



CUCBA



**“ ANALISIS CUANTITATIVO Y MORFOLOGICO DE LA  
FAGOCITOSIS Y DIGESTION *in vitro* DE  
*Trichomonas vaginalis* por *Entamoeba histolytica* “**

Por

**RODOLFO HERNANDEZ GUTIERREZ**

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de

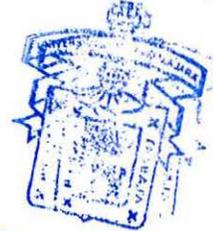
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(ÁREA DE INMUNOBIOLOGÍA)**

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
AGROPECUARIAS  
1999.**

184730/021256  
P339  
gd

**DR. EULOGIO PIMIENTA BARRIOS  
COORDINADOR DEL POSGRADO  
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
P R E S E N T E.**

**CUCBA**



**BIBLIOTECA CENTRAL**

Por medio de la presente, nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de tesis realizado por el **BIOL. RODOLFO HERNANDEZ GUTIERREZ**, con el título: "**Análisis cuantitativo y morfológico de la fagocitosis y digestión *in vitro* de *Trichomonas Vaginalis* por *Entamoeba Histolytica***", consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su disposición el escrito final para autorización de impresión y programación de fecha de examen de grado.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial salud.

**ATENTAMENTE**

**Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., a 15 de Febrero de 1999.**

**M. EN C. JUAN MORA GALINDO  
DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. EN C. GALINA ZAITSEVA PETROVNA**

**DR. EN C. ARTURO OROZCO BAROCIO**

**DR. EN C. ALFONSO ISLAS RODRIGUEZ**

**M. EN C. EDUARDO VAZQUEZ VALLS**

c.c.p. Coordinación de Posgrado del CUCBA  
c.c.p. Tesista

## RESUMEN :

Los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* poseen la capacidad de fagocitar de gran variedad de células, tanto *in vivo* como *in vitro*, y se ha demostrado su habilidad para fagocitar otros protozoarios.

Nuestro objetivo es determinar si *Entamoeba histolytica* es capaz de fagocitar y digerir *Trichomonas vaginalis* y establecer si entre cepas de *E. histolytica* con diferente virulencia existen diferencias en ambos procesos, así como realizar un análisis a nivel de Microscopio Electrónico de Transmisión y Microscopio Electrónico de barrido de la fagocitosis y la digestión de *T. vaginalis* por *E. histolytica*. Se utilizaron trofozoitos de *T. vaginalis* de la cepa GT1 y de *E. histolytica* HK9, HM1, y dos subpoblaciones de la última obtenidas mediante su paso una vez por hígado de Hámster (H1) y tres veces por hígado de hámster (H3), las cepas de *E. histolytica* se caracterizan por tener diferente virulencia. Las células fueron cultivados en medio B-I-S-33 a 37°C y cosechadas en fase logarítmica de crecimiento, para los ensayos de fagocitosis se mezclaron suspensiones de cada una de las cepas de *E. histolytica* con *T. vaginalis* en proporción 1:5 y 1:10 a diferentes tiempos. Para evaluar la digestión las proporciones de amibas-tricomonas fueron de 1:1 con un pulso de fagocitosis de 30 min y los tiempos de incubación de 1.5, 3, 4.5 y 6 h posfagocitosis ; Los ensayos se realizaron a 37°C, para detener el proceso de fagocitosis las muestras se incubaran en un baño de hielo-agua y se realizaran preparaciones en fresco para ser examinadas en el microscopio equipado con contraste de fases y contraste diferencial de interferencia según Normarski para determinar el número de tricomonas fagocitadas y el porciento de amibas fagocíticas en cada uno de los tiempos de fagocitosis y digestión en cien células amibianas contadas al azar de cuando menos tres experimentos por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza y t de Student para determinar si existen diferencias entre las cepas de *E. histolytica* para fagocitar y digerir *T. vaginalis* y, mediante regresión lineal para determinar la vida media de las tricomonas en el interior de los trofozoitos amibianos. Para el análisis morfológico de la fagocitosis y digestión las muestras se procesaran para ser observadas en el microscopio electrónico de transmisión y microscopio electrónico de barrido.

A nivel de microscopia electrónica de barrido, se observaron un número variable de tricomonas adheridas a la superficie amibiana; se observaron

también tricomonas parcialmente fagocitadas por las amibas mediante la emisión de pseudopodos y ocasionalmente sin la formación de éstos. Las tricomonas fagocitadas por las amibas se observan como protusiones esferoidales en la superficie amibiana.

Mediante microscopía electrónica de transmisión se corroboró lo observado con microscopía de barrido; se observó la interacción membrana-membrana entre tricomonas y amibas; la formación de los pseudopodos por las amibas y las características de los mismos, los cuales fueron utilizados por las amibas para ingerir a las tricomonas a través del canal fagocítico, el cual también se observó con algunas características. Una vez en el interior de las vacuolas amibianas las tricomonas se observan normales y se les pueden apreciar algunos de sus organelos como los flagelos, vacuolas, hidrogenosomas y su membrana plasmática. Durante el proceso de digestión se observó que las tricomonas ingeridas por los trofozoítos amibianos una vez que se encuentran en el interior de las vacuolas sufren cambios en su estructura, lo primero que se observa son cambios claros en citoplasma de las tricomonas, conforme transcurre el tiempo de digestión el citoplasma disminuye en cantidad y se observa granuloso hasta desaparecer completamente en las vacuolas digestivas amibianas, la membrana plasmática de las tricomonas es la última estructura en ser digerida en las vacuolas amibianas.



## ABSTRACT

Some authors studied phagocytic process in *Entamoeba histolytica*, they established who the trophozoites of *E. histolytica* are able to phagocytose numerous particulate material and differents cells types.

On this job our aim was establish if *E. histolytica* is able to phagocytose motile cells, ours white cell was *Trichomonas vaginalis* a flagelate protozoa. We interacted trichomonads with amebas at differents phagocytosed times. It was found that differents strains of *E. histolytica* had differents phagocytose capacity, the hamster passage of the strain HM1 increased the phagocytose rate in *E. histolytica*. There are statistical diferences between strains used, the capacity of phagocytose of HK9 and HM1 is statistically different. This activity is dependent of interaction time, disponibility of the white cells and the *E. histolytica* strain used.

At transmision electron and scanning microscope level, we found the trichomonads adhered in any place of the amebic surface. *E. histolytica* used two differents mechanisms for phagocitose trichomonas, a) classical phagocitose with the formation of pseudopodia for ingest the trichomonas and b) phagocitose of trichomonas whitout the formation of the pseudopodia. And by other hand the trichomonads were ingested complete and ocasionalmente in small portions. The kill and digestion of trichomonads ingested by *E. histolytica* ocurr inside amebic totally in 6 h. the trichomonads was observed with evidents changes inside amebic vacuoles, the digestion start with the citoplasm and finish with the membrane plasmatic.



## DEDICATORIAS

A Cristina, Christian y Rodolfo:

Con cariño y amor, por ser la fuente de inspiración y motivación en mi vida.

A mis padres:

Cariñosamente. les agradezco su cariño, por estar conmigo siempre en todo momento, hoy y siempre mil gracias

A mis hermanos:

Cariñosamente, gracias por todo su apoyo.



## AGRADECIMIENTOS



A Dios.

**Maestro Juan:**

Me es grato poder dedicar con mucho cariño esta tesis, agradecer hoy y siempre sus enseñanzas. Gracias por compartir conmigo todos sus conocimientos, por su apoyo incondicional, por el tiempo que ha dedicado en enseñarme, corregirme con calma y paciencia, gracias por la motivación y ayuda que día tras día me ha brindado, gracias por su amistad, gracias por ser hoy y siempre mi maestro.

**Susana y alex:**

De manera muy especial les agradezco sus atenciones, sus consejos tan valiosos, así como sus enseñanzas, gracias por su amistad, gracias por todo.

**A todos mis amigos:**

Por su amistad y por permitirme compartir con ellos mis sueños e ilusiones.

Finalmente al CIBO, a la Universidad de Guadalajara, y a todos mis profesores.

**CUCBA****BIBLIOTECA CENTRAL**

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN LA DIVISION DE BILOGIA DEL  
DESARROLLO DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMEDICA DE  
OCCIDENTE DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

## I N D I C E

I.- INTRODUCCIÓN .....	1
II.- ANTECEDENTES .....	3
1) Biología de <i>Entamoeba histolytica</i>	
2) Posición Taxonomica	
3) Ciclo vital	
4) Virulencia	
5) Fagocitosis	
6) Digestión en	
7) Características generales de <i>Trichomonas vaginalis</i>	
III.- JUSTIFICACION.....	13
IV.- OBJETIVOS.....	14
V.- MATERIALES Y METODOS.....	15
1) Cultivos celulares	
2) Cuantificación de los parásitos	
3) Ensayos de fagocitosis	
4) Ensayos de digestión	
5) Microscopía óptica	
6) Microscopía electrónica de transmisión	
7) Microscopía electrónica de barrido	
VI.- RESULTADOS.....	20
1) Fagocitosis análisis cuantitativo	
2) Fagocitosis análisis morfológico	
a).- Microscopía óptica	
b).- Microscopía electrónica de barrido.	
c).- Microscopía electrónica de transmisión	
3) Digestión análisis cuantitativo	
4) Digestión análisis morfológico	
a).- Microscopía electrónica de transmisión	
VII.- DISCUSIONES.....	63
VIII.- CONCLUSIONES.....	70
IX.- BIBLIOGRAFIA.....	71

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

## INTRODUCCION

*Entamoeba histolytica* es un protozoo parásito del humano descubierta por Lesh en 1875 y denominada así por Schaudinn en 1903. Para esta especie de amiba se había establecido hasta antes de 1997, que podía habitar en forma comensal en el intestino del hombre o bien bajo ciertas circunstancias cambiar su comportamiento y causar enfermedad, incluso la muerte. Actualmente se ha establecido que existen dos especies de *Entamoeba* distinguibles entre sí únicamente mediante técnicas inmunológicas y de Biología Molecular, estas especies son; *Entamoeba histolytica*, la cual es la causante de la amibiasis con la sintomatología característica de la enfermedad y, *Entamoeba dispar* que se comporta en forma comensal.

Existen algunas características de *E. histolytica* que han sido relacionadas o utilizadas como marcadores de patogenicidad, entre las que se encuentran: a) susceptibilidad a aglutinar con ConA, b) cargas de superficie, c) adhesión a células epiteliales, d) efecto citopático sobre monocapas de líneas celulares en cultivo, e) fagocitosis, e) actividad colagenolítica, f) secuencias de DNA, g) diferencias en el RNA ribosomal, así como la producción de diversas enzimas líticas.

Entre todas las las características antes señaladas la fagocitosis es una de las propiedades que ha sido más estudiada, lo cual ha permitido determinar que los trofozoitos de diferentes cepas de *E. histolytica* tienen la capacidad de fagocitar eritrocitos humanos *in vivo*, lo cual es utilizado por el parásito para obtener nutrientes y sobrevivir en el hospedero. En estudios de eritrofagocitosis *in vitro* se ha determinado que esta actividad es mayor en cepas con alta virulencia que en cepas con virulencia atenuada. Al realizar estudios para conocer el proceso de fagocitosis en *E. histolytica*, se ha determinado que esta actividad del protozoo no se encuentra limitada solo a eritrocitos, puesto que se ha observado en diferentes estudios la fagocitosis de gránulos de almidón, bacterias, esferas de látex, células de mamífero en cultivo y protozoarios. Así mismo, se ha reportado la presencia de enzimas líticas las cuales podrían participar o estar involucradas en el proceso de digestión del material fagocitado. Este último proceso, sin embargo ha sido poco estudiado.

Las investigaciones realizadas para conocer el proceso de fagocitosis han sido efectuadas con partículas inertes, o bien con células inmóviles. Por otra parte, en la literatura existe un reporte de fagocitosis de *Leishmania mexicana* por *E. histolytica* y otro de fagocitosis de *Trypanosoma* por *E. histolytica*. En

ambos casos se trata de dos protozoarios parásitos intracelulares, condición que podría facilitar la internalización de los mismos por las amibas. Se desconoce si otros protozoarios móviles no intracelulares (por ejemplo tricomonas) son fagocitados por *Entamoeba histolytica* y si es así cuales son los mecanismos utilizados por las amibas para fagocitar tricomonas y si esta actividad depende de la virulencia de la cepa amibiana. Además se desconoce si el paso de amibas por hígado de hamster provoca un aumento en la capacidad de fagocitosis de las amibas para fagocitar células móviles. En el presente trabajo estudiamos tanto cuantitativa, como morfológicamente la actividad fagocítica de *E. histolytica*, mediante el uso de *T. vaginalis* como célula blanco, y de la misma manera evaluamos cuantitativa y morfológicamente la actividad digestiva de las amibas después de pulsos determinados de fagocitosis de tricomonas.



## II.- ANTECEDENTES

### 1.- Biología de *E. histolytica*

Entre los organismos clasificados como protozoarios, existen diferentes especies de amibas del género *Entamoeba*; una de las especies más estudiadas ha sido *Entamoeba histolytica*, la cual fue descubierta por Lesh en 1875 (Kean 1988) y nombrada así por Schaudinn en 1903, la importancia para su estudio radica principalmente por ser una amiba parásita del humano. El ciclo de vida de esta amiba presenta una fase móvil llamada trofozoíto, el cual es una célula altamente dinámica y pleomórfica y otra fase inmóvil e infectante denominada quiste, la cual es la forma de resistencia del parásito cuando abandona al hospedero para diseminarse.

La infección por *Entamoeba histolytica* cuando se presenta puede causar enfermedad severa, principalmente diarrea y absceso hepático e incluso la muerte. Lo anterior puede depender de factores relacionados con el parásito o con el hospedero o ambos.

Los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* miden entre 7 y 40  $\mu\text{m}$  de diámetro, generalmente son pleomórficos, aunque en ocasiones se observan alargados, con un lobopodio protuberante y un uroide. Pueden formar pseudopodos de diversos tamaños, abundantes filopodios de diferente longitud y protusiones esferoidales lisas. La mayor parte de la superficie amibiana tiene una apariencia arrugada, con aberturas circulares de entre 0.2 a 0.4  $\mu\text{m}$  de diámetro, que corresponden a las bocas de las vesículas micropinocíticas; los estomas salientes de los canales macropinocíticos son más grandes, entre 2 y 6  $\mu\text{m}$  de diámetro (González-Robles y Martínez-Palomo, 1982). La célula presenta una locomoción rápida, en cultivos poliaxénicos alcanzan una velocidad de hasta 50  $\mu\text{m}$  por segundo, pero esta capacidad disminuye en trofozoitos cultivados axénica y monoaxenicamente.

El citoplasma de *E. histolytica* se divide en endoplasma y ectoplasma, en el primero se presentan abundantes vacuolas y partículas citoplásmicas mientras que el segundo es una región de material fibrogranular de baja densidad a los electrones. Estudios con microscopía electrónica han revelado que los trofozoitos de *E. histolytica* carecen de varios organelos típicos de las células eucarióticas; por ejemplo mitocondrias, complejo de Golgi, retículo endoplásmico y centriolos. Una gran proporción de su citoplasma está ocupado por vesículas y vacuolas de tamaño variable que va desde 0.5 a 9  $\mu\text{m}$  de diámetro, las cuales están limitadas

de membrana derivada de regiones internalizadas por micro y macropinocitosis, así como por fagocitosis.

