Tesis N°240
MFN 4865
DM
s/PDF
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA
BIBLIOTECA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Tesina presentada para obtener el grado académico de
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

EFECTO DE INHIBIDORES DE LA POLIMERIZACIÓN DE LA TUBULINA EN LA DIVISIÓN DE *Tritrichomonas foetus*

MARIA SOLEDAD TREFFINGER CIENFUEGOS

SANTA ROSA (LA PAMPA) ARGENTINA

2018

Prefacio

Esta tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Laboratorio de Ecología y Biotecnología, dependiente del Departamento de Biología, durante el período comprendido entre el 02 de diciembre de 2016 y el 20 de marzo de 2018, bajo la dirección de Jorge OYHENART y bajo la codirección de Ricardo ROUAUX.

Agradecimientos

A mi familia.

A Jorge.

A Ricardo, Franco, Fani, Mariana y Florencia.

A Alicia, Santiago, Gabriela y Alberto.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Reda, Alexad

M. TONT.

Jorge Oyhenart

Resumen

La Trichomonosis es una enfermedad venérea producida por *Tritrichomonas foetus* que afecta al ganado bovino doméstico (*Bos taurus*). Actualmente no existen tratamientos y/o vacunas realmente eficaces contra la enfermedad. Uno de los motivos de esta carencia es la falta de información respecto de la biología de *T. foetus.* Este protozoo se caracteriza por una estructura fusiforme con tres flagelos anteriores y uno recurrente que forma la membrana ondulante. No se conoce una fase diploide ni la existencia de meiosis en su ciclo celular. Su genoma es de ~170.000 pb fraccionadas en cinco cromosomas.

Para el conteo de cromosomas se ha empleado la colchicina como droga antimitótica, aunque la información respecto de su eficacia es contradictoria. Se estudió el efecto de esta y otras drogas que se unen a tubulinas tales como el mebendazol, albendazol y griseofulvina en el desarrollo del ciclo celular, para determinar su potencialidad de uso en técnicas citogenéticas. Ninguna de estas tiene capacidad para detener la cariocinesis, aunque sí mostraron un efecto trichomonicida. Si bien el efecto es reversible, podrían representar alternativas terapéuticas, no disponibles hasta el momento.

Abstract

Trichomonosis is a venereal disease of cattle (*Bos taurus*) caused by *Tritrichomonas foetus*. There is no effective vaccine to prevent the disease. There is no cure for an infected animal which must be culled. *T. fetus* is characterized by a fusiform structure with three anterior flagella and a recurrent one that forms an undulating membrane. *T. fetus* is haploid and there would be no meiosis in its life cycle. *T. fetus* genome is ~ 170,000 bp and it is splitted into five chromosomes.

Karyotype analysis included the use of the antimitotic drug colchicine. However colchicine efficacy in trichomonads is contradictory. We studied the effect of this drug and found no effect on cell or nucleous division. Then we tested other drugs that bind tubulins to determine its potential use in cytogenetic techniques. Mebendazole, albendazole and griseofulvin did not show capacity to stop karyokinesis. All three drugs showed strong anti-T. foetus effect which makes them advisable as therapeutic alternatives.

Índice

Introducción.....1

Materiales y Métodos.....4

Resultados.....6

Discusión.....14

Bibliografía.....16

Introducción

La Trichomonosis es una enfermedad venérea producida por *Tritrichomonas foetus* que afecta al ganado bovino doméstico (*Bos taurus*). En el macho el microorganismo se encuentra en el lumen de la mucosa de la cavidad prepucial, siendo una enfermedad asintomática y crónica, principalmente en toros de más de 5 años (Campero, *et al.* 2006). En la hembra, *T. foetus* se encuentra en la vagina, cérvix, útero y oviductos, produciendo vaginitis, endometriosis, infertilidad y abortos (Singh, *et al.* 2004). Esta es una enfermedad con una gran capacidad de contagio durante la reproducción natural, por lo que produce significativas pérdidas económicas en el sector ganadero de muchos países, principalmente en aquellos con ganadería extensiva y servicio natural, entre los que se encuentra Argentina (Doumecq y Soto, 2012).

Actualmente, no existen vacunas o tratamientos realmente eficaces contra la enfermedad. Si bien se han estudiado los mecanismos de inmunización, el conocimiento de la biología del microorganismo es muy escaso. *T. foetus* pertenece al clado Parabasalia, que incluye a los eucariotas microaerofílicos carentes de mitocondrias, pero con organelas análogas denominadas hidrogenosomas (Adl, *et al.* 2012). Morfológicamente, *T. foetus* se caracteriza por un cuerpo celular fusiforme de entre 10 y 15 µm de longitud, con un núcleo anterior, tres flagelos anteriores libres y uno recurrente adherido a la membrana celular, que forma una membrana ondulante. En condiciones de estrés térmico se ha observado la internalización de los flagelos y cuerpo celular esférico (Granger, *et al.* 2000). El citoesqueleto, altamente complejo, está compuesto por un eje longitudinal denominado complejo pelta-axostilo y varias estructuras asociadas, tales como los cuerpos basales, que se relacionan con los flagelos (Benchimol, 2004).

Previo a la división celular, dada por una pleuromitosis cerrada en este grupo, los cromosomas se condensan y las estructuras del citoesqueleto se duplican. El proceso comienza con la segregación de los cuerpos basales, que conlleva el movimiento del complejo pelta-axostilo y los flagelos en el extremo anterior de la célula. Durante la endomitosis se han observado varios puntos de contacto entre la membrana nuclear y los cromosomas, lo que sugiere que la membrana nuclear cumple un rol importante en la conexión entre los cromosomas y el huso mitótico (Ribeiro, *et al.* 2002). Gradualmente, el núcleo se ubica entre los dos axostilos y éstos comienzan un proceso de torsión que finaliza con estas estructuras en disposición antiparalela. En consecuencia, el núcleo sería presionado por estas estructuras, lo que culmina con la cariocinesis (Ribeiro, *et al.* 2000).

