



Trichomonas vaginalis: The versatility of a tenacious parasite

Title in Spanish: *Trichomonas vaginalis*: la versatilidad de un parásito tenaz

Alexandra Ibáñez-Escribano^{1,*}, Alicia Gómez-Barrio¹

¹Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Campus de Excelencia Internacional Campus Moncloa. Plaza Ramón y Cajal s/n-28040. Madrid, España.

ABSTRACT: Trichomonosis is one of the most prevalent nonviral sexually transmitted infection (S.T.I.) worldwide, with an estimated 276 million cases per year according to WHO overview. Little attention is paid to this disease, although more than 50% of S.T.I. curable are caused by this protozoan. Clinically, *Trichomonas vaginalis* infection can produce a wide range of pathological manifestations, from asymptomatic presentation to severe inflammatory and invasive lesions in the genitourinary tract of both men and women. The possible role displayed by *T. vaginalis* as a viral vector might also explain its role as a risk factor in the development of cervical and prostate neoplasia. In addition, trichomonosis is strongly associated with transmission and acquisition of other bacterial and viral pathogens like HIV. *T. vaginalis* is a very complex organism and has developed diverse mechanisms for the colonization of the genitourinary tract probably due to its extensive genome. This parasite must survive in a hostile environment exposed to continue fluctuations. Surprisingly, *T. vaginalis* possesses one of the largest and most repetitive genomes, with a core set of 60,000 protein-coding genes. According to all these features, *T. vaginalis* could be considered an excellent model of parasite to be studied in order to better understand the dynamics and immune evasion mechanisms of such versatile parasite.

RESUMEN: La tricomonosis urogenital humana, causada por el parásito *Trichomonas vaginalis*, es una de las infecciones de transmisión sexual (I.T.S.) de mayor prevalencia en el mundo, con un total de 276 millones de casos cada año, según la OMS. Algunos autores la han calificado como una enfermedad desatendida u olvidada ligada a la pobreza, a pesar de que más del 50% de las I.T.S. curables se deben a este agente etiológico. La tricomonosis cursa con un rango amplio de manifestaciones clínicas, que van desde casos asintomáticos hasta cuadros más graves e invasivos de los conductos genitourinarios. Se ha relacionado la infección con el riesgo de adquisición y transmisión del VIH y de lesiones preneoplásicas de cérvix y próstata. Este protozoo parásito presenta una gran variabilidad intraespecífica en su comportamiento patogénico, probablemente por el tamaño y complejidad de su genoma, con más de 60.000 genes codificantes. Es capaz de sobrevivir y colonizar un nicho complejo sometido a constantes fluctuaciones, el aparato genitourinario, pasando desapercibido en muchos casos. El tamaño y complejidad de su genoma convierten a *T. vaginalis* en un parásito de gran interés científico para el estudio de los mecanismos de patogenia y evasión de la respuesta inmune.

*Corresponding Author: alexandraibanez@ucm.es

Received: Mars 21, 2017 Accepted: Mars 22, 2017

Premio del Colegio Oficial de Farmacéuticos del Concurso científico 2016 de la Real Academia Nacional de Farmacia

An Real Acad Farm Vol. 83, N° 1 (2017), pp. 10-47

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

Las I.T.S. son una de las principales causas de morbilidad e infertilidad con graves consecuencias médicas y psicológicas para hombres, mujeres y niños. Se han descrito hasta 30 patógenos transmisibles por contacto sexual entre los que se encuentra un único parásito: *Trichomonas vaginalis* (1). La tricomonosis urogenital humana es una enfermedad olvidada (2, 3) responsable de más de 276 millones de infecciones anuales según el último informe de la OMS (4). Sin embargo, estos datos epidemiológicos podrían estar subestimados debido a la alta tasa de casos asintomáticos, especialmente en el hombre (5) y al no ser una enfermedad de declaración

obligatoria fuertemente asociada a la pobreza (2, 3). Este parásito presenta uno de los genomas de mayor tamaño y complejidad jamás secuenciados en un organismo unicelular. Se encuentra constituido por más de un 60% de secuencias repetitivas y en torno a 60.000 genes codificantes, muchos de ellos homólogos a los de otros organismos con los que puede co-habitar en el nicho genitourinario: VIH o *Treponema* entre otros (6). La presencia de un genoma tan grande podría explicar cómo un organismo unicelular como *Trichomonas* es capaz de colonizar y sobrevivir pasando desapercibido en numerosos casos en un ambiente tan hostil como el nicho genitourinario sometido a constantes fluctuaciones

ecológicas y fisiológicas. *T. vaginalis* muestra una elevada variabilidad intraespecífica habiendo desarrollado numerosos mecanismos patogénicos dependientes e independientes de contacto que influyen decisivamente en la variabilidad clínica de la infección.

Con el objetivo de entender en mayor profundidad el comportamiento patogénico de un parásito cuyo genoma, recientemente secuenciado por el equipo de Carlton en 2006, ha revolucionado la idea preconcebida de este protozoo, se realiza una revisión sobre su morfología y ciclo biológico, así como de la patogenia descrita hasta el momento (6). Aunque se ha intentado buscar marcadores moleculares capaces de discernir entre aislados en base a su patogenia y consecuencias clínicas, la complejidad que muestra *T. vaginalis* hace que esta búsqueda siga vigente. Asimismo, se hace una amplia descripción de los métodos de diagnóstico desarrollados hasta el momento y el tratamiento farmacológico que existe para tratar una de las I.T.S. más importantes de nuestro siglo.

2. MORFOLOGÍA

La morfología de *T. vaginalis* es muy variable. Desde aspectos piriformes, semilunares, esferoidales en medios líquidos, con una actividad locomotriz muy intensa, hasta formas ameboides en medios sólidos (agar), que

disminuyen su movilidad. Los agentes que operan tal polimorfismo son múltiples: la flora bacteriana concomitante, pH y presión osmótica del entorno, así como la riqueza de nutrientes del medio. El tamaño de la especie en preparaciones fijadas y teñidas es de $9,70 \pm 0,07 \times 7,00 \pm 0,04 \mu\text{m}$, produciéndose un incremento de un tercio en los trofozoitos vivos (7).

El movimiento vibratorio y adireccional característico de *T. vaginalis* se debe a la presencia de cinco flagelos, uno de los cuales es recurrente y constituyente fundamental de un orgánulo motor complejo: la membrana ondulante. Esta alcanza la mitad del cuerpo, presentando una laminilla marginal periódica conectada al primer cinetosoma por una estructura filamentosa. La Figura 1 muestra de forma esquemática la morfología del protozoo. El complejo cinetosomal está compuesto por unas estructuras cilíndricas llamadas cinetosomas, a las que se encuentra anclado cada flagelo en su extremo anterior. Los cuatro cinetosomas de los flagelos anteriores se disponen rodeando a un quinto que da origen al flagelo posterior o recurrente (FR). El número de flagelos presentes en el trofozoito, así como la longitud de la membrana ondulante (Mo), son características morfológicas con valor taxonómico.

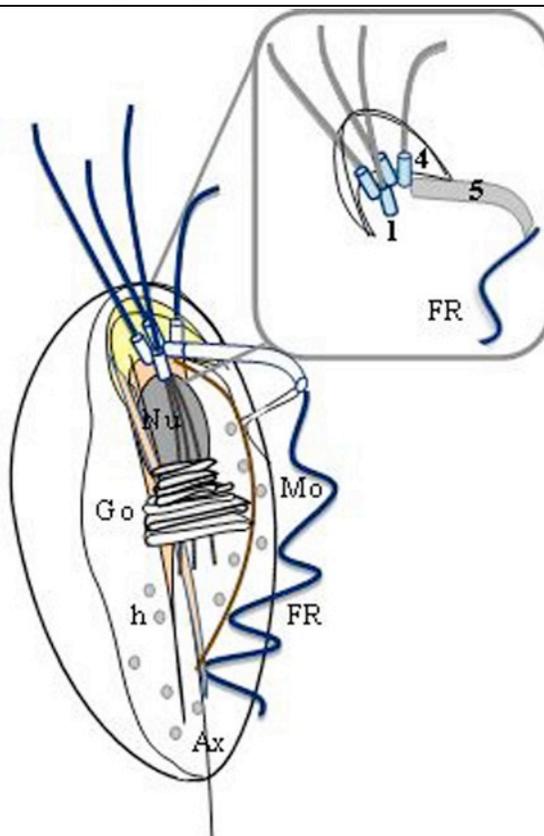


Figura 1. Morfología piriforme de *Trichomonas vaginalis*. Esquema morfológico de un tricomonádido en el que se observa: *Complejo cinetosomal*, compuesto por los cuatro cinetosomas de los flagelos anteriores y el quinto del flagelo recurrente (FR). La *costa* (coloreada de marrón), cuyo origen comienza en los cinetosomas 2 y 5, y ejerce de soporte de la membrana ondulante (Mo). El *aparato parabasal*, formado por los filamentos parabasales que conectan el complejo cinetosomal con el complejo de Golgi (Go). *Complejo pelta-axostilar* (de color amarillo), constituido por la pelta que soporta el canal periflagelar de donde emergen los flagelos y el axostilo (Ax). En color gris se representan los hidrogenosomas (h), con localización fundamentalmente paraxostilar y paracostal.

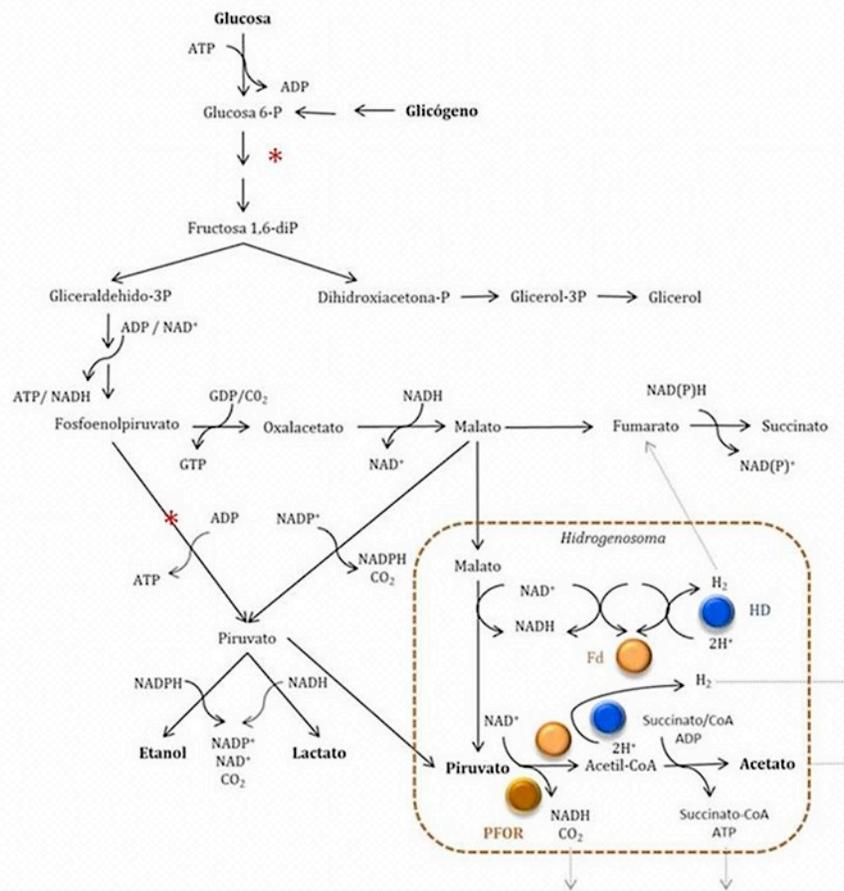
El citoesqueleto, con funciones motoras y reproductoras, está formado por microtúbulos que dan lugar a la formación de diversas estructuras como el complejo pelta-axostilar, la costa y los filamentos parabasales. El axostilo (Ax) constituye el eje de la célula sobresaliendo en la parte posterior del protozoo en forma de punta de flecha y uniéndose en la región anterior a la pelta, estructura citoesquelética con forma de media luna que rodea el área de donde emergen los flagelos anteriores. El complejo pelta-axostilar engloba el núcleo (Nu) y al aparato parabasal, formado por fibras estriadas que conectan las vesículas de Golgi (Go) o dictiosomas al aparato flagelar. La costa, formada por un haz de fibras estriadas, se encuentra asociada al cinetosoma del flagelo recurrente ejerciendo una función de soporte mecánico a la membrana ondulante (Mo).

El núcleo (Nu) se localiza en la porción anterior del trofozoíto, rodeado por una membrana nuclear porosa. Los tricomonádidos poseen un genoma de gran tamaño, organizado en 4 a 6 cromosomas según el género, con un tamaño variable, siendo mayor en los géneros *Trichomonas* y *Tritrichomonas* (133-177 Mb) mientras que *Tetratrichomonas gallinarum* presenta el más pequeño (86 Mb), dentro de las especies estudiadas (8). *T. vaginalis* se considera, hasta la fecha, el organismo unicelular con el genoma más grande secuenciado (*Giardia duodenalis*: 12 Mb, *Plasmodium falciparum*: 23 Mb).

El citoplasma presenta numerosas vacuolas y vesículas relacionadas con procesos de endocitosis, digestión y transporte, así como ribosomas e hidrogenosomas (h) estrechamente unidos a gránulos de glucógeno y al retículo endoplasmático rugoso (9). Los tricomonádidos son protozoos microaerófilos, carentes de mitocondrias y peroxisomas. Se alimentan mediante procesos de pinocitosis y fagocitosis, que tienen lugar preferentemente en la región posterior de la célula, formando vacuolas de

distintos tamaños. Los orgánulos implicados en el metabolismo energético son los hidrogenosomas (h), descubiertos por Lindmark y Müller en 1973. Estos orgánulos, presentes en protozoos de la superclase Parabasalia, están evolutivamente relacionados con las mitocondrias. Se localizan en su mayoría en las regiones paraxostilar y paracostal, tienen una forma esférica o ligeramente alargada, con un tamaño que oscila entre 0,2 a 1 μm de diámetro, aunque en condiciones de estrés como un tratamiento farmacológico, pueden llegar a duplicar su tamaño (9). El hidrogenosoma es el responsable de la formación de ATP mediante la oxidación del piruvato y el malato en condiciones anaeróbicas. Los hidratos de carbono son la principal fuente de ATP del tricomonádido, comenzando su metabolismo en el citosol, donde se lleva a cabo la glicolisis. Algunos intermediarios de esta ruta metabólica, como el piruvato o el malato, continúan su catabolismo en los hidrogenosomas. El piruvato sufre una descarboxilación oxidativa por acción de la piruvato:ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) formando acetato, H_2 y CO_2 . La ferredoxina (Fd), actúa como proteína transportadora de electrones en el hidrogenosoma y una vez reducida por la acción de la oxidoreductasa, vuelve a ser oxidada mediante la acción de la hidrogenasa (HD) produciendo hidrógeno molecular. Este orgánulo recibe su nombre por el hidrógeno molecular que generan durante el metabolismo energético en condiciones anaeróbicas.

Como muestra la Figura 2, el metabolismo de los hidratos de carbono se lleva a cabo parcialmente en el hidrogenosoma y no finaliza con la oxidación completa de la glucosa. Los productos que se generan tras el metabolismo son acetato, lactato, malato, glicerol, CO_2 e H_2 . Este metabolismo energético comienza en el citoplasma a través de la vía clásica Embden-Meyerhoff-Parnas con la obtención de ATP (9).



* Reacciones metabólicas en las que las enzimas que intervienen son distintas en el hombre y en *T. vaginalis*.

PFOR: Piruvato:ferredoxina oxidorreductasa; Fd: Ferredoxina; HD: Hidrogenasa

Figura 2. Ruta de la glicolisis y la descarboxilación oxidativa en *T. vaginalis*.

3. CICLO BIOLÓGICO

T. vaginalis es un parásito de transmisión sexual de ciclo biológico directo. Sólo presenta formas flagelares o trofozoítos, no existiendo ninguna forma de resistencia o quiste en su ciclo vital. Aunque se han descrito formas redondeadas en ambientes desfavorables o cultivos agotados, este estado es reversible en cuanto el parásito vuelve a encontrarse en un medio adecuado y rico en nutrientes. Estas formas polimastigotes o pseudoquisticas son organismos esféricos e inmóviles caracterizados por la internalización de los flagelos y de la membrana ondulante (10).

El único hospedador natural de *T. vaginalis* es el ser humano. Su multiplicación se produce en la mucosa genitourinaria del hombre y la mujer mediante criptopleuromitosis. Este tipo de fisión binaria se caracteriza por la formación de un huso microtubular o *spindle* de localización externa al núcleo. La membrana nuclear se mantiene y los microtúbulos se polarizan en dos orgánulos llamados atratóforos, que realizan el papel de los centrosomas. La división comienza con la duplicación

de las estructuras cinetosomales, seguida de la división del núcleo mediante mitosis. La Figura 3 muestra un trofozoíto durante el proceso de división en dos células hijas.

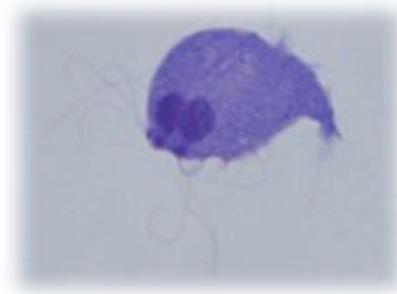


Figura 3. Trofozoíto en criptopleuromitosis. En la región anterior se observan los dos penachos flagelares, los complejos cinetosomales duplicados y los núcleos.

Algunos autores han estudiado la viabilidad de *T. vaginalis* en otras localizaciones anatómicas distintas al tracto genitourinario. Ryu *et al.* (11) determinaron la

supervivencia de los trofozoítos en distintas condiciones, estimando una supervivencia inferior al 10% tras exponer la muestra a 4 °C durante 30 minutos. *T. vaginalis* es muy sensible al aumento de temperatura, no pudiendo sobrevivir a más de 45 °C. Al no presentar formas de resistencia es susceptible a los detergentes y aguas cloradas, recuperándose menos de un 10% de parásitos viables tras 24 h en muestras de orina.

Se han descrito casos de transmisión vertical de madre a neonato a través del canal del parto. La mayoría de las tricomonosis neonatales son asintomáticas o se logra la curación espontánea de las mismas tras la disminución de los niveles de estrógenos maternos en el recién nacido a partir de la sexta semana (12) o tras el tratamiento con metronidazol (MTZ) (13).

Duboucher *et al.* (14) diagnosticaron la coinfección por *T. vaginalis* y *Pneumocystis* en un varón VIH⁺ con problemas respiratorios. Aunque la presencia de tricomonádidos en pulmón se asociaba a *T. tenax* (13, 15, 16), un comensal humano de localización oral, los estudios genómicos han permitido identificar otros tricomonádidos (*T. vaginalis*, *Pentatrichomonas hominis* y *Tetratrichomonas* spp.) en pacientes con afecciones pulmonares (14, 17-19)..

4. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

El genoma de *T. vaginalis* es uno de los de mayor tamaño secuenciado en un organismo vivo, incluido el hombre. Está constituido por aproximadamente 160 Mb organizados en 6 cromosomas y en torno a 46.000 genes codificantes (6, 20). Más del 65% del genoma está compuesto por familias génicas repetidas entre las que se encuentran un elevado porcentaje de elementos transponibles y secuencias codificantes para proteínas homólogas presentes en bacterias (*Treponema pallidum* y *Chlamydia poxvirus*), virus (VIH) y otros protozoos parásitos como *Entamoeba histolytica*, *Leishmania major* o *Giardia duodenalis* (6). Algunos estudios mencionan la posible incorporación de ciertos genes bacterianos por *T. vaginalis* mediante un proceso de transferencia genética lateral (21, 22). Strese *et al.* (22) definen este fenómeno como la adquisición e incorporación de material genético de un organismo donador, sin que exista un proceso de transferencia sexual o vertical, en al menos un 0,25% de los genes de este protozoo. La transmisión potencial se habría producido mediante un proceso de fagocitosis, seguido de una fisión binaria, que habría incorporado en su genoma y en el de sus células hijas dichos genes, sin la necesidad de estar presentes en un gameto para poder ser transmitido a la progenie, como ocurriría en un organismo de reproducción sexual. Esto explicaría cómo *T. vaginalis* puede tener tantos genes homólogos al de otros organismos eucariotas y procariotas (6). Este fenómeno ya se ha descrito en otros protozoos parásitos como *Giardia* o *Entamoeba* (23). Sin embargo, la ausencia de genes procariotas en *Tritrichomonas tenax* y *Trichomonas gallinae* parece indicar que este fenómeno de transferencia debió suceder tras la divergencia de ambos géneros (22). La presencia de, al menos, un 5% de familias génicas inestables o pseudogenes, que han sufrido eventos de

duplicación reciente, también podría haber contribuido al aumento del genoma de este parásito (24). En lo que respecta al genoma de *T. vaginalis*, algunos autores atribuyen su tamaño a uno o varios procesos de expansión y duplicación de las familias génicas completas durante la evolución de los parabasalidos, especialmente durante la transición de *T. vaginalis* de una localización intestinal al tracto genitourinario (8). Existen numerosas incógnitas en cuanto al por qué de un genoma tan grande y repetido así como a la posible relación que pueda existir con su patogenia. Algunos autores han postulado que la duplicación de genes y, por consiguiente, la aparición de genes redundantes, podrían estar asociados a la supervivencia del parásito ante los cambios drásticos de su ecosistema natural. Este hecho explicaría cómo cientos de genes pueden aumentar o disminuir su expresión hasta 100 veces ante un estímulo como la presencia de oxígeno (25). Esta adaptación justifica la existencia de procesos de co-regulación entre familias génicas. Sin embargo todavía sólo se ha podido especular de forma teórica con hipótesis que intentan explicar este fenómeno.

Los estudios genómicos en *T. vaginalis* se han dirigido al conocimiento de regiones génicas, el diagnóstico y la caracterización de los aislados en función de propiedades fenotípicas como la resistencia a los 5-nitroimidazoles (5-NI), la presencia o no de virus de *T. vaginalis* (TVV), el origen geográfico, la correlación con la patogenia clínica, etc., mediante técnicas diversas. Se describen a continuación los estudios más relevantes:

4.1. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Este método de análisis de ADN mediante la amplificación aleatoria de fragmentos polimórficos se emplea en estudios filogenéticos y de caracterización de aislados. Se utilizan varios cebadores diseñados al azar que permiten la comparación de polimorfismos en numerosos *loci*. A pesar de tratarse de una de las técnicas más empleadas para este tipo de estudios, su principal inconveniente es la baja reproducibilidad. Snipes *et al.* (26) publicaron en el año 2000 un estudio de epidemiología molecular basado en la caracterización de 109 aislados clínicos mediante tres métodos distintos: análisis comparativo de las secuencias mediante RAPD, estudio de mutaciones por medio de la secuenciación de la región ITS1-5.8S ARNr-ITS2 y la determinación de RNA de doble cadena. Los resultados mostraron una correlación significativa entre los patrones de RAPD y la presencia de TVV en los aislados de *T. vaginalis*. Los análisis de comparación de secuencias diferenciaron los aislados de tipo I de los de tipo II de forma estadísticamente significativa. Asimismo, Vanacova *et al.* (27) también lograron diferenciar los aislados en función de su susceptibilidad a metronidazol (MTZ) y la clínica de las pacientes. Estos resultados coinciden con los de Rojas *et al.* (28). No obstante, y en contraposición a los estudios de Snipes (26) los resultados de Vanacova no mostraron ninguna concordancia con la presencia de TVV (27). En 2001, Hampl *et al.* realizaron un estudio de RAPD empleando 27 cebadores con el fin de buscar correlaciones

entre los patrones genómicos de los aislados y la presencia de TVV, presencia de *Mycoplasma*, el origen geográfico o el desarrollo de resistencias. Sin embargo, los dendrogramas no mostraron asociaciones entre los resultados genómicos y los fenotípicos (29). En este sentido, Kaul *et al.* (30) en 2004 analizaron 15 aislados frescos de mujeres asintomáticas y otros 15 de pacientes con síntomas procedentes de India. Los resultados agruparon todas las muestras asintomáticas. No obstante, los valores de *bootstrap* en los aislados estudiados fue muy bajo entre los agrupamientos y la sensibilidad a MTZ.