Se pueden distinguir dos tipos de vacuolas en base al aspecto de su superficie, al analizar las células en replicas de criofractura, las más abundantes son las que tienen un contorno liso, mientras que otras aparecen con pequeñas elevaciones, el significado de esto no se ha determinado (Martínez-Palomo 1976). La membrana de estas vesículas y vacuolas mide aproximadamente 10 nm de espesor. Ultraestructuralmente se pueden identificar diferentes tipos de vacuolas: a) vacuolas fagocíticas, b) vacuolas macropinocíticas, c) vacuolas micropinocíticas d) lisosomas secundarios, e) cuerpos residuales y f) vacuolas autofágicas, los primeros tipos probablemente representan algún fenómeno de endocitosis (Martínez-Palomo 1982).

En los lisosomas de las células eucariotas típicas las enzimas como la fosfatasa ácida se encuentran en forma soluble; en el caso de algunas vacuolas de *E. histolytica*, mediante ensayos de aislamiento y posteriormente análisis citoquímicos y bioquímicos de membrana aisladas, indican que la fosfatasa ácida y su actividad se encuentra principalmente asociada con la membrana vacuolar, más que estar libre en el interior de la vacuola. Estudios citoquímicos ultraestructurales sugieren que la membrana plasmática de los trofozoitos también contienen actividad de fosfatasa ácida.

Aunque *E. histolytica* carece de un retículo endoplásmico y complejo de Golgi con la estructura típica de tales organelos, se ha notado la presencia de elementos membranosos que forman tubulos, este sistema puede ser interpretado como contraparte del típico retículo endoplásmico liso; cuando está presente se encuentra formado por tubulos de aproximadamente 20 nm de diámetro. Ciertos productos amibianos son liberados por los trofozoitos, entre los que se incluyen toxinas capaces de dañar células en cultivo y enzimas que facilitarían la invasión de tejidos sólidos por el parásito. Sin embargo aun no se ha determinado si estas moléculas son canalizadas por medio de compartimientos ligados a la membrana a través de la superficie celular o si permanecen adheridos como componentes de membrana.

La membrana plasmática de *E. histolytica* y la cubierta celular es más gruesa que los componentes correspondientes de los glóbulos rojos de mamíferos y presenta la clásica unidad de membrana de las membranas biológicas. Esta membrana está rodeada por una cubierta celular que se hace notar al ser teñida con rojo de rutenio o azul alciano; se ha demostrado que esta cubierta es más

prominente en amibas obtenidas de lesiones del colon, abscesos hepáticos y las cultivadas monoxénicamente (12.8 nm), que en aquellas cultivadas axénicamente en las que su espesor aproximado es de 10 nm. Mediante la visualización ultraestructural por técnicas de criofractura y con microscopio electrónico de barrido de la superficie de trofozoitos activos, se determinó la existencia de endocitosis y exocitosis. *E. histolytica* presenta además la capacidad de distribuir polarmente componentes de la superficie (capping), los cuales se acumulan en la parte posterior de la célula o uroide (Martínez-Palomo y col. 1980).

El núcleo generalmente es poco notable cuando las amibas son observadas con microscopía óptica de campo claro, pero es notorio cuando son observadas al microscopio de contraste de fases o microscopía de interferencia de Normarsky, el núcleo mide entre 4 y 7  $\mu\text{m}$  de diámetro. La membrana nuclear esta resaltada por una capa delgada y uniforme de gránulos cromatinicos, los cuales le dan al núcleo la apariencia de un anillo. Cuando se examinan trofozoitos vivos, se observa que el núcleo no esta fijo en un sitio del citoplasma, pues se mueve en forma libre y algunas veces rota rápidamente.

## 2.- POSICION TAXONOMICA:

	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
REINO	Protista	Protista
SUB-REINO	Protozoa	Protozoa
PHYLUM	Sarcomastigophora	Sarcomastigophora
SUB-PHYLUM	Sarcodina	Mastigophora
SUPERCLASE	Rhizopoda	
CLASE	Lobosea	Zoomastigophorea
SUBCLASE	Gymnamoebia	
ORDEN	Amoebida	Trichomonadida
SUB-ORDEN	Tubulina	
FAMILIA	Entamoebidae	
GENERO	<i>Entamoeba</i>	<i>Trichomonas</i>
ESPECIE	<i>E. histolytica</i>	<i>T. vaginalis</i>

(Levine y col. 1980)

## 3.- CICLO VITAL DE *Entamoeba histolytica*

El ciclo vital de *E. histolytica* en el humano se desconoce, pero los detalles de su ciclo de vida completo fueron obtenidos en un estudio realizado por Dobeil en

1928, sus observaciones proporcionan las bases para el conocimiento del ciclo de vida de *E. histolytica* y desde entonces poco se ha agregado a su descripción original. El ciclo completo de este parásito comprende principalmente 4 etapas consecutivas; 1) trofozoíto, 2) prequiste, 3) quiste y 4) amiba metaquística. Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria; en estado avanzado de la división celular se forma una estructura filiforme entre las células que se están dividiendo, misma que se hace más delgada y se separa terminando así la división celular. Los trofozoítos disminuyen su motilidad momentos antes de su división, generalmente se dividen en dos pero algunas ocasiones pueden también dividirse en tres, las células hijas pueden tener el mismo tamaño o ser unas más grandes que las otras hasta tres veces más, es por eso que en los cultivos de 48-72 h se encuentran amibas de diversos tamaños, el proceso de división se completa u ocurre en su totalidad entre 3 y 8 min (Shafer y col. 1961). Durante el proceso de diferenciación o enquistamiento, se producen quistes tetranucleados después de dos divisiones de un quiste uninucleado. En el desenquistamiento, una amiba metaquística tetranucleada emerge de cada quiste y produce 8 amibas uninucleadas después de su división (Martínez-Palomo 1982).

#### 4.- VIRULENCIA DE *E. histolytica*

Una de las principales incógnitas acerca de la biología de *E. histolytica* radica en los factores que determinan la virulencia del parásito y de los factores que determinan que su comportamiento como patógena. El término patogenicidad es usado para denotar la habilidad de un organismo para producir enfermedad, mientras que la virulencia se refiere al grado de enfermedad que llega a producir el organismo dado en el hospedero (Clark y Diamond 1994). El efecto citopático de las amibas sobre los tejidos humanos no puede ser atribuido a una sola función del parásito, sino que parece ser resultado de varias propiedades químicas y mecánicas (fagocitosis y movilidad) del protozooario (Martínez-Palomo, 1982; Martínez-Palomo y col. 1985). En la amibiasis invasora estos parásitos fagocitan pequeñas porciones de la periferia de las células blanco, acciones que provocan el rompimiento de la membrana plasmática y que resulta en la ruptura de la célula y la subsecuente lisis celular (Martínez-Palomo y col. 1985). Por otra parte se ha demostrado que sonicados de *E. histolytica* contienen compuestos tóxicos para células de mamífero así como para eritrocitos de hámster y ratón (López-Revilla y Said-Fernández, 1980;

Monfort y col. 1993), así como actividades de proteinasas (Mc Laughlin y col. 1976; Lushbaugh y col. 1984; Lushbaugh y col. 1985; Schulte y Scholze, 1989; Monfort y col. 1993), colagenasas (Gadasi y col. 1983b) y la presencia del ameboporo (Young y col. 1982, Dodson y col. 1994), los cuales, se propone tienen importancia relevante en procesos de lisis celular e invasión de tejidos.

### 5.- FAGOCITOSIS EN *E. histolytica*

La actividad fagocítica se ha analizado ampliamente mediante el uso de glóbulos rojos como célula blanco, la fagocitosis de *Entamoeba histolytica* se ha relacionado con la nutrición del microorganismo y con la patogenicidad del mismo. Se ha encontrado que la fagocitosis en esta especie de ameba es mayor en cepas que son altamente virulentas, motivo por el cual se consideró a la eritrofagocitosis como un marcador de virulencia (Trissl y col. 1978; Martínez-Palomo y col. 1980; Orozco y col. 1982a; Orozco y col. 1983), aunque posteriormente algunos autores han reportado que no existe dicha correlación (Tsusumi y col. 1992; Monfort y col. 1992; Diamond y Clark 1994). Se ha encontrado que los trofozoitos tanto de *E. histolytica*, como de otras especies de *Entamoeba*, fagocitan diversos materiales particulados, tales como granos de almidón, células inflamatorias (Griffin 1972; Chévez y col. 1974, Guerrant y col. 1981), bacterias, esferas de látex (Orozco y col. 1983), células de mamífero en cultivo (Radvin y col. 1980) y protozoarios (Anaya-Velazquez y Chang 1983; Martínez-Palomo y col. 1985) estos últimos estudios solo incluyen observaciones aisladas, en los que no se determinó la cinética de fagocitosis, ni un análisis estructural con microscopio óptico, electrónico de transmisión o de barrido.

Con el propósito de conocer más a fondo el proceso de fagocitosis en *Entamoeba histolytica*, se han realizado diversos estudios sobre este proceso, entre los primeros se encuentran los de Chévez y col (1972, 1974); en el primero se reporta la capacidad que presenta *E. histolytica* para fagocitar eritrocitos humanos y la forma en que las amebas los ingirieron, mediante análisis a nivel de microscopía óptica con contraste de fases. Se hace énfasis en los mecanismos utilizados por las amebas para fagocitar eritrocitos humanos. En el segundo reporte los autores realizan ensayos de fagocitosis, en los que utilizan como célula blanco eritrocitos de diversas especies animales, estos reportes a nivel de microscopía óptica con contraste de fases y cinematografía. Posteriormente Esther Orozco y col. 1983) establecieron con sus estudios a la fagocitosis de eritrocitos humanos como un factor de virulencia, también otros autores

señalaron que cepas de *E. histolytica* deficientes en adhesión son deficientes en fagocitosis (Rodríguez MA y col. 1990). En otros estudios se determinó que componentes del citoesqueleto, como los filamentos de actina y de miosina intervienen activamente en el proceso de fagocitosis en *E. histolytica* (Bailey y col. 1985; Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 1994), adicionalmente se han realizado estudios a nivel de microscopía electrónica de barrido, que han permitido establecer también parte de los mecanismos utilizados por las amibas para fagocitar las células blanco (Tsutsumi y col 1992, Herrera-Verdugo y col 1997)

#### 6.- DIGESTION EN *E. histolytica*

En diversos estudios realizados con *E. histolytica* se ha logrado determinar que este protozoo posee y presenta actividad de numerosas enzimas hidrolíticas o proteinasas. Se ha pensado además que el comportamiento invasivo y la destrucción de tejidos en algunas formas invasivas de la amibiasis puede estar mediada por las enzimas proteolíticas que *E. histolytica* produce, de hecho a principios de siglo Schaudinn les dio el nombre de histolytica por el efecto lítico que las amibas producen sobre los tejidos. Los estudios bioquímicos relevantes de las enzimas proteolíticas se dieron a partir de que se logró el cultivo axénico de *E. histolytica*. En múltiples estudios realizados antes de 1961 se llegó a conclusiones que hasta la fecha aun son válidas, por ejemplo el hecho de que *E. histolytica* posee enzimas proteolíticas altamente activas, capaces de degradar varios sustratos proteínicos como gelatina, caseína, y albumina entre otros (Perez-Montfort y col. 1993). Que las amibas intactas o lisadas poseen productos tóxicos con capacidad proteolítica y que las actividades tóxicas y de proteólisis pueden ser inhibidas por componentes del suero (Perez-Montfort y col. 1993).

Refiriéndonos de manera general a los sistemas biológicos, se piensa que por lo menos existen 4 grupos de proteinasas; las de serina, de cisteína, de aspártico y las metaloproteiniasas, para el caso de *E. histolytica* las que predominan son las cistein-proteiniasas. McLaughlin y Faubert (1977) realizaron estudios sobre enzimas proteolíticas en *E. histolytica* cultivada en forma axénica; estos autores, identificaron y purificaron parcialmente dos proteiniasas, una de aspártico y una de cisteína. La de aspártico con una masa de 41 kDa y con algunas propiedades similares con la cathepsina D, y la de cisteína con 27 kDa. con propiedades similares con la cathepsina B. Se han desarrollado dos tipos de

líneas de trabajo; una enfocada a estudiar las propiedades tóxicas y degradativas de los extractos amibianos y la otra hacia la purificación y caracterización de las toxinas y proteinasas de dicho extractos.

Los grupos de Bos (1980) y Lushbaugh (1984), fueron los iniciadores del estudio de las propiedades citopáticas y citotóxicas de extractos amibianos, establecieron que las principales toxinas tenían masas moleculares entre los 25 y 45 kDa, y que estas podrían ser glicoproteínas. El hecho de algunos inhibidores de proteinasas bloquearan el efecto citotóxico de los extractos amibianos permitió establecer una correlación entre el efecto tóxico y enzimas proteolíticas. McGowan y col. (1982) encontraron una correlación entre la virulencia de la cepa amibiana y la actividad citotóxica del extracto correspondiente, en su estudio lograron inhibir dicha actividad con inhibidores de proteasas, lo que les permitió identificar las toxinas como enzimas proteolíticas. Gadasí y Koliber (1983) establecieron una correlación entre la actividad aparente de enzimas proteolíticas en los extractos amibianos y la virulencia reportada para diferentes cepas. Lushbaugh (1985) y Bos (1980) mencionaron que la actividad citotóxica dependía de grupos sulfhidrilo, pero fueron Avila y col. (1985), quienes al revertir la acción inhibitoria de agentes que bloquean grupos sulfhidrilo con el 2-mercaptoetanol, concluyeron que las principales enzimas proteolíticas de *E. histolytica* son de la clase catalítica de cisteína. Posteriormente Perez-Monfort y col. (1987) demostraron con un número mayor de inhibidores de proteinasas de cisteína, que éstos inhibían entre el 80 y el 90% de la actividad; mientras que con inhibidores de las proteasas de serina se inhibían únicamente entre el 15 y el 18% de la actividad. Mediante electroforesis con gel de sustrato demostraron la existencia de proteinasas; de 56, 40 y 27 kDa que correspondían a las proteinasas de cisteína. Los resultados de estos estudios confirmaron que en *E. histolytica* predominan las proteinasas de cisteína; propiedad que se ha observado en un gran número de protozoarios parásitos (Perez-Monfort y col. 1987).

Scholze y Werries (1984) aislaron una proteínasa de cisteína con una masa molecular de 21 kDa, nombrada recientemente amebapaina, la cual tiene un gran número de sustratos, y se encuentra localizada en la superficie de la membrana celular, así como en las membranas de vesículas intracelulares. Por su parte Lushbaugh (1985) purificó una proteínasa de cisteína con una masa molecular de 16 kDa a la que designó catepsina B, la cual tiene actividad sobre hemoglobina y caseína y una actividad mayor en cepas virulentas que en las no

virulentas. Keene y col. (1986) purificaron una proteínasa de cisteína neutra con una masa molecular de 56 kDa, con la capacidad de degradar colágena tipo I, fibronectina, laminina y elastina. En tanto que Luaces y Barret (1988) purificaron una proteínasa de cisteína con una masa molecular de 27 kDa llamada histolisina, capaz de degradar azocaseína, azocol, elastina. La secuencia completa de esta proteínasa que resultó tener una homología del 84% con la amebapaína (Tannich 1992).