Los escasos estudios genéticos que se han realizado de este organismo describen un genoma de ~ 170.000 pb distribuidos en cinco cromosomas (Zubácová, *et al.* 2008). No se conoce una fase diploide ni la existencia de meiosis. El alto grado de repetitividad dentro del genoma dificulta el ordenamiento de este, por lo que la localización de los genes en los diferentes *loci* no se conoce con certeza. Las duplicaciones de genes relacionados con la motilidad no han afectado sensiblemente a la secuencia proteica, lo que sugiere que se ha añadido mayor cantidad de proteína, con ligeros cambios relacionados a la utilidad de las múltiples estructuras del citoesqueleto presentes (Oyhenart y Breccia, 2014). Por el contrario, las duplicaciones de genes metabólicos habrían experimentado cambios significativos en la secuencia proteica y probablemente en la actividad de estas. Sumado a esto, la gran variación en la expresión proteica permite suponer que el patógeno presenta una gran capacidad de adaptación a los diferentes ambientes en los que se puede encontrar.

El diagnóstico de tricomonosis es perfectible y debería posibilitar la caracterización de propiedades intraespecíficas del parásito. Esto no es posible si no existe información clara respecto a la biología del organismo, por lo que es necesario el estudio de la variabilidad intraespecífica existente, lo que puede lograrse mediante el análisis de cariotipos de diferentes cepas.

El protocolo que se ha aplicado en *T. foetus* utiliza la colchicina como droga antimitótica (Zubácová, *et al.* 2008; Xu, *et al.* 1998). Sin embargo, hemos aplicado este protocolo en nuestro laboratorio y no se ha observado tal efecto. Además, existe evidencia de que este grupo es resistente a dicha droga (Dostál y Libusová, 2014). La optimización de la técnica de observación de cariotipo implica indagar los efectos de otras drogas con conocida capacidad antimitótica en la división de *T. foetus*.

Las drogas derivadas del benzimidazol, tales como el albendazol y el mebendazol, han sido ampliamente utilizadas en tratamientos antiparasitarios. Esta familia afecta a las subunidades de ß-tubulinas de los microtúbulos. Las células tratadas con mebendazol presentan formas redondeadas y vacuoladas, con flagelos internos y no exhiben movilidad. En contraste, las células tratadas con albendazol no presentan cambios morfológicos remarcables (Carvalho, *et al.* 2007). La griseofulvina, una droga antifúngica, detiene la división de *Trichomonas vaginalis* en los estadíos tempranos de la mitosis, ya que inhibe la polimerización de la tubulina. Los individuos tratados con esta droga muestran mayor tamaño que aquellos no tratados. Además, en las células tratadas el complejo pelta-axostilo no es visible (Nöel, *et al.* 2003). Los efectos descriptos anteriormente permiten suponer

que estas drogas presentan capacidad antimitótica en *T. foetus*, y que su uso puede optimizar la técnica del estudio del cariotipo de esta especie.

Este trabajo se basa en el supuesto de que una droga con reconocida capacidad para unir una tubulina (alfa o beta) puede detener la división de los cromosomas de *T. foetus*.

Los objetivos de este trabajo fueron entonces:

1. Determinar el efecto de drogas que inhiben la polimerización o despolimerización de tubulinas en la división celular de *T. foetus*.
2. Observar variaciones morfológicas en el núcleo de *T. foetus* tratado con estas drogas.
3. Evaluar su uso en la identificación y caracterización de cromosomas de *T. foetus*.

Materiales y métodos

Cultivo de *T. foetus*

Para el presente trabajo se utilizó la cepa B1 de *T. foetus*, aislada de una hembra con piómetra en la EEA INTA Balcarce y conservada en EEAs de INTA y en el laboratorio de Biotecnología de la UNLPam. El cultivo se realizó en caldo infusión de hígado suplementado con 10% de suero equino, penicilina (100 UI/mL) y estreptomicina (100 µg/mL), a 37°C y mantenido con 2-3 repiques semanales.

Curva de crecimiento

Se realizaron cultivos con concentraciones de 0,06 y 0,66 cel/µL por duplicado, y se midió la concentración celular cada 24 horas.

Efecto de drogas en crecimiento y morfología

Los trofozoitos (500 cel/µL) fueron inoculados a 37°C en medio con concentraciones variables de Colchicina (C9754, SIGMA), Griseofulvina (INVESTI), Albendazol (Dr. Lazar y Cía. S.A.Q. e I.) o Mebendazol (ANDRÓMACO) durante 4-24 hrs. Luego se estimó el número y morfología celular mediante observación directa en microscopio óptico con un aumento final de 1000x. Se utilizó T15 como tinción de contraste de estructuras celulares.

Imágenes

Las imágenes se obtuvieron en un microscopio Leica MD 500 en 30 campos por preparado. El tratamiento y manipulación de imágenes se limitó al contraste para la visualización de estructuras intracelulares.

Reversibilidad

La reversibilidad del efecto de las drogas se evaluó tras la incubación de células (500 cel/µL) con concentraciones crecientes de cada una transcurridas 6 hrs y luego de una reincubación en medio fresco por 18 hrs. Cada conteo en cámara de Malassez se hizo por triplicado. Las concentraciones empleadas fueron 100 µg/mL, 207 µg/mL y 300 µg/mL de Griseofulvina (INVESTI), 1 µg/mL, 2,5 µg/mL y 5 µg/mL de Albendazol (Dr. Lazar y Cía. S.A.Q. e I.) y 0,5 µg/mL, 0,7 µg/mL y 1 µg/mL de Mebendazol (ANDRÓMACO).

Análisis estadísticos

Para el análisis de diferencias en el número de células por campo se realizó una prueba ANOVA. El efecto de los tratamientos en la morfología celular se observó mediante diferencia de proporciones de células fusiformes contrastando poblaciones de a pares. El análisis de reversibilidad se realizó mediante una prueba Kruskal-Wallis a las 24 hrs de tratamiento. Estos análisis fueron realizados empleando el software Infostat (descargado desde www.infostat.com.ar).