4.2. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Los resultados obtenidos en la aplicación de esta técnica a la amplificación de la secuencia que codifica para la proteína de choque térmico (HSP70) y la resistencia a MTZ no mostraron ninguna correlación entre los fragmentos de 36 aislados (31). En cambio, Meade *et al.* (32) obtuvieron dos agrupaciones claramente diferenciadas

tras el análisis de 129 aislados de *T. vaginalis* empleando la misma diana EcoRI-HSP70. En ambos estudios se corrobora la heterogeneidad genómica que muestra este parásito, en función del número elevado de patrones de RFLP obtenidos por ambos grupos.

4.3. Genes Ribosomales

El análisis de los genes ribosomales, en particular, el que codifica para la subunidad pequeña (ARNr 18S) continúa siendo una de las herramientas principales para el análisis filogenético de especies debido a su naturaleza conservada y evolución lenta (33). En el campo de la tricomonosis, la secuenciación del ARNr 18S ha sido una herramienta empleada en estudios de diagnóstico rápido de esta enfermedad mediante PCR, mejorando la sensibilidad del diagnóstico de referencia (34, 35). La región genómica codificante de los ARN ribosomales 18S, 5.8S y 28S se esquematiza en la Figura 4.

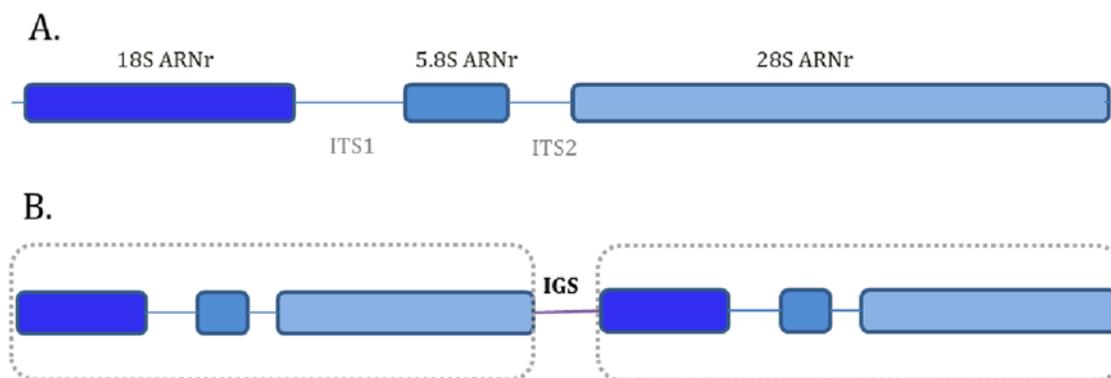


Figura 4. Esquema de la región genómica codificante de los ARN ribosomales 18S, 5.8S y 28S. A. Esquema de una unidad transcripcional en la que cada ARNr se separa por un espaciador interno no codificante (ITS). B. Representación de dos unidades transcripcionales separadas por el espaciador intergénico (IGS).

4.4. Espaciadores Internos (ITS)

Los genes que codifican a los ARNr están mucho más conservados que los espaciadores internos (ITS), convirtiéndose estos últimos en marcadores adecuados para la diferenciación inter e intra-específica de organismos (39). Este hecho explica el alto número de estudios en otros parásitos en los que se ha realizado la diferenciación inter e intra-específica con éxito empleando esta región como marcador molecular (40-44).

Los tricomonádidos se caracterizan por presentar un *locus* ITS2 pequeño que presenta una estructura secundaria formada por una rama en lugar de tres (45). La secuencia genética compuesta por las regiones 18S ARNr - ITS1 - 5.8S ARNr - ITS2 - 28S ARNr se encuentra codificada en una única unidad transcripcional formada por varias copias en tándem y de número variable en función del organismo (Figura 4.A). El análisis del genoma de *T. vaginalis* reveló la existencia de 254 copias de la subunidad ribosomal pequeña y 251 copias del 5.8S ARNr (6). Cada una de estas unidades transcripcionales se separan mediante otra secuencia no codificante denominada espaciador intergénico (IGS) (Figura 4.B). Simoes-Barbosa *et al.* (46) emplearon este *locus* para el estudio de la variabilidad

entre aislados obtenidos de pacientes con y sin sintomatología. Sin embargo no lograron detectar una asociación clara entre la clínica y los perfiles de IGS-RFLP, considerando este marcador inadecuado para los estudios de caracterización intraespecífica en *T. vaginalis*.

Todos los estudios han confirmado la idoneidad del *locus* ITS1 - 5.8S ARNr - ITS2 como herramienta para estudios filogenéticos en tricomonádidos (47-50). Otros grupos se han centrado en la caracterización de aislados, habiendo obtenido variabilidades de entre el 15% y el 4% en la región ITS de los aislados secuenciados. Algunos autores han asociado mutaciones de nucleótidos específicos, especialmente en el ITS1, con fenómenos de resistencia al metronidazol (26, 51) y con el desarrollo de tricomonosis asintomáticas en las pacientes (52).

Este *locus* también ha sido empleado para el diagnóstico de casos de sospecha de tricomonosis pulmonar. En los estudios desarrollados por Mallat, Bellanger y Leterrier se amplificaron muestras pulmonares de pacientes afectados por un neumotórax post-trasplante cardíaco, un glioblastoma y un adenocarcinoma esofágico, respectivamente, identificando la presencia de *T. tenax* en los lavados broncopulmonares mediante la secuenciación

de este *locus* (13, 15, 16). Jongwutiwes *et al.* (17) emplearon esta región e identificaron *Pentatrachomonas hominis* en una mujer de 28 años afectada por un lupus

eritematoso y coinfectada al mismo tiempo por *Strongyloides* y *Opistorchis*.

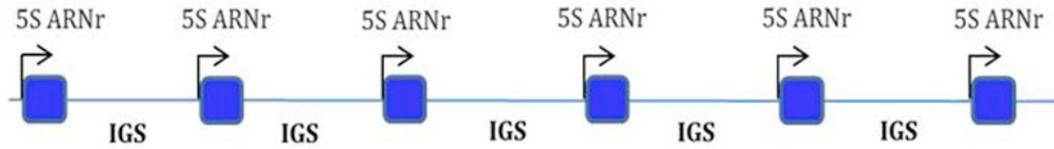


Figura 5. Disposición nucleotídica en tándem de los genes que codifican el ARNr 5S en *T. vaginalis*, separados por una secuencia intergénica (IGS) no codificante.

La subunidad 5S del ARNr de *T. vaginalis* se encuentra codificada en otra región del genoma, organizada en tándem de más de 200 copias (Figura 5). No existen estudios que empleen este *locus* como marcador para la caracterización molecular de este parásito, tan sólo el trabajo de Torres-Machorro *et al.* (53) publicado en 2009, en el que se compara la secuencia de este gen en tres tricomonádidos distintos (*T. vaginalis*, *T. tenax* y *Tritrichomonas foetus*), confirmando una divergencia de entre un 94-98%, así como una localización cromosómica variable entre los organismos.

Independientemente del *locus* que se emplee (ribosomal o espaciador no codificante), en todos los casos

se amplifica la región y se secuencia el producto de PCR para su análisis comparativo. Los nuevos secuenciadores siguen basándose en el método de Sanger. Sin embargo las nuevas tecnologías permiten llevar a cabo de forma automatizada la secuenciación de varias muestras a la vez mediante cromatografía capilar.

La Figura 6 compara la metodología de secuenciación antigua empleando el método de Sanger en geles de poliacrilamida y revelados con radiactividad, y el que se lleva a cabo actualmente con secuenciadores automáticos capaces de generar un cromatograma en función de las señales obtenidas por los fluorocromos con los que se marcan los nucleótidos del ADN amplificado (54).

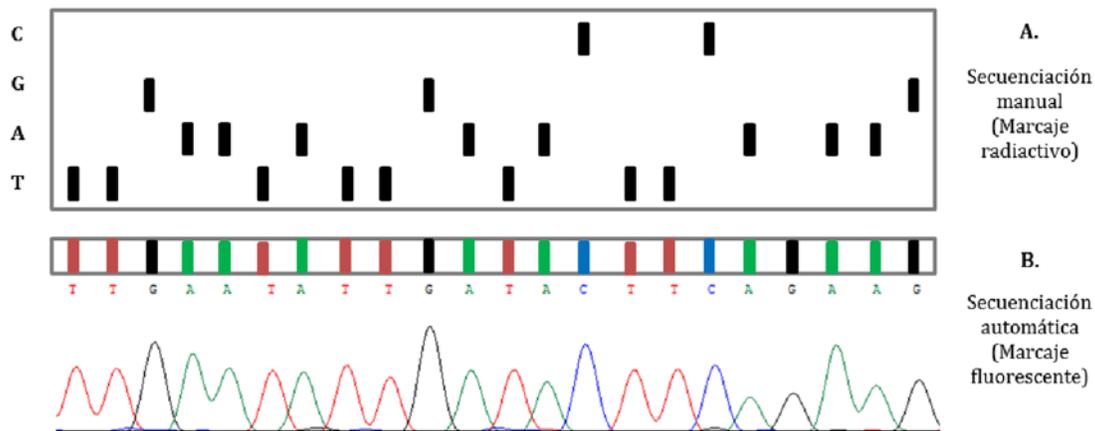


Figura 6. Comparación de la secuenciación de Sanger mediante el método enzimático empleando geles de poliacrilamida y revelando mediante marcaje radiactivo (A) y la secuenciación automática empleando fluorocromos (B).

4.5. Microsatélites (*MS* o *SSR*)

Las regiones microsatélites son secuencias cortas de dos a seis nucleótidos repetidas en tándem formando fragmentos de 100 nucleótidos aproximadamente (Figura 7) y distribuidas ampliamente de forma multialélica y ubicada en eucariotas y procariotas en numerosas copias (55-57). Ramel sostiene la hipótesis de que se trata de ADN basura (58). Sin embargo, cada vez son más los estudios que confirman que estas regiones repetidas están implicadas en procesos de organización de la cromatina, regulación génica, replicación del ADN, activación de la transcripción y en los procesos de reparación mediante *mismatch*, entre otros (59). Los microsatélites pueden ubicarse en distintas regiones genómicas, como las regiones no codificantes, los marcos abiertos de lectura o

regiones UTR, con implicaciones en el desarrollo de patologías como la enfermedad de Huntington, algunos tipos de cáncer, ataxia cerebrosespinal, etc. (59).

La región que se encuentra flanqueada por dos MS se denomina intermicrosatélite (ISSR o Inter-SSR) (Figura 7). Este fragmento génico puede ser codificante y también ha sido objeto de estudio. Con el fin de investigar el polimorfismo genético de cepas y clones de organismos vivos, Zietkiewicz *et al.* (60) diseñaron en 1994 cebadores para la caracterización molecular de distintos organismos por medio de la huella genómica o *fingerprinting* a través de la comparación de patrones de bandas entre muestras. Para ello, diseñaron cebadores formados por uno de los dímeros más comunes en los genomas eucariotas (CA_n) en cuyos extremos 5' y 3' ancló una región de dos

nucleótidos distintos con el fin de aumentar la especificidad de unión y la reproducibilidad de la técnica (Figura 7). El polimorfismo que se detecta con esta metodología no se debe a la variación del tamaño de los MS de destino sino a las mutaciones (inserciones o deleciones) que se han producido durante la evolución del

organismo. Las principales ventajas de este marcador molecular son: la reproducibilidad, la rapidez y sencillez de la técnica. Asimismo, es recalable el polimorfismo elevado asociado a la tasa de mutación espontánea que le convierte en un marcador excelente para estudios intraespecíficos (60, 61).

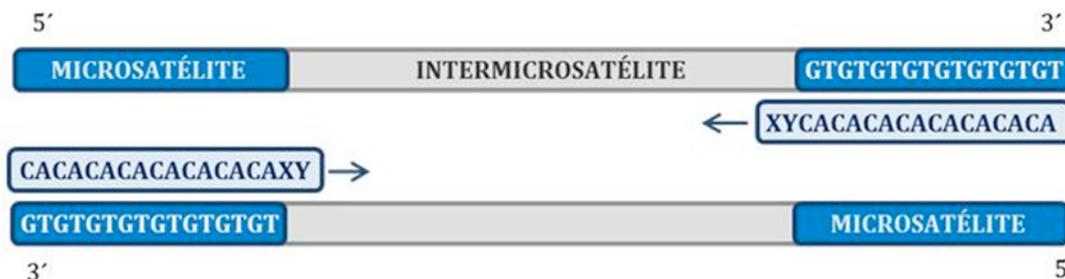


Figura 7. Representación de una región microsatélite (SSR) de 2 nucleótidos repetidos en tándem flanqueando a un intermicrosatélite (ISSR). Los cebadores siguen el modelo diseñado por Zietkiewicz *et al.* (60).

Estos marcadores se consideran buenas herramientas en la identificación de infecciones mixtas así como en el estudio de genética poblacional de distintos parásitos como *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* o *Plasmodium* spp. (57,61-67).

Aunque no existen trabajos de ISSR en *T. vaginalis*, en 2011 el grupo de Conrad *et al.* (68) llevó a cabo los primeros estudios de MS en *T. vaginalis*. Para ello analizaron el genoma en busca de regiones de menos de 400 bp formadas por repeticiones de 2-6 nucleótidos. Los estudios bioinformáticos generaron 86 MS, de los cuales se seleccionaron un panel de 21 marcadores MS capaces de diferenciar entre aislados. Un año más tarde, este mismo grupo corroboró la utilidad de este panel de marcadores de MS para la caracterización de 235 muestras de *T. vaginalis* procedentes de todos los continentes (68).

4.6. Polimorfismo de Nucleótido Simple (SNP)

Se trata de alteraciones en la secuencia que afectan a un único nucleótido (Figura 8). Se encuentran distribuidos

por todo el genoma, produciéndose en 1 de cada 1000 bases (69). Su localización es relevante en el resultado fenotípico que puede ocasionar dicha mutación. Muchos SNP se producen en regiones no codificantes por lo que son empleados como marcadores evolutivos. No obstante, también se encuentran en regiones codificantes, incluyendo genes de copia única (SCG: *Single-Copy Gene*). Conrad *et al.* (57) estudiaron este tipo de genes en busca de los marcadores óptimos para la caracterización de aislados en el laboratorio e identificaron un número elevado de SCG. Seleccionaron sólo aquellos que presentasen un tamaño no muy elevado (<400 pb), no mostrasen similitud con secuencias de otros organismos y representasen a genes constitutivos o *housekeeping*, factores de virulencia potenciales o de interés como dianas farmacológicas. El estudio de los SNP requiere no sólo la amplificación del fragmento sino su posterior secuenciación para la comparación entre aislados, al igual que los ARNr y los ITS.

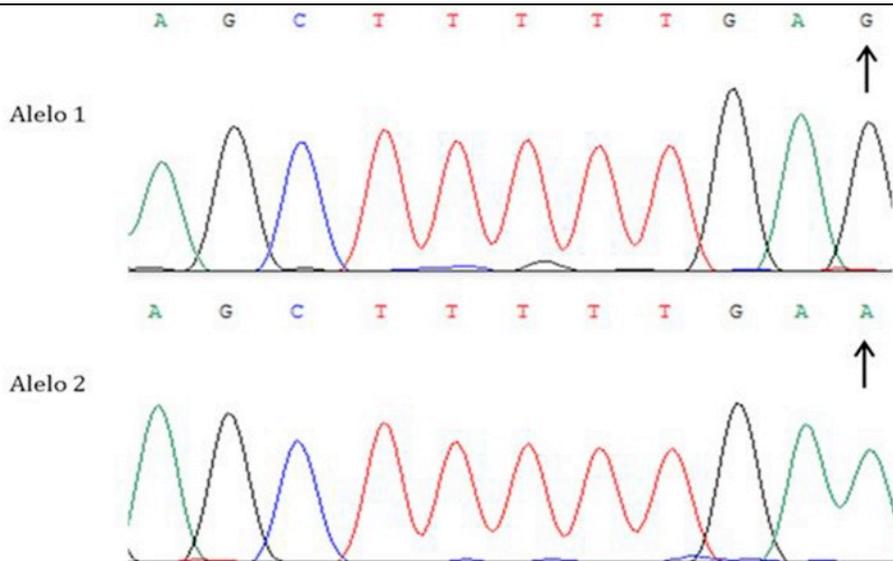


Figura 8. Ejemplo de polimorfismo de nucleótido simple o SNP.

En los estudios de Conrad *et al.* (57), de los 21 SCG iniciales, se seleccionaron seis como los más adecuados para la caracterización genética de este parásito, junto con los 21 MS seleccionados. La combinación de los MS y SNP permitió un año más tarde diferenciar dos tipos de poblaciones asociadas con la presencia de TVV y la sensibilidad a MTZ tras genotipar 235 muestras positivas (68). A diferencia de los SSR, estos marcadores presentan una menor tendencia a fenómenos de homoplasia al mostrar un ratio de mutación menor (57, 70). Cornelius *et al.* (70) seleccionaron siete genes constitutivos de copia única con el fin de caracterizar 68 aislados que agruparon en dos poblaciones diferentes. Esta tipificación multilocus de secuencias, también conocida como *Multilocus Sequence Typing* (MLST), se emplea para los estudios poblacionales de patógenos mediante la secuenciación de fragmentos internos de los genes seleccionados. Las diferencias o SNP con respecto al gen de referencia permiten conocer la evolución del aislado e identificar el

número de alelos en las secuencias estudiadas.

5. PATOGENIA

La distinta sintomatología provocada por el parásito sienta sus bases en los mecanismos de patogenia, los cuales, aún hoy en día, no han podido ser explicados de forma clara. En las últimas décadas se han realizado estudios que han permitido revelar de forma parcial el comportamiento y evolución de este parásito. *Trichomonas* se encuentra en un ambiente complejo, que sufre cambios bruscos, en el que influyen el pH, la microflora, la respuesta inmune del hospedador, los niveles de hierro y zinc, poliaminas y calcio, etc.

En este sentido, el parásito ha tenido que ser capaz de desarrollar mecanismos de adaptación al hospedador para colonizar y mantener la infección en este ambiente tan hostil. La interacción parásito-hospedador es un proceso multifactorial dependiente de mecanismos inherentes al paciente (hospedador) y al parásito (Figura 9).

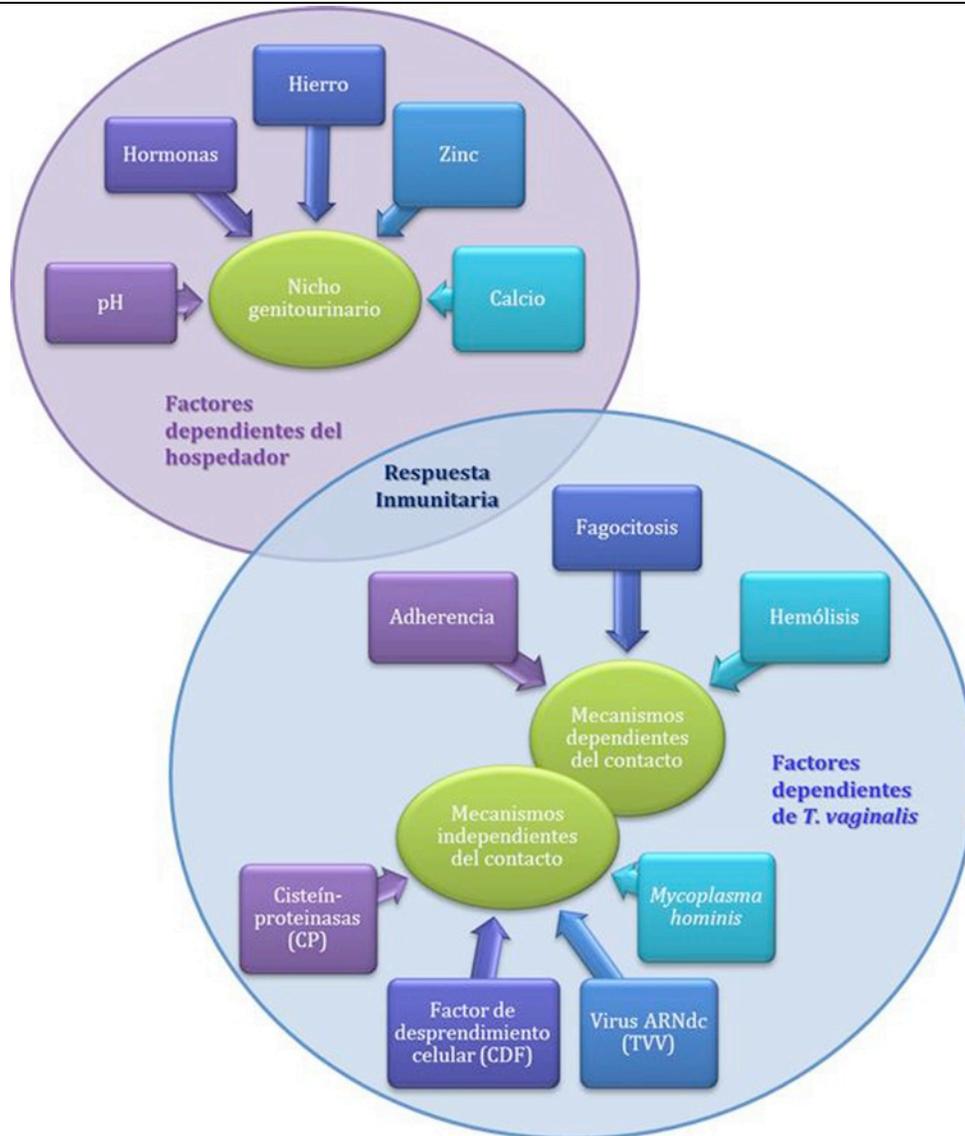


Figura 9. Esquema representativo de los factores principales que influyen en la patogenia y colonización por *T. vaginalis*.