En cuanto a su distribución subcelular se ha demostrado por varios grupos de trabajo y por diversos métodos que *E. histolytica* posee enzimas en la membrana plasmática y en membranas de vesículas internas, además de poseer proteínasas en fracciones subcelulares solubles (Ostoa-Saloma y col. 1989). Además de las proteínasas de cisteína de *E. histolytica* se ha reportado que también presenta actividad de colagenasa (Muñoz y col. 1982; Gadasi y col. 1983b). Se han identificado además diversas actividades enzimáticas en esta especie de amiba, se detectó una ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$   $\text{Mg}^{+2}$ , sobre la membrana plasmática y en la superficie interna de la mayoría de las vacuolas, además se identificaron: una ADPasa dependiente de Ca, timino pirofosfatasa dependiente de Ca y fosfatasa ácida en el interior de las vacuolas (Kobayashi y col. 1982). Esta enzima se pueden encontrar unida a las membranas de las vacuolas o en forma soluble dentro de ellas. En *E. histolytica* se ha encontrado actividad de fosfatasa ácida en la membrana de los fagolisosomas, en los filopodios y en las membranas de las amibas

Las proteínasas mencionadas anteriormente presentan actividad degradativa, y se les atribuye participación en la invasión de los tejidos por *E. histolytica*. Además es importante mencionar que estas pueden jugar un papel relevante en los procesos de digestión del material fagocitado por los trofozoitos amibianos. La capacidad de digestión del material fagocitado y la velocidad digestiva de *E. histolytica* puede ser dependiente de la existencia o ausencia de enzimas degradativas en los trofozoitos, así como de la naturaleza del material fagocitado.

### 7.- Características generales de *Trichomonas vaginalis*

*Trichomonas vaginalis* es un protozoario flagelado descubierto por Donné en 1836, es el parásito causante de la tricomoniasis clasificada como una enfermedad sexualmente transmisible, que consiste en la infección del aparato urogenital femenino principalmente. Este protozoario presenta formas variables

como organismo vivo y en preparaciones teñidas y fijadas, debido a que la forma y tamaño de las tricomonas son afectados por los métodos de fijación, pero su tamaño promedio en cultivo es de  $9.7 \times 7 \mu\text{m}$ .

La forma de las tricomonas varía de acuerdo con su origen, aunque en general las células mantenidas en cultivo presentan una forma uniforme, ovoide o periforme, que las observadas en secreciones vaginales u orina. Se ha observado que la forma de este flagelado también depende de la presión osmótica; en solución salina hipertónica las tricomonas tienden a ser de forma delgada mientras que en soluciones hipotónicas se presentan redondeadas y vacuoladas. Se ha observado además que cuando se están dividiendo son más pequeñas y redondeadas. Los flagelos tienden a ser irregulares, su membrana ondulante y la costa en relación con la longitud del cuerpo son más pequeñas y se ha observado que los organismos que no se encuentran en división siempre tienen 4 flagelos en la parte anterior del cuerpo, estos flagelos tienen su origen en el cinetosoma también localizado anteriormente; en algunos especímenes los flagelos parecen estar organizados en dos grupos, en donde cada grupo contiene dos flagelos, el flagelo anterior más largo puede medir hasta  $12.5 \mu\text{m}$  de longitud en promedio.

La membrana ondulante y la costa se originan del cinetosoma un poco posterior al origen de los flagelos y en el dorso del cuerpo de la tricomona, la membrana ondulante es típicamente más corta que el cuerpo de la tricomona y relativamente baja. El margen externo libre de la membrana consiste del filamento accesorio y flagelo recurrente unido, el cual no continúa más allá del final de la membrana como un flagelo anterior libre. El cuerpo del axostilo es relativamente delgado en forma de bastoncillo y presenta su extremo anterior cerca de la extremidad anterior del cuerpo de la tricomona, se extiende a lo largo del citoplasma y se proyecta por la parte posterior de la tricomona adelgazándose cada vez más, la proyección axostilar mide en promedio  $4.9 \mu\text{m}$  de longitud.

Uno de los aspectos más notables de *Trichomonas vaginalis* es el arreglo de sus llamados gránulos paraxostilares, los cuales aparecen en tres hileras paralelas al axostilo, más del doble de estos gránulos son hidrogenosomas. En los organismos vivos el núcleo está situado cerca de la parte anterior del cuerpo y puede tener forma elipsoidal u ovoide, mide aproximadamente  $4.2 \mu\text{m}$  de largo por  $2 \mu\text{m}$  de ancho (Honigberg 1978).

Diversos estudios han permitido conocer parte de la biología de *Trichomonas vaginalis* y la importancia de las propiedades y características que presenta en la invasión del tejido del hospedero, como puede ser la presencia de proteínas de membrana que le permiten el reconocimiento y adhesión a proteínas y componentes de la matriz extracelular del hospedero, como la laminina y la fibronectina, además de la presencia de proteinasas de membrana cuyas propiedades han sido correlacionadas con su capacidad invasiva. Por otro lado se ha establecido la capacidad de *Trichomonas vaginalis* para fagocitar y digerir células como las de *Neisseria gonorrhoeae* (Francioli y col. 1983), tanto *in vivo* como *in vitro*, también se demostró recientemente que son capaces de fagocitar lactobacilos, células del epitelio vaginal y eritrocitos *in vitro* (Rendon y col 1998). La fagocitosis de eritrocitos humanos se propone como un mecanismo utilizado por el parásito para la obtención de lípidos y hierro (Lekher y col. 1990). También se ha demostrado que presentan actividades beta hemolíticas relacionadas estas con la virulencia del parásito (Krieger y col. 1983) y con la capacidad de las tricomonas para llevar a cabo la hemólisis de los eritrocitos, actividad que es dependiente de la adherencia entre ambos tipos celulares (Potamianos y col. 1992). Se ha propuesto que la adhesión de *Trichomonas vaginalis* puedan depender o estar mediados por lectinas (Roussel y col. 1991). Las células de *Trichomonas vaginalis* aisladas de pacientes de tricomoniasis, una vez axenizadas se mantienen en cultivo en medio líquido BI-S-33.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

### III.- JUSTIFICACIÓN

Se ha reportado que el protozooario *Entamoeba histolytica* fagocita diversos tipos celulares del hospedero durante la patogénesis, adicionalmente es capaz de fagocitar los mismos tipos de células *in vitro*. Estas células se caracterizan por ser inmóviles y podrían ser utilizadas como nutrientes por el parásito para su sobrevivencia.

En el contenido intestinal del hospedero se pueden encontrar diversos organismos como bacterias y algunos protozoarios flagelados como *Pentatrichomonas hominis* y *Giardia lamblia*. Es conocido que las amibas son capaces de fagocitar bacterias, y aunque existen reportes de fagocitosis de protozoarios flagelados, uno de *Leishmania* y otro de *Tripanosoma* no se ha descrito en detalle la interacción entre las amibas y otros protozoarios flagelados que no sean parásitos intracelulares. Particularmente se desconoce si *E. histolytica* posee la capacidad de fagocitar células móviles con las que pudiera estar en contacto en el intestino, y aunque *Trichomonas vaginalis* no es un parásito intestinal nosotros las utilizamos como un modelo para estudiar la fagocitosis de células móviles por *Entamoeba histolytica* y establecer si las amibas utilizan como fuente alterna de nutrientes a microorganismos presentes en el lumen intestinal diferentes a las del hospedero. También utilizar el modelo para establecer los diferentes etapas del proceso de fagocitosis, como son la adhesión, fagocitosis, muerte y digestión.



#### IV.- OBJETIVOS

##### OBJETIVO GENERAL :

Evaluar cuantitativa y morfológicamente la actividad fagocítica y digestiva de cepas de *Entamoeba histolytica* con diferentes virulencias mediante el uso de *Trichomonas vaginalis* como célula blanco.

##### OBJETIVOS PARTICULARES :

-Determinar si las cepas de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS, HK9:NIH y las subpoblaciones HM1H<sub>1</sub> y HM1H<sub>3</sub> poseen la capacidad de fagocitar *T. vaginalis*, como modelo para analizar la capacidad de *E. histolytica* para ingerir células móviles.

-Determinar si las cepas de *E. histolytica* son capaces de digerir *T. vaginalis*.

-Evaluar el efecto del paso de la cepa de HM1 de *E. histolytica* por hígado de hámster en su actividad fagocítica.

-Establecer si existen diferencias en la capacidad fagocítica y digestiva entre las cepas de *E. histolytica* utilizadas.

-Realizar el análisis morfológico de la fagocitosis y digestión de *T. vaginalis* por *E. histolytica*, mediante microscopio óptico, microscopio electrónico de transmisión, y microscopio electrónico de barrido.



## MATERIALES Y METODOS

### 1.- CULTIVOS CELULARES

Se utilizaron trofozoitos de *E. histolytica* de las cepas HM1:IMSS y HK9:NIH, y además dos subpoblaciones, la H<sub>1</sub> y la H<sub>3</sub>, obtenidas mediante la recuperación de trofozoitos a partir de un absceso hepático amibiano en hámster, inducido experimentalmente por nosotros con trofozoitos de la cepa HM1:IMSS. Los trofozoitos fueron cultivados en medio BI-S-33 suplementado con suero bovino inactivado al 15% y 3% de mezcla de vitaminas (Diamond y col. 1978), mantenidos a 37°C en tubos de vidrio de 13 x 100 mm con tapón de rosca y cosechados en fase logarítmica de crecimiento. Los trofozoitos de *Trichomonas vaginalis* utilizados fueron de la cepa GT-1, obtenidos por el Dr. Fernando Anaya Velázquez de una paciente de tricomoniasis (Instituto de Investigación en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato) y donadas por él a nuestro laboratorio. Las tricomonas fueron cultivadas en medio BI-S-33 suplementado con 5% de suero bovino inactivado y 0.5% de la mezcla de vitaminas e incubados a 37°C, en tubos de vidrio de 13 x 100 mm con tapón de rosca y fueron cosechados en fase logarítmica de crecimiento.

### 2.- CUANTIFICACION DE LOS PARASITOS

Para determinar el número de trofozoitos de *E. histolytica*, estos fueron cuantificados en cámaras de Neubauer, para lo cual los tubos de los cultivos se colocaron en baño de hielo-agua durante 15 min y se agitaron por inversión continua para desprender los trofozoitos de la pared y tener una suspensión homogénea, de la cual se obtuvo una alícuota para su cuantificación.

En virtud de la gran movilidad de los trofozoitos de *T. vaginalis* el número de ellos se determinó previa dilución de una alícuota del cultivo con formaldehído al 4%, en amortiguador de fosfatos 0.1M, en proporción 1:1 para inmovilizarlos y facilitar su conteo. Una vez determinada la densidad celular de los cultivos, se prepararon suspensiones de los mismos para tener una proporción de 5 y 10 tricomonas por cada trofozoito amibiano para los ensayos de fagocitosis, y para los ensayos de digestión, para tener una proporción de 1:1. Para ello, de cada cultivo se descartó el volumen necesario para que al final tuvieramos en ellos  $10 \times 10^6$  ó  $20 \times 10^6$  tricomonas, para cada proporción a usar. En el caso de los trofozoitos amibianos se dejó en el tubo el volumen de cultivo que contenía 2 x

$10^6$  amibas. En ambos casos los cultivos se mantuvieron en el baño de hielo-agua.

### 3.- ENSAYOS DE FAGOCITOSIS

Las suspensiones de ambos protozoarios para los experimentos correspondientes se procesaron por separado; inicialmente se descartó el medio de cultivo para eliminar posibles componentes tóxicos en el mismo. Para ello los cultivos se centrifugaron a  $700 \times g$  a  $4^\circ C$  durante 5 min y se descartó el sobrenadante, las pastillas de células (amibas o tricomonas) se resuspendieron en 1 ml de medio BI-S-33 nuevo frío, los cultivos se volvieron a centrifugar a  $700 \times g$  a  $4^\circ C$  durante 5 min y se descartó el sobrenadante, las pastillas de células se resuspendieron nuevamente en 1 ml de medio BI-S-33 nuevo frío, se agitaron y centrifugaron de la forma antes señalada, se descartó el sobrenadante y en el caso de los cultivos amibianos la pastilla se resuspendió en 2.1 ml de medio frío, e inmediatamente se repartió en 21 alicuotas de  $100\mu l$  cada una, para cada cepa amibiana. Una vez lavadas las células amibianas, resuspendidas en medio nuevo y repartidas en las alicuotas éstas se incubaron a  $37^\circ C$  durante 20 min para que se estabilizaran, recuperaran movilidad y se adhirieran a las paredes del tubo. Para el caso de los cultivos de tricomonas estas se resuspendieron en 2.1 ml de medio nuevo y se incubaron durante 20 min a  $37^\circ C$ .

Una vez estabilizadas las amibas en las alicuotas se inició la interacción de las células, para lo cual se tomaron alicuotas de  $100 \mu l$  de la suspensión de tricomonas y se mezclaron con cada una de las alicuotas de amibas para tener un total de 21 alicuotas mixtas con un volumen final de  $200 \mu l$ . Las 21 alicuotas se repartieron en 7 grupos de tres tubos cada uno y cada grupo se incubó a diferentes tiempos: 5, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 min a  $37^\circ C$ .

Se realizaron también ensayos de fagocitosis efectuados para la misma cepa amibiana con una proporción de 10 tricomonas por amiba como se indicó antes; los intervalos de tiempo utilizados en estas condiciones fueron únicamente de 15, 30, 45 y 60 min.

Para detener el proceso de fagocitosis una vez concluidos cada uno de los tiempos de interacción, las alicuotas se incubaron en un baño de hielo-agua durante 5 min para detener el proceso de fagocitosis. Inmediatamente después se elaboraron preparaciones en fresco para examinarlas en un microscopio equipado con óptica de contraste de fases y con contraste diferencial de interferencia, con la finalidad de determinar el número de tricomonas fagocitadas

por amiba, para lo cual se examinaron 100 trofozoitos amibianos seleccionados al azar y se determinó en número de tricomonas en cada uno, así como el número de amibas fagocíticas. Esto nos permitió obtener los valores promedio de el porciento de amibas fagocíticas, así como el número de tricomonas/amiba.

## CONTROL

Como experimento control, para determinar si *E. histolytica* es capaz de fagocitar tricomonas a temperatura ambiente (25°C) se utilizaron trofozoitos de la cepa HM1, los cultivos de amibas se enfriaron en un baño de hielo-agua durante 5 min, posterior a esto se hizo la interacción con tricomonas en proporción 1:5, los cultivos mixtos se mantuvieron en el baño de hielo-agua durante 5 min y posteriormente se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30, 60 y 90 min, al finalizar cada periodo de tiempo se analizaron muestras en preparaciones en fresco y al azar se examinaron 100 células amibianas para determinar el número de tricomonas fagocitadas y el porcentaje de amibas fagocíticas, cuyos valores respectivos en cada período de tiempo fueron de cero.

Después de mantener los cultivos a temperatura ambiente durante 90 min estos fueron incubados a 37°C durante 45 min, al termino de los cuales se procedió a determinar la actividad fagocítica de las amibas y se encontró un 67% de amibas fagocíticas y 1.45 tricomonas por amiba. Lo anterior nos permitió establecer que *E. histolytica* es incapaz de fagocitar tricomonas a temperatura ambiente, condición que se presenta durante la cuantificación despues de los pulsos de fagocitosis.

## 4.- ENSAYOS DE DIGESTION

Para el proceso de digestión se determinó la densidad celular de ambos tipos celulares y se ajustaron en proporción 1:1 y a una densidad celular de  $2 \times 10^6$  células por ml de cada tipo celular.

De la misma manera que se hizo para los ensayos de fagocitosis las células amibianas y las tricomonas fueron lavadas tres veces con medio nuevo, para el caso de los cultivos amibianos las células se resuspendieron en 1.8 ml de medio frio y se repartieron inmediatamente en 18 alicuotas de 100µl cada una y éstas se incubaron a 37°C durante 20 min para que se estabilizaran, recuperaran movilidad y se adhirieran a las paredes del tubo. Para el caso de los cultivos de tricomonas estas se resuspendieron en 1.8 ml de medio nuevo y se incubaron durante 20 min a 37°C. Una vez estabilizadas ambos tipos celulares se inició la

interacción de las células, para lo cual se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ l de la suspensión de tricomonas y se mezclaron con cada una de las alícuotas de amibas para tener un total de 18 alícuotas mixtas con un volumen final de 200  $\mu$ l cada una. Inmediatamente después de la interacción las alícuotas se centrifugaron a 100 x g durante 30 min para facilitar la interacción de ambos tipos celulares (Arias-negrete y col. 1991.).

