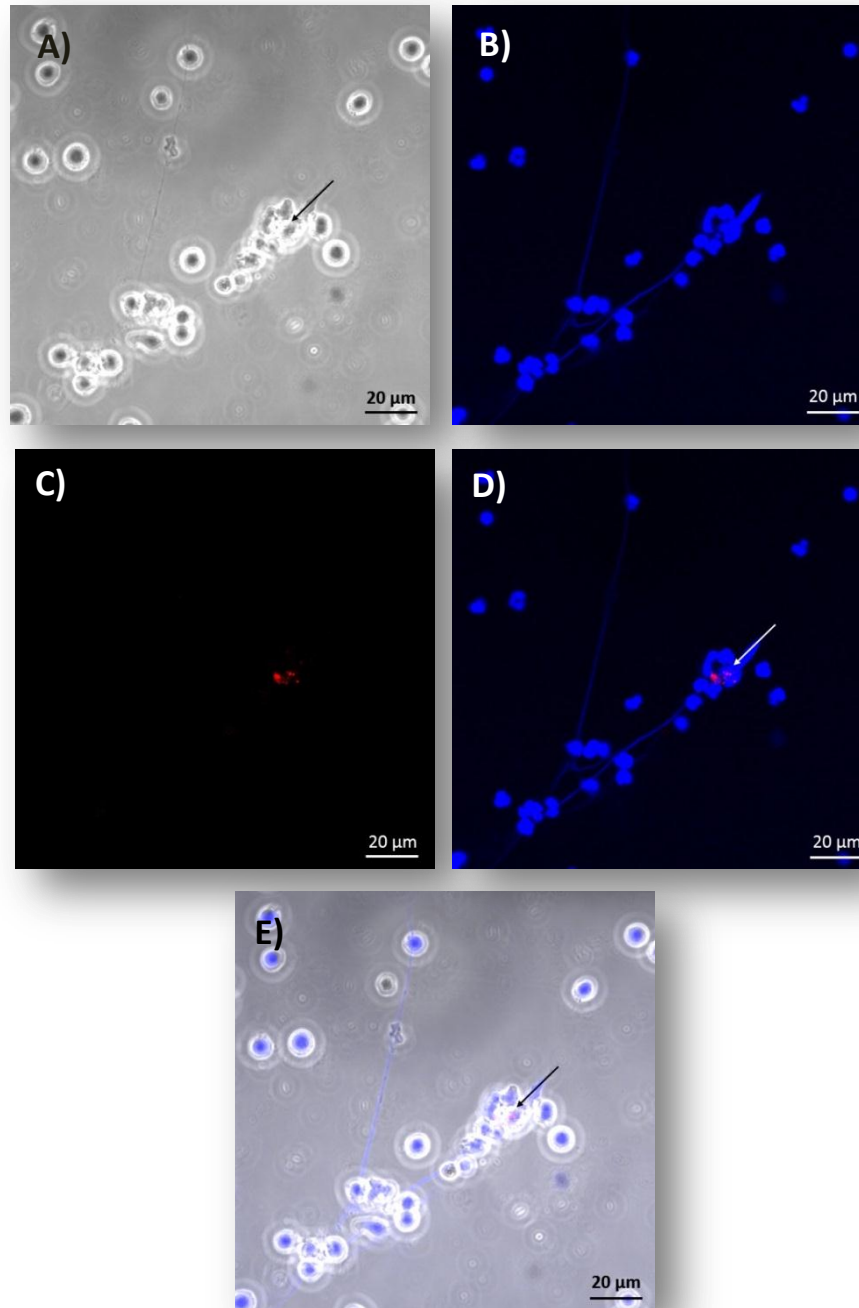


Figura 15. Interacción de Neutrófilos con *T. vaginalis* a una relación 1:10. A) Campo observado por contraste de fases, indicando la forma y posición de las fibras de DNA de Neutrófilo y *T. vaginalis*. En la imagen B se observa la bifurcación de las redes de DNA, representados en color azul, marcadas con el colorante Hoechst 33342. La imagen C, muestra en color rojo a un trofozoíto dañado marcado previamente con el colorante HPK26. En la imagen D se señalan al trofozoíto atrapado entre las redes de las NETs. La imagen E muestra el traslape de los colorantes y contraste de fases (Microscopia Confocal, 40X).