5.1. Factores asociados al hospedador

Los factores más relevantes asociados al hospedador son:

5.1.1. pH vaginal y microflora: *T. vaginalis* crece en un pH próximo a 5,0. El pH vaginal de una mujer sana es ácido, por debajo de 4,5. La existencia de enfermedades genitourinarias concomitantes o una alteración de la flora (especialmente la disminución de la población de *Lactobacillus acidophilus* y/o un incremento de las bacterias anaerobias), están asociadas a un aumento del pH. Esta circunstancia facilita el asentamiento del parásito en caso de un contacto de riesgo. Existen muchos factores asociados al parásito cuya expresión y funcionalidad van a estar determinados por el pH del medio (71). Asimismo, el propio parásito a través de la fagocitosis de las bacterias de la microflora, reduce la población de *Lactobacillus*, principal responsable del ambiente ácido en la vagina (72).

Esta alteración de la flora y la secreción de determinados factores favorece un ambiente menos ácido y con ello el asentamiento parasitario.

5.1.2. Ciclo menstrual y niveles hormonales: el papel que juegan estos dos elementos en la presentación clínica de la tricomonosis es de gran relevancia. La exacerbación de los síntomas en la mujer está asociada a las fluctuaciones hormonales durante el transcurso del ciclo menstrual. El nivel de estrógenos alcanza dos picos máximos durante el ciclo: el primero durante la ovulación y el segundo en la mitad de la fase lútea (periodo previo a la menstruación). En cambio la progesterona comienza a secretarse durante la segunda parte del ciclo, es decir, tras la ovulación, disminuyendo drásticamente con el comienzo de la menstruación (Figura 10). Durante el embarazo, la mujer presenta niveles de estrógenos y progesterona elevados.

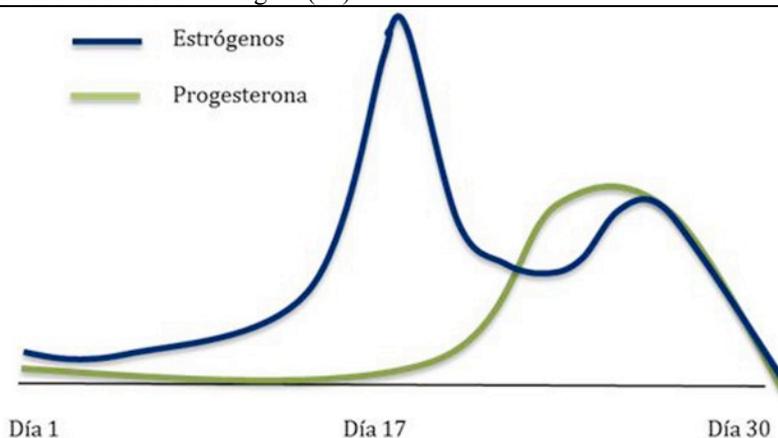


Figura 10. Niveles de estrógenos y progesterona durante el ciclo de una mujer fértil no embarazada.

La presencia de receptores específicos para estrógenos y andrógenos en la superficie de *T. vaginalis* refleja la importancia de las hormonas en el desarrollo de esta parasitosis (73).. Hay estudios que parecen indicar que tanto un ambiente hipo como hiper-estrogénico podrían favorecer distintos mecanismos relacionados con el asentamiento del parásito. En la literatura científica se pueden encontrar dos hipótesis contrapuestas que no se han logrado confirmar.

La primera teoría explicaría por qué algunas pacientes experimentan una exacerbación de los síntomas durante la menstruación. Este periodo se caracteriza por presentar niveles bajos de estrógenos y un incremento en la disponibilidad de hierro a través de los glóbulos rojos en el aparato genitourinario. Asimismo, durante la menstruación la flora vaginal sufre una disminución de la población de lactobacilos (74), convirtiéndose en otro factor que también influye en el asentamiento parasitario. La situación hormonal contraria se produce durante el embarazo, periodo en el que la mujer presenta una mayor concentración de estrógenos y progestágenos. Según esta hipótesis el desarrollo de síntomas se vería disminuido tal y como han llegado a relatar algunas pacientes. Los estudios de Garber *et al.* (75) demostraron que la presencia

de estrógenos en la cavidad genitourinaria induce una disminución en la secreción de factores de virulencia asociados al parásito como el factor de desprendimiento celular (CDF). Por otro lado, el nivel de estrógenos en sangre condiciona la producción de glucógeno en las células del epitelio vaginal. Una deficiencia estrogénica induce una disminución de la flora normal, que emplea y transforma el glucógeno en ácido láctico como sustrato energético. En estas condiciones, el pH vaginal aumentaría, favoreciendo el asentamiento de *T. vaginalis* (Figura 11, teoría A).

Sin embargo, y en contra de lo defendido por la teoría A, este ambiente (bajos niveles de estrógenos, un menor glucógeno disponible y un pH alto) es el que presentan las adolescentes pre-menárquicas y las mujeres postmenopáusicas, poblaciones en las que el asentamiento es poco frecuente. Asimismo, Sharma *et al.* (76) describieron la curación de un caso de tricomonosis recurrente en una mujer menopáusica tras retirarle la terapia de reemplazo hormonal. Este grupo defiende la idea de que los estrógenos pueden favorecer el asentamiento del parásito (Figura 11, teoría B). En relación a esta segunda teoría, se podría asociar este factor biológico (niveles hormonales altos) con un incremento

del crecimiento de *T. vaginalis* en animales ovariectomizados y estrogenizados tras la infección experimental. El incremento de glucógeno, observado en la mucosa vaginal de ratas ovariectomizadas tras el

tratamiento con estradiol, sugiere una posible asociación entre la susceptibilidad a la infección y la acumulación de este sustrato (glucógeno) empleado como nutriente por el parásito.

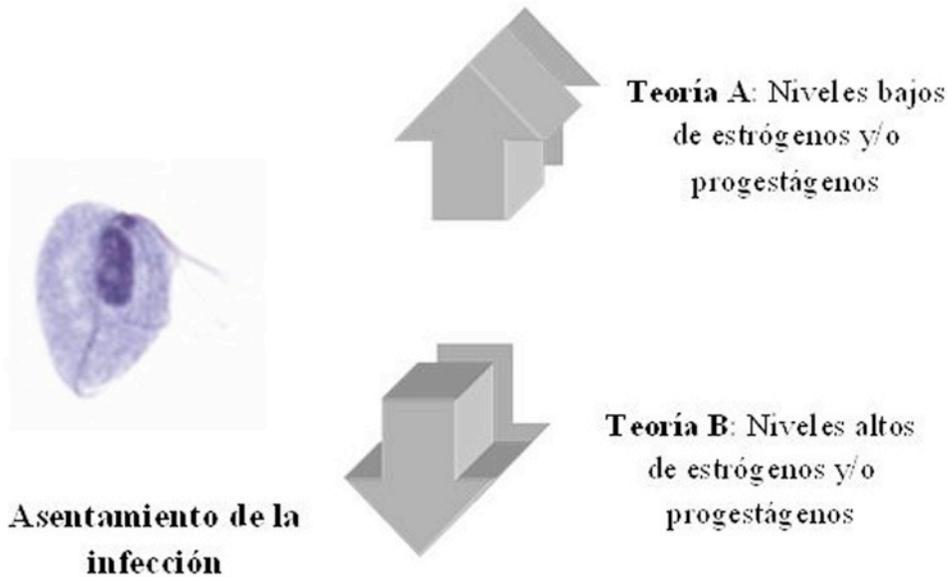


Figura 11. Resumen gráfico de las dos teorías que reflejan la influencia de los niveles de hormonas sexuales femeninas en el asentamiento de *T. vaginalis* a nivel genitourinario.

La existencia de trabajos que muestran resultados contrapuestos refuerza la idea de que la patogenicidad de este parásito se debe a la correlación entre los distintos factores de virulencia y el microambiente genitourinario. Un único factor no puede explicar la pato-biología de esta I.T.S., aunque, tal y como se ha demostrado, parece que la influencia del factor hormonal en el establecimiento de esta parasitosis es de gran importancia.

De forma concomitante a las fluctuaciones de hormonas, se va a producir la renovación periódica de la mucosa junto con la descamación fisiológica durante el ciclo menstrual del epitelio cervical y vaginal, que van a permitir que el parásito acceda a capas más profundas.

5.1.3. Presencia de hierro: el hierro es uno de los factores que más se han estudiado en la patogenicidad de *T. vaginalis*. Su papel como inductor de numerosos genes

asociados al asentamiento y colonización del parásito (77), así como a la exacerbación de su patogenicidad, son indiscutibles. También es esencial para el desarrollo adecuado del metabolismo del parásito y su multiplicación. *T. vaginalis* presenta un metabolismo fermentativo en el que participan proteínas citoplasmáticas e hidrogenosomales con núcleos Fe-S (78). Hay estudios que corroboran el papel regulador del hierro en determinadas proteínas parasitarias como las cisteín-proteasas (CP) o las adhesinas (AP), así como en otras enzimas (**tabla 1**). Sin embargo, en muchos de los genes que codifican para estas proteínas no se han logrado identificar elementos reguladores de hierro (IRE) ni promotores génicos dependientes de hierro (IRP) (79), como se observa en el gen que codifica a la adhesina AP65 (80).

Tabla 1. Proteínas reguladas por la acción del hierro (78, 81).

Proteína	Tipo de proteína	Función	Regulación por Fe
AP23	Adhesina	Citoadherencia	+
AP33	Adhesina y enzima hidrogenosomal	Citoadherencia y actividad succinil CoA sintetasa	+
AP51	Adhesina y enzima hidrogenosomal	Citoadherencia y actividad succinil CoA sintetasa	+
AP65	Adhesina y enzima hidrogenosomal	Citoadherencia y actividad málica	+
AP120	Adhesina y enzima hidrogenosomal	Citoadherencia y actividad PFOR	+
TvCP4	CP de superficie	Hemólisis	+
TvCP12	CP de superficie	Citotoxicidad	-
TvCP30	CP de superficie	Citoadherencia, desorganización del citoesqueleto y degradación de proteínas	-
TvCP39	CP de superficie	Citotoxicidad y degradación de inmunoglobulinas	-
TvCP62	CP	Citoadherencia	+
TvCP65	CP de superficie	Citotoxicidad	-
TvCP2, CP3, CP4 y CPT	CP de secreción	Inducción de la apoptosis en células del hospedador	-
TvLEGU-1	CP de superficie	Citoadherencia	+
TvLIP	Triacilglicerol lipasa	Hemólisis	+
TvGAPDH	Proteína de unión a fibronectina (Fn) y deshidrogenasa	Citoadherencia	+
P270	Proteína de superficie	Variación fenotípica	-

Los niveles de hierro altos condicionan procesos metabólicos asociados al hidrogenosoma, regulando el potencial de membrana del orgánulo, así como la expresión de enzimas hidrogenosomales entre las que se encuentran las AP (82). También se ha confirmado que este elemento induce modificaciones en los componentes de la matriz extracelular del hospedador, como el incremento de moléculas de fibronectina (Fn) que favorece la adhesión de los trofozoítos (77, 83). Asimismo, este

ambiente rico en Fe se correlaciona con procesos de evasión del sistema inmune del hospedador. El hierro induce la expresión de determinadas cisteín-proteinasas implicadas en la degradación del componente C3b del complemento (84) o la fosforilación de la proteína inmunógena de superficie P270 (85).

Aunque en condiciones de bajo hierro la capacidad de adhesión se encuentra mermada debido a la disminución en la expresión de las adhesinas (AP), el parásito va a inducir otras proteínas que permiten la colonización. En

este ambiente, el parásito aumenta hasta tres veces su unión a mucina y posteriormente va a causar la degradación proteolítica de la mucosa a través de la secreción de CP con actividad mucinasa (86). En otras palabras, en condiciones de hierro bajo, el parásito estimula su actividad citotóxica mediada por algunas CP (CP30 o CP65) (79, 87), lo que va a permitir una mayor motilidad y con ello una penetración mejor a capas más profundas del epitelio, logrando de esta forma colonizar y sobrevivir en el ambiente vaginal.

Debido a que no existe hierro libre en el tracto genitourinario, *T. vaginalis* lo adquiere mayoritariamente a través de la lactoferrina presente en las secreciones cervicales, a través de receptores específicos, que se incrementan en número y afinidad mediante procesos de retroalimentación negativos. La concentración de lactoferrina es elevada en la mucosa vaginal tras la fase post-menstrual (88). Como fuentes alternativas de hierro, el parásito es capaz de tomar Fe^{2+} a partir del grupo hemo y la hemoglobina por medio de la hemólisis y la fagocitosis de los glóbulos rojos. Durante el periodo menstrual los eritrocitos están presentes en el medio vaginal, periodo que coincide con una disminución de los niveles de lactoferrina (89). *T. vaginalis* también es capaz de internalizar ferritina aunque no es capaz de emplear la transferrina (81).

5.1.4. Presencia de zinc: este elemento presente en el fluido prostático del hombre, dificulta el crecimiento del parásito. Los niveles normales de Zn^{2+} en el fluido prostático de un individuo sano son de $590 \pm 45 \mu\text{g/mL}$ ($\sim 9 \text{ mM}$) (90). El carácter citotóxico del Zn^{2+} explica por qué esta I.T.S. cursa de forma asintomática en la mayoría de los varones (91). Por el contrario, si las secreciones prostáticas de zinc disminuyen ($< 1,6 \text{ mM}$) existe un riesgo mayor de desarrollar prostatitis crónica en caso de tricomonosis (91). Estudios moleculares y proteómicos confirman la regulación negativa de algunas CP (CP70, CP65, CP39, CP25 y CP20) por este elemento. Entre las CP caracterizadas, se encuentran dos proteasas que se han correlacionado de forma directa con el efecto citotóxico de *T. vaginalis* en células (78, 92, 93).

De igual forma, este elemento también regula positivamente la expresión de dos fimbrinas, esenciales junto con la actina en la modificación estructural que sufre el parásito durante el contacto con las células del tracto genitourinario, adquiriendo una forma ameboidea (78).

5.1.5. Niveles de poliaminas: las poliaminas son moléculas presentes en todos los organismos y que, gracias a su naturaleza catiónica, interactúan con los ácidos nucleicos. Se encuentran implicadas en procesos de proliferación celular como división celular, diferenciación, estabilización del ARN y ADN, crecimiento celular y apoptosis. Garcia *et al.* (94) observaron que la inhibición de la síntesis de putrescina en *T. vaginalis* provocaba una inhibición reversible del crecimiento normal del trofozoito. No obstante, *T. vaginalis* no tiene la capacidad de sintetizar *ex novo* algunas de estas moléculas, como la espermina, debiéndola adquirir del hospedador. El

metabolismo parasitario de estos compuestos comienza con la síntesis de putrescina a partir de ornitina. Los niveles de poliaminas en la mujer también sufren fluctuaciones en función del momento del ciclo en el que se encuentre. Sin embargo, las secreciones vaginales de mujeres infectadas presentan un nivel elevado de putrescina ($> 2 \text{ mM}$) sintetizada y secretada por el propio parásito (78) y responsable del olor característico de la leucorrea en esta infección. En los últimos años, se ha estudiado el papel que juegan las poliaminas como reguladores de determinados factores asociados al parásito. El metabolismo de estas moléculas, y concretamente el de la putrescina, está implicado en procesos de citoadherencia y citotoxicidad. Los estudios realizados por Garcia *et al.* (94) revelaron que la inhibición del metabolismo de las poliaminas ocasionaba un aumento en la capacidad de adhesión a células del epitelio vaginal inmortalizadas de entre 4 a 20 veces. En este mismo estudio observaron que en esas mismas condiciones, *T. vaginalis* inhibía la citotoxicidad mediada por contacto. Posteriormente, Álvarez-Sánchez *et al.* (95) estudiaron la influencia de la putrescina en la expresión de CP65. Este equipo, siguiendo el método de Garcia *et al.* (94), inhibió la síntesis de putrescina y confirmó una disminución de los niveles de transcripción de la proteasa y por ende, de la cantidad de proteína sintetizada implicada en la acción citotóxica del parásito. Figueroa-Angulo *et al.* (78) también han confirmado el papel regulatorio de las poliaminas en la expresión a nivel post-transcripcional de CP39. Esta proteasa, al igual que CP65, también está implicada en la citotoxicidad parasitaria.

5.2. Factores asociados al Parásito

Los factores asociados al parásito se agrupan en dos tipos:

5.2.1. Mecanismos dependientes de contacto

La pared vaginal está formada por un epitelio escamoso estratificado externo sustentado por un tejido conjuntivo. El soporte y mantenimiento de las células del epitelio vaginal (CEV) se basa en la red de macromoléculas que conforman la matriz extracelular. El parásito requiere la interacción con la superficie de la célula del hospedador, en la que tanto proteínas como azúcares van a ser esenciales para la interacción entre ambas células.

La Figura 12 muestra de forma esquemática el control de los microambientes generados en los huecos que se establecen entre las dos membranas. La representación esquemática es una modificación de la publicada por Fiori *et al.* (96) a partir de una fotografía de los estudios de citoadherencia entre una célula HeLa y un trofozoito de *T. vaginalis*. Durante este contacto se generan pequeños huecos entre ambas membranas que permiten al parásito controlar distintos factores como el pH o la concentración de iones.

Entre los factores contacto-dependientes asociados a *T. vaginalis* destacan:

a) Adhesión: el fenómeno de adhesión es uno de los procesos iniciales requeridos para el establecimiento de la infección a través de la interacción parásito-hospedador. La adhesión es un proceso multifactorial dependiente de pH, temperatura, hierro y tiempo de contacto, en el que intervienen numerosas proteínas. El parásito sufre un cambio morfológico rápido tras el contacto con la célula del epitelio vaginal, pasando de una forma elipsoidal a una ameboide, incrementando el área de adhesión. Esta transformación induce la síntesis de diversos factores entre las que destacan las adhesinas (AP). El contacto se establece entre estas proteínas parasitarias (AP120, AP65,

AP51, AP33 y AP23) y un receptor de la célula hospedadora (101).

Estas AP destacan por su diversidad funcional y el mimetismo molecular que presentan, co-localizándose en el hidrogenosoma donde desarrollan diversos papeles enzimáticos (tabla 2) o pudiéndose expresar en la superficie del parásito donde intervienen en el proceso de interacción con el hospedador. La presencia o no de determinados estímulos condiciona su localización en el parásito y con ello la función que finalmente desarrollarán estas proteínas (78).

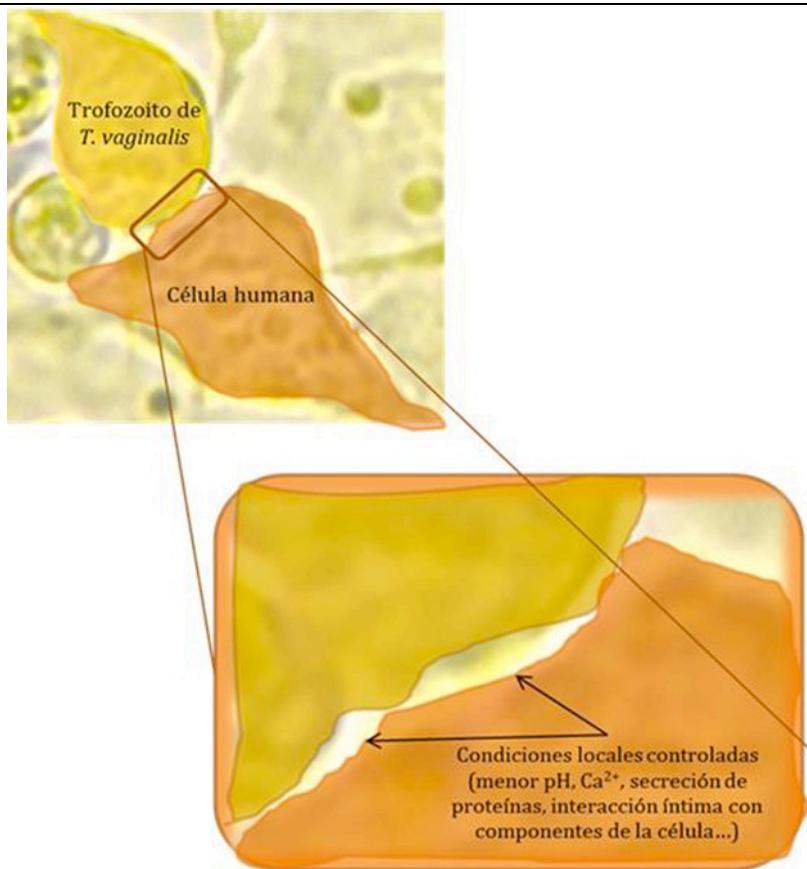


Figura 12. Esquema representativo de la interacción entre *T. vaginalis* y la célula diana del hospedador. Durante este contacto se generan pequeños huecos entre ambas membranas que permiten al parásito controlar distintos factores como el pH o la concentración de iones. Esquema modificado a partir del publicado por Fiori *et al.* (95).

Tabla 2. Actividad enzimática de cuatro de las cinco adhesinas descritas hasta el momento en *T. vaginalis*.

Proteína	Función enzimática	Referencia bibliográfica
AP120	PFOR	(97)
AP65	Enzima málica	(98)
AP51	Subunidad β de la SCS	(99)
AP33	Subunidad α de la SCS	(100)

SCS: Succinil coenzima A sintetasa; PFOR: Piruvato:ferredoxina oxidoreductasa

Algunos investigadores asocian la multifuncionalidad de estas AP, denominadas *moonlighting proteins*, al hecho de que estén codificadas por familias multigénicas (98-100). Según estos autores, a causa de un fenómeno de duplicación génica durante el proceso de divergencia evolutiva, una de las copias podría haber adquirido funciones nuevas (78). Sin embargo esta teoría requiere estudios más detallados, ya que se contradice con los resultados descritos por García *et al.* (101), quienes confirmaron que todas las adhesinas codificadas por los distintos genes podían localizarse en la superficie del protozoo. La multifuncionalidad de estas adhesinas ha suscitado el interés de distintos grupos de investigación.

Según los resultados publicados, la secuencia de sucesos sería la siguiente:

1.- En primer lugar, determinados estímulos, como el contacto celular o el hierro van a favorecer la expresión y secreción de estas AP al medio extracelular.

2.- A continuación, dichas proteínas pueden asociarse de forma no específica a distintas células epiteliales del hospedador así como a eritrocitos (102).

3.- Algunas adhesinas como la AP65, una vez secretada, se re-asocia por un lado a la superficie de *T. vaginalis* y al mismo tiempo a la célula hospedadora a través de receptores específicos en ambas membranas, actuando de puente entre ambas células gracias a una conformación dimérica por medio del dominio N-terminal de las dos moléculas de AP65 (103) (Figura 13).