### 5.- Microscopía óptica

El análisis morfológico de la fagocitosis a nivel de microscopía óptica, se realizó de la siguiente manera: al término de cada uno de los tiempos de interacción se tomaron muestras de cada una de las alícuotas a 37°C y se realizaron preparaciones en fresco para ser observadas inmediatamente al microscopio y realizar anotaciones de las condiciones y detalles de la fagocitosis, también se fijaron algunas muestras con glutaraldehído a 37°C con las cuales se realizaron preparaciones para ser analizadas al microscopio.

### 6.- Microscopía Electrónica de Transmisión

Al término de cada uno de los tiempos de interacción las muestras se fijaron con glutaraldehído al 2.5% diluido en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M, pH 7.4 y se incubaron durante 1 h. Al término de este tiempo, las muestras se centrifugaron y se descartó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 1 ml de cacodilato de sodio 0.1M a pH 7.4, se agitaron, centrifugaron y se descartó el sobrenadante, el lavado con cacodilato se repitió por tres ocasiones. Posteriormente las muestras se posfijaron con tetraóxido de osmio al 1% diluido en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M a pH 7.4, durante una hora; en seguida se descartó el fijador después se centrifugar la pastilla a 700 x g por 5 min. y se lavó con cacodilato de sodio 0.1M a pH 7.4. Inmediatamente después se procedió a deshidratar las muestras con alcohol etílico en concentraciones ascendentes, de 50 al 100% durante 10 min cada uno, finalmente se hicieron dos cambios de óxido de propileno. Para el proceso de inclusión de las muestras en resina, las amibas se resuspendieron en una mezcla de óxido de propileno-resina en proporción 1:1 durante 24 h a temperatura ambiente, para favorecer la infiltración y finalmente se incluyeron en resina epóxica pura a 60°C durante 24 h.

De los bloques con amibas se obtuvieron cortes gruesos de 0.5  $\mu$ m a 1.0  $\mu$ m de espesor, los cuales fueron teñidos con azul de toluidina para ser analizados

en el microscopio óptico. Así mismo, se obtuvieron también cortes finos de aproximadamente 90 nm de espesor, se colocaron sobre rejillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo para ser analizadas en el microscopio electrónico de transmisión. Ambos tipos de cortes se obtuvieron en ultramicrotomos Reichert Om-u3 y Sorvall Porter Blum MT1, equipados con cuchillas de vidrio. Las rejillas fueron analizadas en un microscopio electrónico ZEISS EM906 y JEOL 1010, en los que se obtuvieron micrografías.

### **7.- Microscopía Electrónica de Barrido**

Se realizaron ensayos de fagocitosis en las condiciones mencionadas para el análisis cuantitativo solo que para esto los cultivos mixtos se fijaron a los 5, 10 y 15 min de interacción, con glutaraldehído al 2.5% diluido en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M, pH 7.4 a 37°C y se incubaron durante 1 h, al término de este tiempo las muestras se centrifugaron y se descartó el sobrenadante; la pastilla se resuspendió en 1 ml de cacodilato de sodio 0.1M a pH 7.4, se agitaron, centrifugaron y se descartó el sobrenadante, este lavado se repitió por tres ocasiones. Inmediatamente después se procedió a deshidratar las muestras con alcohol etílico en concentraciones ascendentes, de 50 al 100% por 10 min cada uno. Una vez deshidratadas, las muestras se sometieron a desecado por el método de punto crítico con CO<sub>2</sub> en un desecador Samdri-780 (Tousimis). Después de la desecación, las muestras se recubrieron con oro durante 5 min. en corriente directa empleando 1.5 Kv y 5mA, en un evaporador iónico JFC-1100 (JEOL), posteriormente las muestras se observaron y se obtuvieron micrografías en el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM35C.

## VI.- RESULTADOS

### 1.- FAGOCITOSIS

**Análisis cuantitativo.** Las observaciones realizadas al llevar cabo la interacción amibas-tricomonas nos permitieron apreciar que las amibas fagocitaron a la célula blanco inmediatamente después de que las tricomonas estuvieron en contacto con las amibas. Se observó claramente la emisión de pseudopodos de las amibas sobre las tricomonas que hicieron contacto con la superficie amibiana. Así podemos señalar que la fagocitosis de una tricomona desde que esta es adherida por la amiba y hasta encontrarse en el interior de una vacuola amibiana ocurre entre 60 y 90 segundos. Como las cepas de amibas utilizadas están formadas por una población heterogénea no todos los trofozoítos tienen la misma eficiencia fagocítica, aunado a esto a la disponibilidad y contacto de la célula blanco con las amibas es probable que a esto se deba que encontramos variaciones en la fagocitosis de las amibas (número de tricomonas fagocitadas por amiba y el porcentaje de amibas fagocíticas). Trofozoítos amibianos con un número significativamente menor de tricomonas incluso algunas sin tricomonas fagocitadas.

Cepa HM1: Al realizar los ensayos de fagocitosis con trofozoítos de la cepa HM1 de *E. histolytica* en proporción de 5 tricomonas por cada trofozoíto amibiano, encontramos que desde los 5 minutos iniciales de interacción se pudieron observar amibas con tricomonas en su interior, a este intervalo de tiempo se contaron en promedio 0.8 tricomonas por amiba. El número de tricomonas aumentó hasta 1.4 a los 10 min de interacción; el aumento del número de tricomonas por amiba fue progresivo, a los 15 min se contabilizaron en promedio 2 tricomonas por amiba; en cambio se observaron 3 tricomonas por amiba a los 30 min de interacción y finalmente a los 45 y 60 min de interacción los valores encontrados para esta cepa de amiba fueron de 3.2 y 3.5 tricomonas por amiba respectivamente (Fig. 1a). El otro parámetro utilizado para medir la fagocitosis fue el determinar el porcentaje de amibas fagocíticas a diferentes tiempos de interacción y se obtuvo lo siguiente: a los 5 min de interacción encontramos que el 46% de amibas contenían al menos una tricomona en su

interior, a los 10 min el 60%, a los 15 min el 73% de las amibas fueron fagocíticas. Los valores aumentaron conforme avanzó el tiempo, a los 20 min se encontraron 85% de amibas fagocíticas. a los 30 min 87% de las amibas contenían en su interior por lo menos una tricomona, a los 45 min el promedio de amibas fagocíticas fue de 87.5% y finalmente a los 60 min el porcentaje de amibas fagocíticas fue de 90% (Fig. 1).

Se realizó otra serie de experimentos con esta misma cepa de amibas en esta ocasión con una proporción de 10 tricomonas por cada trofozoito amibiano. Al llevar a cabo la determinación de los parámetros, encontramos que a los 15 min de interacción los valores fueron mayores y estadísticamente significativos ( $p < 0.002$ ) que los encontrados con la proporción de 5:1. Esta situación fue constante y las diferencias se mantuvieron con las mismas características en los siguientes tiempos de interacción analizados (30, 45 y 60 min). Los valores encontrados en cada uno de los tiempos fueron; a los 15 min 3.8 tricomonas/amiba, a los 30 min 5.5, a los 45 min 6 y finalmente a los 60 min 6.7 tricomonas por amiba (Fig. 1). En lo que respecta al porcentaje de amibas fagocíticas los valores encontrados fueron los siguientes; a los 15 min de interacción el 91.7% de amibas contenían tricomonas en su interior, a los 30 min el porcentaje de amibas con tricomonas fue de 93, a los 45 min el 98.8% y finalmente a los 60 min de interacción el 99.3% de las amibas contenían tricomonas en su interior (Fig. 1).

Subpoblación H<sub>1</sub>: Como se indicó en el apartado de materiales y métodos, los ensayos de fagocitosis con esta subpoblación de amibas se realizaron en las mismas condiciones que para la cepa HM1, en proporción de 1 amiba por 5 tricomonas. En este caso también se determinó el número de tricomonas fagocitadas por amiba a diferentes tiempos, así como el porcentaje de amibas fagocíticas.

El incremento en el número de tricomonas por amiba fue gradual, conforme avanzó el tiempo de interacción los valores aumentaron; en los 5 min iniciales de interacción las amibas contenían en promedio 1 tricomona por amiba, a los 10 min incremento a 1.6. a los 15 min se encontraron 2.2 tricomonas por cada trofozoito amibiano, a los 20 min 2.8, a los 30 min el valor

encontrado fue de 3.5, a los 45 min se observó un ligero incremento el cual alcanzó 4 tricomonas por amiba y finalmente, a los 60 min este valor fue de 5 (Fig.2).

Al llevar a cabo la determinación del porcentaje de amibas que contenían al menos 1 tricomona es decir, el porcentaje de amibas fagocíticas, también observamos un incremento constante al transcurrir los tiempos de interacción. En el primer tiempo analizado (5 min de interacción) se contabilizaron en promedio 57% de amibas fagocíticas, a los 10 min 68%, a los 15 min de interacción encontramos que un 79% de amibas contenían en su interior por lo menos una tricomona, a los 20 min el valor fue de 86%, a los 30 min el porcentaje de amibas con tricomonas ingeridas fue de 91%, a los 45 minutos el porcentaje de amibas fagocíticas fue de 92.5 y finalmente a los 60 min el valor encontrado fue de 95.5% (Fig. 3). En ninguna de las muestras cuantificadas se registró un 100% de amibas fagocíticas.

Subpoblación H3: Para determinar la actividad fagocítica de esta subpoblación, así como en los ensayos anteriores nosotros determinamos el número de tricomonas fagocitadas y el porcentaje de amibas fagocíticas. El número de tricomonas por amiba a los 15 min de interacción fue de 3.7; a los 30 min se contabilizaron 4 tricomonas y finalmente a los 60 min de interacción 3.5 (Fig. 2). Para este caso el porcentaje de amibas con tricomonas en su interior alcanzó el 100% desde los 15 min iniciales de interacción y este comportamiento se mantuvo durante los siguientes 45 min de interacción (Fig. 3).

Al realizar el análisis para valorar el comportamiento de las amibas durante los tiempos analizados, agrupamos los resultados de la actividad fagocítica, en donde se graficaron los promedios de tricomonas/amiba en intervalos de 5; (cero (amibas sin tricomonas completas en su interior), de 1 a 5 tricomonas por amiba, de 6 a 10, de 11 a 15 y 16 o más]. Para la cepa HM1, en proporción de 1 amiba por 5 tricomonas, al realizar el análisis, encontramos que a los 5 min de interacción el porcentaje de amibas que no contenían tricomonas en su interior fue de 55%, a los 10 min 41.5 % de amibas no presentaron tricomonas en su interior; esta disminución en el porcentaje de amibas sin tricomonas continuo apreciando a los 15 min de interacción valor encontrado fue

de 27%, a los 20 min fue de 16%, y finalmente a los 60 min de interacción el porcentaje de amibas sin tricomonas en su interior fue de 10%. En el intervalo de 1-5 tricomonas por amiba, a los 5 min interacción el 45% de amibas contenían en su interior por lo menos una tricomona y como máximo 5 tricomonas, a los 10 min de interacción el 57% de las amibas contenían tricomonas en su interior, a los 15 min hubo tricomonas de 67%, a los 20 min se contabilizaron 77% de amibas con tricomonas, este valor fue el máximo alcanzado en este intervalo. A partir de los 30 min se registró una disminución en el porcentaje de amibas que contenían de 1-5 tricomonas, a este tiempo el valor encontrado fue de 75%, a los 45 min de 70% y a los 60 min de 72%. No se observaron amibas que fagocitaran entre 6 y 10 tricomonas en los primeros 5 min de interacción. Solo se pudieron encontrar amibas con este número de tricomonas en su interior a partir de los 10 min de interacción, en este tiempo el valor encontrado fue de 2%, a partir de este tiempo se observó incremento en los parámetros, a los 15 min minutos el valor fue 5.5%, a los 20 min fue del 10%, a los 30 min de 14%, a los 45 min de 17% y finalmente a los 60 min el 18% contenían entre 6 y 10 tricomonas (Fig. 3a).

En el intervalo de 11 a 15 tricomonas por amiba el valor máximo alcanzado fue a los 60 min de interacción con un valor de 2%, se observó menos del 1% de amibas con 16 o más tricomonas en su interior (Fig. 3a). En la figura anterior se apreció que mientras el porcentaje de amibas sin tricomonas disminuyó conforme avanzó el tiempo de interacción, de manera inversa el porcentaje de amibas con tricomonas en el intervalo de 1 a 5 aumentó, obteniéndose el máximo a 20 min, después de los cuales se observó un descenso a los 30, 45 y 60 min de interacción; a la disminución en este intervalo (1 a 5), correspondió un aumento en el porcentaje de amibas con tricomonas en el siguiente intervalo (6 a 10), (Fig. 3a).

Para la cepa H<sub>1</sub> se realizó el análisis de igual manera que para la cepa HM1, en el valor de cero tricomonas, encontramos que a los 5 min de interacción el porcentaje de amibas que no contenían tricomonas en su interior fue de 42.5%, a los 10 min 34% de amibas no presentaron tricomonas en su interior esta disminución en el porcentaje de amibas sin tricomonas se continuó apreciando a

los 15 min de interacción en cuyo tiempo el valor encontrado fue de 22%, a los 20 min hubo 15%, y finalmente a los 60 min de interacción el porcentaje de amibas sin tricomonas en su interior fue de 5%. En el intervalo de 1 a 5 tricomonas por amiba, a los 5 min interacción el 56% de amibas contenían en su interior por lo menos una tricomona y como máximo 5, a los 10 min de interacción el 64% de las amibas contenían este número de tricomonas en su interior, a los 15 min el valor encontrado fue de 70%, a los 20 min se contabilizaron 71% de amibas con tricomonas siendo este valor el máximo alcanzado en este intervalo, después de los 20 min y a partir de los 30 min se registró una disminución en el porcentaje de amibas que contenían de 1-5 tricomonas, a los 30 min el valor encontrado fue de 68%, a los 45 min de 65% y a los 60 min de 57%. Las amibas que ingirieron entre 6 y 10 tricomonas no se observaron a los primeros 5 min de interacción, se pudieron encontrar amibas con este número de tricomonas en su interior a partir de los 10 min de interacción; en este tiempo el valor encontrado fue de 3%, a partir de este tiempo se observó un incremento en los valores, a los 15 min minutos fue 7%, a los 20 min fue del 14%, a los 30 min de 21%, a los 45 min de 24% y finalmente a los 60 min el valor encontrado fue del 31%. En el intervalo de 11 a 15 tricomonas por amiba el valor mínimo alcanzado fue del 1% a los 20 min de interacción y el valor máximo fue 6% a los 60 min de interacción, se observó menos del 1% de amibas con 16 o más tricomonas en su interior (Fig. 3b). De igual manera que en el análisis anterior, pudimos apreciar que mientras el porcentaje de amibas sin tricomonas disminuyó conforme avanzó el tiempo de interacción, de manera inversa el porcentaje de amibas con tricomonas en el intervalo de 1 a 5 aumentó conforme avanzó el tiempo de interacción y hasta los 20 min, después de los cuales se observó un descenso a los 30, 45 y 60 min de interacción, a esta disminución en este intervalo (1 a 5) correspondió un aumento en el porcentaje de amibas con tricomonas en el siguiente intervalo (6 a 10), (Fig. 3b).