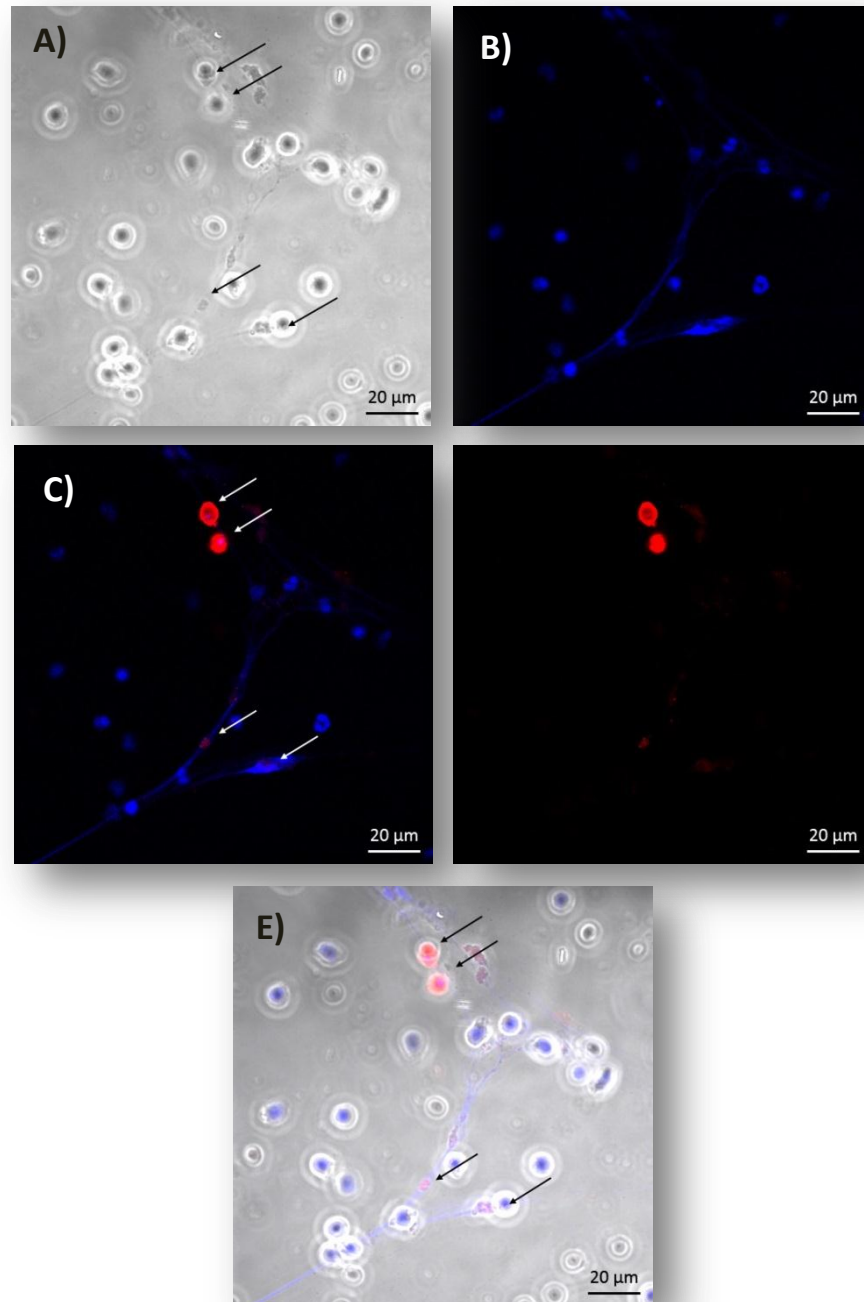


Figura 16. Interacción de Neutrófilos con *T. vaginalis* a una relación 1:5. La imagen A muestra el campo por contraste de fases, indicando la forma y posición de las fibras de DNA de Neutrófilo y *T. vaginalis*. En la imagen B se observa en color azul las fibras de DNA, marcadas con el colorante Hoechst 33342. La imagen C, muestra en color rojo a los trofozoítos. En la imagen D observa a los trofozoítos atrapados entre las fibras de las NETs. La imagen E muestra el traslape de los colorantes y contraste de fases. Todas las fotografías fueron tomadas por Microscopia Confocal en objetivo 40X.

5.8 Cuantificación del crecimiento de *T. vaginalis* en interacción con NETs

Se realizó la cuantificación del crecimiento de los trofozoítos posterior a las tres horas interacción con NET a una relación 1:20; se utilizó como medio de crecimiento TYI-S-33 Modificado con 16% Suero Bovino y Kanamicina (Ver anexo 10.1.3).

Se ha reportado que *Trichomonas vaginalis* libera cisteína proteasas como factores de virulencia, permitiéndole evadir la respuesta inmune del hospedero, para determinar el efecto de estas enzimas se utilizó el inhibidor E-64 (10 μ M). Además, se sabe que existen microorganismos patógenos que liberan DNAsas como factores virulencia, que les proporcionan un mecanismo de defensa contra las NETs, degradando el DNA de las mismas. Para inhibir DNAsas se utilizó el componente EGTA (0.5 nM) como quelante de iones.

En la figura 17 se representa el promedio del crecimiento del trofozoíto en interacción con NETs posterior a 35 h de incubación, utilizando las condiciones descritas en Materiales y Métodos 4.4. Se representa el crecimiento de *T. vaginalis* en presencia de inhibidores (barra azul) y en presencia de NETs (barra roja). Es posible visualizar que el efecto de ambos inhibidores es mucho mayor que en presencia de uno solo. Sin embargo, también se utilizó como control, la presencia de Neutrófilos sin el inductor PMA (barra verde) con *T. vaginalis*, observando una disminución del crecimiento del parásito. Estos resultados demuestran que independientemente de la presencia de E-64, EGTA o ambos, el crecimiento de *T. vaginalis* disminuyó en presencia de NET o neutrófilos.