Resultados

Curva de crecimiento

El tiempo de duplicación y el tiempo transcurrido entre divisiones puede variar con el medio de cultivo. Para conocer el comportamiento de la cepa B1 de *T. foetus* en el medio de cultivo a utilizar en este trabajo, se sembraron concentraciones diferentes del microorganismo, se contaron diariamente durante una semana y se estableció una curva tipo de crecimiento (Fig. 1). El tiempo generacional de *T. foetus* se estimó a partir de la curva mediante la fórmula $g = \frac{(t-t_0)\cdot\log 2}{\log N - \log N_0}$ y resultó en aproximadamente 4,3 hrs. En un lapso de 24 hrs la cepa B1 experimentó entre 5 y 6 divisiones. Por otra parte, la máxima concentración de células obtenidas en este medio fue de ~6 x 10^6 células por mililitro, decayendo la viabilidad a un ritmo similar al que se alcanzara la saturación. Por estas razones los ensayos posteriores se realizaron según un esquema que consiste en sembrar 5 x 10^5 células por mililitro, incubadas a 37°C durante 24 hrs. Los distintos tratamientos se realizaron con el cultivo en fase exponencial.

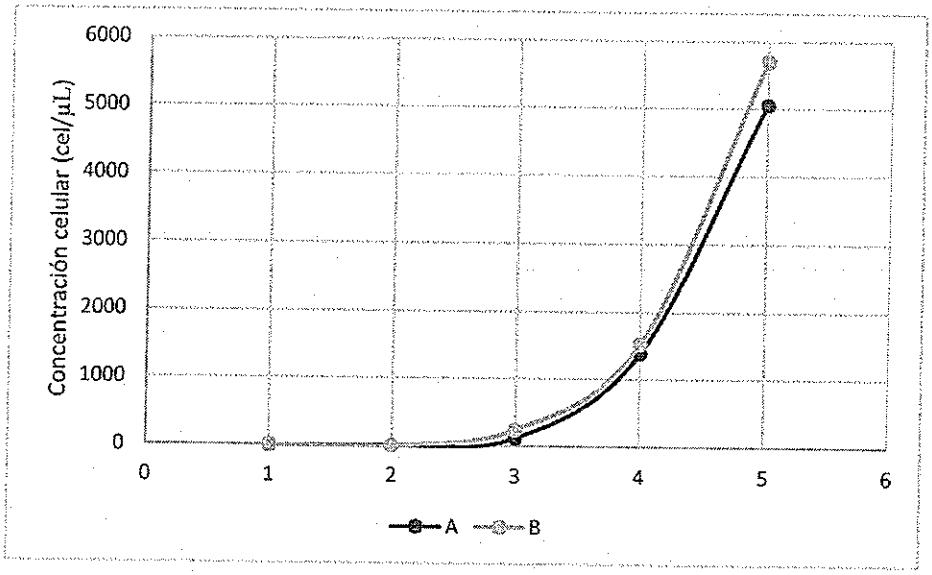

Fig. 1. Curva de crecimiento de *T. foetus* con una concentración inicial de 0,06 y 0,66 cel/µL, medido cada 24 hrs.

Efecto de drogas en el crecimiento celular

Los tratamientos realizados con colchicina no presentaronn cambios significativos en el crecimiento celular respecto del control. Tanto los benzimidazoles testeados como la griseofulvina mostraron inhibición del crecimiento de *T. foetus*. La droga que mayor

efecto produjo fue el albendazol en todas las concentraciones aplicadas, mientras que el mebendazol y la griseofulvina presentaron el mismo efecto en concentraciones de drogas altas, y un efecto menor a concentraciones medias y bajas (Fig. 2).

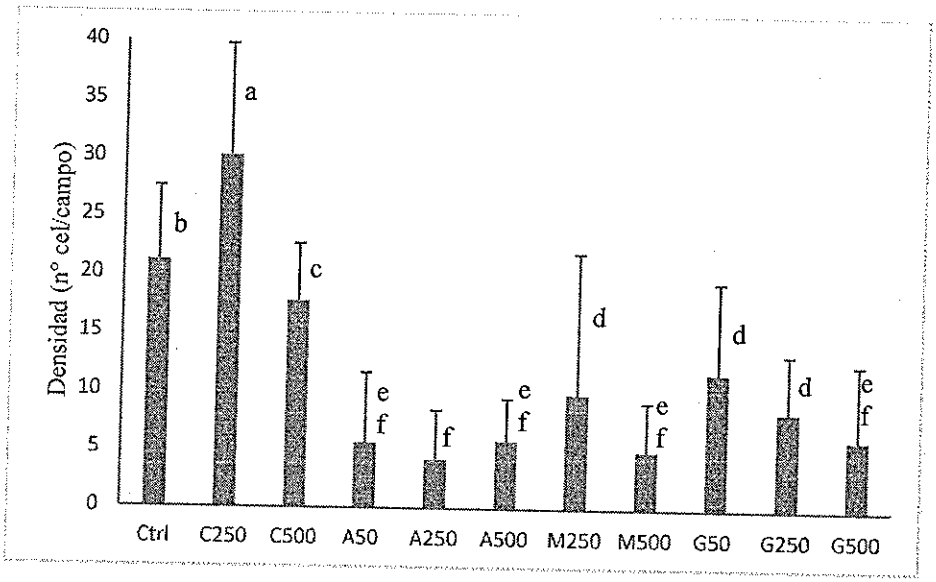

Fig. 2. Densidad celular (n° de células/campo) a las 24 hrs de tratamiento con colchicina, albendazol, mebendazol y griseofulvina en tres concentraciones crecientes (50 µg/ml, 250 µg/ml y 500 µg/ml). valor-p<0,0001. Letras diferentes implican diferencias significativas entre tratamientos. Los tratamientos de C50 y M50 fueron descartados debido a la presencia de contaminación.