Los resultados del análisis cuantitativos de los ensayos realizados con la cepa HK9 de *E. histolytica* la cual ha sido caracterizada como una cepa de baja virulencia encontramos lo siguiente: A los 5 min de interacción con las tricomonas encontramos en promedio 0.11 tricomonas por amiba, a los 10 min de

interacción se observó un pequeño incremento y el número de tricomonas por ameba fue de 0.23, a los 15 min de interacción el valor alcanzado fue de 0.49, a los 30 min de interacción se contabilizaron 0.88 tricomonas por cada trofozoito amebiano en promedio, a los 45 y 60 min de interacción los valores promedio encontrados fueron de 1.25 y 1.42 respectivamente. Al llevar a cabo el análisis del porcentaje de amebas con tricomonas en su interior los valores encontrados fueron los siguientes; a los 15 min encontramos 9.6% de amebas fagocíticas, en los siguientes intervalos los valores aumentaron paulatinamente así encontramos que a los 10 min de interacción el valor promedio encontrado fue de 19.6%, a los 15 min fue de 30.86%, posteriormente a los 30 min encontramos 39.3% de amebas con tricomonas, a los 45 min se contabilizaron 59.2% de amebas con tricomonas y finalmente a los 60 min de interacción el valor promedio de amebas con tricomonas ingeridas fue de 59.6% (Fig.4).

## 2.- DIGESTION

**Análisis cuantitativo.** Los resultados obtenidos en los experimentos preliminares fueron similares a los obtenidos anteriormente (Hernández-Gutiérrez R. Tesis profesional de Licenciatura Octubre de 1994). Las amebas de la cepa HK9:NIH incubadas en las condiciones descritas y mencionadas en el apartado de materiales y métodos para evaluar la actividad digestiva, fagocitaron en promedio 1 tricomona por ameba a los 30 min de interacción (Fig. 5a) y el 60.7% de las amebas mostraron capacidad fagocítica (Fig. 5b). En este caso el 100% de las tricomonas observadas dentro de las amebas se encontraron íntegras (Fig. 6). Durante el proceso de digestión los parámetros antes indicados se modificaron, a las 1.5 h el número de tricomonas por ameba fue de 0.76 (Fig. 5a), en estas condiciones sólo el 52.7% de las amebas contenían en su interior tricomonas (Fig. 5b); el 28% de las tricomonas se observaron íntegras dentro de las vacuolas, mientras que el 72% restante se observaron en proceso de digestión (Fig. 6). A las 3 h de digestión el número de tricomonas encontradas en el interior de las amebas disminuyó en relación con el pulso anterior el valor encontrado fue de 0.42 (Fig. 5a), mientras que el porcentaje de amebas con tricomonas en su interior fue de 33.8% (Fig. 5b); el 3.5% de las tricomonas se

encontraron íntegras y el 96.5% restante en proceso de digestión (Fig. 6), a partir de este periodo y hasta las 4.5 h la degradación de las tricomonas fue amplia y las 0.40 tricomonas por amibas presentes en este intervalo (Fig. 5a) se encontraron en su totalidad en un estado avanzado de digestión (Fig. 6), solo se observaron 29.5% de amibas con tricomonas del total de las analizadas (Fig. 6). Al finalizar las 6 h de digestión, no se observaron tricomonas en las vacuolas de los trofozoitos amibianos; en este caso, en un bajo número de amibas se observaron pequeñas vacuolas en las que no se distinguió material alguno en su interior, lo cual indica que las tricomonas fagocitadas fueron digeridas en su totalidad por los trofozoitos amibianos (Figs. 5a, 6)

Las amibas de la cepa HM1:IMSS presentaron 1.4 tricomonas por trofozoito amibianos en el pulso de 30 min (Fig. 5a) y un porcentaje de 71.5% de amibas con tricomonas en su interior (Fig. 5b), la totalidad de las tricomonas cuantificadas en este periodo se encontraron íntegras (Fig. 6). En los ensayos de digestión de 1.5 h a los valores encontrados se les observó una disminución y los valores encontrados fueron de 0.84 tricomonas por amiba (Fig. 5a) el porcentaje de amibas con tricomonas disminuyó a 60% (Fig. 5b), de las cuales el 39% se observaron íntegras y el 61% restante el proceso de digestión (Fig. 6), los valores de estos parámetros evaluados continuaron descendiendo y a las 3 h de incubación encontramos 0.51 tricomonas en promedio por trofozoito amibiano (Fig. 5a), la totalidad de las tricomonas observadas se apreciaron en proceso de digestión (Fig. 6), por otra parte el promedio de amibas con tricomonas fue de 40% (Fig. 5b). Posteriormente, a las 4.5 h de incubación los valores disminuyeron a 0.49 tricomonas por amiba (Fig. 5a), y el 33% de amibas (Fig. 5b) que se observaron con tricomonas en su interior solo presentaban éstas como un material en estado avanzado de degradación (restos celulares de tricomonas) (Fig. 6). Finalmente a 6 h de digestión no se observaron restos de tricomonas en el interior de los trofozoitos amibianos y las pocas vacuolas observadas se aprecian de menores dimensiones que aquellas que contenían tricomonas completas o restos de estas (Figs. 5a, 6).

Una vez obtenidos los datos de la digestión y el análisis estadístico de los mismos, reveló fue que no existen diferencias estadísticamente significativas

entre las dos cepas de *E. histolytica* analizadas (HM1 y HK9). Mediante regresión lineal encontramos que la vida media de las tricomonas en el interior de los trofozoitos amibianos para la cepa HM1 fue de 3 h, mientras que para la cepa HK9 fue de 3.1 h (Fig. 9); lo anterior nos revela que no existen diferencias para digerir tricomonas entre estas dos cepas de *E. histolytica*.

### 3.- FAGOCITOSIS

#### Análisis morfológico

a).- Microscopía óptica. La microscopía óptica nos permite observar procesos celulares *in vivo*, en este trabajo utilizamos el microscopio óptico equipado con contraste de fases y contraste diferencial de interferencia (Nomarski), lo que permitió la observación clara del proceso de fagocitosis, algo que no fue posible con microscopía óptica de campo claro. Al llevar a cabo el análisis morfológico de la fagocitosis en preparaciones en fresco de células vivas, se observaron las amibas con la forma característica, en diferentes fases de interacción con las tricomonas. Un número variable de tricomonas estuvieron adheridas a la superficie de los trofozoitos amibianos, otras en proceso de fagocitosis, y otras más se observaron en el interior de las vacuolas amibianas (Fig. 8). En los tiempos cortos de interacción entre ambos tipos celulares las tricomonas que se observaron adheridas a la superficie amibiana mantuvieron el movimiento de los flagelos y de la membrana ondulante, sin que este movimiento le permitiera a la tricomona liberarse de las amibas. El número de tricomonas en el interior de los trofozoitos amibianos fue variable, algunos de ellos fueron incapaces de fagocitar, mientras que otros contenían una o más tricomonas (Fig. 9). En los ensayos realizados con la proporción de una amiba por 5 tricomonas, se observaron hasta 16 tricomonas en algunas amibas después de 60 in de interacción, en cambio en los ensayos con la proporción 1:10 se contabilizaron hasta 42 en el mismo intervalo de tiempo. Generalmente se observó una tricomona en el interior de una vacuola amibiana, aunque en ocasiones se pudieron observar 2 o más tricomonas en una misma vacuola.

En tiempos cortos de interacción las tricomonas se observaron aún móviles en el interior de las vacuolas amibianas, se apreció el movimiento de los

flagelos así como el de la membrana ondulante y en algunos casos el movimiento fue tan vigoroso que las tricomonas giraban rápidamente en el interior de las vacuolas, probablemente debido a que son liberadas de los receptores por efecto de las enzimas digestivas sobre éstos.

La fagocitosis de tricomonas por las amibas ocurrió mediante la adhesión de las células blanco y una vez adheridas éstas, la amiba inició la emisión de los pseudopodos para llevar a cabo la fagocitosis (bocas fagocíticas). La ingestión de las tricomonas dio lugar a la formación de un canal, lo cual implicó la deformación temporal del flagelado hasta localizarse dentro de la amiba en una vacuola fagocítica, con la célula blanco en su interior (Fig. 8). Es importante señalar que a pesar de que las tricomonas fueron deformadas al ser ingeridas a través del canal fagocítico, estas se apreciaron vivas en el interior de las vacuolas amibianas, evidenciado por el movimiento de los flagelos. También se observó la formación de numerosas vacuolas pequeñas con porciones de tricomonas dentro de ellas.

#### **b).- Microscopía electrónica de barrido**

##### **ADHESIÓN**

Este equipo nos permite realizar observaciones en tercera dimensión de las células fijadas en tercera dimensión, aunque sólo nos permite observar la superficie celular, nos aporta información que no es posible obtener con microscopía óptica. Mediante este tipo de análisis, se corroboró la morfología característica tanto de amibas como de las tricomonas. Durante la interacción entre ambas células se observó un número variable de tricomonas adheridas a la superficie amibiana, en base a lo observado la adhesión parece no ser al azar pues pudimos apreciar que las tricomonas se adhirieron a las amibas preferentemente por alguna parte lateral de la misma (Figs.10a y 10b). No observamos que las tricomonas fueran adheridas por su parte posterior (axostilo) o por su parte anterior (flagelos), probablemente debido al sentido del movimiento de las tricomonas y al movimiento vigoroso de los flagelos, el cual evitó que las amibas pudieran adherir al flagelado por las regiones señaladas. En lo que parecen ser las fases iniciales de adhesión las tricomonas conservaron

su forma característica, y se adhirieron a cualquier parte de la superficie de las amibas.

### FAGOCITOSIS

Posterior a la adhesión de las tricomonas ocurrió la ingestión de las mismas, la cual se caracterizó por llevarse a cabo principalmente mediante la emisión progresiva de pseudopodos sobre la tricomona, acción que provocó la formación de las bocas fagocíticas, se observaron los pseudopodos amibianos avanzando sobre la superficie de las tricomonas pero estos pseudopodos se aprecian de menores dimensiones que la tricomona y aunque aparentemente la tricomona se observa sin cambios ésta esta siendo deformada a travez del canal fagocítico (Fig. 10a y 10b). Se pudieron apreciar amibas con pseudopodos claramente formados pero sin tricomonas adheridos a ellos, en estos casos se observó claramente la boca fagocítica de la que probablemente se desprendió la tricomona debido a los procesos de preparación de las muestras, se observaron además tricomonas lisadas adheridas a la superficie amibiana (Fig. 11). Otro mecanismo usado con menor frecuencia pero que fue utilizado por las amibas para llevar a cabo la ingestión de las tricomonas, fue aquel que se caracterizó por la falta de emisión de pseudopodos sobre la superficie de las tricomonas, en este caso una vez que las tricomonas estuvieron adheridas a la superficie amibiana, el flagelado se observa que sufre un aparente hundimiento sobre la superficie amibiana y al interior de la misma (Fig. 12). Mientras lo anterior ocurrió en la superficie de las amibas, en el interior de las mismas se formó el canal fagocítico a través del cual la tricomona fue ingerida.

Por otro lado, y como ocurrió frecuentemente, las tricomonas que se observaron adheridas a las amibas o parcialmente fagocitadas, mantuvieron su forma periforme característica (Fig. 10a,10b,11); ocasionalmente se pudieron apreciar tricomonas en forma ameboide en proceso de fagocitosis (Fig. 13). En las muestras se observaron algunas tricomonas lisadas, adheridas a la superficie amibiana y algunas otras libres. No fue posible determinar si estas tricomonas murieron debido al procedimiento de preparación de las mismas; si es el resultado de una lisis celular dependiente de contacto o si esta mediada por

factores solubles liberados por las amibas, o bien corresponden a las tricomonas muertas que se encuentran comunmente en el cultivo.

En algunos casos al despegarse las tricomonas de las amibas, debido probablemente al tratamiento a que fueron sometidas durante la preparación de las muestras, fue posible observar sobre la superficie de los trofozoitos amibianos la boca fagocítica, así como también parte del canal fagocítico, el cual se observa con una luz irregular (Fig. 11). Al término del proceso de fagocitosis, una vez que las amibas completaron la ingestión de las tricomonas y estas se encuentran en el interior de las vacuolas amibianas estas se aprecian como protusiones esferoidales en la superficie de los trofozoitos amibianos, tales protusiones corresponden en tamaño a las cuales tricomonas que se observan adheridas a la superficie de las amibas (Fig. 14).

### c).- Microscopía electrónica de transmisión

#### ADHESION

Al realizar el análisis morfológico de la adhesión tricomonas-amibas (amibas de la cepa HM1) con el microscopio electrónico de transmisión, se corroboraron observaciones previas realizadas mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido. Esto es, que la adhesión de las tricomonas a las amibas ocurrió en número variable y sobre cualquier punto de la superficie amibiana (Fig. 15). La adhesión fue el primer paso que ocurrió previo a la ingestión de la célula blanco por la célula fagocítica; en el presente caso, pudimos observar que la adhesión de *Trichomonas vaginalis* a la superficie de las amibas presenta ciertas características; 1.- Las tricomonas siempre son adheridas por una parte lateral de su cuerpo, 2.- Una vez adheridas a la superficie amibiana las tricomonas no se liberan de aquella aun a pesar del movimiento vigoroso que presentan, 3.- En las etapas iniciales de la adhesión a la superficie amibiana las tricomonas mantienen su forma periforme o en algunas ocasiones adoptan la forma ameboide, 4.- La superficie de adhesión entre ambos tipos celulares puede ser amplia o reducida, 5.- El número de tricomonas adheridas a la superficie amibiana es variable y puede ocurrir por cualquier parte de éstas.

El análisis específico de la unión tricomonas-amibas reveló que el área de contacto entre las células fue variable: se encontraron zonas de adhesión limitada, así como áreas de contacto o superficie de adhesión amplias (Fig. 16a y 16b).

En toda el área o superficie de adhesión se pudieron apreciar dos zonas claramente distinguibles, una de éstas se caracterizó por presentar una distancia muy pequeña entre las membranas de ambos tipos celulares; en estos casos y a baja amplificación no se observó un espacio que separe ambas membranas (Fig. 16b), la interacción entre las membranas de ambos tipos celulares se observa ininterrumpida y su unión es continua (Fig. 16b), también se observó con una gran discontinuidad y gran espacio entre ambas membranas de ambos tipos celulares (Fig. 16a) en dicho espacio se aprecia un material un poco más denso a los electrones. El citoplasma subyacente de la amiba se observa normal, con algunas vacuolas de tamaño pequeño y algunos granulos de glucógeno.

#### FAGOCITOSIS.

Una vez que las células blanco se encontraron en contacto con la superficie amibiana y se estableció la adhesión entre amibas y tricomonas, probablemente como resultado de la interacción ligandos-receptores de ambos tipos celulares, se apreció la aparición de una región fibrogranular exactamente por debajo de la membrana plasmática amibiana en contacto con las tricomonas (Fig. 17), esta zona ocupó todo el espacio correspondiente al área de contacto con la célula blanco y probablemente corresponde a las denominadas placas de adhesión. Posterior a esto, inició la internalización de las tricomonas mediante la formación de un canal fagocítico, el cual mostró un contorno irregular (Fig. 18a y 18b), a diferencia de como se observó a nivel de microscopía óptica donde lo apreciamos como una estructura lineal.

A través de este canal formado por los pseudopodos las tricomonas fueron internalizadas por las amibas, para esto las tricomonas fueron deformadas por la fuerza que la amiba ejerce en este canal (Fig. 18a y 18b). En este canal pudimos distinguir claramente las membranas plasmáticas de ambos tipos celulares. Por la parte interior del canal, y a todo lo largo del mismo se observó

claramente una región fibrogranular, la cual se observó más desarrollada en la anterior que en la region posterior o más interna (Fig. 18a y 18b) otros autores han demostrado que esta zona está constituida por componentes del citoesqueleto, principalmente actina y miosina.