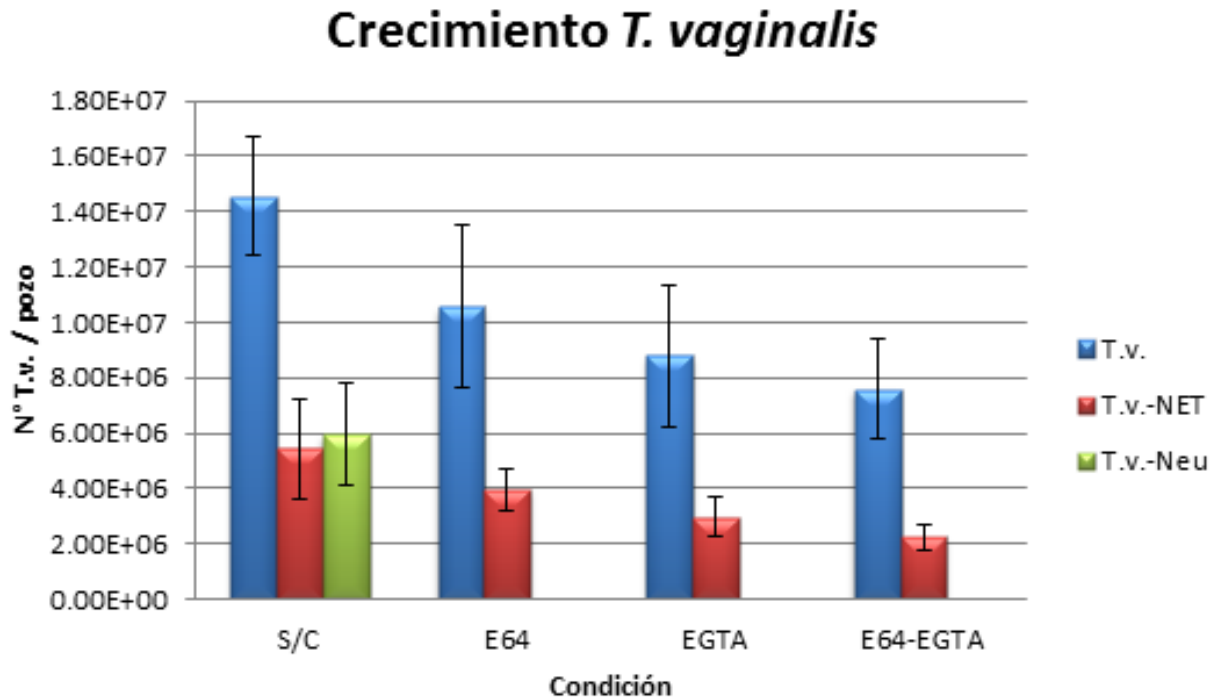


Figura 17. Cuantificación del crecimiento de *T. vaginalis* posterior a la interacción con NETs en presencia y ausencia de inhibidores. Las barras azules representan el crecimiento del trofozoíto en ausencia de NET, las barras rojas en presencia de NET y la barra verde el crecimiento de *T. vaginalis* en presencia de neutrófilos. Se muestra el resultado de tres experimentos por triplicado.

5.9 Análisis estadístico del crecimiento de *T. vaginalis*

Se realizó la prueba estadística ANOVA para analizar si existen diferencias significativas entre las condiciones establecidas, utilizando como valores $p < 0.001$ para observar el efecto en el crecimiento de *T. vaginalis* y $p < 0.05$ para determinar que no existe efecto en presencia. El análisis arrojó que no existe una diferencia significativa de *T. vaginalis* en presencia de NET comparado con su control en presencia de neutrófilos; sin embargo, cada una individualmente presenta diferencias respecto al control de trofozoítos solos.

Trichomonas vaginalis utiliza como factores de virulencia DNAsas y quelantes de iones de calcio, por ello se utilizaron los inhibidores E64 y EGTA, observando que no hay diferencias significativas en presencia de EGTA y/o E64. Por ello podemos

definir que el crecimiento de *T. vaginalis* no se ve afectada en presencia de NETs y ambos inhibidores, individual y conjuntamente. Dichos resultados se muestran en la figura 18.

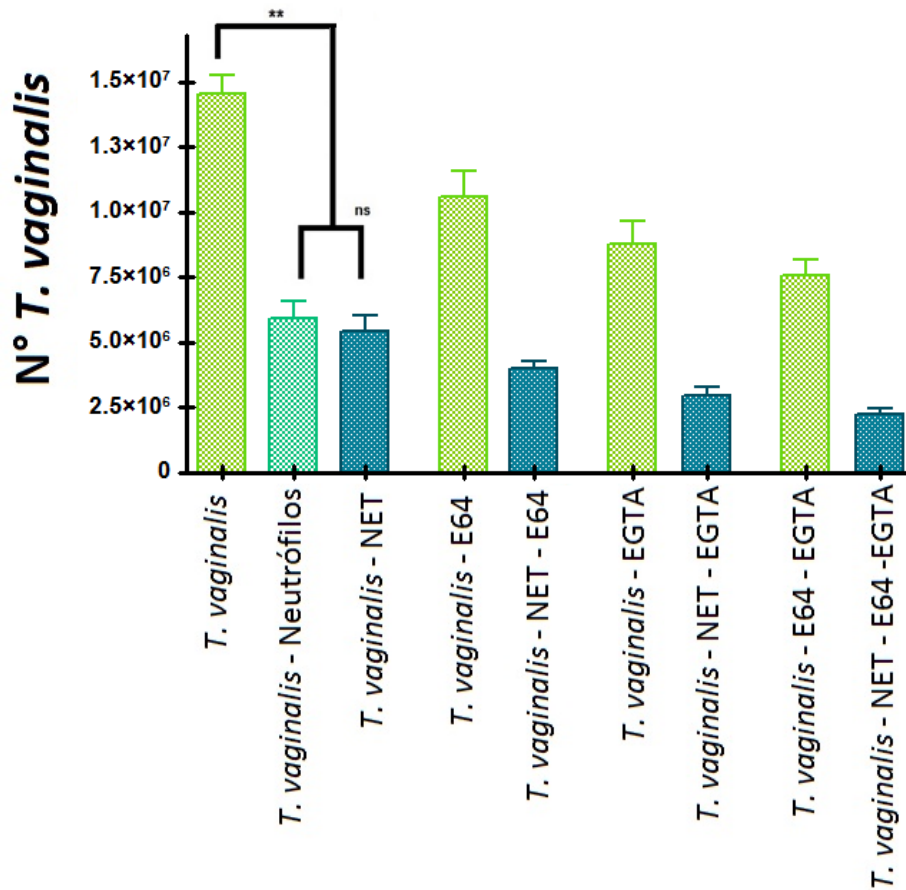


Figura 18. Análisis estadístico del crecimiento de *T. vaginalis* posterior a la interacción con NETs en presencia y ausencia de inhibidores. Se muestra el resultado de tres experimentos por triplicado, comparando las medias de cada condición con su control correspondiente, mediante el análisis estadístico ANOVA. No significancia (ns), ** $p < 0.001$.