Efecto de drogas en morfología celular

Se espera que una droga adecuada para el estudio del cariotipo de *T. foetus* detenga la división celular en metafase en una proporción elevada de células. En la Figura 3 se observa un preparado en el cuál la mayoría de las células se encuentran en división. Los trofozoitos se caracterizan por presentar el citoplasma y los flagelos poco teñidos y un núcleo de aspecto granular, que se corresponde con la condensación de la cromatina en 5 cromosomas duplicados.

Como se observa en la Figura 4, las células no tratadas presentaron una estructura fusiforme con tres flagelos anteriores, un flagelo recurrente que forma la membrana ondulante y un núcleo anterior. Se observó en este tratamiento (Ctrl, Fig. 5) una baja

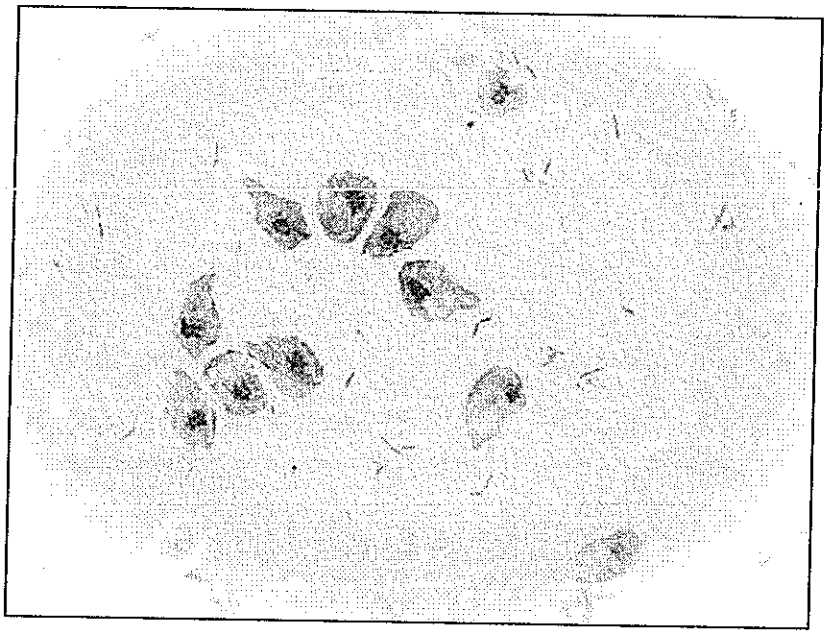

Figura 3. Microfotografía de *T. foetus* en metafase con un aumento total de 1000x.

proporción de células en división, que muestran las estructuras anteriormente descriptas duplicadas y con una clara simetría explicada por una división longitudinal.

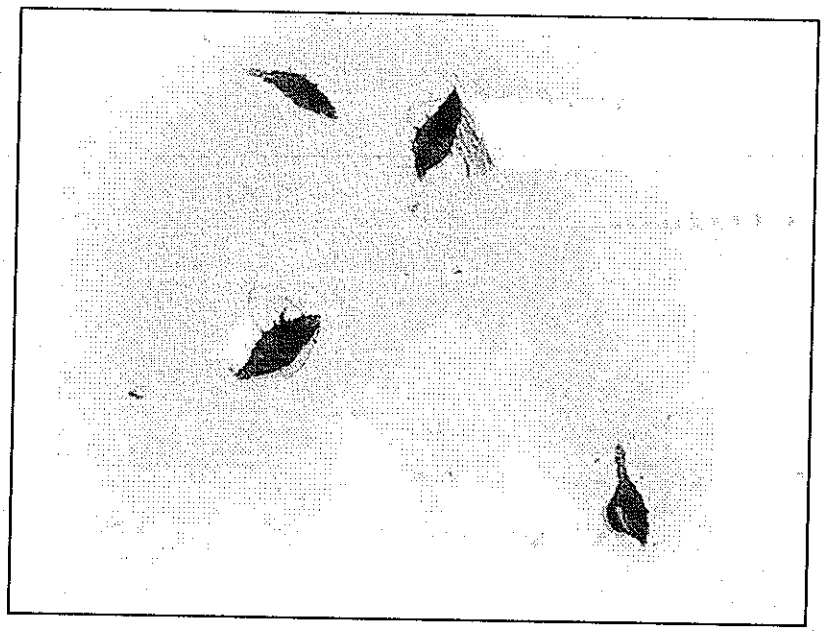

Figura 4. Microfotografía de *T. foetus* con un aumento total de 1000x sin tratamiento.

Ninguna de las drogas testeadas en este ensayo tuvo un efecto claro en la detención de la división en metafase. Sin embargo, la proporción morfológica de células entre cada uno de ellos varió considerablemente (Fig. 5). Todos los tratamientos presentaron aproximadamente el 10% de células binucleadas, es decir, células en división en las que