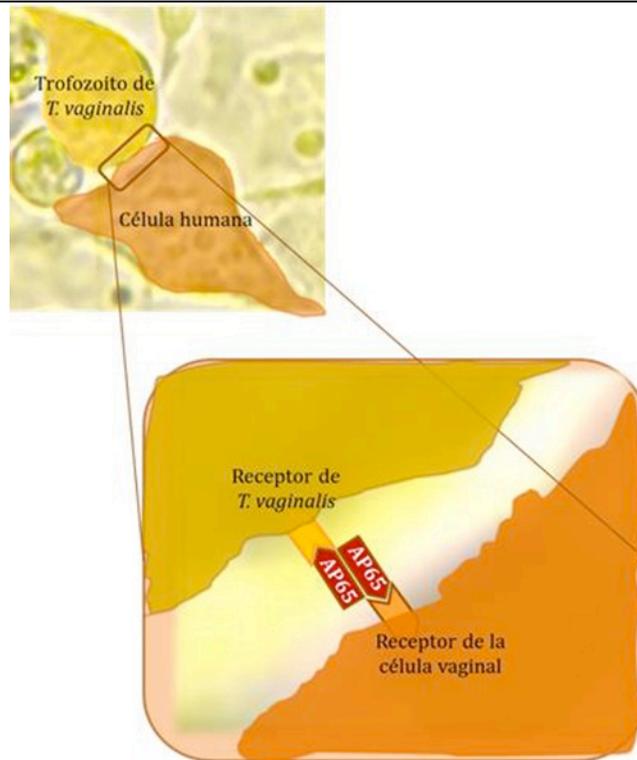


Figura 13. Representación gráfica del mecanismo de interacción entre *T. vaginalis* y la célula del hospedador. Interacción mediada a través de AP y propuesta por García y Alderete (103).

Es importante resaltar el carácter complejo del proceso de adhesión. En él intervienen otras biomoléculas, como el lipofosfoglicano (LPG), el polisacárido de superficie más abundante de *T. vaginalis*, con más de 2,3 millones de copias por célula (104). El parásito se encuentra cubierto de un glicocálix denso cuyo LPG se ancla a la membrana plasmática a través de uniones inositolfosfoceramida y no

a través de puentes glucosilfosfatidilinositol (GPI) como cabría esperar de un eucariota. Este LPG revela una composición glicolipídica altamente específica y rica en galactosa, glucosamina y ramnosa, más parecida a la de los procariotas (105, 106), y sin manosa, monosacárido abundante en el LPG de eucariotas (106) (Figura 14).

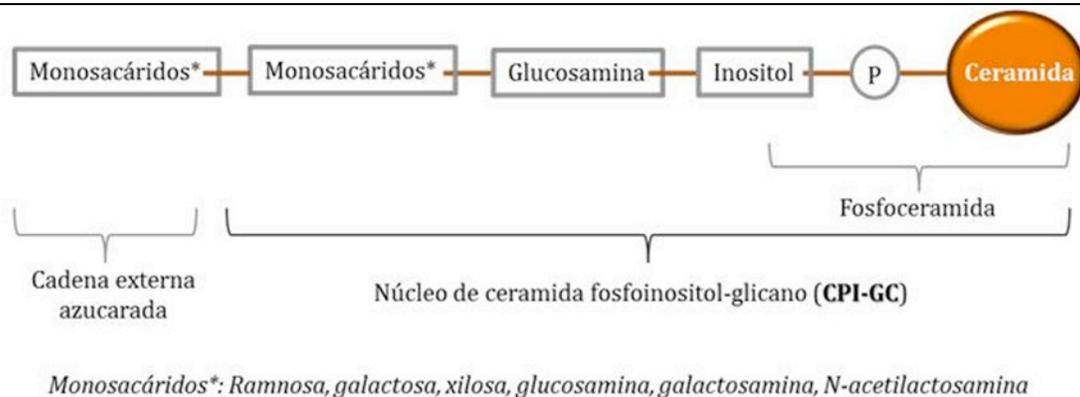


Figura 14. Esquema de la estructura del LPG de *T. vaginalis* (106).

Entre las funciones del LPG, destaca el papel clave en la interacción con las células del hospedador a través de lectinas (86, 106), como las galectinas, localizadas en la superficie de células epiteliales vaginales, ectocervicales y endocervicales (107). Asimismo, se ha confirmado que el LPG de *T. vaginalis* también interviene en el desarrollo de la respuesta inmunitaria mediada por células epiteliales a través de la inducción de algunas citoquinas (IL-6) y quimiocinas como MIP-3 α y especialmente IL-8 (104,106).

Del mismo modo, el parásito es capaz de reconocer y unirse de forma específica a otros componentes de la matriz extracelular y de la membrana basal del hospedador como la mucina, la fibronectina (Fn), la laminina o el colágeno de la mucosa vaginal (83, 86). La asociación a la mucina se encuentra mediada por lectinas (86), mientras que la unión a las otras dos glicoproteínas requiere la interacción con proteínas receptoras y carbohidratos presentes en la superficie del parásito (83). Estos procesos también están regulados por la concentración de Fe, incrementándose la unión a Fn y mucina en condiciones de niveles bajos de Fe (77, 86). El calcio también parece estar implicado en la inducción de la expresión de receptores para Fn (77). Además de todas estas proteínas, hay que tener en cuenta algunas enzimas que son secretadas por *T. vaginalis* y que intervienen en el proceso de adhesión. Recientemente, se ha descrito la importancia de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) que al igual que las AP puede adquirir una función no enzimática y localizarse en la superficie del parásito, actuando como receptor de Fn, plasminógeno y colágeno (108).

Existe otra familia multigénica que codifica para numerosas proteínas de tipo BspA, conocidas por el papel como mediadoras de la unión entre células del hospedador y bacterias. Se piensa que *T. vaginalis* podría haber adquirido estos genes a partir de procariotas mediante una transferencia genética lateral. Noël *et al.* (109) estudiaron el papel de estas proteínas como mediadoras en la interacción con el mucus, la matriz extracelular y células del hospedador. También parecen jugar un papel importante en la endocitosis de virus y en la evasión a la respuesta inmunitaria del hospedador.

b) Fagocitosis: este proceso se encuentra estrechamente relacionado con la obtención de nutrientes y con la evasión del sistema inmune. Estudios de microscopía han mostrado la secuencia de acontecimientos en el proceso de fagocitosis de *T. vaginalis*: (a) Adhesión parásito-célula diana (110, 111). Algunos autores sugieren la posible implicación de los receptores de manosa presentes en la superficie del parásito como responsables de este primer evento (111). (b) Fagocitosis de la célula diana gracias a una reorganización citoplasmática de la actina que permite al parásito fagocitar a través de cualquier parte de su cuerpo celular (110). Este proceso puede producirse mediante dos mecanismos distintos: a través de la generación de pseudópodos que rodean e internalizan a la célula diana o bien mediante procesos de succión causando la elongación de la membrana plasmática de la célula diana y su posterior internalización a través de un canal endocítico estrecho (110-112). (c) Digestión de la célula fagocitada en el interior de vacuolas a través de enzimas lisosomales (111, 112).

Mediante microscopía electrónica se ha podido confirmar la capacidad de *T. vaginalis* para fagocitar células del epitelio, lactobacilos, leucocitos, eritrocitos y levaduras. La ingestión de levaduras y bacterias ocasiona un aumento del pH vaginal generando un microambiente favorable para el crecimiento y multiplicación de este parásito y, al mismo tiempo, una disminución de la flora endógena, que actúa como mecanismo de protección de la mujer frente a la colonización de patógenos. Este mecanismo de evasión del sistema inmune también se ve favorecido por la fagocitosis de los leucocitos (112). La actividad β -hemolítica de *T. vaginalis*, publicada en los años 80 por Krieger *et al.* (113), está descrita como un factor de virulencia del parásito. Al mismo tiempo, los eritrocitos son fuente de ácidos grasos y hierro para el parásito (114), permitiendo la regulación de numerosos genes (88) y factores ligados a la patogenia. Estudios posteriores también han identificado la presencia de fosfolipasas A1 y A2 con actividad lítica, que contribuyen al desarrollo del proceso inflamatorio (115) y a la actividad hemolítica (116).

Por otro lado y desde un punto de vista evolutivo, la fagocitosis de bacterias de la microbiota podría explicar la

adquisición de genes bacterianos a través de una transferencia lateral (*Lateral Gene Transfer* o LGT). Esto justificaría la presencia de enzimas en este parásito con funciones esenciales en la colonización de la mucosa que presentan origen bacteriano (117); como las familia de las BspA (109), entre otras.

5.2.2. Mecanismos independientes de contacto

El parásito puede secretar sustancias tóxicas que van a intervenir en numerosos procesos vitales.

a) Cisteín-proteasas (CP): son factores líticos esenciales en los procesos de adherencia y colonización del tracto genitourinario, aunque también intervienen en otros procesos relacionados con la evasión inmunitaria o la adquisición de nutrientes. Se han descrito hasta la fecha 23 CP con tamaños entre 23 y 110 kDa, cuya expresión y funcionalidad varía según las características de los aislados (78, 118) y la presencia de algunos factores en el medio (Tabla 3).

Tabla 3. Función y regulación de las CP descritas.

CP	Función	Regulación por Fe	Regulación por otros factores
CP (30 kDa)	Desorganización del citoesqueleto	ND	
TvCP4	Hemólisis	+	
TvCP12	Citotoxicidad	-	
TvCP30	Citoadherencia y degradación de proteínas	-	
TvCP39	Citotoxicidad. Degradación de proteínas de la matriz extracelular, Hb e Ig	-	Zn (-) y poliaminas (+)
TvCP62	Citoadherencia	+	
TvCP65	Citotoxicidad. Degrada colágeno y Fn	-	Zn (-) y poliaminas (+)
CP2, CP3, CP4 y CPT	Inducción de la apoptosis de células del hospedador	-	
TvLEGU-1	Citoadherencia	+	
TvLEGU-2	Transportador de precursores de proteínas en retículo endoplásmico	No lo regula	

Las funciones en las que participan estas CP son:

a.1) La degradación de componentes de la mucosa y células del tracto genitourinario, que permiten la penetración del parásito a capas más profundas. Está ampliamente aceptada la relación entre la secreción de estas proteasas parasitarias y los mecanismos de adherencia y colonización del tracto genitourinario. Algunos estudios han revelado la importancia de la función mucinasa de las CP en las primeras fases de colonización de la mucosa vaginal (86). Otros trabajos también han mostrado su implicación en la degradación de componentes estructurales de la superficie de mucosas como la Fn o el colágeno (85, 92, 119, 120). Hernández-Gutiérrez *et al.* estudiaron el papel de la CP39 (92). Esta CP presenta funciones diversas entre las que destaca su capacidad para degradar distintos tipos de colágeno, pudiendo ser una de las moléculas implicadas en los nacimientos prematuros en mujeres embarazadas infectadas o intervenir en el estrechamiento observado previo al parto de la pared cervical.

a.2) La citotoxicidad celular: la CP65 o la CP30 se encuentran estrechamente relacionadas con estos procesos de citotoxicidad celular (119).

a.3) La inducción de la apoptosis en CEV por la acción conjunta de varias proteasas (CP2, CP3, CP4 y CPTotal) (121).

a.4) La mediación en la citoadherencia a las células del hospedador: Arroyo y Alderete demostraron que las CP juegan un papel esencial en la adhesión a las células del hospedador y no únicamente en fenómenos de citotoxicidad (122). Estas CP podrían mediar en la activación de precursores inactivos de AP presentes en la superficie, que pasarían a conformaciones activas tras la digestión específica, o bien podrían intervenir en la modificación de los receptores de las células diana. En un primer momento, estas AP van a encontrarse enmascaradas en la superficie parasitaria por proteínas específicas. Las CP eliminan de forma específica proteínas inmunogénicas de enmascaramiento, permitiendo a las AP realizar su función en el reconocimiento y unión al hospedador (122). Las CPs que cumplen esta función serían CP30 y CP62 (120).

a.5) La evasión de la respuesta inmunitaria a través de la degradación de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas IgA, IgM e IgG humanas identificadas en los lavados vaginales de mujeres infectadas (123), así como por medio de la lisis del factor C3b (84) o del inhibidor de proteasas secretado por los leucocitos (124).

a.6) Otras funciones son los procesos relacionados con la adquisición de nutrientes, como la degradación de la hemoglobina para la adquisición de hierro (120). Algunas CP como la CP39 se unen a receptores específicos de eritrocitos y células humanas vaginales y prostáticas corroborando el papel de estas CP en la obtención de

nutrientes en ambos microambientes (92).

b) Factor de desprendimiento celular (*cell-detaching factor*, CDF): es una glicoproteína de unos 200 kDa secretada por el parásito, que se inactiva a un pH inferior a 5 o por efecto de la temperatura (125). La producción de este factor se ve regulada por la presencia de estrógenos (75), pudiendo estar implicada en la exacerbación de los síntomas durante la menstruación por la disminución de los niveles de estas hormonas. Esta proteína inmunogénica soluble tiene como función producir un desprendimiento del epitelio genitourinario (125, 126), favoreciendo la penetración del parásito a capas más profundas. Se ha descrito una correlación entre el desarrollo de síntomas graves y la mayor actividad de la CDF en comparación con aislados procedentes de pacientes asintomáticas o con una presentación clínica leve (75).

c) Presencia de virus de doble cadena: se han descrito tres tipos de virus de ARN de doble cadena (ARNdc) denominados de forma genérica como virus de *T. vaginalis* (TVV) (127), clasificados dentro de la familia Totiviridae, a la que pertenecen virus ARNdc no fragmentados capaces de infectar protozoos parásitos y hongos (128, 129). Las distintas poblaciones víricas pueden presentar tamaños (33 a 200 nm) y formas variables (icosaédrico, filamentoso, cilíndrico o esférico), identificándose en la membrana plasmática, asociados al complejo de Golgi, en el interior de vacuolas y citoplasma y, en menor proporción, en el núcleo de *T. vaginalis* (130, 131). Este parásito puede estar infectado por más de una especie de TVV, sin embargo las implicaciones que puedan derivarse de esta coinfección no se han dilucidado (127, 129). Los virus TVV penetran por endocitosis (131). Son capaces de regular la transcripción de genes de *T. vaginalis* y variar la expresión de determinados antígenos de superficie, como la proteína P270, así como otras proteínas entre las que destacan algunas CP. En este sentido, los estudios parecen indicar que la presencia de TVV influye en la patogenia del parásito (123, 127-129, 132-134). En virtud de la expresión en la superficie de la proteína inmunogénica P270, se han clasificado los aislados de *T. vaginalis* en dos grupos: *T. vaginalis* tipo I y tipo II. Los aislados tipo I sintetizan P270 de forma basal, no pudiéndose localizar en la superficie del parásito. Estos aislados no se encuentran infectados por TVV, siendo por tanto, V⁻ (virus negativo), mientras que los aislados de *T. vaginalis* Tipo II son poblaciones heterogéneas en las que algunos trofozoítos expresan en su superficie P270, siendo V⁺ (infectados por TVV) (133, 135). A pesar de lo que se podría esperar, estos virus no se detectan en los sobrenadantes de cultivos infectados. De igual forma, los intentos de infectar aislados TVV⁻ con partículas virales no han tenido éxito (133). Con el fin de investigar el papel de los TVV en la virulencia del parásito, algunos grupos han tratado de correlacionar aislados Tipo II con el desarrollo de una clínica concreta (136), o el desarrollo de resistencia a los 5-NI (132). Sin embargo, se requieren más estudios que confirmen los resultados aportados.

En función de estos hallazgos, algunos autores han

descrito el papel potencial de este parásito como transmisor de virus humanos. Pindak *et al.* en 1989 (137) y Sayed el-Ahl *et al.* (138) una década más tarde corroboraron la capacidad de *T. vaginalis* para fagocitar células infectadas por reovirus y por herpes simplex tipo II, confirmando la presencia de partículas víricas en el interior de las vacuolas y en el citoplasma del parásito. Los virus pudieron ser recuperados tras varios días en el interior del protozoo. El herpes simplex tipo II se mantuvo viable en el interior de los tricomonádidos hasta seis días. Ante este posible papel como transmisor de virus, se investigó *in vitro* si partículas víricas o bien linfocitos infectados por distintos subtipos de VIH-1 podrían ser incorporados y transmitidos por *T. vaginalis* (139). Los resultados de este equipo confirmaron que el parásito incorpora partículas víricas capaces de mantenerse en el citoplasma durante 48 horas, pero no se han detectado evidencias de replicación o liberación del virus como puede ocurrir con TVV. En cuanto a las células infectadas por VIH, el protozoo tiene la capacidad de fagocitar linfocitos. No obstante, la digestión por acción del fagolisosoma de dicha célula y del virus parece llevarse a cabo antes de que el propio virus pueda evadir la acción lítica de las enzimas, a diferencias del virus del herpes que sí es capaz de escapar de la degradación digestiva. Ningún estudio ha demostrado que estos virus humanos tengan capacidad replicativa en el interior del trofozoíto, aunque su supervivencia durante un cierto periodo sí que podría conllevar graves consecuencias en aquellos casos en los que exista co-infección por ambos patógenos, convirtiéndose el parásito en un transportador pasivo.

d) Presencia de *Mycoplasma hominis*: *T. vaginalis* es un parásito que puede encontrarse asociado con *Mycoplasma hominis*. Esta bacteria, al igual que el protozoo, reside únicamente en el tracto genitourinario humano, y se caracteriza por una dependencia metabólica alta del hospedador que parasita a causa de su pequeño tamaño génico (0,7-0,83 Mb) (140). Esta curiosa asociación es estrictamente especie-específica, no habiéndose descrito otras simbiosis similares con otras bacterias. Los estudios de Rappelli *et al.* (141) detectaron una coinfección en el 90% de los aislados estudiados. Los resultados revelaron que *M. hominis* presente en los aislados de *T. vaginalis* eran capaces de transmitirse a células de cérvix humano, así como a otros aislados no infectados. Otros trabajos han confirmado la capacidad de esta bacteria para sintetizar ADN y replicarse en el interior del parásito. Esta simbiosis permitiría a la bacteria protegerse de la respuesta inmune del hospedador y de la presión antibiótica. Sin embargo, los beneficios, así como los cambios fisiológicos y nutricionales que podrían derivarse de esta asociación parásito-bacteria, aún no están del todo claros (142). Algunos investigadores han sugerido un posible efecto beneficioso en cuanto a la patogenia y la resistencia a fármacos (140, 143). En este sentido, los estudios genómicos han llegado a correlacionar dichos patrones con la resistencia al MTZ. Sin embargo, si se analizan los resultados de este grupo, tan sólo el 50% de

las muestras *Mycoplasma*+ mostraron resistencia reducida (concentración mínima letal por encima de 13 µg/mL) o moderada (CML > 50 µg/mL) (140). El trabajo publicado por Morada *et al.* (144) sugiere que las poblaciones de trofozoítos coinfectados consumen una mayor cantidad de arginina que los cultivos de *T. vaginalis* axénicos. La depleción de arginina en la vagina podría contribuir a una producción menor de óxido nítrico y por tanto una disminución de la eficacia de la *explosión respiratoria* de los macrófagos y con ello una alteración en la respuesta inmune del hospedador. Sin embargo, la variabilidad entre aislados de *T. vaginalis*, los cuales no resultan ser en todos los casos igual de susceptibles a una infección bacteriana, así como una heterogeneidad en el propio aislado al no encontrarse todos los trofozoítos infectados (141) y la posible co-infección por más de una cepa bacteriana, dificulta en gran medida la interpretación de resultados debido a la variabilidad que se obtiene en los patrones de ADN (140, 143), asemejándose a lo observado en las infecciones por TVV (26, 135).

5.3. Respuesta Inmunitaria

Aunque se ha ido comentando a lo largo de este punto, es importante mencionar la evasión del parásito a la respuesta inmunitaria del hospedador:

T. vaginalis ha desarrollado numerosos mecanismos implicados en la supervivencia y colonización del tracto genitourinario, y en la evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador. El tracto genital femenino está protegido por una microflora bacteriana, responsable de su pH ácido, que junto con otros mecanismos del sistema inmunitario, protegen de la invasión de patógenos. Los mecanismos más relevantes son: a) las enzimas, b) la secreción del inhibidor de la proteasa de leucocitos producido por CEV, c) las IgG e IgA (145) o d) las proteínas surfactantes (146).

A continuación se recogen los factores que se han citado a lo largo de esta revisión y que intervienen en la supervivencia de *T. vaginalis* a la respuesta inmunitaria del hospedador:

5.3.1. La fagocitosis de lactobacilos de la microflora vaginal, levaduras o incluso células del sistema inmunitario (112).

5.3.2. La inducción de la apoptosis de neutrófilos por medio de la activación de la vía de las caspasas (147).

5.3.3. La capacidad de enmascaramiento del parásito con componentes localizados en la matriz extracelular vaginal como la Fn (77) o de proteínas séricas del hospedador (148), que le permiten la evasión del sistema inmunitario y de la acción degradativa de determinadas sustancias proteolíticas del fluido vaginal o plasmático (149).

5.3.4. La degradación de Ig por parte de cisteín-proteinasas de *T. vaginalis* (145).

5.3.5. La evasión al sistema del complemento a través de la lisis de la C3b (84). En relación con la protección frente a la acción del complejo de ataque a la membrana (CAM), es importante mencionar que este parásito secreta al medio externo enzimas capaces de lisar ácido siálico

como la neuraminidasa (150) o Neu5Ac liasa (151). El ácido siálico protege a las células autólogas de la acción lítica del complemento, impidiendo la unión de C3b en la superficie de las mismas. Algunos investigadores sugieren que el ácido siálico podría ser una fuente de nutrientes para el parásito, lo que explica la secreción de estas enzimas y la presencia en la superficie parasitaria de sitios de unión al ácido siálico (151, 152). Sin embargo, no se ha estudiado el posible papel de estas enzimas en la captación de ácido siálico del hospedador con el fin de emplearlo como factor de evasión del complemento. Asimismo, recientes estudios parecen mostrar que el parásito es capaz de secuestrar CD59 de la superficie del hospedador que parasita para incorporarlo en su superficie y de esta manera protegerse de la acción del complemento evitando la formación del CAM (153).

6. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

T. vaginalis fue considerado como comensal, desde su descubrimiento hasta que Hühne, en 1916, aisló el parásito en el flujo de una mujer que padecía colpitis aguda. Los efectos patológicos asociados con la infección son el resultado de una compleja interacción entre el parásito y el hospedador.

La tricomonosis se manifiesta como una enfermedad del tracto urogenital humano de transmisión venérea, que si bien no es grave, produce un cuadro clínico muy variado (114). Los signos y síntomas de la tricomonosis son inespecíficos, por lo que se requiere la toma de muestras y su examen en el laboratorio para el diagnóstico.

En las mujeres, la muestra vaginal se toma con hisopo estéril, recomendándose la observación inmediata al microscopio. Si es necesario se procede a la siembra en medio de cultivo. El diagnóstico en muestras de orina presenta una sensibilidad menor, independientemente de la técnica empleada (154, 155). Lawing *et al.* (154) demostraron que no todas las mujeres diagnosticadas mediante muestras vaginales de tricomonosis presentaban trofozoítos en las muestras de orina, corroborándose el diagnóstico en un 75% de los casos. En el hombre, las muestras que se emplean para el diagnóstico son uretrales o de orina fundamentalmente, aunque también se han descrito estudios con muestras de semen (156).