6. *Discusión*

Los neutrófilos son la línea celular más abundante del torrente sanguíneo. Su función principal es fagocitar y eliminar microorganismos mediante la liberación de especies reactivas de oxígeno (EROS). Sin embargo, en el año 2004 Brinkmann y colaboradores descubrieron un nuevo mecanismo denominado NETosis. Éste mecanismo consiste en la liberación de fibras de DNA y péptidos antimicrobianos al medio extracelular llamados NET, desarrollado evolutivamente como mecanismo de protección contra infecciones provocadas por patógenos, que abarca tanto vertebrados como invertebrados.

La formación de estas trampas es inducida *in vivo* por factores químicos y biológicos como IFN- γ , IL-8 y TNF. Tan solo en el 2011 Guimaraes-Costa y colaboradores, describieron que la formación de NETs se encuentra relacionado a infecciones ocasionadas por hongos utilizando como factor de inducción hifas y levaduras y en bacterias el componente membranal LPS.

Por otro lado, la formación de trampas no es exclusiva de neutrófilos, en el 2012 Camicia y de Larragaña describieron que los eosinófilos tienen la capacidad de formar trampas extracelulares o EET. Estos usan ADN mitocondrial, por lo tanto carecen de histonas; sin embargo, el efecto microbicida es similar a las NET, con la diferencia de que poseen péptidos antimicrobianos diferentes. Ejemplo de estos péptidos son la proteína básica principal (MBP), la proteína catiónica del eosinófilo (ECP), la neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN) y la peroxidasa del eosinófilo (EPO) (Castrillón y Arango, 2014).

Las NETs tienen como principal función atrapar a los microorganismos patógenos en el sitio de infección, evitando la diseminación de los mismos. Su interacción ha sido demostrada con *Shigella flexneri*, *Pseudomonas luminescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* (Arazna y col. 2013) y hongos tales como *Candida albicans* (Medina, 2009; Bonne-Année y col., 2014). También se ha reportado la presencia de NETs en infecciones cutáneas ocasionadas por el

género *Leishmania* y en enfermedades como lupus eritematoso sistémico, trombosis y preclamsia (Guimaraes-Costa y col, 2011).

En el ensayo realizado en este proyecto, se utilizó como modelo de estudio el parásito trofozoíto *Trichomonas vaginalis*, principal responsable de infecciones urogenitales como Tricomoniasis. Para observar la interacción y crecimiento, este microorganismo se incubó con NETs inducidos con PMA durante 3 h y se cultivó por 35 h, obteniendo como resultado una disminución del crecimiento del parásito en presencia de NET con respecto a su control sin trampas (figura 17).

Sin embargo, se han reportado que algunos microorganismos poseen estrategias para evadir la actividad microbicida de las trampas. Uno de estas es la liberación de DNAsas que degradan el DNA de las NETs permitiendo la diseminación del microorganismo; este mecanismo se ha descrito para *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* y *S. aureus* (reportado en Goldman y Medina, 2013). Otros estudios han demostrado que *S. pneumoniae* contiene una cápsula que le permite evadir a las NET evitando su atrapamiento (Gabelloni y col, 2013). Por ello, durante el ensayo de viabilidad se utilizaron dos inhibidores E-64 y EGTA como quelante de iones de Ca^{2+} e inhibidor de cisteína proteasas, para disminuir la probabilidad de degradación de las NET por efecto de proteasas y/o DNAsas. El análisis estadístico de los resultados de la cuantificación de *T. vaginalis* en interacción con NET y ambos inhibidores (figura 18) arrojó que no existe diferencia significativa en presencia de uno o ambos inhibidores, lo cual implica que en nuestras condiciones las proteasas y DNAsas no juegan un papel importante.

Durante el ensayo anterior se observó que en el control Neutrófilos + *T. vaginalis* induce la formación de trampas extracelulares; sin embargo, no existen reportes que expliquen qué factores del trofozoíto intervienen en la formación de NETs en condiciones *in vitro*. Por otro lado, la Universidad de Guadalajara en el 2013, realizó estudios demostrando la formación de NET en interacción con conidios de *Trichophyton rubrum* en condiciones *in vitro*, sin la intervención de un inductor (Prieto Correa, 2013). Estudios realizado en el 2014 en el Departamento de Biología de la UG indican que el componente membranal LPPG de *Entamoeba Histolytica*

induce *in vitro* la formación de trampas (Pulido Ortega, 2014), por lo que se sugiere que el componente LPG de *T. vaginalis* puede ser el principal factor responsable de la formación de NET. En el estudio, se realizaron diferentes relaciones del parásito con neutrófilos (1:5, 1:10 y 1:20) con la finalidad de verificar si el efecto ocurría de igual manera, observando trampas en cada una de las relaciones.

A pesar de que las NET son un mecanismo de protección contra microorganismos patógenos, también pueden ocasionar un daño al organismo. Gabelloni y colaboradores en el 2013 reportaron que las proteasas que contiene las NET pueden producir daño tisular y deterioro en la circulación, y en consecuencia que se presenten autoantígenos, que provoquen en el paciente enfermedades autoinmunes.

Actualmente se sabe que la endonucleasa sérica DNasa 1 es la encargada del desmantelamiento de las trampas; sin embargo, en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico, una enfermedad autoinmune caracterizada por la producción de anticuerpos contra antígenos nucleares, posee una deficiencia en la degradación de NET, debido a la disminución en la producción de dicha endonucleasa, por lo tanto hay un incremento en la producción de trampas. Estas a su vez activan a las células dendríticas y liberan TNF- α produciendo un incremento en la inflamación que conduce al padecimiento de enfermedades. Caso contrario ocurre con la Enfermedad Granulomatosa Crónica que se inhibe la producción de trampas (Bosch, 2011).