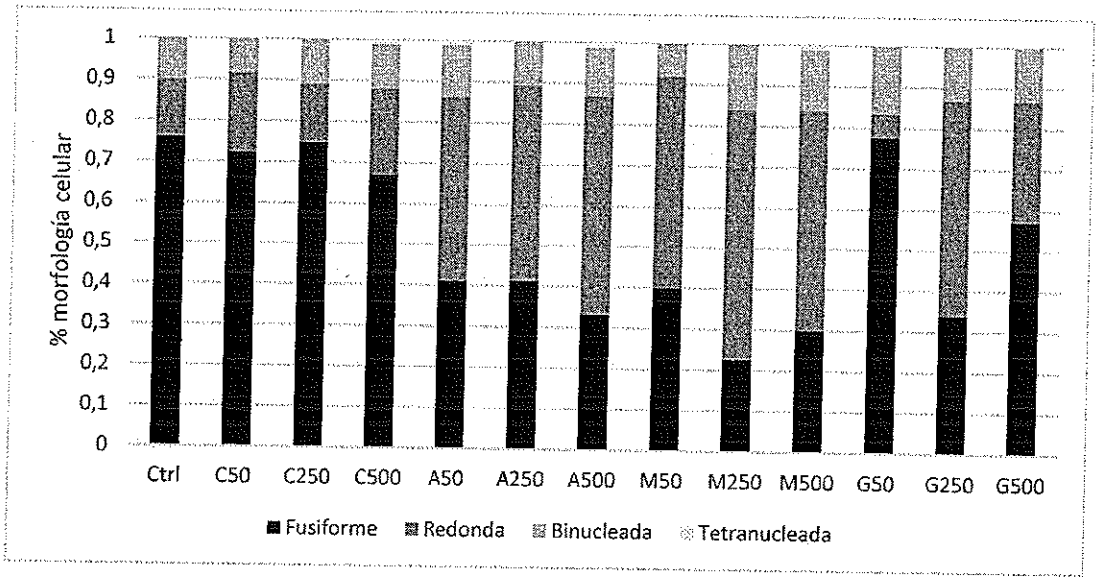

Figura 5. Proporción de células en preparados realizados con cultivos en ausencia o con 50 µg/mL, 250 µg/mL o 500 µg/mL de colchicina, albendazol, mebendazol o griseofulvina.

el proceso de cariocinesis ha concluido, pero no así el de citocinesis. Las diferencias más notables de proporciones se dieron entre células uninucleadas de aspecto fusiforme y aquellas más redondeadas. La colchicina no afectó a la morfología celular, mientras que las drogas como el albendazol y el mebendazol presentaron una proporción significativamente menor de células fusiformes, un aumento de células uninucleadas no fusiformes y un bajo porcentaje de células multinucleadas. La griseofulvina, en cambio, afectó significativamente a la proporción de células fusiformes en la población a concentraciones mayores a 50 µg/mL (Tabla 1).

Tabla 1. Valor-p de diferencia de proporciones de células fusiformes contrastado de a pares de poblaciones. Valor-p menor a 0,05 implica diferencias significativas en la proporción.

	Ctrl	C50	C250	C500	A50	A250	A500	M50	M250	M500	G50	G250	G500
Ctrl	-	0,54	0,87	0,16	1E-06	1E-06	1E-07	1E-07	1E-07	1E-07	0,86	1E-07	0,005
C50	-	-	0,76	0,46	3E-06	4E-06	1E-07	2E-06	1E-07	3E-06	0,43	1E-07	0,024
C250	-	-	-	0,22	1E-06	1E-06	1E-07	1E-07	1E-07	1E-07	0,63	1E-07	0,007
C500	-	-	-	-	3E-04	3E-04	7E-06	1E-04	1E-07	1E-07	0,11	2E-06	0,15
A50	-	-	-	-	-	1	0,29	0,886	0,005	0,107	1E-07	0,317	0,026
A250	-	-	-	-	-	-	0,29	0,887	0,005	0,108	1E-07	0,318	0,026
A500	-	-	-	-	-	-	-	0,36	0,105	0,63	1E-07	1	0,001
M50	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	0,142	1E-07	0,389	0,017
M250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,268	1E-07	0,07	1E-07
M500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1E-07	0,554	1E-04
G50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1E-07	0,002
G250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9E-04
G500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Aunque la colchicina no presentó efectos en el crecimiento celular, si se observó que la división de estas células es variable, presentando formas longitudinales, oblicuas y transversales (Fig. 6a). La técnica de coloración empleada permitió ver diferencias marcadas en el citoplasma de células en cultivo con albendazol, mebendazol o griseofulvina indicando un modo de acción diferente entre las tres drogas. Los cambios morfológicos más notables se dieron con los benzimidazoles. Las células tratadas con albendazol presentaron vacuolas citoplasmáticas en tamaño y número variables. El número de flagelos anteriores por célula se observó reducido a uno o dos, y no se observó el flagelo posterior (Fig. 6b). Las células tratadas con mebendazol (Fig. 6c) presentaron el cambio morfológico más relevante. En este tratamiento no se observó un límite definido de la membrana celular y el número y posición de los flagelos fue muy variable, aunque nunca se presentaron más de cuatro flagelos por núcleo. La disposición de los núcleos y material citoplasmático asociado fue grupal, por lo que se infiere que estas células no presentaron movilidad. En el detalle de la Figura 6c se observa una clara metafase, que, si bien era el estado esperado en este ensayo, se presentó en un bajo porcentaje de núcleos, por lo que puede atribuirse al ciclo celular y no al tratamiento aplicado. Los cultivos tratados con griseofulvina (Fig. 6d) no presentaron cambios morfológicos considerables en concentraciones bajas, mientras que en concentraciones medias y altas se observó una mayor proporción de células redondeadas (sin mostrar metafase) y de células binucleadas.