En la tabla 4 se esquematizan los métodos de diagnóstico más relevantes. La técnica más utilizada en clínicas y hospitales es el examen directo al microscopio de la muestra (157). El parásito se identifica por su morfología y movimiento característico. Sin embargo la sensibilidad de esta técnica no es muy elevada.

El cultivo de la muestra en medio líquido o semisólido es la técnica de referencia o *gold standard*. Existen diversos medios para el cultivo de *T. vaginalis*, como el medio Kupferberg, Kupferberg STS, Hirsch, Trichosel, Diamond modificado, suero Lash, o el más reciente, denominado InPouch TV (158). Sin embargo, el más utilizado es el Diamond (TYM) o Diamond modificado (159). Este diagnóstico requiere de 2 a 7 días de observación diaria. Es una técnica económica y sencilla,

pero requiere un tiempo de espera y la necesidad de que los organismos se encuentren vivos (**tabla 4**). Ya se han comercializado dispositivos que contienen un medio de cultivo similar al Diamond y que permiten introducir la muestra del paciente para su incubación. El sistema InPouch TV permite emplear no sólo muestras vaginales y uretrales sino también de orina. Una de las grandes ventajas de estos sistemas es que permiten la observación directa de la muestra al microscopio en el propio dispositivo y su transporte y no requiere refrigeración para su conservación (160).

En los últimos años se han descrito métodos de diagnóstico molecular, basados en la amplificación de ácidos nucleicos (NAATs) mediante PCR para aumentar la sensibilidad del diagnóstico respecto al cultivo. Algunos proceden de adaptaciones de técnicas aprobadas por la agencia *Food and Drug Administration* (FDA) para el diagnóstico de clamidiasis y gonorrea (Amplicor® *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* assay-Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN). Esta técnica permite la detección de ADN de *T. vaginalis* a partir de muestras vaginales, endocervicales y de orina con rangos de sensibilidad superiores al 90% (161). Otra técnica molecular aprobada en 2011 por la FDA es la APTIMA TV (Gen-Probe) vinculada a la detección del ARN ribosomal 18S de *T. vaginalis*. Este método comercial emplea muestras endocervicales, vaginales o de orina de pacientes tanto asintomáticas como sintomáticas, y cuenta con el distintivo CE para su uso en la UE (159). Aunque puede emplearse con muestras uretrales y de orina, la FDA no ha aprobado esta técnica para el diagnóstico en varones (162).

Existen escasos datos sobre las manifestaciones clínicas de la tricomonosis en el varón, que ha sido considerado como un simple portador asintomático del parásito, debido en parte a métodos de diagnóstico poco apropiados, siendo responsable de casos de uretritis no gonocócicas. Las consecuencias de la infección en el hombre pueden variar, desde prurito en el pene en los casos crónicos, hasta la descarga uretral purulenta e inflamación del meato externo (uretritis y prostatitis) en procesos agudos, actuando la glándula prostática como reservorio de los tricomádidos (114). En algunos casos se ha descrito irritación, dolor uretral, dolor abdominal, disuria, epididimitis y casos de infertilidad transitoria. La influencia sobre la fertilidad se debe al probable efecto citotóxico de las sustancias secretadas por *T. vaginalis* sobre los espermatozoides (163) así como su capacidad para fagocitarlos (78, 163).

Por consiguiente, la técnica más efectiva para el diagnóstico de la tricomonosis en el varón es la PCR. La amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR permite detectar hasta un tricomonádido (164). Este límite es significativamente inferior al de detección del cultivo (300 trofozoitos/mL) (157) o la observación al microscopio (10.000 parásitos/mL) (160). El inconveniente principal del diagnóstico mediante PCR es el riesgo de inhibidores en la muestra que podrían invalidar el resultado (154, 156).

Asimismo cabe destacar el desarrollo de métodos de diagnóstico basados en la hibridación de ácidos nucleicos. BD Affirm™ VPIII (Becton-Dickinson) está diseñado para el diagnóstico de *T. vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* y *Candida albicans*.

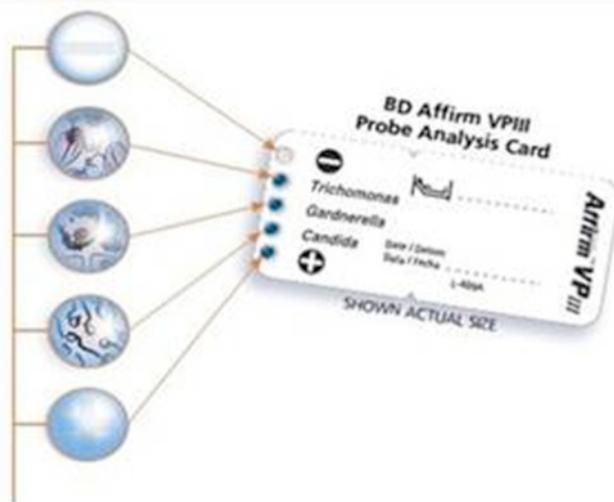


Figura 15. Test de hibridación de ADN BD Affirm™ VP III. Las imágenes han sido tomadas de www.moleculardiagnosis.bd.com.

Este test incorpora sondas de captura que se encuentran integradas en una tarjeta para la lectura automatizada de la misma. Su ventaja principal es que permite diagnosticar tres de las patologías ginecológicas más frecuentes en la mujer mediante una reacción de hibridación en un pequeño dispositivo que cambia de color (azul) cuando la muestra es positiva, permitiendo detectar co-infecciones en menos de 1 hora (Figura 15) (Tutorial BD Affirm™ VP III

Microbial Identification System).

Posee una sensibilidad superior a la observación en fresco y en menor tiempo (165, 166), aunque se han descrito casos de falsos positivos, no resultando eficaz en muestras uretrales. Este test se encuentra aprobado por la FDA y la Unión Europea (marca CE) (159).

En la última década, la FDA ha aprobado dos técnicas

diagnósticas nuevas definidas como *point-of-care diagnostics* en muestras vaginales (167). Ambas técnicas han demostrado ser más sensibles que el diagnóstico en fresco, aunque pueden producirse falsos positivos en poblaciones con una baja prevalencia de esta I.T.S. El método OSOM[®] *Trichomonas Rapid Test* (Genzyme Diagnostics, Cambridge, Massachusetts), anteriormente comercializado con el nombre de XenoStrip *T. vaginalis* test (Xenotope Diagnostics) se fundamenta en la detección cualitativa antigénica del parásito mediante inmunocromatografía capilar. El fundamento del método OSOM[®] es similar a los test de embarazo, obteniéndose el resultado en unos 10 minutos. Está indicado para la

detección de antígenos de muestras vaginales y emplea dos anticuerpos monoclonales murinos, uno de los cuales se encuentra inmovilizado en la superficie de la tira reactiva de nitrocelulosa y conjugado a las partículas rojas. En caso de que la muestra sea positiva, generará un complejo con los antígenos específicos de la muestra. El anticuerpo de captura secundario anti-ratón se une al complejo antigénico, apareciendo la línea azul indicativa de que la muestra es positiva (165, 168). Todas las tiras contienen un control interno de color rojo que debe aparecer en todos los casos para validar la prueba. En caso de que la muestra sea positiva y existan antígenos de *T. vaginalis*, aparecerá una línea azul (Figura 16).

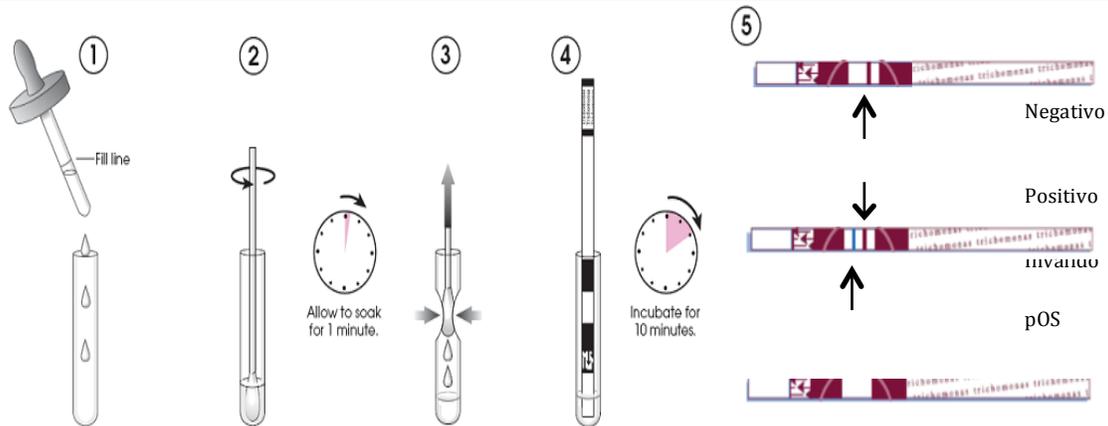


Figura 16. Procedimiento para el diagnóstico de *T. vaginalis* mediante el test rápido OSOM[®] *Trichomonas Rapid Test* (Genzyme Diagnostics). Imagen tomada del Testing Handbook provisto con el test.

Recientemente se ha comercializado un test de aglutinación en látex en el Reino Unido para el diagnóstico rápido de la tricomonosis en muestras vaginales denominado *Tv latex agglutination test* (Kalon Biological, Surrey, UK). Emplea partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos (IgG) anti-*T. vaginalis* de conejo. En caso de que la muestra sea positiva, se produce la aglutinación de las mismas con los antígenos parasitarios. El resultado de la prueba se obtiene en tres minutos. Las principales ventajas de este método son la rapidez, sencillez y economía, ya que no requiere ningún tipo de instrumentación. Sin embargo, el laboratorio recomienda que los reactivos del *kit* se almacenen entre 4 y 8 °C, dificultando su posible uso como método de diagnóstico de campo. Esta técnica no está aprobada aún, ni en EEUU ni en la UE (159) y se fundamenta en el trabajo publicado a finales de la década de los ochenta por Carney *et al.* (169).

Las últimas investigaciones en este campo se encaminan a la búsqueda de nuevas técnicas de diagnóstico rápido que puedan ser empleadas con muestras de ambos sexos. Alderete y Neace han identificado anticuerpos en el suero de pacientes infectados frente a proteínas de *T. vaginalis* altamente inmunogénicas [α -actinina (ACT), aldolasa (ALD), α -enolasa (ENO) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAP)]. Sus últimos estudios se han centrado en la generación de una proteína recombinante compuesta por la combinación de epítomos de ALD, ENO y GAP previamente seleccionados en función de su reactividad con sueros de pacientes de ambos sexos (170). Los resultados, hasta el momento, son satisfactorios; no obstante, el equipo continúa buscando nuevos antígenos con el fin de desarrollar y comercializar un sistema rápido de diagnóstico en muestras séricas.

Tabla 4. Porcentajes de sensibilidad (Sens.) y especificidad (Esp.) de las distintas técnicas diagnósticas descritas para identificar *T. vaginalis*.

Diagnóstico	Test	Muestra	Cebadores	Sens. (%)	Esp. (%)	Ref.	Ventajas	Limitaciones	
Observación al microscopio	Muestra en fresco	MV / O(M)		58,5	100	(154)	Fácil, rápido (resultado en el mismo día de la toma), sencillo y de bajo coste.	Requiere un microscopio y un especialista. La sensibilidad y especificidad dependen de las aptitudes del microscopista. No aplicable en muestras de varón.	
		MV		71,4	100	(171)			
		MV		61,5	100	(161)			
		MV		71,7		(166)			
		MV		66,7	100	(157)			
		MV		48,2	100	(168)			
		MV		55,0	100	(160)			
		MV		64,9	100	(172)			
		MV		64,4		(171)			
		MV		68,5		(160)			
MV		73,8	100	(169)					
Tinción	Giemsa Naranja de Acridina Papanicolaou	MV		71,4	99,4	(157)	Rápido y de bajo coste. Papanicolaou útil en citologías.	Requiere tiempo, microscopio. Método subjetivo.	
				52,0		(173)			
		MV		94,3	100	(154)			
Cultivo	Medio Diamond	O(M)		60,4	100	(154)	Mejora la sensibilidad con respecto a la observación en fresco.	Requiere equipación y un especialista. Periodo de incubación largo. Riesgo de falsos negativos.	
		O(H)		56,0	100	(160)			
		MV		95,8		(171)			
		MV		76,2	100	(169)			
		MV		89,2	100	(172)			
	MU//O(H)		48,0	100	(171)				
	MV		90,0		(171)				
InPouch™		92,0	98,0	(172)	Menor manipulación, sencillo y de fácil transporte	Más caro que el cultivo.			
Prueba de hibridación de ácidos nucleicos	Affirm VP III	MV		92,0	99,7	(174)	Resultados en 45 min. Detección de coinfecciones con <i>Gardnerella</i> y <i>Candida</i> .	Complejidad moderada. Requiere un especialista e instrumental. No aplicable en asintomáticos, ni muestras de varón.	
		MV		63,4	99,9				
		MV		98,7	94,6	(172)			
		ME		98,7	97,3				
NAAT (Test de amplificación de ácidos nucleicos)	APTIMA TV	O(M)		98,7	98,2	(172)	Alta sensibilidad y especificidad.	Caro, requiere equipo cualificado e instrumental de laboratorio.	
		MU		96,0	90,5				
		O(H)		96,0	96,3				
		MV		97,9	95,3				
		MV		98,0	95,6				
		O(H)		90,1	98,9				
		MV		100	100				
		MV	TV3 y TV7	88,7	97,1				(154)
		O(M)		64,2	100				(160)
		MV	TVA	48,7	100				
	MV	TVK	79,5	97,8					
	O(H)	TVK	96,0	99,2					
	O(H)	β-tubulina	92,0	99,4					
	MV	BTUB9 y 2	80,9	97,2	(157)				
	MV	TVK3 y TVK7	100	99,2	(176)				
	PCR casera	MV	β-tubulina	98,7	100	(172)	Detectan <i>T. vaginalis</i> a concentraciones menores que en cultivo. Altamente sensible y específico. Se puede emplear con muestras de varón.	Riesgo de presencia de agentes inhibidores de PCR en las muestras. Caro. Requiere equipo cualificado e instrumental de laboratorio.	
		ME	β-tubulina	96,0	100				
O(M)		β-tubulina	90,6	100					
MU		β-tubulina	92,0	100					
O(H)		β-tubulina	80,0	100					
MU		TVK3 y TVK7	82,0	95,0	(177)				
MV			98,0	99,4	(166)				
Test rápidos	Tv latex agglutination test	MV		83,3	98,8	(171)	Sensible. Resultados en 10 minutos.		
				66,6	100	(176)			
	OSOM rapid antigen test/Xeno-Strip	MV		76,7	99,1	(178)			
		MV		79-90		(171)			
		MV		89,6	97,5				

MV, Muestra vaginal; ME, Muestra endocervical; O(M), Orina de mujer; MU, Muestra uretral; O(H) Orina de varón

7. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

7.1. 5-Nitroimidazoles

El metronidazol [1-(2-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol; Figura 17] (MTZ) es el fármaco de referencia empleado para el tratamiento de la tricomonosis. La alternativa farmacológica es el tinidazol [1-[2-(etilsulfonil)etil]-2-metil-5-nitroimidazol; Figura 18] (TDZ). Estos dos 5-nitroimidazoles (5-NI) son los únicos medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento de la tricomonosis.

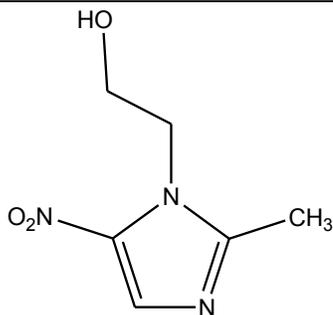


Figura 17. Estructura química del metronidazol.

El MTZ fue descubierto por Cosar y Jolou en 1959, a partir de la azomicina, un antibiótico obtenido a partir de *Streptomyces* y descrito por Nakamura a mediados de los años 50, con estructura de 2-nitroimidazol (179, 180). En tan solo un año se autorizó su uso en el tratamiento clínico de la tricomonosis humana en Europa y cuatro años después en EEUU (181). Este fármaco es activo frente a otros protozoos como *Giardia duodenalis* y *Entamoeba histolytica* y su espectro de actividad incluye bacterias anaerobias Gram positivas y negativas de los géneros *Bacteroides*, *Fusobacterium* y *Clostridium* entre otros (181). Es uno de los 100 fármacos más prescritos en EEUU (182), y pertenece a la lista de fármacos esenciales definidos por la OMS (183).

El régimen posológico recomendado es una única dosis de 2 g de MTZ por vía oral. No obstante, la guía de tratamiento de I.T.S. editada por la OMS recomienda el uso de MTZ durante 5 días en infecciones uretrales y neonatales (tabla 5). En caso de fallo en el tratamiento, los clínicos habitualmente recomiendan repetir el mismo esquema. Si no se logra la eliminación del parásito, algunos médicos prescriben TDZ o bien alargan la duración del tratamiento (167).

Tabla 5. Régimen posológico recomendado por la OMS (184).

Tratamiento	Fármaco	Dosis	Duración
Infecciones vaginales	Metronidazol	2 g	Dosis única
	Tinidazol	2 g	Dosis única
Alternativa en infecciones vaginales	Metronidazol	400 mg o 500 mg	2 veces/día; 7 días
	Tinidazol	500mg	2 veces/día; 5 días
Infecciones uretrales	Metronidazol	400 mg o 500 mg	2 veces/día; 7 días
	Tinidazol	500 mg	2 veces/día; 5 días
Infecciones neonatales	Metronidazol	5 mg/kg	3 veces/día; 5 días

La vía de administración en todos los casos es oral.

Como se ha descrito anteriormente, la tricomonosis es un factor de riesgo en la transmisión y adquisición del SIDA. La tasa de infecciones persistentes (185) y de reinfecciones por *T. vaginalis* en pacientes con VIH puede triplicarse, destacando un porcentaje de resistencia al tratamiento de hasta un 10% en pacientes VIH+ (186). Asimismo, en personas coinfectadas con el virus, se ha observado que el tratamiento con MTZ es más eficaz si se administra en varias tomas, en lugar del régimen de dosis única de 2 g (186). Estos datos parecen sugerir que el tratamiento antirretroviral o los mecanismos desencadenados por la infección vírica podrían interaccionar con el MTZ, recomendándose a pacientes seropositivos la terapia con MTZ multidosis (187).

Aunque existen formulaciones de MTZ para la administración intravaginal, su eficacia es menor en comparación con el tratamiento oral, ya que no se alcanzan los niveles terapéuticos adecuados en uretra y glándulas

anejas (167).

El tinidazol (TDZ), es la alternativa terapéutica al MTZ. Pertenece a la misma familia química de los 5-nitroimidazoles con un sustituyente sulfona (Figura 18).

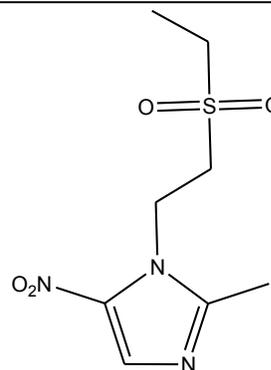


Figura 18. Estructura química del tinidazol.

Fue sintetizado en 1969 y aprobado en 2004 para su uso en EEUU por la FDA con el nombre comercial de Tindamax® (162). En comparación con el MTZ, este fármaco muestra una actividad *in vitro* superior, una mejor distribución tisular y una mayor capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), debido a su carácter lipofílico. Llega a alcanzar niveles de hasta un 80% en líquido cefalorraquídeo (LCR) frente al 42% detectado con MTZ. Su semivida es de 13 h uniéndose a proteínas plasmáticas en un 12% (180). Estas propiedades farmacocinéticas explican la capacidad del TDZ para alcanzar entre 1,4 y 2 veces más concentración en suero y tracto genitourinario que la que se alcanza con el MTZ en pacientes tratados con 500 mg, 2 a 3 veces al día (162).

El tratamiento de la/s pareja/s sexual/es resulta de gran importancia, aunque no se hayan manifestado síntomas, para reducir los casos de reinfección (184). Está demostrada la existencia de un porcentaje elevado de varones infectados que no son diagnosticados debido al carácter asintomático de la infección (156, 188). Por esta razón, es recomendable evitar cualquier contacto sexual hasta no haber confirmado la curación total del paciente y su/s pareja/s (156).

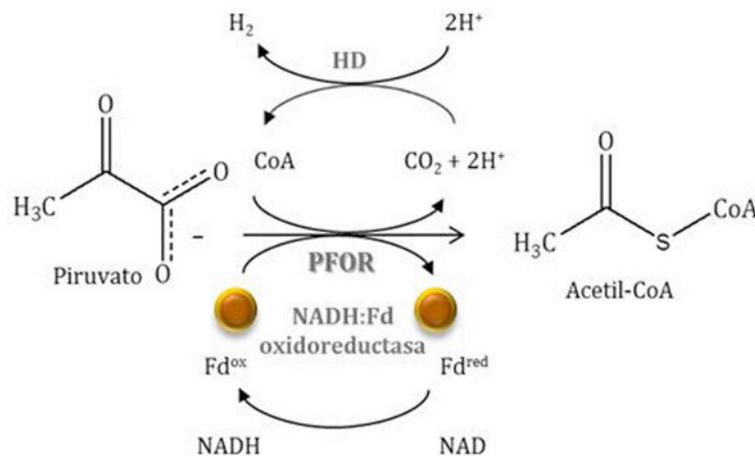
Se han descrito efectos secundarios asociados al consumo de estos fármacos, entre los que destaca la hipersensibilidad a los 5-NI. De todos los efectos adversos descritos en la ficha técnica de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS), los más comunes son las alteraciones gastrointestinales y el desarrollo de sabor metálico (189). El consumo de alcohol está contraindicado durante el tratamiento con ambos 5-NI, al ocasionar “efecto antabus” por su metabolismo hepático (182).

El tratamiento con MTZ se encuentra contraindicado durante el primer trimestre de embarazo. Aunque existen

estudios contradictorios sobre el efecto mutagénico y teratogénico de estos 5-NI, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) determina que existen evidencias suficientes como para considerar al MTZ agente carcinogénico en animales, pero insuficientes en humanos (182). Es por ello por lo que este medicamento está catalogado como un fármaco de Categoría B (12). Su excelente absorción y paso a través de membranas provoca que ambos 5-NI alcancen tejido placentario, fetal y líquido amniótico (190). El fármaco se secreta por la leche materna habiéndose detectado tanto en suero materno como en lactantes (191). Con el fin de reducir la exposición del neonato al fármaco, se recomienda en mujeres en periodo de lactancia la interrupción de la misma desde el inicio del tratamiento con MTZ hasta 12-24 h tras la última dosis o de 3 días en caso de que el fármaco empleado sea el TDZ (167).

El mecanismo de acción de esta familia de fármacos se ha estudiado ampliamente. Los 5-NI son pro-fármacos, que se metabolizan en el interior del parásito para transformarse en agentes activos. El compuesto penetra en el protozoo mediante difusión pasiva, acumulándose en el interior del trofozoíto. La enzima responsable de la activación del fármaco es la piruvato:ferredoxina oxidorreductasa (PFOR), situada en el hidrogenosoma y responsable de la conversión del piruvato en acetil-CoA con la liberación de CO₂ y protones.