Dicho lo anterior, el objetivo de este trabajo se basa en estudiar el mecanismo de la interacción de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NET) con el trofozoíto *Trichomonas vaginalis*, así como estudiar los componentes citotóxicos de las NET, esto con la finalidad de promover alternativas que ayuden a la eliminación del parásito en condiciones *in vivo*.

7. Conclusiones

- El inductor PMA induce la formación de trampas extracelulares de neutrófilo en condiciones *in vitro*.
- Las Trampas Extracelulares de Neutrófilo o NET inducidos *in vitro* con PMA interacciona con el parásito trofozoíto *Trichomonas vaginalis*.
- *T. vaginalis* induce la formación de Trampas Extracelulares de Neutrófilos, aislados de sangre periférica humana, sin la intervención de un inductor.
- Existen diferencias significativas en el crecimiento de *T. vaginalis* en presencia de NET con respecto a la ausencia.

8. *Perspectivas*

- Aislar el componente membranal LPG de *T. vaginalis* para determinar si éste induce la formación de NETs, en condiciones *in vitro*.
- Analizar exudados vaginalis de pacientes con tricomoniasis, para determinar la presencia de NET en condiciones *in vivo*.

9. Bibliografía

1. Adad, S. J. (2005). Disminuyó la frecuencia de *Trichomonas vaginalis* en citologías cervicovaginales, Sociedad Iberoamericana de Información Científica, 1(3):1-7.
2. Akira, S, Uematsu, S. y Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity, Cell, 124:783–801.
3. Alderete, J. F., Provenzano, D. y Lehker, M. W. (1995). Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis, Microbial Pathogenesis, 19:93-103.
4. Almyroudis, N. G., Grimm, M. J., Davidson, B. A., Röhm, M., Urban, C. F. y Segal, B. H. (2013). NETosis and NADPH-oxidase: at the intersection of host defense, inflammation, and injury, Frontiers in Immunology, 4(45).
5. Angosto, M. C. (2005). Estallido respiratorio de los fagocitos, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, 71:365-386.
6. Arazna, M., Pruchniak, M. P. y Demkow, U. (2013). Neutrophil extracellular traps in bacterial infections: Strategies for escaping from killing, Respiratory Physiology & Neurobiology 187:74– 77.
7. Arroyo, R. y Alderete, J. F. (1989). *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells, Infection and Immunity, 57(57):2991.
8. Bonne-Année, S., Kerepesi, L. A., Hess, J. A., Wesolowski, J., Paumet, J., Lok, J. B., Nolan, T. J. y Abraham, S. (2014). Extracellular traps are associated with human and mouse neutrophil and macrophage mediated killing of larval *Strongyloides stercoralis*, Microbes and Infection, p1-10.
9. Bosch, X. (2011). Systemic lupus erythematosus and the neutrophil. N Engl J Med: 365: 758-60.
10. Botero, D. y Restrepo, M. (2006). Parasitosis humanas, 4ª ed., Medellín Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas, p294-302.

11. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y. y Zychlinsky, A., (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria, *Science*, Vol.303.
12. Browden, F. J. y Garnett, G. P. (2000). *Trichomonas vaginalis* epidemiology: parameterising and analysing a model of treatment interventions. *Sexually Transmission Infection*, 76:248–256.
13. Camicia, G. y de Larrañaga, G. (2013). Trampas extracelulares de neutrófilos: un mecanismo de defensa con 2 caras, *Medicina clínica*, 140(2):70–75.
14. Cancelo, H. M. J. C., Cancelo, H. C. y García, F. C., (2005). Vaginitis por *Trichomonas*, *SEMERGEN*, 31(3):121-124.
15. Cañas, C. A. (2011). Autoinmunidad y autoinflamación, *Acta Médica Colombiana*, 36(2).
16. Carr, P. L., Felsentein, D. y Friedman, R. (1998). Evaluation and Management of Vaginitis, *Clinical Reviews*, 13:335-346.
17. Carrada-Bravo, T. (2006). Tricomoniasis vaginal, *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 53(3):151-156.
18. Castrillón, A. M. y Arango, R. J. C. (2014). Trampas extracelulares de ADN de eosinófilos en alergias, *IATREIA*, 27(2):165-176.
19. Castrillón, L. E. R., Palma, A. R. y Padilla, C. D. (2007). Péptidos antimicrobianos: antibióticos naturales de la piel, *Dermatología Revista Mexicana*, 51:57-67.
20. Cocom-Góngora, P. C., Mut-Martín, M. C. y García-Miss M. (2004). Los receptores de los linfocitos de la inmunidad innata, *Revista Biomédica* 15:113-122.
21. Escovar, L. X. y Chalela, J. G. M. (2004). Péptidos Antimicrobianos Cutáneos, *Dermatología Peruana*, 14(1):40-43.
22. Figueroa, A. E. E., Rendón, G. F. J., Puente, R. J., Calla, C. J. S., Cárdenas, G. R. E., Ortega, L. J., Quintas, G. L. I., Alvarez, S. M. E. y Arroyo, R. (2012). The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and Infection*, 14:1411-1427.