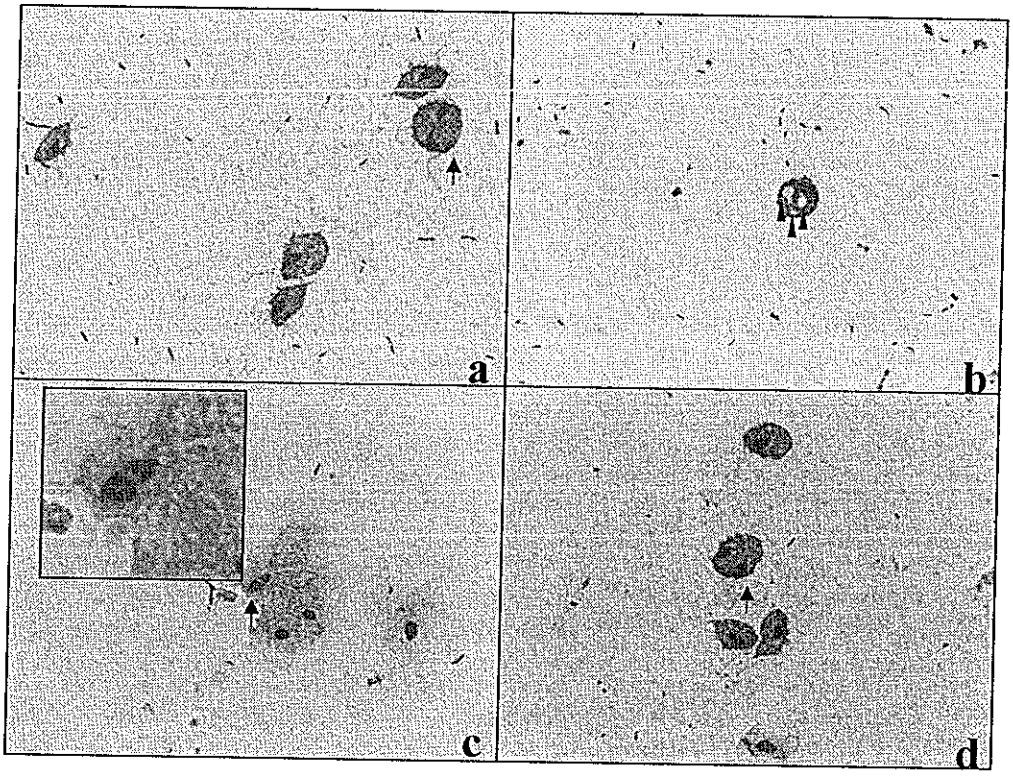

Figura 6. Microfotografía de *T. foetus* con un aumento total de 1000x tratadas con colchicina (a), albendazol (b), mebendazol (c) y griseofulvina (d), a una concentración de 500 µg/mL. Puntas de flecha indican vacuolas, flechas indican células en división.

Reversibilidad

Ninguna de las drogas examinadas demostró capacidad de bloquear la cariocinesis por lo que no son de utilidad para la detención de los núcleos en metafase y su visualización. Sin embargo, las tres drogas exploradas parecen tener un efecto importante en el crecimiento de *T. foetus*.

Dado que un bovino infectado con trichomonosis debe ser excluido del establecimiento sin posibilidad de tratarlo, se exploró en un último experimento la eficacia de estas drogas buscando la concentración inhibitoria y la reversibilidad de su efecto sobre células en cultivo.

Las concentraciones inhibitorias de albendazol y mebendazol utilizadas en estos ensayos resultaron similares a las halladas en otros estudios (Carvalho, 2007). La concentración inhibitoria de la griseofulvina fue de 207 µg/mL.

UNLPam F.A. R.P. Nº 99669

Las tres drogas evaluadas mostraron un efecto reversible en el crecimiento de *T. foetus* luego de incubarlas durante 6 hrs en las concentraciones testeadas. Sin embargo, se ha observado respuestas diferentes en cada una de las drogas analizadas.

Los cultivos incubados con albendazol arrojaron datos significativamente diferentes a un valor de significancia de 0,05 (valor-p=0,0286). No obstante, las diferencias de crecimiento entre poblaciones son incoherentes respecto de las concentraciones utilizadas en cada una de ellas, por lo que estos resultados no son concluyentes (Fig. 7a). La respuesta del crecimiento celular a la incubación del mebendazol fue nula (Fig. 7b). A pesar de que se observaron grandes cambios morfológicos en las células tratadas con esta droga, los cultivos no presentaron diferencias significativas transcurridas 18 hrs de crecimiento en medio sin presencia de droga (valor-p=0,2095). La respuesta más clara de los cultivos a las distintas concentraciones de droga se observó con la incubación en griseofulvina (Fig. 7c). Si bien se observa una relación inversamente proporcional entre el número celular y la concentración de droga utilizada, la diferencia es significativa entre el cultivo control y el cultivo incubado con mayor concentración, 300 µg/mL, con un valor-p=0,0210.