Esta descarboxilación oxidativa está asociada a un proceso de fosforilación a nivel de sustrato que lleva consigo la consecuente producción de ATP. Tal y como muestra la Figura 19, los electrones, que se liberan de esta reacción, son captados por una proteína aceptora denominada ferredoxina (Fd). Esta reacción se completa por la acción de la hidrogenasa que produce hidrógeno molecular (H₂).



CoA: Coenzima A; PFOR: Piruvato:ferredoxina oxidorreductasa; Fd: Ferredoxina; HD: Hidrogenasa.

Figura 19. Proceso de descarboxilación oxidativa llevada a cabo en el hidrogenosoma de *T. vaginalis*.

Cuando el MTZ se encuentra en el interior del hidrogenosoma compete con la Fd por los electrones. Al presentar un potencial redox superior se produce la

activación del fármaco a causa de la transferencia de los electrones de la Fd al grupo NO₂ del MTZ como se observa en el panel A de la Figura 20, causando la

reducción y activación del fármaco con la consecuente disminución de la producción de hidrógeno. El panel B refleja los pasos necesarios para lograr la reducción total de un grupo NO_2 en NH_2 , requiriéndose $6 e^-$ /molécula. Durante este proceso se van a generar los distintos intermediarios tóxicos (181). Los radicales formados (2, 4

y 6 de la Figura 20.B) actúan sobre los residuos de adenina y timina del ADN del parásito originando la ruptura de cadenas sencillas y dobles de ADN y con ello la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas que derivan en la muerte del organismo (181, 192).

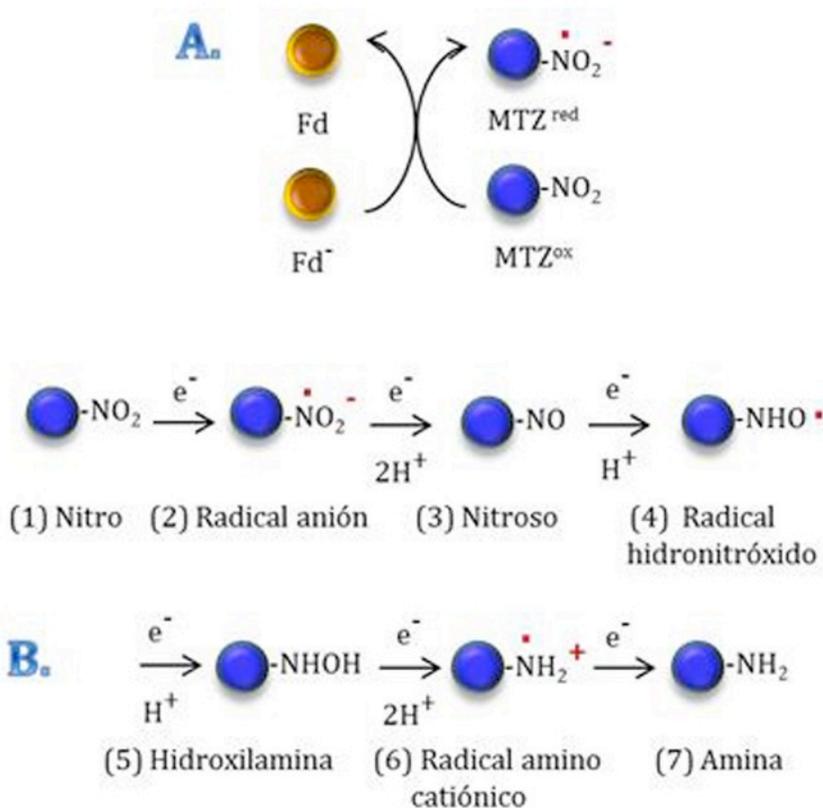


Figura 20. Proceso secuencial de activación del profármaco MTZ. A. Activación del MTZ por transferencia electrónica de la Fd al grupo nitro. **B.** Reducción secuencial del radical nitro mediante transferencia electrónica.

T. vaginalis se caracteriza por presentar un genoma con porcentaje de A+T del 68% (6), lo que explica la alta toxicidad selectiva de este grupo de fármacos como tricomonocidas (12). Asimismo, en los últimos años se ha observado que estos intermediarios citotóxicos también forman aductos con las proteínas del parásito que llevan a la apoptosis del mismo (192, 193). Los estudios proteómicos de Leitsch *et al.* (193) identificaron seis proteínas citosólicas que formaban aductos covalentes con MTZ y TDZ. Todas ellas se encuentran implicadas en procesos redox mediados por la tioredoxina, responsable de la eficiente depleción de las reservas de tior en el parásito y la alteración del equilibrio redox celular.

El potencial redox necesario para la activación del MTZ es de -486 mV (192). Este potencial no puede ser alcanzado en las condiciones aeróbicas en las que se encuentran las células eucarióticas de los mamíferos (-430 mV) (194), resultando difícil la reducción total del grupo nitro a las dosis terapéuticas a las que se administran estos fármacos. Asimismo, al tratarse de células aeróbicas, el

oxígeno provoca la reoxidación de los radicales aniónicos, generando de nuevo el compuesto inicial inactivo (Figura 21), sin llegar a causar grandes lesiones (181). Este ciclo fútil y el bajo potencial redox explican la toxicidad selectiva de este grupo de fármacos en organismos anaerobios, así como la resistencia aeróbica observada a los 5-NI. Ya en los años 80, Moreno y Docampo indicaron que la activación del MTZ no debía ser sólo a causa de la ruta metabólica de la PFOR (181).

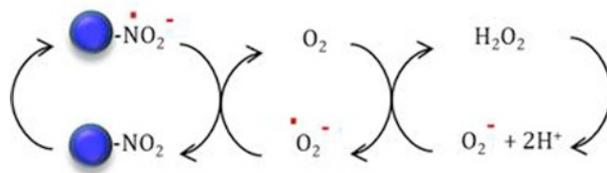


Figura 21. Ciclo fútil de reoxidación del radical aniónico en presencia de oxígeno.

Estudios recientes confirmaron esta hipótesis, describiéndose otras rutas de activación de los 5-NI en la

que estarían implicadas enzimas redox, como la tiorredoxín-reductasa, capaz de reducir el grupo nitro del fármaco y generar radicales tóxicos como los producidos por la PFOR (193). O bien, a través de la ruta metabólica

del malato en la que los electrones generados durante la descarboxilación oxidativa del malato para generar piruvato, son transferidos a la Fd a través de la NADH:ferredoxin oxidoreductasa (Figura 22).



EM: Enzima málica o malato deshidrogenasa

Figura 22. Activación alternativa del MTZ a través de la ruta de la descarboxilación oxidativa del malato.

Asimismo se han identificado distintos genes en *T. vaginalis* que codifican para nitrorreductasas, cuyas construcciones recombinantes en modelos de *E. coli* han demostrado la capacidad de reducir MTZ, sugiriéndose otras vías de activación de este grupo de fármacos en el protozoo (195).

Aunque el éxito en el tratamiento de la tricomonosis con MTZ se sitúa por encima del 90%, el primer caso de resistencia clínica se publicó a los dos años de su comercialización (196). Hasta la fecha, no se ha aprobado un tratamiento alternativo con fármacos de otras familias químicas. Desde 1962 se han publicado fenómenos de resistencia al tratamiento en todos los continentes (197-199). Algunos estudios han registrado datos de fallo en el tratamiento con 2 g de MTZ en al menos el 7% de las mujeres (188), habiéndose estimado que de todos los casos clínicos que se diagnostican, entre el 2-10% son casos de resistencia (200).

Este parásito puede desarrollar dos tipos de resistencia:

Resistencia aeróbica basada en la reoxidación de los aniones tóxicos del MTZ por la presencia de oxígeno (Figura 22). Este tipo de resistencia es la que sucede de forma común en los aislados clínicos de pacientes refractarios al tratamiento con MTZ. En la vagina existen niveles de oxígeno que oscilan entre 15-56 μM (201). Las concentraciones de O_2^- y de H_2O_2 que se generan son fácilmente detoxificadas por acción de catalasas y superóxido dismutasas presentes en este parásito (202). Asimismo, la conversión del fármaco de nuevo a la forma oxidada causa la disminución de la entrada de más profármaco por difusión pasiva al interior del hidrogenosoma (181).

La resistencia aeróbica está catalogada en baja, moderada o alta por el CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) (tabla 6), en función de la respuesta al

fármaco que presente el aislado tras someterle a un test de susceptibilidad en el que se estudia la concentración mínima letal (CML) del MTZ o del TDZ mediante observación al microscopio (203).

Tabla 6. Catalogación de la resistencia aeróbica de aislados en función de la concentración mínima letal detectada en presencia de MTZ o TDZ.

Rango de CML ($\mu\text{g/mL}$)	Nivel de resistencia
< 50	Sensible a MTZ o TDZ
50-100	Baja
100-200	Moderada
200-400	Alta

La resistencia anaeróbica, en cambio, está mediada por modificaciones en el parásito que conllevan la reducción en más de un 50% de la expresión de enzimas claves para la activación del fármaco en el hidrogenosoma de determinados aislados que han desarrollado una resistencia elevada como la PFOR o la ferredoxina (193, 202), así como otras enzimas presentes en este orgánulo como la malato deshidrogenasa (193) o la NADH oxidasa (202). Estos aislados resistentes han sido generados *in vitro* mediante la exposición de los flagelados a concentraciones crecientes del fármaco, forzando al parásito a sobrevivir ante una presión creciente del compuesto (204). Se considera que poseen resistencia anaeróbica todos aquellos aislados que presenten una CML por encima de 3 $\mu\text{g/mL}$ (203).

Aunque el MTZ y el TDZ son los dos únicos fármacos aprobados para el tratamiento de la tricomonosis, existen otros compuestos de la misma familia, a excepción del clotrimazol, cuyo uso en clínica no se ha aprobado. Las

moléculas más conocidas son (Figura 23):

Secnidazol: presenta una absorción rápida por vía oral. Su semivida plasmática es mayor a la del MTZ y el TDZ (entre 17-29 h). Se han descrito efectos secundarios similares a los del MTZ, resultando las alteraciones gastrointestinales las más frecuentes. Cudmore *et al.* lo describen como una alternativa terapéutica adecuada para el tratamiento de esta I.T.S. (12).

Satranidazol: muestra una semivida igual a la descrita en el secnidazol aunque presenta una actividad *in vitro* inferior a la del fármaco de referencia.

Ornidazol: con una actividad similar a la del MTZ, muestra una semivida plasmática de 12-14 h. Sköld *et al.* publicaron la curación del 100% de un grupo de veinte pacientes tratadas con una única dosis de 2 g del compuesto. Sin embargo, ocho de ellas mostraron efectos secundarios describiendo principalmente estados de fatiga y mareos (205). Los estudios séricos revelaron niveles de

ornidazol en sangre entre 5 y 8 veces superiores a la concentración mínima inhibitoria (CMI) registrada para este compuesto, manteniéndose hasta 36 h tras la ingestión. Su potencial redox es -467 mV, inferior al del MTZ (193).

Clotrimazol: imidazol de baja absorción sistémica que se emplea en formulaciones tópicas para el tratamiento de la tricomonosis, con una actividad inferior que los 5-NI. El equipo de duBouchet registraron sólo un 11,1% de curación en un grupo de 45 mujeres tratadas con este fármaco, aunque ninguna desarrolló efectos adversos (189). Es el tratamiento prescrito en mujeres embarazadas más común (206), siendo la alternativa terapéutica recomendada por el CDC durante el primer trimestre de embarazo para aliviar los síntomas (100 mg clotrimazol intravaginal/día durante 6 días) seguido de un tratamiento de 2 g de MTZ durante el segundo trimestre (12).

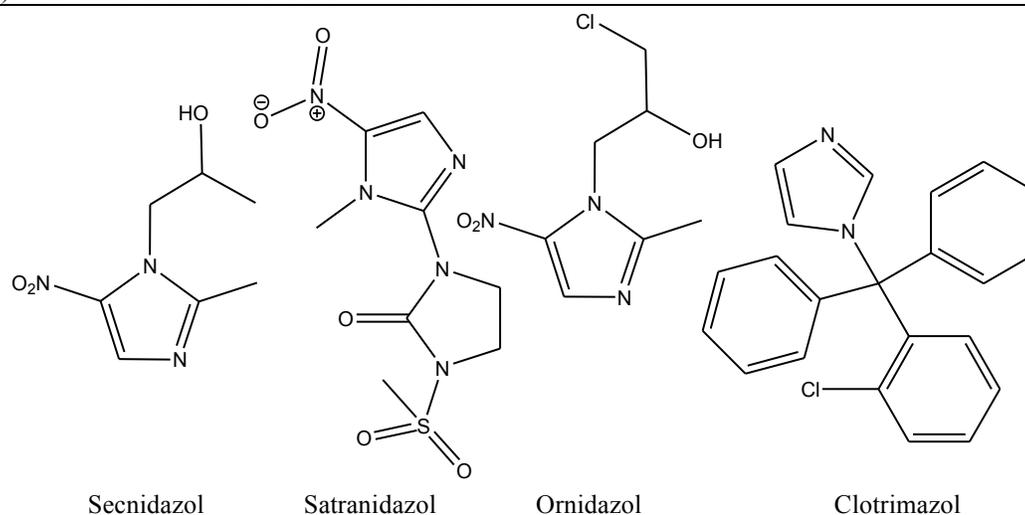


Figura 23. Estructura química de otros fármacos tricomonocidas.

7.2. Otras alternativas terapéuticas

La búsqueda de alternativas farmacológicas eficaces para el tratamiento de esta parasitosis continúa siendo de gran importancia hoy en día. La literatura contiene un gran número de artículos que describen la actividad tricomonocida de extractos de plantas de distintas regiones geográficas como Oceanía (207), África (208, 209), Yemen (208), México (210), Panamá (211, 212), Guatemala (211), Ecuador (211), Argentina (211), Brasil

(213, 214, 215), Filipinas (216), Turquía (217), España (218, 219) o Irán (220, 221), entre otros.

A continuación, se recogen los compuestos de origen natural ensayados *in vitro* y que podrían ser fuente de nuevas alternativas terapéuticas (tabla 7). Tan solo se citan aquellos estudios que han presentado una actividad antiparasitaria relevante con valores de $CI_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$ y/o CMI en torno a 1 mg/mL.

Tabla 7. Actividad tricomonocida de las especies naturales más relevantes obtenidas de la literatura científica. En la tabla se especifica la especie, denominación común, actividad tricomonocida, uso tradicional de los extractos de la planta y la composición mayoritaria del extracto estudiado.

Especie	Nombre común	Parte de la planta	Actividad ($\mu\text{g/mL}$)	Uso tradicional	Compuestos aislados	Referencia
<i>Aframomum sceptrum</i>		Rizoma	$\text{CI}_{50} = 0,1$; $\text{CMI}_{100} = 1,7$	Antimicrobiano	β -pineno, óxido de cariofileno y cipereno	(209)
<i>Allium hirtifolium</i>	Chalote persa	Granos	$\text{CMI}_{100} = 10-5$	Tratamiento de los síntomas asociados a los resfriados y gripes, frente al asma, antiinflamatorio (artritis y arteroesclerosis), antineoplásico	Sulfuros orgánicos (alicina)	(222)
<i>Arbutus unedo</i>	Madroño	Hojas	$\text{CMI}_{100} = 500$	Tratamiento de las hemorroides, hipertensión, diarrea y ansiedad	Glicósidos y taninos	(217)
<i>Artemisia absinthium</i>	Ajenjo, hierba santa	Aérea	$\text{CI}_{50} = 87,2$	Antihelmíntico, antiséptico, febrífugo, repelente de insectos y en el tratamiento de alteraciones hepatobiliares, dispepsia y fiebre crónica	Lactonas sesquiterpénicas, flavonoides, polifenoles	(219, 223)
<i>Bocconia frutescens</i>		Aéreas	$\text{CI}_{50} = 30,9$	Antipruriginoso, tratamiento de alteraciones en la piel (dermatitis, úlceras, tiña, verrugas, etc), disentería e infecciones respiratorias (tos ferina, tuberculosis)	Alcaloides	(210, 224)
<i>Carica papaya</i>	Papaya	Semilla	$\text{CI}_{50} = 5,6$	Antibacteriano, antipuriginoso, vermífugo y antiamebiano	Isotiocianato de bencilo y glucosinolatos	(210)
<i>Cocos nucifera</i>	Coco	Fibra de la cáscara	$\text{CI}_{50} = 5,8$	Tratamiento de la artritis y la diarrea	Polifenoles	(210, 225)
<i>Cussonia spp.</i>		Hojas	$\text{CMI}_{100} = 300-1000$	Analgésico, antimalárico, antiinflamatorio, antidiarreico y contra las enfermedades mentales y la I.T.S.		(208)
<i>Geranium mexicanum</i>	Geranio de olor, pata de león	Corteza	$\text{CI}_{50} = 56$	Antipruriginoso, antidiarreico	Flavonoides	(210, 226)
<i>Hypericum polyanthemum</i>		Aéreas	$\text{CMI}_{100} = 325$	Antimalárico	Floroglucinol y benzopiranos	(215)
<i>Lygodium venustum</i>	Culebrina	Aéreas	$\text{CI}_{50} = 60,9$	Antidiarreico, antídoto contra la mordedura de víbora		(210)
<i>Myristica fatua</i>		Fruto	$\text{CI}_{50} = 35,2$	Antirreumático		(207)
<i>Neurolaena lobata</i>		Hojas	$\text{CMI}_{100} = 1000$; $\text{CI}_{90} = 500$	Antimalárico	Lactonas sesquiterpénicas	(211)
<i>Sapindus saponaria</i>	Boliche, amole, jaboncillo	Fruto	$\text{CMI}_{100} = 156$	Limpieza de la ropa, curación de úlceras, inflamación y heridas externas	Saponinas	(227)
<i>Scaevola balansae</i>		Hojas, corteza	$\text{CI}_{50} = 29,3$	Reconstituyente		(207)
<i>Tarchonanthus camphoratus</i>	Arbusto de alcanfor	Hojas	$\text{CMI}_{100} = 500$	Enfermedades respiratorias y para perfumar las casas		(228)
<i>Voacanga globosa</i>	bayag-usa	Hojas	$\text{CMI}_{100} = 1000$	Antibacteriano	Alcaloides, saponinas y taninos	(216)

En lo que respecta a los compuestos de síntesis, en las últimas décadas se han descrito numerosas moléculas con estructura no imidazólica y actividad tricomonocida *in vitro* e *in vivo* que han llegado a ser empleadas como tratamiento alternativo a los 5-NI en ciertas regiones. Algunas de ellas se utilizaron tópicamente antes de la aparición del MTZ. Sin embargo, sólo lograban una

mejora de los síntomas, no pudiéndose alcanzar en muchos casos la cura total debido a la dificultad del fármaco para alcanzar órganos anejos profundos, que *T. vaginalis* puede colonizar. De igual forma, otros tratamientos se han empleado en casos clínicos de resistencia a los fármacos de referencia. En la siguiente tabla se muestran los compuestos más relevantes.

Tabla 8. Fármacos empleados como alternativa terapéutica para el tratamiento de la tricomonosis.

Fármaco	Estructura	Mecanismo de acción	Observaciones	Ref.
Hanamicina	Polieno aromático	Similar al de la anfotericina B. Se asocia al ergosterol de la membrana del parásito causando la formación de poros.	Empleado en India a nivel tópico. Toxicidad elevada, desarrollando ulceraciones en la mucosa genitourinaria. Baja absorción intestinal, formulaciones tópicas.	(12)
Paromomicina	Aminoglicósido	También empleado en el tratamiento de la amebosis, criptosporidiosis y giardiosis. Se une al ARNr 16S inhibiendo la síntesis de proteínas.	Empleado en pacientes alérgicos al MTZ o en tratamientos conjuntos con 5-NI. Estudios con resultados de efectividad contradictorios. Casos de ulceraciones vaginales dolorosas.	(229-232)
Ácido bórico	Ácido trioxobórico	Antiséptico debido a su carácter ácido.	En supositorios y duchas vaginales en casos de hipersensibilidad al MTZ. Estudios con resultados contradictorios en cuanto a su eficacia.	(231, 233)
Furazolidona	Nitrofurano	Tratamiento frente a bacterias entéricas y <i>Giardia</i> . Interfiere en rutas metabólicas al interaccionar con distintos sistemas enzimáticos. Se une al ADN.	Escasa absorción intestinal aunque eficaz tras su administración intravaginal.	(232, 234)
Nitazoxanida	Derivado sintético de la salicilamida	Aprobado como agente frente a la giardiosis y la criptosporidiosis, actuando de forma similar a los 5-NI a través del grupo nitro. También activo frente a algunos helmintos mediante la inhibición de la polimerización de la tubulina.	Altamente activo <i>in vitro</i> frente a <i>T. vaginalis</i> . Absorción intestinal limitada, limitando su uso a nivel intravaginal.	(232, 235, 236)
Miltefosina	Fosforil-colina	Leishmanicida. Inhibe la síntesis de fosfolípidos gracias a su estructura.	Altamente activo <i>in vitro</i> frente a aislados sensibles y resistentes de <i>T. vaginalis</i> . Algunos estudios alertan sobre posibles efectos teratogénicos.	(237-239)
Nonoxinol-9	Hexacosanol	Contraceptivo espermicida empleado en formulaciones tópicas durante más de 50 años. Detergente no iónico con actividad microbicida.	En desuso debido al riesgo de ulceraciones genitales, erosiones en el epitelio y alteración de la flora aumentando el riesgo de adquirir VIH. No protege frente a otras I.T.S.	(240)

8. CONCLUSIONES

La secuenciación del genoma de *T. vaginalis* y los últimos estudios que han demostrado el papel relevante que muestra este parásito, favoreciendo la implantación de otros patógenos en la cavidad genitourinaria, así como su intervención como factor de riesgo en el desarrollo de neoplasias, ha revolucionado el idea preconcebida que se tenía de la tricomonosis. Hasta finales del siglo XX, la tricomonosis urogenital humana era una enfermedad venérea molesta pero con poca relevancia. Sin embargo los estudios de los últimos años parecen mostrar lo contrario. Un parásito capaz de desarrollar un amplio cuadro clínico y poco específico, pudiendo llegar a pasar desapercibido en parte de los pacientes. Esta versatilidad parece tener relación con el genoma tan complejo y repetido, formado por genes que podría haber adquirido durante su evolución tras estar en contacto con otros organismos mediante transferencia lateral de genes. Asimismo, esta capacidad genómica también podría explicar cómo un parásito unicelular sin formas de resistencia es capaz de colonizar y asentarse en un ambiente tan hostil como el nicho genitourinario, sometido a cambios de pH, iones, hormonas, el sistema inmune del hospedador, la flora vaginal, etc. En virtud de todo lo descrito en esta revisión, *T. vaginalis* se postula como un excelente modelo parasitológico para el estudio de los mecanismos de adaptación, interacción parásito-hospedador y patogenia, de fácil manejo en el laboratorio y versátil en términos de patogenia, genómica y clínica.