23. Fraga, N. J. (2012). Virus de *Trichomonas vaginalis*: análisis filogenético y de la posible asociación con la virulencia del parásito. (Tesis doctoral inédita). Departamento de parasitología. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”.
24. Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., y Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 176:231–241.
25. Gabelloni, M. L., Sabbione, F., Iula, L., Keitelman, I., Jancic, C., Giordano, M., Geffner, J. y Trevani, A. (2013). Trampas extracelulares de neutrófilos: una novedosa estrategia antiinfecciosa empleando moléculas antimicrobianas largamente conocidas, *Revista QuimicaViva*, Vol.1.
26. Geffner, J. R., Fontán, P. A., Sordelli, D. O. y Isturiz, M. A. (1991). Neutrophil Erythrotoxicity Induced by Phorbol Myristate Acetate: Mechanisms Involved in Neutrophil Activation. *Journal of Leukocyte Biology*, 49:352-359.
27. Gillin, F. D. y Sher, A. (1981). Activation of the alternative complement pathway by *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*, 34(1):268-273.
28. Goldman, O. y Medina, E. (2013). The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more, *Frontiers in Immunology*, 3(420):1-10.
29. Guimaraes-Costa, A. B., Nascimento, M. T. C., Wardini, A. B., Pinto-da-Silva, L. H. y Saraiva, E. S. (2011), ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death, *Journal of Parasitology Research*, 2012.
30. Harp, D. F. y Chowdhury, I. (2011). Trichomoniasis: evaluation to execution, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 157(1):3-9.
31. Hernández, A. H. M., Sariego, R. I. y Sarracent, P. J. (2009). Infección humana por *Trichomonas vaginalis* y su relación con otros agentes patógenos, *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 35(4):108-117
32. Hernández, M. S., Díaz, N. B., Martínez, D. V. y Puñales, A. B. (2005). Factores de riesgo de infección por *Trichomonas vaginalis*, *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 52(3):145-150.
33. Hirt, R. P. (2013). *Trichomonas vaginalis* virulence factors: an integrative overview, *Sex Transm Infect*, 89:439–443.

34. Iba, T., Hashiguchi, N., Nagaoka, I., Tabe, Y. y Murai, M. (2013). Neutrophil cell death in response to infection and its relation to coagulation, *Journal of Intensive Care*, 1:13.
35. Kalantari, N., Ghaffari, S. y Bayani, M. (2014). *Trichomonas vaginalis*, *Candida* and *Gardnerella* in Cervical Smears of Iranian Women for Cancer Screening, *North American Journal of Medical Sciences*, 6(1):25-29.
36. Kissinger, P. y Adamski, A. (2013). Trichomoniasis and HIV interactions: a review, *Sexually Transmission Infection*, 89(6):426–433.
37. Kobayashi, S. D., Voyich, J. M., Burlak, C., y DeLeo, F. R. (2005). Neutrophils in the innate immune response, *Arch Immunol Ther Exp*, 53:505–517.
38. Kumar, V. y Sharma, A. (2010). Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology*, 10:1325-1334.
39. Maciques, R. I. y Alonso, C. M. (2002). Diagnóstico y síntomas clínicos de la tricomoniasis vaginal, *Rev Cubana Obstet Ginecol*, 28(2):93-99.
40. Mayer-Scholl, A. M., Averhoff, P. y Zychlinsky, A. (2004). How do neutrophils and pathogens interact?, *Current Opinion in Microbiology*, 7:62-66.
41. Medina, E. (2009). Neutrophil Extracellular Traps: A Strategic Tactic to Defeat Pathogens with Potential Consequences for the Host, *Journal of Innate Immunity*, 1:176-180.
42. Meijer, M., Pruchniak, M. P., Arazna, M. y Demkow, U. (2012). Extracellular traps: how to isolate and quantify extracellular DNA (ET-DNA), *Central European Journal of Immunology*, 37(4):321-325.
43. Metzler, K. D., Fuchs, T. A., Nauseef, W. M., Reumaux, D., Roesler, J., Schulze, I., Wahn, V., Papayannopoulos, V. y Zychlinsky, A. (2011), Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity, 117(3):953-959.
44. Moodley, P., Wilkinson, D., Connolly, C., Moodley, J. y Sturm, A. W. (2002). *Trichomonas vaginalis* Is Associated with Pelvic Inflammatory Disease in Women Infected with Human Immunodeficiency Virus, *Clinical Infectious Diseases*, 34:519–22.

45. Nogal-Ruíz, J. J. (1999). Modelo experimental de *Trichomonas vaginalis*: estudios de quimiosensibilidad, patogenia e inmunomodulación. (Tesis doctoral inédita). Departamento de Parasitología. Universidad Complutense de Madrid.
46. Padilla-Vaca F. y Anaya-Velázquez F. (1997). Biochemical properties of a neuraminidase of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Parasitology*, 83:1001-1006.
47. Papayannopoulos, V. y Zychlinsky, A. (2009). NETs: a new strategy for using old weapons, *Trends in Immunology*, 30(11):513-521.
48. Paravicini, T. M. y Touyz, R. M. (2008). NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension, *Diabetes Care*, 31(2):S170-S180.
49. Perazzi, B., Coppolillo, M. E., Gatta, C., Eliseth, M. C., Vay, C., Méndez, O., De Rudavega, H, M., De Torres, R., y Famiglietti, (2007). Investigación de *Trichomonas vaginalis* durante el embarazo mediante diferentes metodologías, *Revista Argentina de Microbiología*, 39(2):99-104.
50. Perea, E. J., (2010). Infecciones del aparato genital femenino: vaginitis, vaginosis y cervicitis, *Medicine*, 10(57):3910-3914.
51. Pereira, Á. y Pérez, M., (2003). Tricomonosis, *OFFARM*, 22(4):130-135.
52. Quinn, M. T., DeLeo, F. R. y Bokoch, G. M. (2007). *Neutrophil Methods and Protocols*, Humana Press,
53. Ramos, I. S., Rivero, L. R. Y Nodarse, J. F. (2011). Estudio de la susceptibilidad al metronidazol en aislamientos cubanos de *Trichomonas vaginalis*, *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 37(2):271-276.
54. Remijsen, Q., Kuijpers, T. W., Wirawan, E., Lippens, S., Vandenabeele, P., y Vanden B. T. (2011). Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death and Differentiation* 18:581–588.
55. Remijsen, Q., Vanden B. T., Wirawan, E., Asselbergh, B., Parthoens, E., De Rycke, R., Noppen, S., Delforge, M., Willems, J. y Vandenabeele, P. (2011). Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation, *Cell Research*, 21(2):290-304.
56. Rivas-Santiago, B., Sada, E. Hernandez-Pando, R. y Tsutsumi, V. (2006). Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas, *salud pública de México*, 48(1)62:71.