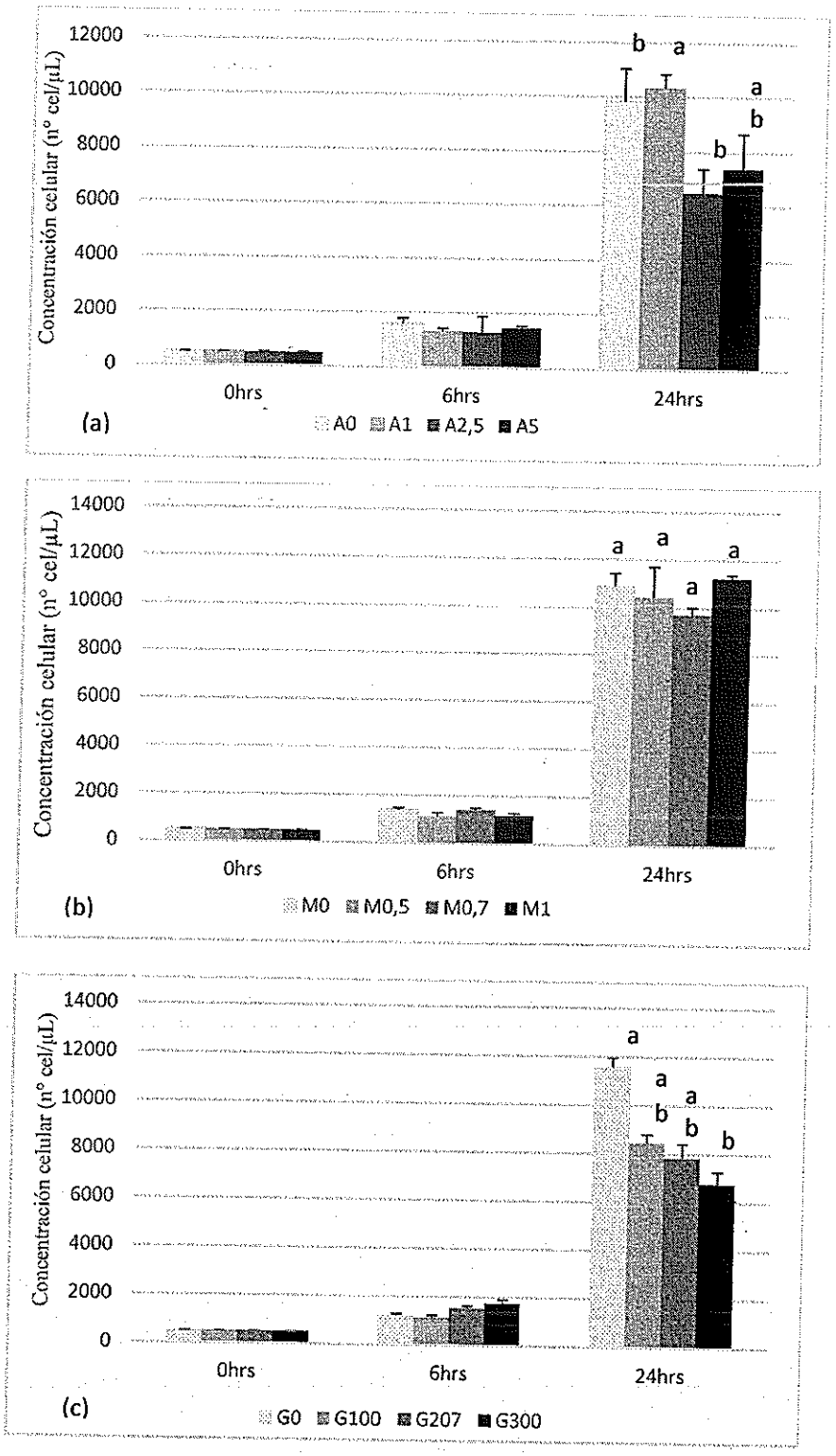

Figura 7. Ensayos de reversibilidad tratados con albendazol (a), mebendazol (b) y griseofulvina (c), medidos tras 6 hrs de incubación en distintas concentraciones de drogas y a las 18 hrs posteriores trasferidas a medio fresco. Letras diferentes implican diferencias significativas entre tratamientos.

Discusión

Se evaluaron algunas drogas que interfieren con la polimerización/despolimerización de tubulina por su capacidad para detener la división nuclear de *T. foetus* y permitir el estudio detallado de la división celular y cariotipo del protozoo.

La colchicina es una droga conocida por su efecto antimitótico sobre células eucariotas de organismos superiores ampliamente utilizada como droga anticancerígena (Bader, *et al.* 2016; Mandhare, *et al.* 2016). Algunos autores han descripto el efecto de esta droga sobre protozoarios. En *Trypanosoma cruzi* se ha observado que el efecto de la colchicina es reversible; la colchicina detiene la división celular pero una vez que los cultivos son reincubados en medio fresco, el número de núcleos y flagelos varía en las células hijas (Potenza, *et al.* 2015). En tricomonadidos se observó la formación de pseudoquistes, caracterizados por una forma esférica y la internalización de los flagelos (Madeiro da Costa, *et al.* 2004). A pesar de estas observaciones, se ha postulado que los protozoos son resistentes a la colchicina debido a que la estructura conformacional de las β-tubulinas (usando como organismo modelo a *Leishmania* sp.) no presentan sitios de unión a colchicina disponibles (Dostál y Libusová, 2014). Nuestros resultados no muestran efecto alguno de la colchicina sobre el crecimiento celular ni la morfología de *T. foetus*. Si bien esta droga ha sido ampliamente utilizada en el estudio del cariotipo de *T. foetus* y otros tricomonadidos (Xu, *et al.* 1998; Zubácová, *et al.* 2008), la evidencia expuesta nos permite concluir que esta droga no es adecuada para la obtención y visualización de cariotipo de *T. foetus*.

Diversos estudios de los efectos de los benzimidazoles en protozoarios presentan distintos resultados. Los protozoarios son susceptibles a los benzimidazoles debido a que la β-tubulina de este grupo presenta dos sitios de unión a esta droga (Katiyar, *et al.* 1994). Al utilizar un rango de concentraciones de benzimidazoles similar al empleado por otros autores, por ejemplo Carvalho, *et al.* (2007) se encontró un efecto cuantitativo menor al que estos autores indican; esto puede atribuirse a la actividad de las drogas empleadas, aunque se observaron cambios morfológicos similares. Se han testeado al menos 9 análogos sintéticos de benzimidazoles como agentes antiparasitarios en *T. vaginalis* y *Giardia lamblia,* obteniendo resultados favorables en todos los tratamientos (Navarrete-Vázquez, *et al.* 2003). El albendazol y el mebendazol también han sido probados en tricomonadidos como *Histomona meleagridis*, sin obtener efecto aparente (Hauck, *et al.* 2009). Debido a la evidencia existente, es probable que los tiempos de incubación y/o

concentraciones utilizadas en los ensayos de reversibilidad no hayan sido suficientes para generar una respuesta mayor en *T. foetus*. Otra explicación probable resultaría de la variabilidad presente en este grupo de protozoarios y a una sensibilidad reducida de la cepa empleada en este estudio.

Los efectos observados en los tratamientos con griseofulvina han sido similares a los observados por Mariante, *et al* (2006). Estos autores describen, a través de microscopia electrónica, una fragmentación del complejo pelta-axostilo y una intensa vacuolización del citoplasma en células tratadas. Estas características no han sido descriptas aquí debido a las propias limitaciones ópticas de los métodos utilizados. Hemos observado la pérdida de movilidad de las células luego de la incubación con griseofulvina. Con 6 hrs de incubación en esta droga y luego una reincubación en medio fresco, se ha observado que el efecto es reversible. Sin embargo, Mariante, *et al.* (2006, op. cit.) encontraron que el efecto es completamente irreversible cuando la incubación se realiza por 12 hrs. Los efectos observados de la griseofulvina sobre *T. vaginalis* consistieron en la formación de pequeñas vesículas citoplasmáticas y la condensación de la cromatina, diferente a la descripta en una metafase, por lo que esto puede darse como efecto del tratamiento y no por la detención del ciclo celular en la mitosis (Nöel, *et al.* 2003).