9. AGRADECIMIENTOS

Los autores de esta revisión quieren agradecer al Ministerio de Economía y Competitividad (proyecto SAF2015-66690-R) por la ayuda recibida

10. REFERENCIAS

1. WHO, Global strategy for the prevention and control of sexually transmitted infections: 2006-2015: breaking the chain of transmission. WHO Press, 2011.
2. Hotez PJ. Neglected infections of poverty in the United States of America. *Plos Neglect Trop D* 2008; 2: doi: 10.1371/journal.pntd.0000256.
3. Hotez PJ, Gurwith M. Europe's neglected infections of poverty. *Int J Infect Dis* 2011; 15: e611-9.
4. WHO, Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted diseases - 2008. WHO Press, 2012.
5. Harp DF, Chowdhury I. Trichomoniasis: evaluation to execution. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; 157: 3-9.
6. Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, *et al.*. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 2007; 315: 207-12.
7. Honigberg BM, Brugerolle G. Structure. In: Honigberg BM, Ed. *Trichomonads Parasitics in Humans*. New York: Springer-Verlag 1990; pp. 5-35.
8. Zubáčová Z, Cimbůrek Z, Tachezy J. Comparative analysis of trichomonad genome sizes and karyotypes.

- Mol Biochem Parasitol 2008; 161: 49-54.
9. Benchimol M. Hydrogenosomes under microscopy. *Tissue Cell* 2009; 41: 151-168.
10. Pereira-Neves A, Ribeiro KC, Benchimol M. Pseudocysts in Trichomonads – New insights. *Protist* 2003; 154: 313-29.
11. Ryu JS, Lee MH, Park H, Kang JH, Min DY. Survival of *Trichomonas vaginalis* exposed on various environmental conditions. *Korean J Infect Dis* 2002; 34: 373-9.
12. Cudmore SL, Delgaty KL, Hayward-McClelland SF, Petrin DP, Garber GE. Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 783-93.
13. Bellanger AP, Cabaret O, Costa JM, Foulet F, Bretagne S, Botterel F. Two unusual occurrences of trichomoniasis: rapid species identification by PCR. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3159-61.
14. Duboucher C, Noël C, Durand-Joly I, *et al.* Pulmonary coinfection by *Trichomonas vaginalis* and *Pneumocystis* sp. as a novel manifestation of AIDS. *Hum Pathol* 2003 ; 34: 508-11.
15. Mallat H, Podglajen I, Lavarde V, Mainardi J-L, Frappier J, Cornet M. Molecular characterization of *Trichomonas tenax* causing pulmonary infection. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3886-7.
16. Leterrier M, Morio F, Renard B, Poirier AS, Miegville M, Chambreuil G. Trichomonads in pleural effusion: case report, literature review and utility of PCR for species identification. *New Microbiol* 2012; 35: 83-7.
17. Jongwutiwes S, Silachamroon U, Putaporntip C. *Pentatrichomonas hominis* in empyema thoracis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94: 185-6.
18. Mantini C, Souppart L, Noël C, *et al.* Molecular characterization of a new *Tetratrichomonas* species in a patient with empyema. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2336-9.
19. López-Escamilla E, Sanchez-Aguillon F., Alatorre-Fernandez CP, *et al.* New *Tetratrichomonas* species in two patients with pleural empyema. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 3143-6.
20. Smith A, Johnson P. Gene expression in the unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Res Microbiol* 2011; 162: 646-54.
21. de Koning AP, Brinkman FS, Jones SJ, Keeling PJ. Lateral gene transfer and metabolic adaptation in the human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biol Evol* 2000; 17: 1769-73.
22. Strese, A., Backlund, A., Alsmark, C., 2014. A recently transferred cluster of bacterial genes in *Trichomonas vaginalis* – lateral gene transfer and the fate of acquired genes. *BMC Evol Biol* 14, 119-132.
23. Nixon JE, Field J, McArthur AG, *et al.* Iron-dependent hydrogenases of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: activity of the recombinant entamoebic

- enzyme and evidence for lateral gene transfer. *Biol Bull* 2003; 204: 1-9.
24. Woehle C, Kusdian G, Radine C, Graur D, Landan G, Gould SB. The parasite *Trichomonas vaginalis* expresses thousands of pseudogenes and long non-coding RNAs independently from functional neighbouring genes. *BMC Genomics* 2014; 15: 906-18.
 25. Gould SB, Woehle C, Kusdian G, *et al.* Deep sequencing of *Trichomonas vaginalis* during the early infection of vaginal epithelial cells and amoeboid transition. *Int J Parasitol* 2013; 43: 707-19
 26. Snipes LJ, Gamard PM, Narcisi EM, Beard CB, Lehmann T, Secor WE. Molecular epidemiology of metronidazole resistance in a population of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3004-9.
 27. Vanacova S, Tachezy J, Kulda J, Flegr J. Characterization of trichomonad species and strains by PCR fingerprinting. *J Eukaryot Microbiol* 1997; 44: 545-52.
 28. Rojas L, Fraga J, Sariago I. Genetic variability between *Trichomonas vaginalis* isolates and correlation with clinical presentation. *Infect Genet Evol* 2004; 4: 53-8.
 29. Hampl V, Vaňáčová Š, Kulda J, Flegr J. Concordance between genetic relatedness and phenotypic similarities of *Trichomonas vaginalis* strains. *BMC Evol Biol* 2001; 1: 1-11.
 30. Kaul P, Gupta I, Sehgal R, Malla N. *Trichomonas vaginalis*: random amplified polymorphic DNA analysis of isolates from symptomatic and asymptomatic women in India. *Parasitol Int* 2004; 53: 255-62.
 31. Stiles JK, Shah PH, Xue L, *et al.* Molecular typing of *Trichomonas vaginalis* isolates by HSP70 restriction fragment length polymorphism. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62: 441-5.
 32. Meade JC, de Mestral J, Stiles JK, *et al.* Genetic diversity of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates determined by EcoRI restriction fragment length polymorphism of heat-shock protein 70 genes. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80: 245-251.
 33. Cepicka I, Hampl V, Kulda J, Flegr J. New evolutionary lineages, unexpected diversity, and host specificity in the parabasalid genus *Tetratrichomonas*. *Mol Phylogenet Evol* 2006; 39: 542-51.
 34. Mayta H, Gilman RH, Calderon M, *et al.* 18S ribosomal DNA-based PCR for diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2683-7.
 35. Dwivedi SP, Husain N, Singh RB, Malla N. 18S ribosomal DNA based PCR diagnostic assay for *Trichomonas vaginalis* infection in symptomatic and asymptomatic women in India. *Asian Pac J Trop Dis* 2012; 2: 133-8.
 36. Gunderson J, Hinkle G, Leipe D, *et al.* Phylogeny of trichomonads inferred from small-subunit rRNA sequences. *J Eukaryot Microbiol* 1995; 42: 411-5.
 37. Embley TM, Hirt RP. Early branching eukaryotes?. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 624-9.
 38. Viscogliosi E, Edgcomb VP, Gerbod D, Noël C, Delgado-Viscogliosi P. Molecular evolution inferred from small subunit rRNA sequences: what does it tell us about phylogenetic relationships and taxonomy of the parabasalids?. *Parasite* 1999; 6: 279-91.
 39. Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart Rev Biol* 1991; 411-53.
 40. Dávila AMR, Momen H. Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol* 2000; 94: 651-4.
 41. Som I, Azam A, Bhattacharya A, Bhattacharya S. Inter- and intra-strain variation in the 5.8S ribosomal RNA and internal transcribed spacer sequences of *Entamoeba histolytica* and comparison with *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii* and *Entamoeba invadens*. *Int J Parasitol* 2000; 30: 723-8.
 42. Santos SS, Cupolillo E, Junqueira A, *et al.* The genetic diversity of brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates and the phylogenetic positioning of zymodeme 3, based on the internal transcribed spacer of the ribosomal gene. *Ann Trop Med Parasitol* 2002; 96: 755-64.
 43. Beltrame-Botelho IT, Gaspar-Silva D, Steindel M, Dávila AMR, Grisard EC. Internal transcribed spacers (ITS) of *Trypanosoma rangeli* ribosomal DNA (rDNA): a useful marker for inter-specific differentiation. *Infect Gen Evol* 2005; 5: 17-28.
 44. Bostrom B, Wolf C, Greene C, Peterson DS. Sequence conservation in the rRNA first internal transcribed spacer region of *Babesia gibsoni* genotype Asia isolates. *Vet Parasitol* 2008; 152: 152-7.
 45. Katiyar SK, Visvesvara GS, Edlind TD. Comparisons of ribosomal-RNA sequences from amitochondrial protozoa - Implications for processing, mRNA binding and paromomycin susceptibility. *Gene* 1995; 152: 27-33.
 46. Simoes-Barbosa A, Lobo TT, Xavier J, Carvalho SE, Leornadecz E. *Trichomonas vaginalis*: intrastrain polymorphisms within the ribosomal intergenic spacer do not correlate with clinical presentation. *Exp Parasitol* 2005; 110: 108-13.
 47. Felleisen RSJ. Comparative sequence analysis of 5- 8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *Parasitol* 1997; 115: 111-9.
 48. Walker RL, Hayes DC, Sawyer SJ, Nordhausen RW, Van Hoosear KA, BonDurant, RH. Comparison of the 5.8 S rRNA gene and internal transcribed spacer regions of trichomonadid protozoa recovered from the bovine preputial cavity. *J Vet Diagn Invest* 2003; 15: 14-20.
 49. Kleina P, Bettim-Bandinelli J, Bonatto SL, Benchimol

- M, Bogo MR. Molecular phylogeny of Trichomonadidae family inferred from ITS-1, 5.8 S rRNA and ITS-2 sequences. *Int J Parasitol* 2004; 34: 963-70.
50. Ibañez-Escribano A, Nogal-Ruiz JJ, Delclaux M, Martínez-Nevado E, Ponce-Gordo F. Morphological and molecular identification of *Tetratrichomonas* flagellates from the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*). *Res Vet Sci* 2013; 95: 176-81.
 51. Kazemi F, Hooshyar H, Zareikar B, Bandehpour M, Arbabi M, Talari S, Alizadeh R, Kazemi B. Study on ITS1 gene of Iranian *Trichomonas vaginalis* by molecular methods. *Iranian J Parasitol* 2010; 5: 9-14.
 52. Rivera WL, Ong VA, Masalunga MC. Molecular characterization of *Trichomonas vaginalis* isolates from the Philippines. *Parasitol Res* 2009; 106: 105-10.
 53. Torres-Gómez H, Hernández-Núñez E, León-Rivera I, et al. Design, synthesis and *in vitro* antiprotozoal activity of benzimidazole-pentamidine hybrids. *Bioorg Med Chem Lett* 2008; 18: 3147-51.
 54. Applied Biosystems Chemistry Guide: DNA sequencing by capillary electrophoresis 2009. Second Edition.
 55. Chambers GK, MacAvoy ES. Microsatellites: consensus and controversy. *Comp Biochem Physiol B Blochem Mol Biol* 2000; 126: 455-76.
 56. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 435-45.
 57. Conrad MD, Zubacova Z, Dunn LA, et al. Microsatellite polymorphism in the sexually transmitted human pathogen *Trichomonas vaginalis* indicates a genetically diverse parasite. *Mol Biochem Parasitol* 2011; 175: 30-8.
 58. Ramel C. Mini-and microsatellites. *Env Health Perspect* 1997; 105: 781-89.
 59. Li YC, Korol AB, Fahima T, Nevo E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol Biol Evol* 2004; 21: 991-1007.
 60. Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 2004; 20: 176-83.
 61. Oliveira RP, Macedo AM, Chiari E, Pena SDJ. An alternative approach to evaluating the intraspecific genetic variability of parasites. *Parasitol Today* 1997; 13: 196-200.
 62. Rossi V, Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pagés M, Bastien P. Structural organisation of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)_n loci. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 65: 271-82.
 63. Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, et al. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol* 2000; 17: 1467-82.
 64. Ajzenberg D, Banuls AL, Tibayrenc M, Dardé ML. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int J Parasitol* 2002; 32: 27-38.
 65. Bulle B, Millon L, Bart JM, et al. Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3391-7.
 66. Gomez JC, McNamara DT, Bockarie MJ, Baird JK, Carlton JM, Zimmerman PA. Identification of a polymorphic *Plasmodium vivax* microsatellite marker. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69: 377-9.
 67. Ford AF, Vardo-Zalik AM, Schall JJ. Relative clonal density of malaria parasites in mixed-genotype infections: validation of a technique using microsatellite markers for *Plasmodium falciparum* and *P. mexicanum*. *J Parasitol* 2010; 96: 908-13.
 68. Conrad MD, Gorman AW, Schillinger JA, et al. Extensive genetic diversity, unique population structure and evidence of genetic exchange in the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6: e1573.
 69. Syvänen A-C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature Rev* 2001; 2: 930-42.
 70. Cornelius DC, Ashley Robinson D, Mziny CA, et al. Genetic characterization of *Trichomonas vaginalis* isolates by use of multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2012; 50 : 3293-300.
 71. Fiori PL, Rappelli P, Addis MF, Sechi A, Cappuccinelli P. *Trichomonas vaginalis* haemolysis: pH regulates a contact-independent mechanism based on pore-forming proteins. *Microb Pathog* 1996; 20: 109-18.
 72. Sood S, Kapil A. An update on *Trichomonas vaginalis*. *Indian J Sex Transm Dis* 2008; 29: 7-14.
 73. Ford LC, Hammill HA, DeLange RJ et al. Determination of estrogen and androgen receptors in *Trichomonas vaginalis* and the effects of antihormones. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156: 1119-21.
 74. Eschenbach DA, Thwin SS, Patton DL, et al. Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 901-7.
 75. Garber GE, Lemchuk-Favel LT, Rousseau G. Effect of beta-estradiol on production of the cell-detaching factor of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1847-9.
 76. Sharma R, Pickering J, McCormack WM. Trichomoniasis in a postmenopausal woman cured after discontinuation of estrogen replacement therapy. *Sex Transm Dis* 1997; 24: 543-5.
 77. Crouch ML, Benchimol M, Alderete JF. Binding of fibronectin by *Trichomonas vaginalis* is influenced by iron and calcium. *Microb Pathogenesis* 2001; 31: 131-44.

78. Figueroa-Angulo EE, Rendon-Gandarilla FJ, Puente-Rivera J, *et al.* The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect* 2012; 14: 1411-27.
79. Kummer S, Hayes GR, Gilbert RO, Beach DH, Lucas JJ, Singh BN. Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron. *Microb Pathog* 2008; 44: 197-203.
80. Tsai CD, Liu HW, Tai JH. Characterization of an iron-responsive promoter in the protozoan pathogen *Trichomonas vaginalis*. *J Biol Chem* 2002; 277: 5153-62.
81. Arroyo R, Cárdenas-Guerra RE, Figueroa-Angulo EE, Puente-Rivera J, Zamudio-Prieto O, Ortega-López J. *Trichomonas vaginalis* cysteine proteinases: Iron response in gene expression and proteolytic activity. *BioMed Res Int*. 2015; doi:10.1155/2015/946787
82. Kim YS, Song HO, Choi IH, Park SJ, Ryu JS. Hydrogenosomal activity of *Trichomonas vaginalis* cultivated under different iron conditions. *Korean J Parasitol* 2006; 44: 373-8.
83. Crouch MV, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* has two fibronectin-like iron-regulated genes. *Arch Med Res* 2001; 32: 102-7.
84. Alderete JF, Provenzano D, Lehker MW. Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. *Microb Pathogenesis* 1995; 19: 93-103.
85. Alderete JF. Iron modulates phenotypic variation and phosphorylation of P270 in double-stranded RNA virus-infected *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 1999; 67: 4298-302.
86. Lehker MW, Sweeney D. Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. *Sex Transm Infect* 1999; 75: 231-8.
87. Alvarez-Sánchez ME, Solano-González E, Yáñez-Gómez C, Arroyo R. Negative iron regulation of the CP65 cysteine proteinase cytotoxicity in *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect* 2007; 9: 1597-605.
88. Lehker MW, Alderete JF. Iron regulates growth of *Trichomonas vaginalis* and the expression of immunogenic trichomonad proteins. *Mol Microbiol* 1992; 6: 123-32.
89. Ardalan S, Lee BC, Garber GE. *Trichomonas vaginalis*: The adhesins AP51 and AP65 bind heme and hemoglobin. *Exp Parasitol* 2009; 121: 300-6.
90. Zaichick VY, Sviridova TV, Zaichick SV. Zinc in the human prostate gland: normal, hyperplastic and cancerous. *J Urol Nephrol* 1997; 29: 565-74.
91. Krieger JN, Rein MF. Zinc sensitivity of *Trichomonas vaginalis* - *In vitro* studies and clinical implications. *J Infect Dis* 1982; 146: 341-5.
92. Hernández-Gutiérrez R, Avila-González L, Ortega-López J, Cruz-Talonia F, Gómez-Gutierrez G, Arroyo R. *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Exp Parasitol* 2004; 107: 125-35.
93. Solano-González E, Alvarez-Sánchez ME, Avila-González L, Rodríguez-Vargas VH, Arroyo R, Ortega-López J. Location of the cell-binding domain of CP65, a 65 kDa cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 2114-27.
94. Garcia AF, Benchimol M, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* polyamine metabolism is linked to host cell adherence and cytotoxicity. *Infect Immun* 2005; 73: 2602-10.
95. Alvarez-Sánchez ME, Carvajal-Gomez BI, Solano-González E, *et al.* Polyamine depletion down-regulates expression of the *Trichomonas vaginalis* CP65. A 65-KDa cysteine proteinase involved in cellular damage. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 2442-51.
96. Fiori PL, Rappelli P, Addis MF. The flagellated parasite *Trichomonas vaginalis*: new insights into cytopathogenicity mechanisms. *Microbes Infect* 1999; 1: 149-56.
97. Moreno-Brito V, Yáñez-Gómez C, Meza-Cervantez P, *et al.* A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate : ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. *Cell Microbiol* 2005; 7: 245-58.
98. O'Brien JL, Lauriano CM, Alderete JF. Molecular characterization of a third malic enzyme-like AP65 adhesin gene of *Trichomonas vaginalis*. *Microb Pathogenesis* 1996; 20: 335-349.
99. Alderete JF, Engbring J, Lauriano CM, O'Brien JL. Only two of the *Trichomonas vaginalis* triplet AP51 adhesins are regulated by iron. *Microb Pathogenesis* 1998; 24: 1-16.
100. Engbring JA, Alderete JF. Three genes encode distinct AP33 proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Mol Microbiol* 1998; 28: 305-13.
101. Garcia AF, Chang TH, Benchimol M, Klumpp DJ, Lehker MW, Alderete JF. Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol* 2003 ; 47 : 1207-24.
102. Addis MF, Rappelli P, Cappuccinelli P, Fiori PL. Extracellular release by *Trichomonas vaginalis* of a NADP(+) dependent malic enzyme involved in pathogenicity. *Microb Pathogenesis* 1997; 23: 55-61.
103. Garcia AF, Alderete JF. Characterization of the *Trichomonas vaginalis* surface-associated AP65 and binding domain interacting with trichomonads and host cells. *BMC Microbiol* 2007; 7: 116.
104. Fichorova RN, Trifonova RT, Gilbert RO, *et al.* *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan triggers a selective upregulation of cytokines by human female reproductive tract epithelial cells. *Infect Immun* 2006; 74: 5773-9.

105. Bastida-Corcuera FD, Okumura CY, Colocoussi A, Johnson PJ. *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan mutants have reduced adherence and cytotoxicity to human ectocervical cells. *Eukaryot Cell* 2005; 4: 1951-8.
106. Singh, B.N., Hayes, G.R., Lucas, J.J., *et al.* Structural details and composition of *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan in relevance to the epithelial immune function. *Glycoconj J* 2009; 26: 3-17.
107. Okumura CY, Baum LG, Johnson PJ. Galectin-1 on cervical epithelial cells is a receptor for the sexually transmitted human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Cell Microbiol* 2008; 10: 2078-90.
108. Lama A, Kucknoor A, Mundodi V, Alderete JF. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 2009; 77: 2703-11.
109. Noël JC, Fayt I, Romero Munoz MR, Simon P, Engohan-Aloghe C. High prevalence of high-risk human papillomavirus infection among women with *Trichomonas vaginalis* infection on monolayer cytology. *Arch Gynecol Obstet* 2010; 282: 503-5.
110. Pereira-Neves A, Benchimol M. Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biol Cell* 2007; 99: 87-101.
111. Midlej V, Benchimol M. *Trichomonas vaginalis* kills and eats--evidence for phagocytic activity as a cytopathic effect. *Parasitol* 2010; 137: 65-76.
112. Rendón-Maldonado JG, Espinosa-Cantellano M, González-Robles A, Martínez-Palomo A. *Trichomonas vaginalis*: *In vitro* phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes, and erythrocytes. *Exp Parasitol* 1998; 89: 241-50.
113. Krieger JN, Poisson MA, Rein MF. Beta-hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* correlates with virulence. *Infect Immun* 1983; 41: 1291-5.
114. Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 300-17.
115. Lubick KJ, Burgess DE. Purification and analysis of a phospholipase A2-like lytic factor of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 2004; 72: 1284-90.
116. Vargas-Villarreal J, Mata-Cárdenas BD, Palacios-Corona R, *et al.* *Trichomonas vaginalis*: identification of soluble and membrane-associated phospholipase A1 and A2 activities with direct and indirect hemolytic effects. *J Parasitol* 2005; 91: 5-11.
117. Hirt RP. *Trichomonas vaginalis* virulence factors: an integrative overview. *Sex Transm Infect* 2013; 89: 439-43.
118. Neale KA, Alderete JF. Analysis of the proteinases of representative *Trichomonas vaginalis* isolates. *Infect Immun* 1990; 58: 157-62.
119. Alvarez-Sánchez ME, Avila-González L, Becerril-García C, Fattel-Facenda LV, Ortega-López J, Arroyo R. A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microb Pathogenesis* 2000; 28: 193-202.
120. Mendoza-López MR, Becerril-García C, Fattel-Facenda LV, *et al.* CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Infect Immun* 2000; 68: 4907-12.
121. Sommer U, Costello CE, Hayes GR, *et al.* Identification of *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases that induce apoptosis in human vaginal epithelial cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 23853-60.
122. Arroyo R, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infect Immun* 1989; 57: 2991-7.
123. Provenzano D, Alderete JF. Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 1995; 63: 3388-95.
124. Draper D, Donohoe W, Mortimer L, Heine RP. Cysteine proteases of *Trichomonas vaginalis* degrade secretory leukocyte protease inhibitor. *J Infect Dis* 1998; 178: 815-9.
125. Garber GE, Lemchuk-Favel LT, Bowie WR. Isolation of a cell-detaching factor of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1548-53.
126. Escario A, Barrio AG, Diez BS, Escario JA. Immunohistochemical study of the vaginal inflammatory response in experimental trichomoniasis. *Acta Trop* 2010; 114: 22-30.
127. Tai JH, Ip CF. The cDNA sequence of *Trichomonas vaginalis* Virus-T1 double-stranded RNA. *Virology* 1995; 206: 773-6.
128. Liu HW, Chu YD, Tai JH. Characterization of *Trichomonas vaginalis* virus proteins in the pathogenic protozoan *T. vaginalis*. *Arch Virol* 1998; 143: 963-70.
129. Bessarab IN, Liu HW, Ip CF, Tai JH. The complete cDNA sequence of a type II *Trichomonas vaginalis* virus. *Virology* 2000; 267: 350-9.
130. Benchimol M, Chang TH, Alderete JF. Visualization of new virus-like-particles in *Trichomonas vaginalis*. *Tissue Cell* 2002; 34: 406-15.
131. Benchimol M, Monteiro SP, Chang TH, Alderete JF. Virus in *Trichomonas* - an ultrastructural study. *Parasitol Int* 2002; 51: 293-8.
132. Wang A, Wang CC, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* phenotypic variation occurs only among trichomonads infected with the double-stranded-RNA virus. *J Exp Med* 1987; 166: 142-50.
133. Khoshnan A, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* with a double-stranded-RNA virus has up-regulated levels of phenotypically variable immunogen mRNA. *J Virol* 1994; 68: 4035-8.
134. Bessarab IN, Nakajima R, Liu HW, Tai JH. Identification and characterization of a type III