57. Rojas-Espinoza, O. y Arce-Paredes, P. (2003). Fagocitosis; mecanismos y consecuencias, Primera parte. *Bioquímica*, 28(4):19-30.
58. Ryu, J. S. y Min, D. Y. (2006), *Trichomonas vaginalis* and trichomoniasis in the Republic of Korea, *Korean Journal of Parasitology*, 44(2):101-115.
59. Saitoh, T., Komano, J., Saitoh, Y., Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Uehata, T., Iwasaki, H., Omori, H., Yamaoka, S., Yamamoto, N., y Akira, S. (2012). Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe*, 12(1):109-116.
60. Schwebke, J. E. y Barrientes, F. J. (2006). Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with Resistance to Metronidazole and Tinidazole, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(12):4209.
61. Schwebke, J. R., y Burgess, D. (2004). Trichomoniasis, *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4):794–803.
62. Song, H. O., Shin, M. H., Ahn, M. H., Min, D. Y., Kim, Y. S. y Ryu, J. S. (2008). *Trichomonas vaginalis*: Reactive oxygen species mediates caspase-3 dependent apoptosis of human neutrophils, *Experimental Parasitology*, 118:59-65.
63. Song, H. O., y Ryu, J. S. (2013). Superoxide Anion Production by Human Neutrophils Activated by *Trichomonas vaginalis*. *Korean J Parasitol*, 51(4): 479-484.
64. Soper, D. (2004). Trichomoniasis: under control or undercontrolled?, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Volume 190(1):281–290.
65. Stock, W. y Hoffman, R. (2000). White blood cells 1: non-malignant disorders, *The Lancet*, 355.
66. Téllez, G. A. y Castaño, J. C. (2010). Péptidos antimicrobianos, *Revista Infectio*. 14(1):55-67.
67. Trejos, V. R. (2012). Tricomoniasis, *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica* 69(601):113-117.
68. Upcroft, P. y Upcroft, J. A. (2001). Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa, *Clinical Microbiology Reviews*, 14(1):150-164.
69. Urban, C. F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., Brinkmann, V., Jungblut, P. R. y Zychlinsky, A. (2009). Neutrophil

- Extracellular Traps contain calprotectin a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*, PLOS pathogens, 5(10):1-18.
70. Van Der Pol, B. (2007). *Trichomonas vaginalis* Infection: The Most Prevalent Nonviral Sexually Transmitted Infection Receives the Least Public Health Attention, Clinical Infectious Diseases, 44:23-25.
 71. Vázquez, F., García, M. J., Pérez, F. y Palacio, V. (2001). *Trichomonas vaginalis*: tratamiento y resistencia a nitroimidazoles, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 19(3):114-124.
 72. Vicente, D. y Pérez-Tallero, (2014). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 28(2):122–130.
 73. Wartha, F., Beiter, K., Normark, S. y Birgitta Henriques-Normark, B. (2007). Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis, Current Opinion in Microbiology, 10:52–56.
 74. Yam-Puc, J. C. García-Marín, L. y Sánchez-Torres, L. E. (2012). Trampas extracelulares de neutrófilos (NET), consecuencia de un suicidio celular, Gaceta Médica de México, 148:68-75.
 75. Yost, C. C., Cody, C. M., Harris, E. S., Thornton, N. L., McInturff, A. M., Martinez, M. L., Chandler, N. B., Rodesch, C. K., Albertine, K. H., Petti, C. A., Weyrich, A. S. y Zimmerman, G. A. (2009). Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates, BLOOD, 113(25):6419-6427.
 76. Pulido Ortega, J. (2014). *Interacción del parásito Entamoeba histolytica con Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NET)*. (Tesis maestría inédita). Departamento de Biología, Universidad de Guanajuato, México.
 77. Prieto Correa, J. R. (2013). *Inducción in vitro de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NET) con Trichophyton rubrum*. (Tesis licenciatura inédita). Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, México.

10. Anexos

10.1 MEDIOS

10.1.1 Medio RPMI + 2% albúmina sérica humana.

Medio RPMI. (Derivado del nombre: *Roswell Park Memorial Institute*). Disolver en agua desionizada estéril el sobre de Medio RPMI-1640 (Gibco; Cat. No. 31800-022). Agregar 2 g de Bicarbonato de Sodio (NaHCO_3) y 25 mM de HEPES por litro de medio, disolver homogéneamente. Ajustar el pH a 6.8 mediante el uso de soluciones NaOH (1 N) ó HCl (1 N). Posteriormente aforar a la cantidad requerida y esterilizar por filtración en membrana de 0.45 μm (Millipore, HAWP02500).

Medio RPMI 2% albúmina sérica humana. Para la preparación del medio adicionado con albúmina sérica humana, se agregaron 800 μl por cada 10 ml de medio RPMI en condiciones de esterilidad.