La internalizacion de las células blanco por las amibas se llevó a cabo fagocitandolas con la formación de pronunciados pseudopodos como se describe arriba, aunque tambien pudimos observar la ingestión de las tricomonas sin la formación de los pseudopodos modalidad en la cual tambien se puede apreciar la formación de la región fibrogranular a lo largo del canal fagocítico (fig. 19). Tambien se pudo observar la fagocitosis de varias tricomonas a la vez por el mismo canal fagocítico, las cuales se pudieron observar en una misma vacuola fagocitica. Una vez en el interior de las vacuolas amibianas en los tiempos cortos de interacción, las tricomonas se observaron íntegras, se apreció la continuidad de su membrana plasmática y se pudieron distinguir varias estructuras intactas (normales) como hidrogenosomas, nucleo, vacuolas y flagelos (Fig. 20a y 20b). Estas condiciones corresponden probablemente a las situaciones en las cuales las tricómonas se mueven en el interior de las vacuolas amibianas, en estas situaciones se observaron las membranas de las vacuolas y de las tricomonas estrechamente unidas (Fig. 20a y 20b).

Una forma de fagocitosis diferente a la arriba mencionada consistió en que porciones de tricomonas fueron fagocitadas, las amibas las ingieren de esta manera mediante la formación del canal fagocítico, el cual una vez formado y al final del mismo este sufre extrangulamientos para formar una o varias vacuolas fagociticas de menores dimensiones a la tricomona, que contendran en su interior porciones de tricomona, en este caso se observarón tanto membranas plasmáticas como contenido citoplásmico de las mismas (Fig. 21). Así mismo, se pudieron observar sólo porciones citoplásmicas de tricomonas sin la presencia de membrana plásmatica (Fig. 21), Así encontramos en el interior de las vacuolas amibianas porciones de citoplasma de las tricomonas, algunas otras citoplasma junto con membrana plasmática y en otras más solo porciones de membrana plasmática de la tricomona (Fig. 21)

Al concluir el proceso de ingestión de las tricomonas por las amibas, ya sea de manera completa o en pequeñas porciones, la región fibrogranular observada en el canal fagocítico desapareció, alrededor del recién formado fagosoma amibiano se observa que el citoplasma contiene pequeñas vacuolas y granulos de glucogeno, similar a los observados en otras regiones del citoplasma de las amibas (Fig. 20a, 20b y 21). Lo anterior nos indica que la zona fibrogranular es formada temporalmente y esta involucrada únicamente y de manera activa en el proceso de fagocitosis, esto es en la formación del canal fagocítico, la succión de la célula blanco y finalmente la formación de la vacuola fagocítica.

Una vez que ocurrió la fagocitosis observamos en algunos casos que las tricomonas se observaron vacuoladas en el interior de las vacuolas amibianas, normalmente cuando las vacuolas se observan en el interior de las tricomonas se apreciaron vacías pero en algunas ocasiones se les observó con material granular y fibrilar en su interior (Fig. 22), el material que se apreció en las vacuolas de la tricomonas correspondió a porciones de amibas fagocitadas. En base a lo observado, podemos establecer que la fagocitosis de porciones de amiba por las tricomonas ocurre previo a la fagocitosis de las tricomonas por las amibas (Fig. 23).

#### 4.- DIGESTION

##### Análisis morfológico

##### a).- Microscopio Electrónico de Transmisión.

Mientras que las investigaciones realizadas para estudiar la fagocitosis en *E. histolytica* han sido numerosas, el evento de la digestión del material fagocitado ha sido escasamente estudiado, a tal grado que los cambios estructurales que sufren las células fagocitadas en el interior de las vacuolas amibianas no han sido reportados. En nuestro trabajo uno de los objetivos es el describir los cambios estructurales que sufren las células fagocitadas (tricomonas) durante el proceso de digestión.

Uno de los aspectos interesantes de nuestro modelo es el hecho de que las tricomonas una vez que han sido fagocitadas y se encontraron dentro de las

vacuolas amibianas, se observó el movimiento de los flagelos y la membrana ondulante, lo que nos evidencia que las tricomonas son fagocitadas vivas. La movilidad de las tricomonas en el interior de las vacuolas amibianas se perdió progresivamente, hasta su totalidad en algunos minutos.

Para realizar estos ensayos se utilizaron trofozoítos de la cepa amibiana HM1, llevar a cabo el análisis de las muestras de los pulsos de fagocitosis a los 5 y 10 min de interacción que son los tiempos en los cuales encontramos el mayor número de tricomonas móviles en el interior de las vacuolas amibianas a nivel de microscopía óptica observamos que las tricomonas pierden su forma periforme característica y se observan redondeadas en el interior de las vacuolas amibianas, a nivel de microscopio electrónico de transmisión corroboramos lo anterior y observamos que el citoplasma de las tricomonas se presenta con un aspecto uniforme, se pueden distinguir claramente los hidrogenosomas los cuales se observan delimitados y un poco más densos a los electrones que el resto del citoplasma de las tricomonas, se observaron también algunas vacuolas de diferentes tamaños y con cierto material dentro de las mismas, la membrana plasmática de la tricomonas se observó normal y a altas ampliaciones se aprecia la estructura trilaminar de la misma sin cambios en su estructura, entre la membrana plasmática de las vacuolas y la membrana plasmática de las tricomonas se puede observar ocasionalmente un pequeño espacio el cual se observa con material denso; en otras ocasiones este espacio es tan pequeño que no es posible apreciarlo. Se pudieron observar otras estructuras como los flagelos, en los que se aprecian la estructura típica del axonema y la disposición de los microtubulos 9 + 2, así como también la membrana plasmática que los rodea con su estructura trilaminar (Fig. 21 y 23).

A los 20 min de interacción, además de las vacuolas que observamos con tricomonas completas y con las características mencionadas arriba se observaron además tricomonas con una apariencia diferente, en estos casos la apariencia del citoplasma fue irregular y granuloso; se observaron espacios claros, algunas áreas con material granular de diversa densidad a los electrones, los hidrogenosomas ya no se apreciaron bien delimitados, se observaron como una masa granular amorfa y densa y sin su forma redondeada típica, las

vacuolas ya no se aprecian en la misma cantidad y su contenido se observó muy similar al del resto del citoplasma de la tricomona. Por su parte la membrana plasmática se observó sin sufrir cambios; por su parte el espacio entre las membranas plasmáticas de la vacuola y la tricomona se observó variable, pudimos observar ambas membranas plasmáticas completamente adosadas una a la otra, así como también un espacio significativo entre ambas, no logramos observar otras estructuras como las de los flagelos (Fig. 24).

A los 30 min de digestión, además de las observaciones anteriores observamos que el material citoplásmico en degradación de la tricomona aun se observó rodeado por su propia membrana, la única diferencia clara que observamos es que la cantidad de material citoplásmico de la tricomona ha disminuido considerablemente (Fig. 25).

Después de los 45 min de digestión además de algunas tricomonas completas y otras en las condiciones arriba mencionadas observamos que el contenido citoplásmico de las tricomonas ha disminuido considerablemente en cantidad; se observaron cumulos de material granular y varias vacuolas con material en su interior en este tiempo las membranas plasmáticas de las tricomonas aun se observaron aunque con una apariencia distinta a la presentada en los tiempos anteriores, en este tiempo se observó difusa y sin distinguirse la estructura bilaminar de la misma (Fig. 26).

A los 60 min de interacción el contenido de las vacuolas digestivas es considerablemente menor en cantidad a lo observado en los tiempos anteriores y el poco material que se observa se aprecia en forma granular sin formar grandes cumulos de material y es muy poco denso a los electrones, ya no es posible observar la membrana plasmática que aun se observó rodeándolo en los tiempos anteriores pues solo es posible observar la membrana plasmática de las vacuolas digestivas amibianas (Fig. 27). En observaciones hechas a baja amplificación estas vacuolas amibianas que mencionamos, se observan de un tamaño considerablemente menor al que tenían en el pulso de fagocitosis. En este intervalo de tiempo en las vacuolas amibianas no fue posible observar material que indique que sea restos de tricomona.

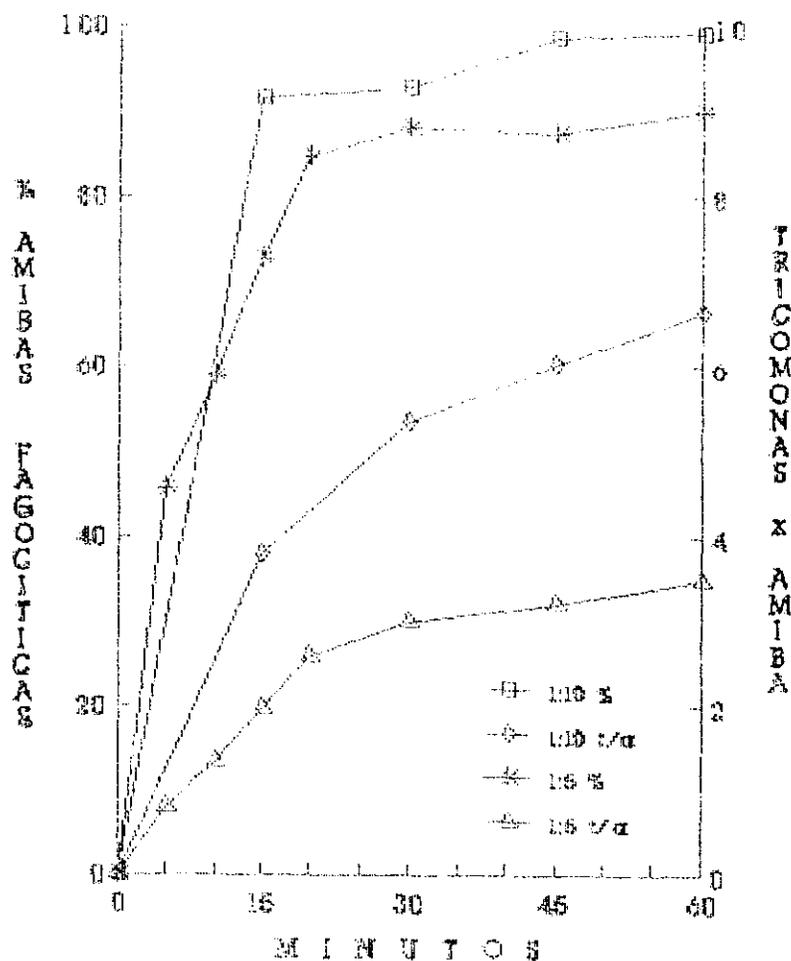


Fig. 1.- Fagocitosis de tricomonas por *E. histolytica*, en proporción 5:1 y 10:1. Se observó la fagocitosis de tricomonas por las amibas desde los 5 min de interacción, se presentaron diferencias estadísticamente significativas a partir de los 15 min y hasta los 60 min de interacción entre las dos proporciones usadas; para la proporción 10:1 a los 60 min el número de tricomonas por amiba fue prácticamente el doble que el de la proporción 5:1. En cuanto al porcentaje de amibas fagocíticas las diferencias no fueron tan amplias pero si estadísticamente significativas.

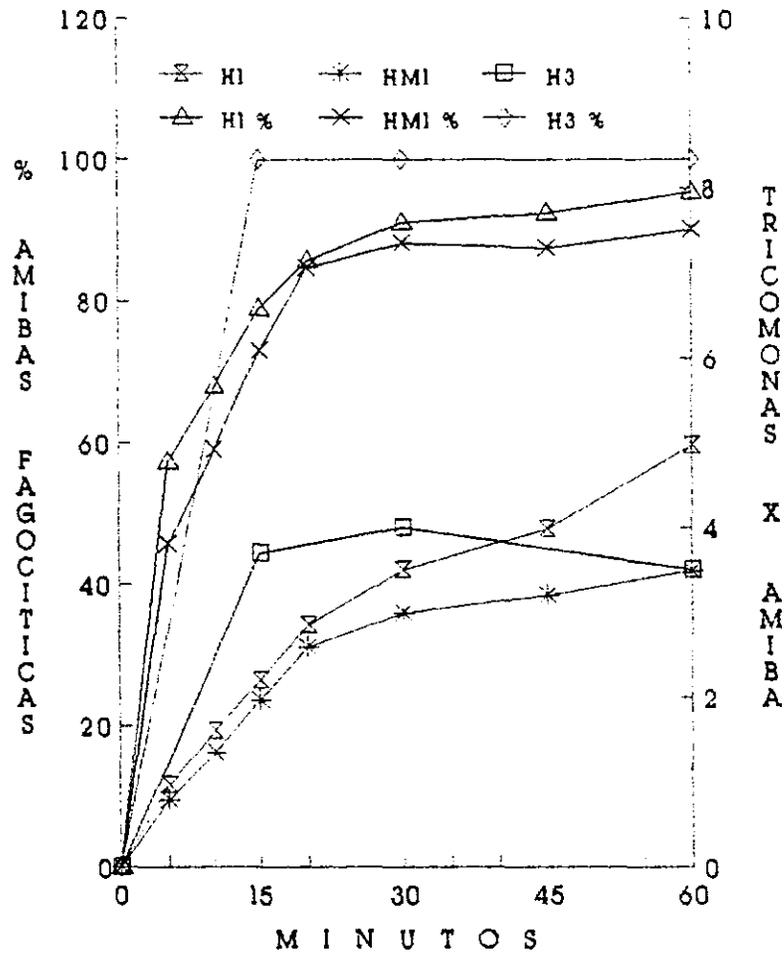


Fig. 2.- Fagocitosis de tricomonas *E. histolytica*, cepa HM1 y subpoblaciones H<sub>1</sub> y H<sub>3</sub>. Se observaron tricomonas en el interior de las amibas desde lo 5 min de interacción; se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre la cepa HM1 y la H<sub>1</sub> a los 45 y 60 min de interacción. La subpoblación H<sub>3</sub> mostró diferencias estadísticamente significativas desde los 15 min con la cepa HM1 y en los 15 y 30 min con subpoblación H<sub>1</sub>. En el porciento de amibas fagocíticas entre la cepa HM1 y la subpoblación H<sub>1</sub> se registraron diferencias estadísticamente significativas a los 45 y 60 min y la fagocitosis en la subpoblación H<sub>3</sub> fue estadísticamente significativa mayor que las dos anteriores desde los 15 min de interacción.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

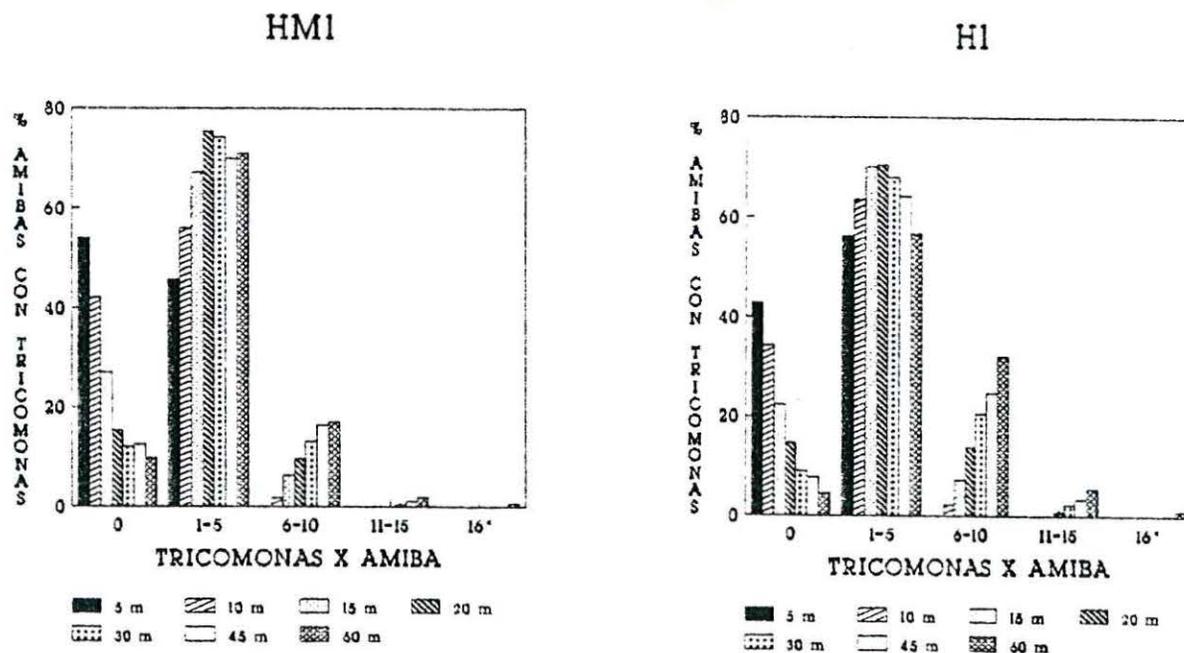


Fig. 3.- Fagocitosis de tricomonas por *E. histolytica*. Al realizar el analisis de la fagocitosis en intervalos por número de tricomonas por amibas y determinar el porciento de amibas con tricomonas en su interior, encontramos que en el intervalo con valor de cero, los valores son mas altos en la cepa HM1 que en la subpoblación H<sub>1</sub>, los cuales disminuyen en ambas cepas amibianas; a la disminución de los valores en este intervalo corresponde un aumento progresivo en el siguiente tal, aumento es menor lento para la cepa HM1 que para la H<sub>1</sub>.. A partir de los 30 min se observa una disminución de los valores más pronunciado en la población H<sub>1</sub>, en el siguiente intervalo el valor máximo alcanzado fue a los 60 min con un 34 % para la población H<sub>1</sub> y para la cepa HM1 el valor fue de un 27% al mismo tiempo.