- Trichomonas vaginalis* virus in the protozoan pathogen *Trichomonas vaginalis*. Arch Virol 2011; 156: 285-94.
135. Fraga J, Rojas L, Sariego I, Fernandez-Calienes A. Double-stranded RNA viral infection in Cuban *Trichomonas vaginalis* isolates. Braz J Infect Dis 2005; 9: 521-4.
 136. Fraga J, Rojas L, Sariego I, Fernandez-Calienes A, Nunez FA. Double-stranded RNA viral infection of *Trichomonas vaginalis* and association with clinical presentation. Acta Protozool 2007; 46: 93-8.
 137. Pindak FF, Depindak MM, Hyde BM, Gardner WA. Acquisition and retention of viruses by *Trichomonas vaginalis*. Genitourin Med 1989; 65: 366-71.
 138. Sayed el-Ahl SA, Maklad KM, Gamil MA, Hammouda MH, Abdel Naby SB. A study on the potential role of *Trichomonas vaginalis* in transmission of *Herpes simplex* virus type II. J Egypt Soc Parasitol 1999; 29: 561-73.
 139. Rendon-Maldonado J, Espinosa-Cantellano M, Soler C, Torres JV, Martinez-Palomo A. *Trichomonas vaginalis*: *in vitro* attachment and internalization of HIV-1 and HIV-1-infected lymphocytes. J Eukaryot Microbiol 2003; 50: 43-8.
 140. Xiao JC, Xie LF, Fang SL, *et al.* Symbiosis of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* may link metronidazole resistance *in vitro*. Parasitol Res 2006 ; 100: 123-30.
 141. Rappelli P, Carta F, Delogu G, *et al.* *Mycoplasma hominis* and *Trichomonas vaginalis* symbiosis: multiplicity of infection and transmissibility of *M. hominis* to human cells. Arch Microbiol 2001; 175: 70-4.
 142. Dessi D, Rappelli P, Diaz N, Cappuccinelli P, Fiori PL. *Mycoplasma hominis* and *Trichomonas vaginalis*: a unique case of symbiotic relationship between two obligate human parasites. Front Biosci 2006; 11: 2028-34.
 143. Xiao JC, Xie LF, Zhao L, Fang SL, Lun ZR. The presence of *Mycoplasma hominis* in isolates of *Trichomonas vaginalis* impacts significantly on DNA fingerprinting results. Parasitol Res 2008; 102: 613-9.
 144. Morada M, Manzur M, Lam B, *et al.* Arginine metabolism in *Trichomonas vaginalis* infected with *Mycoplasma hominis*. Microbiol 2010; 156: 3734-43.
 145. Mestecky J, Fultz PN. Mucosal immune system of the human genital tract. J Infect Dis 1999; 179: S470-4.
 146. MacNeill C, Umstead TM, Phelps DS, *et al.* Surfactant protein A, an innate immune factor, is expressed in the vaginal mucosa and is present in vaginal lavage fluid. Immunol 2004; 111: 91-9.
 147. Kang JH, Song HO, Ryu JS, *et al.* *Trichomonas vaginalis* promotes apoptosis of human neutrophils by activating caspase-3 and reducing Mcl-1 expression. Parasite Immunol 2006; 28: 439-46.
 148. Peterson KM, Alderete JF. Host plasma proteins on the surface of pathogenic *Trichomonas vaginalis*. Infect Immun 1982; 37: 755-62.
 149. Peterson KM, Alderete JF. Acquisition of alpha 1-antitrypsin by a pathogenic strain of *Trichomonas vaginalis*. Infect Immun 1983; 40: 640-6.
 150. Padilla-Vaca F, Anaya-Velázquez F. Biochemical properties of a neuraminidase of *Trichomonas vaginalis*. J Parasitol 1997; 83: 1001-6.
 151. Meysick KC, Dimock K, Garber GE. Molecular characterization and expression of a N-acetylneuraminase lyase gene from *Trichomonas vaginalis*. Mol Biochem Parasitol 1996; 76: 289-92.
 152. Bonilha VL, Ciavaglia MD, de Souza W, Silva FCE. The involvement of terminal carbohydrates of the mammalian-cell surface in the cytoadhesion of trichomonads. Parasitol Res 1995; 81: 121-6.
 153. Ibáñez-Escribano A, Nogal-Ruiz JJ, Pérez-Serrano J, Gómez-Barrio A, Escario JA, Alderete JF. Sequestration of host-CD59 as potential immune evasion strategy of *Trichomonas vaginalis*. Acta Trop 2015; 149: 1-7.
 154. Lawing LF, Hedges SR, Schwebke JR. Detection of trichomonosis in vaginal and urine specimens from women by culture and PCR. J Clin Microbiol 2000; 38: 3585-8.
 155. Sherrard, J., Ison, C., Moody, J., Wainwright, E., Wilson, J., Sullivan, A., 2014. United Kingdom National Guideline on the Management of *Trichomonas vaginalis*. Int J STD AIDS 25, 541-549.
 156. Hobbs MM, Lapple DM, Lawing LF, *et al.* Methods for detection of *Trichomonas vaginalis* in the male partners of infected women: Implications for control of trichomoniasis. J Clin Microbiol 2006; 44: 3994-9.
 157. Radonjic IV, Dzamic AM, Mitrovic SM, Arsic Arsenijevic VS, Popadic DM, Kranjic Zec IF. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection: The sensitivities and specificities of microscopy, culture and PCR assay. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2006; 126: 116-20.
 158. Borchardt KA, Zhang MZ, Shing H, Flink K. A comparison of the sensitivity of the InPouch TV, Diamond's, and Trichosel media for detection of *Trichomonas vaginalis*. Genitourin Med 1997; 73: 297-8.
 159. Hobbs MM, Sena AC. Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. Sex Transm Infect 2013; 89: 434-8.
 160. Sood S, Mohanty S, Kapil A, Tolosa J, Mittal S. InPouch TV culture for detection of *Trichomonas vaginalis*. Indian J Med Res 2007; 125: 567-71.
 161. Van Der Pol B, Kraft CS, Williams JA. Use of an adaptation of a commercially available PCR assay aimed at diagnosis of chlamydia and gonorrhea to detect *Trichomonas vaginalis* in urogenital specimens. J Clin Microbiol 2006; 44: 366-73.
 162. Bachmann LH, Hobbs MM, Sena AC, *et al.*

- Trichomonas vaginalis* genital infections: progress and challenges. Clin Infect Dis 2011; 53: S160-72.
163. Gimenes F, Souza RP, Bento JC, *et al.* Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens. Nat Rev Urol 2014; 11; 672-687.
164. Lee JJ, Moon HS, Lee TC, Hwang HS, Ahn M-H, Ryu J-S. PCR for diagnosis of male *Trichomonas vaginalis* infection with chronic prostatitis and urethritis. Korean J Parasitol 2012; 50: 157-9.
164. Pillay DG, Hoosen AA, Vezi B, Moodley C. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* in male urethritis. Trop Geogr Med 1994; 46: 44-5.
165. Huppert JS, Batteiger BE, Braslins P, *et al.* Use of an immunochromatographic assay for rapid detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal specimens. J Clin Microbiol 2005; 43: 684-7.
166. Hegazy MM, El-Tantawy NL, Soliman MM, El-Sadeek ES, El-Nagar HS. Performance of rapid immunochromatographic assay in the diagnosis of *Trichomoniasis vaginalis*. Diagn Microbiol Infect Dis 2012; 74: 49-53.
167. Workowski KA, Berman S. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. MMWR Recomm Rep 2010; 59: 1-110.
169. Carney JA, Unadkat P, Yule A, Rajakumar R, Lacey CJ, Ackers JP. New rapid latex agglutination test for diagnosing *Trichomonas vaginalis* infection. J Clin Pathol 1988; 41: 806-8.
170. Alderete JF, Neace CJ. Identification, characterization, and synthesis of peptide epitopes and a recombinant six-epitope protein for *Trichomonas vaginalis* serodiagnosis. J Immuno Targets Ther 2013; 2: 91-103.
171. Huppert JS, Mortensen JE, Reed JL, *et al.* Rapid antigen testing compares favorably with transcription-mediated amplification assay for the detection of *Trichomonas vaginalis* in young women. Clin Infect Dis 2007; 45: 194-8.
172. Nye MB, Schwabke JR, Body BA. Comparison of APTIMA *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification to wet mount microscopy, culture, and polymerase chain reaction for diagnosis of trichomoniasis in men and women. Am J Obstet Gynecol 2009; 200: 188-195.
173. Soper D. Trichomoniasis: Under control or undercontrolled? Am J Obstet Gynecol 2004; 190: 281-290.
174. Andrea SB, Chapin KC. Comparison of Aptima *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification assay and BD affirm VPIII for detection of *T. vaginalis* in symptomatic women: performance parameters and epidemiological implications. J Clin Microbiol 2011; 49: 866-9.
175. Hardick J, Yang S, Lin S, Duncan D, Gaydos C. Use of the Roche LightCycler instrument in a real-time PCR for *Trichomonas vaginalis* in urine samples from females and males. J Clin Microbiol 2003; 41: 5619-22.
176. Pillay A, Lewis J, Ballard RC. Evaluation of Xenostrip-Tv, a rapid diagnostic test for *Trichomonas vaginalis* infection. J Clin Microbiol 2004; 42: 3853-6.
177. Hobbs MM, Kazembe P, Reed AW, *et al.* *Trichomonas vaginalis* as a cause of urethritis in Malawian men. Sex Transm Dis 1999; 26: 381-7.
178. Jones HE, Lippman SA, Caiaffa-Filho HH, Young T, van de Wijgert JH. Performance of a rapid self-test for detection of *Trichomonas vaginalis* in South Africa and Brazil. J Clin Microbiol 2013 ; 51: 1037-9.
179. Durel P, Roiron V, Siboulet A, Borel LJ. Systemic treatment of human trichomoniasis with a derivative of nitro-imidazole, 8823 RP. Br J Venereal Dis 1960; 36: 21-6.
180. Vázquez F, García MJ, Pérez F, Palacio V. *Trichomonas vaginalis*: treatment and resistance to nitroimidazoles. Enferm Infecc Microbiol Clin 2001; 19: 114-24.
181. Moreno SN, Docampo R. Mechanism of toxicity of nitro compounds used in the chemotherapy of trichomoniasis. Environ Health Persp 1985; 64: 199-208.
182. Bendesky A, Menendez D, Ostrosky-Wegman P. Is metronidazole carcinogenic? Mutat Res 2002; 511: 133-44.
183. WHO. The selection and use of essential medicines Report of the WHO Expert Committee, 2006; pp. 933.
184. OMS. Guías para el tratamiento de las infecciones de transmisión sexual. 2005; Organización Mundial de la Salud.
185. Gatski M, Kissinger P. Observation of probable persistent, undetected *Trichomonas vaginalis* infection among HIV-positive women. Clin Infect Dis 2010; 51: 114-5.
186. Kissinger P, Secor WE, Leichter JS, *et al.* Early repeated infections with *Trichomonas vaginalis* among HIV-positive and HIV-negative women. Clin Infect Dis 2008; 46: 994-9.
187. Kissinger P, Adamski A. Trichomoniasis and HIV interactions: a review. Sex Transm Infect 2013; 89: 426-33.
188. Van Der Pol B, Williams JA, Orr DP, Batteiger BE, Fortenberry JD. Prevalence, incidence, natural history, and response to treatment of *Trichomonas vaginalis* infection among adolescent women. J Infect Dis 2006; 192: 2039-44.
190. Karhunen M. Placental transfer of metronidazole and tinidazole in early human pregnancy after a single infusion. Br J Clin Pharmacol 1984; 18: 254-7.
191. Erickson SH, Oppenheim GL, Smith GH. Metronidazole in breast milk. Obstet Gynecol 1981; 57: 48-50.
192. Knox RJ, Knight RC, Edwards DI. Interaction of

- nitroimidazole drugs with DNA *in vitro*: structure-activity relationships. *Br J Cancer* 1981; 44: 741-5.
193. Leitsch D, Kolarich D, Binder M, Stadlmann J, Altmann F, Duchene M. *Trichomonas vaginalis*: metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by the flavin enzyme thioredoxin reductase and disrupt the cellular redox system. Implications for nitroimidazole toxicity and resistance. *Mol Microbiol* 2009; 72: 518-36.
 194. Land KM, Delgadillo-Correa MG, Tachezy J, *et al*. Targeted gene replacement of a ferredoxin gene in *Trichomonas vaginalis* does not lead to metronidazole resistance. *Mol Microbiol* 2004; 51: 115-22.
 195. Pal D, Banerjee S, Cui J, Schwartz A, Ghosh SK, Samuelson J. *Giardia*, *Entamoeba*, and *Trichomonas* enzymes activate metronidazole (nitroreductases) and inactivate metronidazole (nitroimidazole reductases). *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 458-64.
 196. Robinson SC. Trichomonal vaginitis resistant to metranidazole. *Can Med Assoc J* 1962; 86: 665.
 197. Meri T, Jokiranta TS, Suhonen L, Meri S. Resistance of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole: Report of the first three cases from Finland and optimization of *in vitro* susceptibility testing under various oxygen concentrations. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 763-7.
 198. Pérez S, Fernández-Verdugo A, Pérez F, Vázquez F. Prevalence of 5-nitroimidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* in Oviedo, Spain. *Sex Transm Dis* 2001; 28: 115-6.
 199. Dunne RL, Dunn LA, Upcroft P, O'Donoghue PJ, Upcroft JA. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Res* 2003; 13: 239-49.
 200. Smith J, Garber GE. Current status and prospects for development of a vaccine against *Trichomonas vaginalis* infections. *Vaccine* 2014; 32: 1588-94.
 201. Kulda J, Hrdy I. Hydrogenosome: The site of 5-nitroimidazole activation and resistance. In: Tachezy H, Ed. *Hydrogenosomes and mitochondria: Mitochondria of anaerobic eukaryotes*. Microbiology Monographs. Springer 2008; pp. 179-200.
 202. Rasolomon D, Tomkova E, Cammack R, Kulda J, Tachezy J. Metronidazole-resistant strains of *Trichomonas vaginalis* display increased susceptibility to oxygen. *Parasito* 2001; 123: 45-56.
 203. Schwebke JR, Barrientes FJ. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 4209-10.
 204. Kulda J, Tachezy J, Cerkasovova A. *In vitro* induced anaerobic resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. *J Eukaryot Microbiol* 1993; 40: 262-9.
 205. Sköld M, Gnarpe H, Hillstrom L. Ornidazole: a new antiprotozoal compound for treatment of *Trichomonas vaginalis* infection. *Brit J Vener Dis* 1977; 53: 44-8.
 206. Singh PP, Jain A. Trichomoniasis: chemotherapy, drug-resistance and new targets. *J Parasit Dis* 2007; 31: 79-91.
 207. Desrivot J, Waikedre J, Cabalion P, *et al*. Antiparasitic activity of some New Caledonian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2007; 112: 7-12.
 208. de Villiers BJ, van Vuuren SF, van Zyl RL, van Wyk BE. Antimicrobial and antimalarial activity of *Cussonia* species (Araliaceae). *J Ethnopharm* 2010; 129: 189-96.
 209. Cheikh-Ali Z, Adiko M, Bouttier S, *et al*. Composition, and antimicrobial and remarkable antiprotozoal activities of the essential oil of rhizomes of *Aframomum sceptrum* K. Schum.(Zingiberaceae). *Chem Biodivers* 2011; 8: 658-67.
 210. Calzada F, Yépez-Mulia L, Tapia-Contreras A. Effect of Mexican medicinal plant used to treat trichomoniasis on *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *J Ethnopharmacol* 2007; 113: 248-51.
 211. Muelas-Serrano S, Nogal JJ, Martínez-Díaz RA, Escario JA, Martínez-Fernández AR, Gómez-Barrio A. *In vitro* screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. *J Ethnopharm* 2000; 71, 101-7.
 212. Gómez-Barrio A, Martínez-Grueiro MM, Montero D, *et al*. *In vitro* antiparasitic activity of plant extracts from Panama. *Pharm Biol* 2004; 42: 332-7.
 213. Frasson AP, dos Santos O, Duarte M, *et al*. First report of anti-*Trichomonas vaginalis* activity of the medicinal plant *Polygala decumbens* from the Brazilian semi-arid region, Caatinga. *Parasitol Res* 2012; 110: 2581-7.
 214. Brandelli, C.L.C., Vieira, P.D.B., Macedo, A.J., Tasca, T., 2013. Remarkable anti-*Trichomonas vaginalis* activity of plants traditionally used by the Mbya-Guarani indigenous group in Brazil. *Biomed Res Int* 2013: 1-7.
 215. Tasca Cargnin S, de Brum Vieira P, Cibulski S, *et al*. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of *Hypericum polyanthemum* extract obtained by supercritical fluid extraction and isolated compounds. *Parasitol Int* 2013; 62: 112-7.
 216. Vital PG, Rivera WL. Antimicrobial activity, cytotoxicity, and phytochemical screening of *Voacanga globosa* (Blanco) Merr. leaf extract (Apocynaceae). *Asian Pacific J Trop Med* 2011; 4: 824-8.
 217. Ertabaklar H, Kivcak B, Mert T, TÖZ SÖ. *In vitro* activity of *Arbutus unedo* leaf extracts against *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *Türkiye Parazitolo Derg* 2009; 33: 263-4.
 218. Martin T, Villaescusa L, Gasquet M, *et al*. Screening for protozoocidal activity of Spanish plants. *Pharm Biol* 1998; 36: 56-62.
 219. Martínez-Díaz RA, Ibáñez-Escribano A, Burillo J, *et al*. Trypanocidal, trichomonocidal and cytotoxic components of cultivated *Artemisia absinthium*

- Linnaeus (Asteraceae) essential oil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2015; 110: 693-9.
220. Youse HA, Kazemian A, Sereshti M, *et al.* Effect of *Echinophora platyloba*, *Stachys lavandulifolia*, and *Eucalyptus camaldulensis* plants on *Trichomonas vaginalis* growth *in vitro*. Adv Biomed Res 2012; 1: 1-3.
221. Hassani S, Asghari G, Yousefi H, Kazemian A, Rafieian M, Darani HY. Effects of different extracts of *Eucalyptus camaldulensis* on *Trichomonas vaginalis* parasite in culture medium. Adv Biomed Res 2013; 2: 1-11.
222. Taran M, Rezaeian M, Izaddoost M. *In vitro* antitrichomonas activity of *Allium hirtifolium* (Persian Shallot) in comparison with metronidazole. Irian J Public Health 2006; 35: 92-4.
224. Sánchez-Arreola E, Hernández-Molina LR, Sánchez-Salas JL, Martínez-Espino G. Alkaloids from *Bocconia frutescens*. and biological activity of their extracts. Pharm Biol 2006; 44: 540-3.
225. Esquenazi D, Wigg MD, Miranda MM, *et al.* Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn.(Palmae) husk fiber extract. Res Microbiol 2002; 153: 647-52.
226. Barbosa E, Calzada F, Campos R. *In vivo* anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. J Ethnopharmacol 2007; 109: 552-4.
227. Damke E, Tsuzuki JK, Chassot F, *et al.* Spermicidal and anti-*Trichomonas vaginalis* activity of Brazilian *Sapindus saponaria*. BMC Complement Altern Med 2013; 13: 196-204.
228. de Brum Vieira P, Giordani RB, Macedo AJ, Tasca T. Natural and synthetic compound anti-*Trichomonas vaginalis*: an update review. Parasitol Res 2015; 114: 1249-61.
229. Helms DJ, Mosure DJ, Secor WE, Workowski KA. Management of *Trichomonas vaginalis* in women with suspected metronidazole hypersensitivity. Am J Obstet Gynecol 2008; 198: 370-2.
230. Nyirjesy P, Gilbert J, Mulcahy LJ. Resistant trichomoniasis: successful treatment with combination therapy. Sex Transm Dis 2011; 38: 962-3.
231. Schwebke JR, Lensing SY, Sobel J. Intravaginal metronidazole/tinidazole for the treatment of vaginal trichomoniasis. Sex Transm Dis 2013; 40: 710-4.
232. Secor WE. *Trichomonas vaginalis*: treatment questions and challenges. Expert Rev Anti Infect Ther 2012; 10: 107-9.
233. Aggarwal A, Shier RM. Recalcitrant *Trichomonas vaginalis* infections successfully treated with vaginal acidification. J Obstet Gynaecol Can 2008; 30: 55-8.
234. Narcisi EM, Secor WE. *In vitro* effect of tinidazole and furazolidone on metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 1121-5.
235. Adagu IS, Nolder D, Warhurst DC, Rossignol JF. *In vitro* activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. J Antimicrob Chemother 2002; 49: 103-11.
236. Wright JM, Dunn LA, Kazimierczuk Z, *et al.* Susceptibility *in vitro* of clinically metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* to nitazoxanide, toyocamycin, and 2-fluoro-2'-deoxyadenosine. Parasitol Res 2010; 107: 847-53.
237. Blaha C, Duchêne M, Aspöck H, Walochnik J. *In vitro* activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against metronidazole-resistant and-susceptible strains of *Trichomonas vaginalis*. J Antimicrob Chem 2006; 57: 273-8.
238. Dorlo TP, Balasegaram M, Beijnen JH, de Vries PJ. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. J Antimicrob Chem 2012; 67: 2576-97.
239. Rocha DAS, de Andrade Rosa I, de Souza W, Benchimol M. Evaluation of the effect of miltefosine on *Trichomonas vaginalis*. Par Res 2014; 113: 1041-7.
240. Wilkinson D, Ramjee G, Tholandi M, Rutherford G. Nonoxynol-9 for preventing vaginal acquisition of sexually transmitted infections by women from men. Cochrane Database Syst Rev 2002; 4: CD003939.