Mediante el trabajo realizado hemos evaluado el efecto de la colchicina en el estudio del cariotipo y podemos concluir que, a pesar de que actualmente se utiliza en citogenética de protozoarios, no es una droga adecuada para la obtención y visualización de cromosomas de *T. foetus*. Además, hemos indagado el uso de tres drogas de utilizadas como antiparasitarios con el fin de aplicarlas en técnicas citogenéticas. Si bien nuestros resultados sugieren que estas drogas no pueden ser utilizadas para tal fin, hemos observado en ellas un claro efecto trichomonicida. Por esta razón, hemos ampliado nuestro estudio, con el propósito de proveer herramientas a futuras investigaciones que tengan como objeto controlar y/o erradicar la trichomonosis.

Referencias Bibliográficas

1. Adl, S. M.; A. G. Simpson; C. E. Lanec; J. Lukeš; D. Basse; S. S. Bowserf, *et al.* (2012) The revised classification of eukaryotes. J Eukaryotic Microbiology; 59(5): 429–493
2. Bader, C.; J. J. Chelladurai; K. Thompson; C. Halla; S. A. Carlson; M. T. Brewera (2016) Evaluation of high-throughput assays for in vitro drug susceptibility testing of *Tritrichomonas foetus* trophozoites. Veterinary Parasitology; 223: 34–37
3. Benchimol, M. (2004). Trichomonads under Microscopy. Microsc. Microanal.; 10: 528–550
4. Campero, C. M. y E. R. Cobo (2006). *Tritrichomonas foetus*: patogénesis de la mortalidad embrionaria/fetal, caracterización de antígenos vacunales y respuesta inmune inducida. Revista de Medicina Veterinaria; 87: 47-56.
5. Carvalho, K. P y A. P. Rocha Gadelha (2007) Effects of three benzimidazoles on growth, general morphology and ultrastructure of *Tritrichomonas foetus*. FEMS Microbiol Lett.; 275: 292–300
6. Dostál, V y L. Libusová (2014) Microtubule drugs: action, selectivity, and resistance across the kingdoms of life. Protoplasma; 251(5): 991-1005
7. Doumecq, M. L. y Soto, P. (2012) *Tritrichomonas foetus*: mecanismos de acción patógena. InVet; 14(2): 151-161
8. Madeiro da Costa, R. F. y M. Benchimol (2004). The effect of drugs on cell structure of *Tritrichomonas foetus*. Parasitology Res.; 92: 159–170
9. Granger, B.L.; S. J. Warwood; M. Benchimol; W. De Souza (2000) Transient invagination of flagella by *Tritrichomonas foetus*. Parasitology Res.; 86(9): 699-709.
10. Hauck, R. y H. M. Hafez (2009). Partial sequence of the beta-tubulin of *Histomonas meleagridis* and the activity of benzimidazoles against *H. meleagridis* in vitro. Parasitology Res.; 104: 1183-1189
11. Katiyar, S. K.; V. R. Gordon; G. L. Mclaughlin y T. D. Edlind (1994) Antiprotozoal Activities of Benzimidazoles and Correlations with 13-Tubulin Sequence. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 38: 2086-2090
12. Mandhare, A y P. Banerjee (2016) Therapeutic Use of Colchicine and its Derivatives: A Patent Review, Expert Opinion on Therapeutic Patents. DOI:10.1080/13543776.2016.1214268

13. Mariante R. M.; R. G. Vancini; M. Benchimol (2006) Cell death in trichomonads: new insights. Histochem. Cell Biol.; 125: 545–556

14. Navarrete-Vázquez, G.; L. Yépez; A. Hernández-Campos; A. Tapia; F. Hernández-Luis; R. Cedillo, *et al.* (2003) Synthesis and Antiparasitic Activity of Albendazole and Mebendazole Analogues Bioorganic & Medicinal Chemistry; 11: 4615–4622

15. Noël, C.; D. Gerbod; P. Delgado-Viscogliosi; N.M. Fast; A. Ben Younes; O. Chose; A. Roseto M. Capron; E. Viscoglios. (2003). Morphogenesis during division and griseofulvin-induced changes of the microtubular cytoskeleton in the parasitic protist, Trichomonas vaginalis. Parasitology Research; 89: 487-494.

16. Oyhenart J, Breccia J. (2014) Evidence for repeated gene duplications in Tritrichomonas foetus supported by EST analysis and comparison with the Trichomonas vaginalis genome. Vet. Parasitol.; 206(3-4): 267-76.

17. Potenza, M. y M. T. Tellez-Iñón (2015) Colchicine treatment reversibly blocks cytokinesis but not mitosis in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Parasitology. Res.; 114(2): 641-649

18. Ribeiro, K. C.; L. Henrique Monteiro-Leal y M. Benchimol (2000) Contributions of the Axostyle and Flagella to Closed Mitosis in the Protists *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis.* J Eukariotic Microbiology; 14, 7(5): 481-492

19. Ribeiro, K. C.; R. M. Mariante; L. L. Coutinho; M. Benchimol. (2002). Nucleus behaviour during the closed mitosis of *Tritrichomonas foetus*. Biology of the Cell; 94: 289–301

20. Singh, B. N.; Lucas, J. J.; Hayes, G. R., Kumar, I.; Beach, D. H.; Frajblat, M.; et al. (2004). *Tritrichomonas foetus* induces apoptotic cell death in bovine vaginal epitelial cells. Infection and Inmunity; 4151-4158.

21. Xu, W.; Z. Lun y A. Gajadhar (1998) Chromosome numbers of *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis*. Veterinary Parasitology; 78: 247-251

22. Zubácová, Z.; Z. Cimburek; J. Tachezy (2008) Comparative analysis of trichomonad genome sizes and karyotypes. Molecular & Biochemical Parasitology; 161: 49–54

UNLPam F.A. R.P. Nº 99669
MFN 4312