## BIBLIOTECA CENTRAL

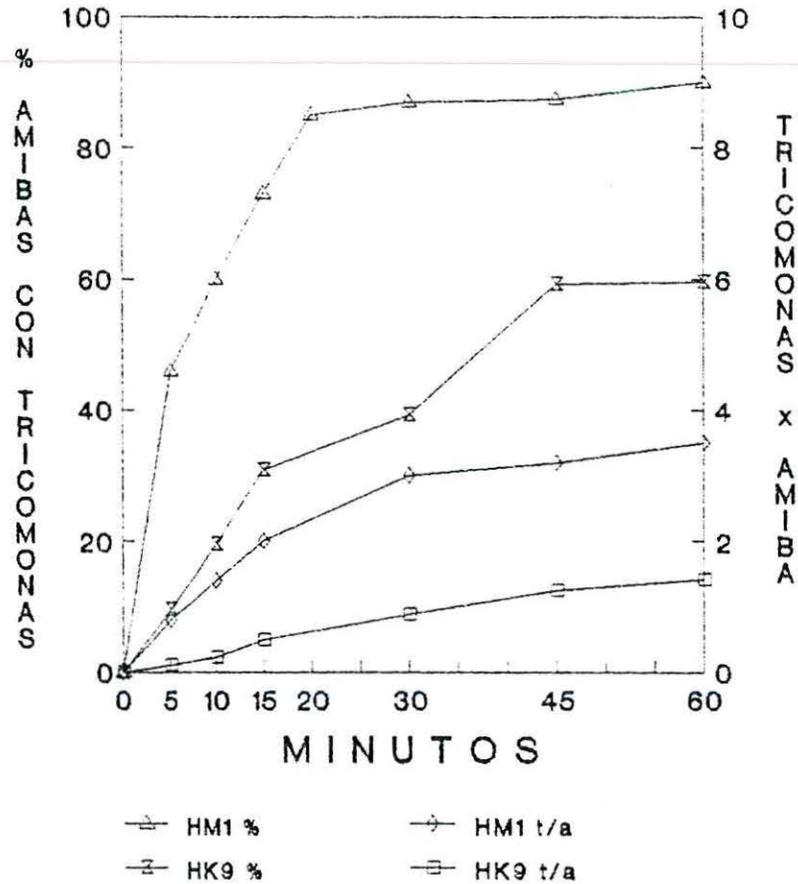
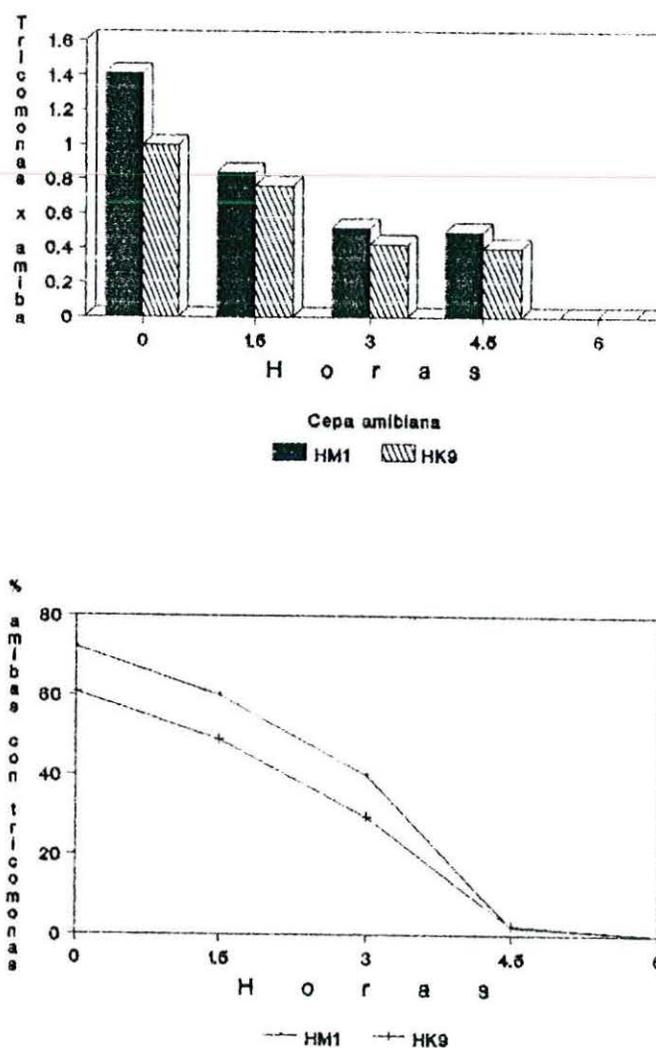


Fig. 4.- Fagocitosis de tricomonas por *E. histolytica*. Al realizar la comparación de la actividad fagocítica entre la cepa de elevada virulencia HM1 y la de baja virulencia HK9, observamos que desde los 5 min de interacción la cepa HM1 muestra una actividad fagocítica significativamente mayor a la de la cepa HK9, tal diferencia se mantiene durante todos los tiempos de interacción y hasta los 60 min, en los que encontramos practicamente el doble de tricomonas por amiba y un tercio más del porciento de amibas fagocíticas para la cepa HM1 en comparación con la cepa HK9.



CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

Fig. 5.- Digestión de tricomonas por amibas. a) La actividad digestiva de *E. histolytica* fue evidenciada por la disminución del número promedio de tricomonas en el interior de las amibas, en ambas cepas amibianas, la degradación intracelular de tricomonas fue mayor a las 3 h, después de 6 no se observaron tricomonas dentro de las amibas. b) La digestión se evidenció también por la disminución del porcentaje de amibas con tricomonas en su interior, nuevamente la mayor disminución del parámetro evaluado fue a las 3 h; después de las 6 h no se observaron amibas con tricomonas.

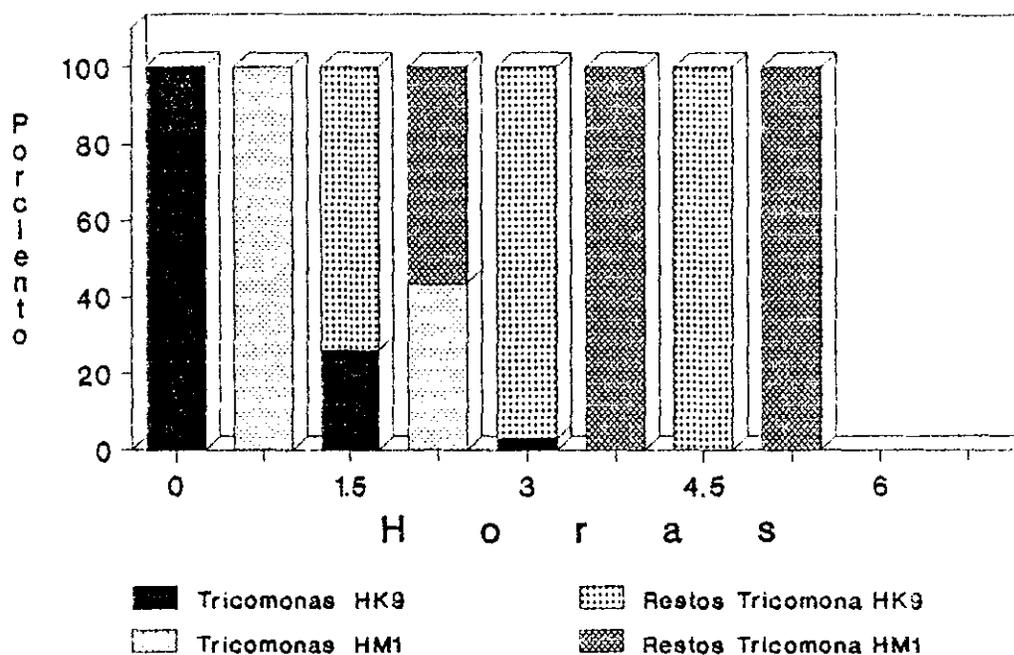


Fig. 6.- Digestión de tricomonas por *E. histolytica*. Las tricomonas contenidas en el interior de las amibas despues del pulso de fagocitosis estuvieron integras en su totalidad; despues de 1.5 h de digestión el 28% de las tricomonas contenidas en las amibas de la cepa HK9 y el 39% de las contenidas en las de la cepa HM1 se observaron completas. En los periodos de 3 y de 4.5 h las amibas contenian principalmente restos de tricomonas, los cuales desaparecieron a las 6 h.

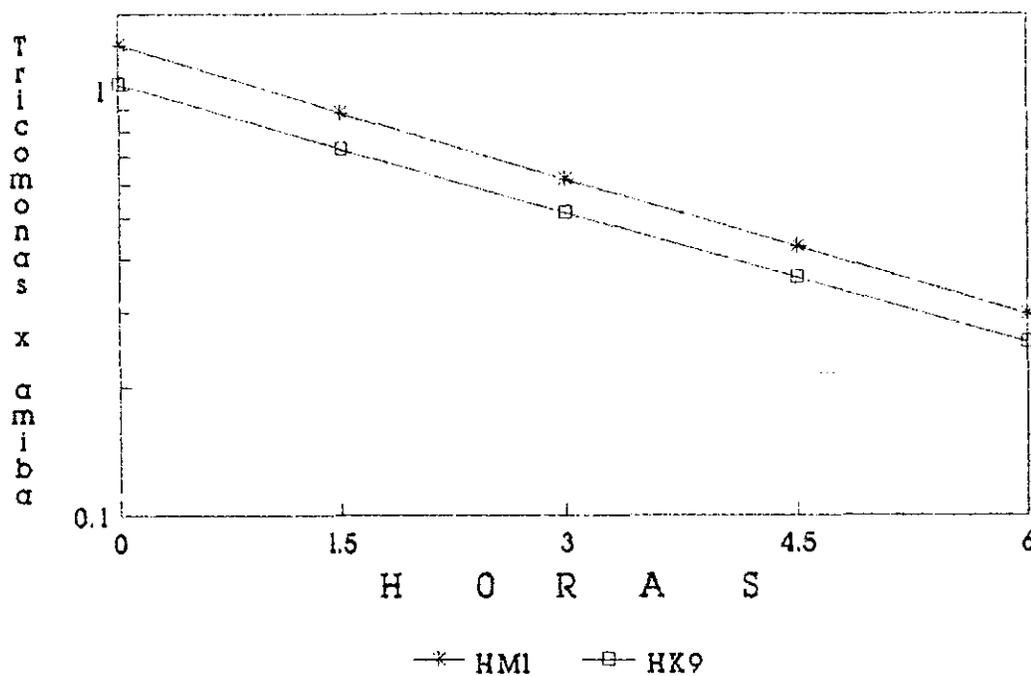


Fig. 7.- Digestión de tricomonas por *E. histolytica*. Al realizar el análisis de los resultados numéricos de la digestión entre las cepas HM1 y HK9 mediante regresión lineal no se observó una diferencia significativa, pues la vida media de las tricomonas fue de 3.0 h y 3.1 h respectivamente.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

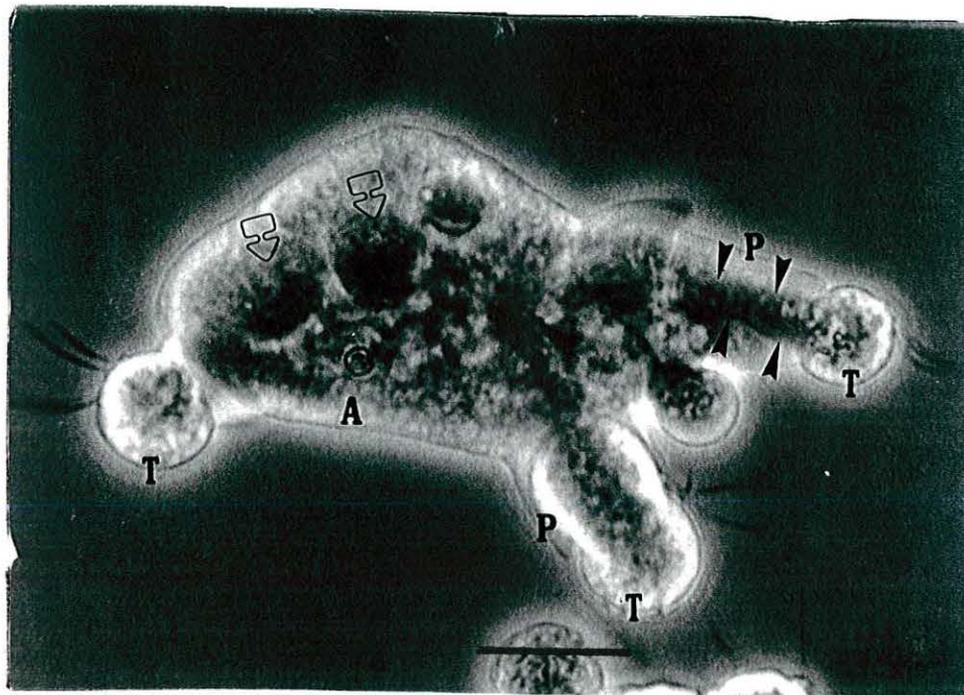


Fig. 8.- Fagocitosis de tricomonas por *E. histolytica*. Se distinguen diferentes etapas de la interacción ameba-tricomonas. La adhesión de la célula blanco a las amebas ocurrió por la región lateral de las tricomonas. La fagocitosis se llevó a cabo por cualquier parte de la célula amebiana. La ingestión implicó la emisión de pseudópodos (Ps) por la ameba, así como la formación de un canal fagocítico a través del cual la tricomonas fue interiorizada (puntas de flecha), hasta ser incorporada en el interior de una vacuola amebiana, durante el tránsito por el canal fagocítico la tricomonas se deformó y finalmente en la vacuola amebiana adoptó una forma redondeada (flecha vacía). Fagocitosis a los 5 min de interacción. Preparación en fresco. Contraste de fases. Barra= 10  $\mu$ m.