10.1.2 Medio TYI-S-33 con 6% de Suero Bovino.

Medio TYI. Agregar de manera ordenada en 750 ml de agua desionizada los siguientes compuestos: 30 g de Peptona Biotriptasa (Bioxon cat. 156), 10 g de Dextrosa (Bioxon BI00255c), 2 g de Cloruro de Sodio (NaCl), 0.6 g de Fosfato de Potasio Monobásico (KH_2PO_4 - PM 136.09), 1 g de Fosfato de Potasio Dibásico (K_2HPO_4 - PM 174.18), 1g de Cisteína – HCl (Sigma C-7880), 0.2 g de Ácido ascórbico (Sigma A-7506) y 0.0236 g de Citrato férrico de amonio. Mezclar constantemente hasta disolver todos los compuestos. Ajustar a un pH de 6.8 y aforar a 940 ml con agua desionizada. Esterilizar a 20lb/in² durante 15 minutos. Conservar a -40°C.

Medio TYI-S-33 al 6% de Suero Bovino. Para la preparación del Suero Bovino se agregaron 10 ml de vitaminas (MicroLab) por cada 100 ml de suero descomplementado a 56°C durante 30 minutos. Posteriormente se agregaron 6 ml

de suero completo adicionado con vitaminas (MicroLab) por cada 100 ml de medio TYI.

Medio TYI-S-33 al 6% de Suero Bovino y Kanamicina. Agregar al medio TYI-S-33 el antibiótico Kanamicina a una concentración final de 25 µg/ml.

10.1.3 Medio TYI-S-33 Modificado con 16% de Suero Bovino.

Medio TYI – modificado. En 150 ml de agua desionizada agregar los siguientes compuestos de manera ordenada: 6 g de Peptona Biotriptasa (Bioxon cat. 156), 2 g de Dextrosa (Bioxon BI00255c), 0.4 g de Cloruro de Sodio (NaCl), 0.12 g de Fosfato de Potasio monobásico (KH_2PO_4 - PM 136.09), 0.2 g de Fosfato de Potasio dibásico (K_2HPO_4 - PM 174.18), 0.4 g de Cisteína – HCl (Sigma C-7880), 0.008 g de Ácido ascórbico (Sigma A-7506) y 0.00944 g de Citrato férrico de amonio. Mezclar con una barra magnética en plancha agitadora hasta disolver completamente. Ajustar a un pH de 6.8 y aforar a 164 ml con agua desionizada. Esterilizar a 20lb/in² durante 15 minutos.

Medio TYI-S-33 con 16% de Suero Bovino. Para la preparación del Suero Bovino se agregaron 10 ml de vitaminas por cada 100 ml de suero descomplementado a 56°C durante 30 minutos. Posteriormente se agregaron 16 ml de suero completo adicionado con vitaminas por cada 100 ml de medio TYI.

Medio TYI-S-33 Modificado con 16% Suero Bovino y Kanamicina. Agregar el antibiótico Kanamicina al medio TYS-S-33 Modificado a una concentración final de 25 µg/ml.

10.2 SOLUCIONES

10.2.1 Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS).

En agua desionizada agregar una solución amortiguadora de fosfatos para una concentración final de 15 mM a pH 7.0, posteriormente agregar una solución de

NaCl para una concentración final de 154 mM. Finalmente confirmar que el pH sea 7.

10.2.2 Solución PMA.

Se tomaron 50 µl de Acetato de Forbol Miristato (Sigma-Aldrich, P8139) con una concentración de 2.4 mM (stock 24000X en PBS) para diluir en 1 ml de medio RPMI.

10.3 TINCIONES

10.3.1 Tinción de *T. vaginalis*.

Para la tinción de *T. vaginalis* se tomó una muestra de la suspensión de células realizada en el Materiales y Métodos 6.1 a concentración 2X. Después se colocó en un tubo eppendorf agregando el colorante PKH26 (Sigma – Aldrich, Cap. MINI26) a una concentración final de 0.25 µM durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó un lavado en PBS para eliminar los residuos de colorante, resuspendiendo en medio RPMI con 2% de albúmina sérica humana y 2% de suero bovino.

10.3.2 Tinción microscópica.

Se utilizó el colorante Hoechst 33342 a concentración final de 10 µg/ml para teñir el DNA de las muestras. Cabe destacar que cada cubreobjetos de la placa fue montada en portaobjetos lavados y estériles siguiendo el punto 10.4. Éstas se observaron por microscopia de fluorescencia (Carl Zeiss, AxiosKop40) y por microscopia confocal (Carl Zeiss, LSM700).

10.4 LAVADOS

10.4.1 Lavado de cubreobjetos y portaobjetos para el montaje de muestras.

Para el lavado se colocaron cubreobjetos redondos y portaobjetos en una solución de HCl a una concentración de 1 M durante 6 h a 37°C en agitación constante. Se incubaron en sucesivos lavados con agua desionizada cada una por 15 minutos. Posteriormente se aclararon en etanol absoluto durante 1 h. Se colocaron en papel filtro para secado y esterilizados a 15lb/in².

10.5 ABREVIATURAS

ATP	Adenosín Trifosfato
DC	Células dendríticas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EET	Trampa Extracelular de Eosinófilo (<i>Eosinophil Extracellular Trap</i>)
EROS	Especies Reactivas de Oxígeno
ETS	Enfermedades de Transmisión Sexual
HSA	Albúmina Sérica Humana, (<i>Human Serum Albumin</i>)
IFN- γ	Interferón gamma
IL-8	Interleucina 8
LPS	Lipopolisacárido
MPO	Mieloperoxidasa
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen</i>)
NET	Trampa Extracelular de Neutrófilo (<i>Neutrophil Extracellular Trap</i>)
PAM	Péptidos Antimicrobianos
PBS	Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)

PKC	Proteína Cinasa C (<i>Protein Kinase C</i>)
PMA	Acetato de Forbol Miristato (<i>Phorbol Myristate Acetate</i>)
PMN	Polimorfonucleares
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TNF	Factor de Necrosis Tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VPH	Virus del Papiloma Humano