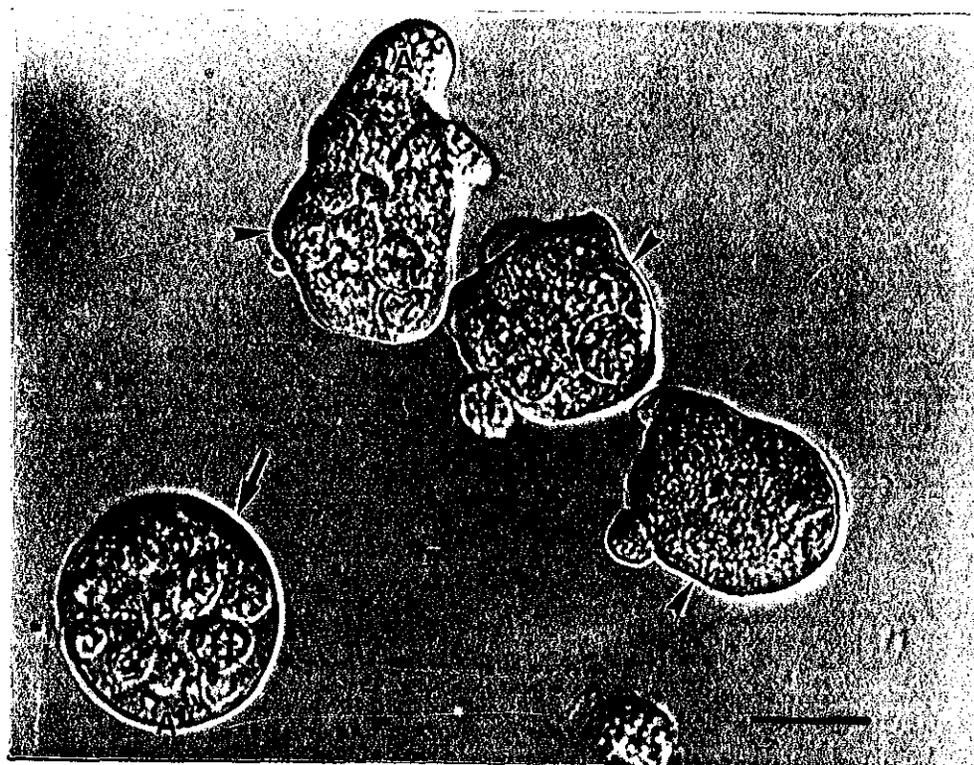


Fig. 9.- Fagocitosis de tricomonas por *E. histolytica*. La fagocitosis de tricomonas (t) por las amibas (A) fue asincrónica y variable en cuanto al número de tricomonas en el interior de las amibas, pues se pudieron observar amibas con un gran número de tricomonas en su interior (flecha), otras con menor número o sólo una tricomona dentro de ellas (punta de flecha). Fagocitosis a los 15 min de interacción, preparación en fresco. Contraste diferencial de interferencia (Nomarski). Barra= 15  $\mu$ m.

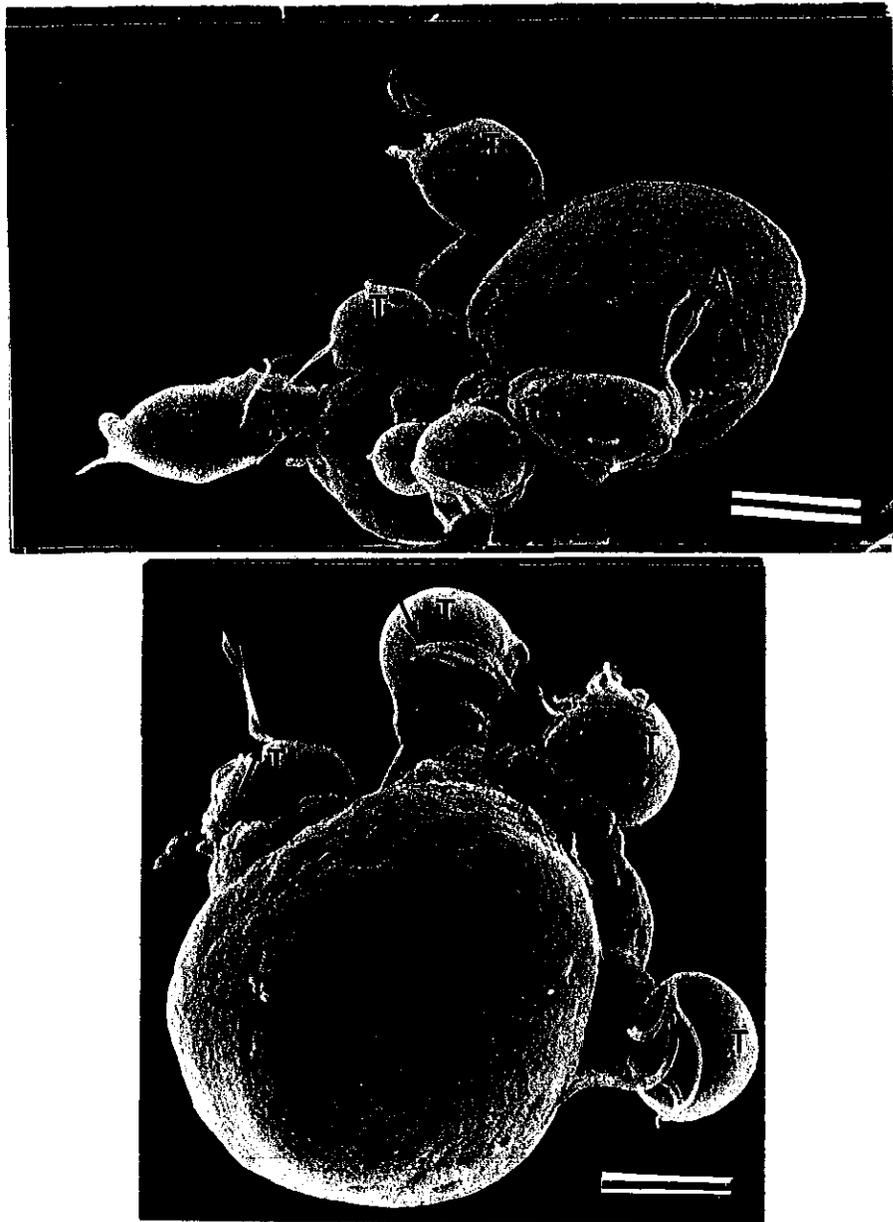


Fig. 10.- Adhesion de *T. vaginalis* por *E. histolytica*. A), Se observan un número variable de tricomonas (T) adheridas a la superficie de los trofozoitos amibianos (A), se aprecia una tricomona adherida a todo lo largo de su cuerpo (flecha), algunas otras tricomonas se aprecian adheridas por pequeñas porciones (asterisco). B) Se observan tricomonas (T) adheridas a varias partes de la superficie amibiana (A) todas las tricomonas adheridas se aprecian con los flagelos y el axostilo libre (puntas de flechas). Microscopio electrónico de barrido. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .

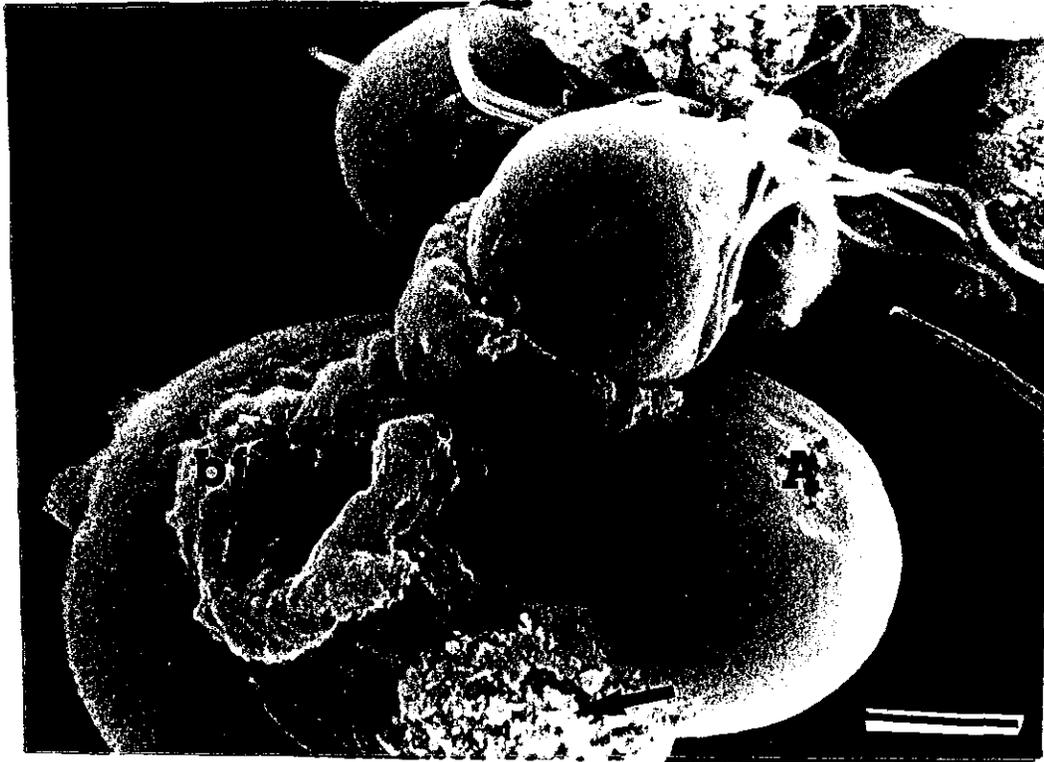


Fig. 11.- Fagocitosis de tricomonas por *E. histolytica*. Se observa una tricomona (T) parcialmente fagocitada por el trofozoito amibiano (A), se aprecia claramente como el pseudopodo (Ps) emitido por la amiba rodea a la tricomona parcialmente. Se distingue una boca fagocítica (bf) de la que probablemente se desprendió la célula blanco, Se aprecian además restos celulares adheridos a la superficie amibiana (flecha). Microscopio electrónico de barrido. Barra = 5  $\mu\text{m}$ .

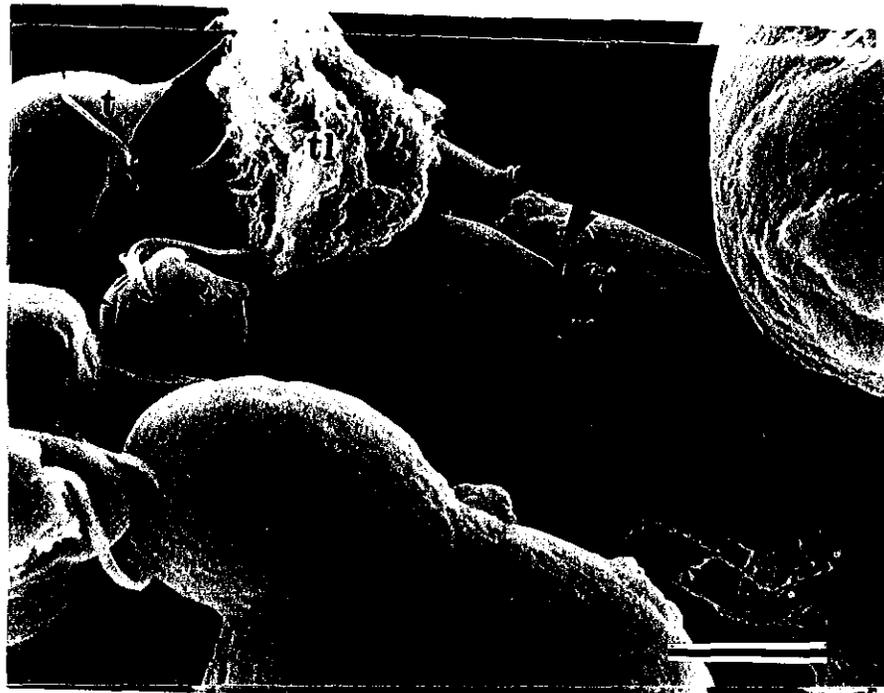


Fig. 12. Fagocitosis de tricomonas por *E. histolytica*. Se pudo observar que la fagocitosis de las tricomonas ocurre, raramente, sin la emisión de los pseudopodos; en estos casos se observaron que las tricomonas (T) practicamente se hunden (flecha) sobre la superficie amibiana (A). Tambien se observan tricomonas aparentemente libres (puntas de flecha), una tricomona lisada (tl) y sobre la superficie amibiana una boca fagocitica de la cual seguramente se desprendió una tricomona (asterisco). Microscopio electrónico de barrido. Barra = 10  $\mu$ m.

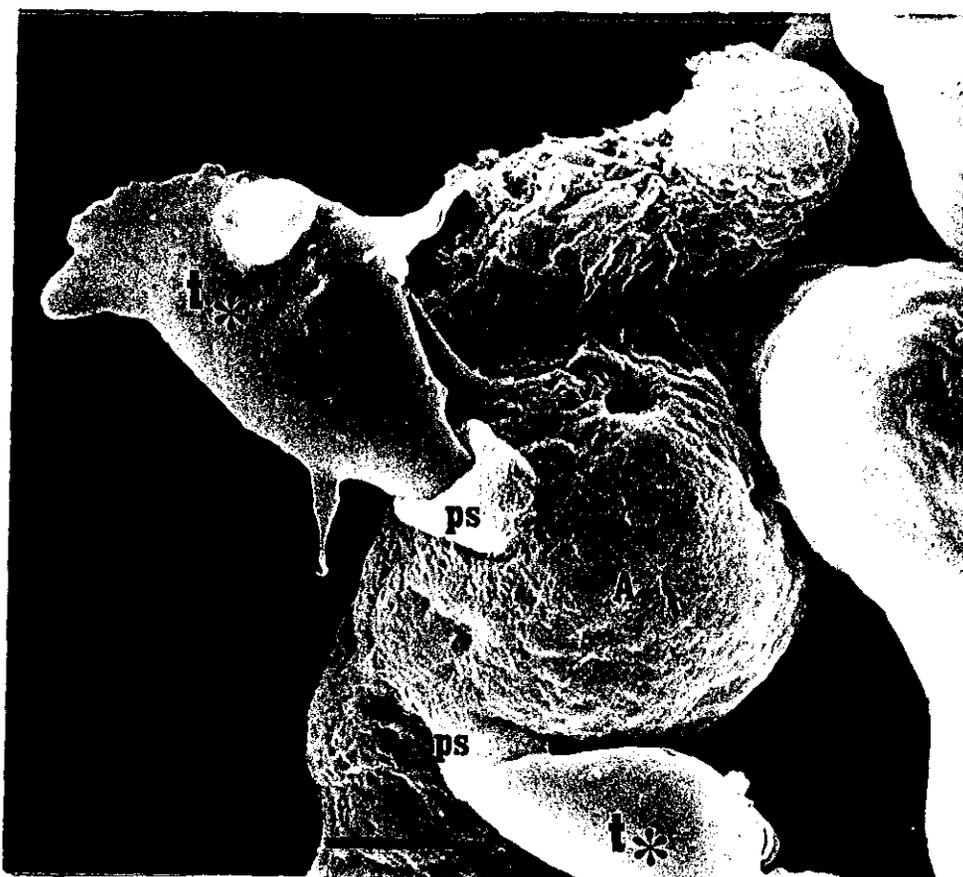


Fig. 13.- Fagocitosis de tricomonas por *E. histolytica*. Después de adheridas la tricomonas (t) a la superficie de la amibas (A), la fagocitosis la llevan a cabo las amibas mediante la emisión de pseudopodos (ps) aunque las tricomonas unidas al pseudopodo se aprecian generalmente redondeadas, en algunas ocasiones las tricomonas pierden su forma redondeada y al ser ingeridas observan con aspecto ameboide (asterisco). Microscopio electrónico de barrido. Barra = 10  $\mu$ m.

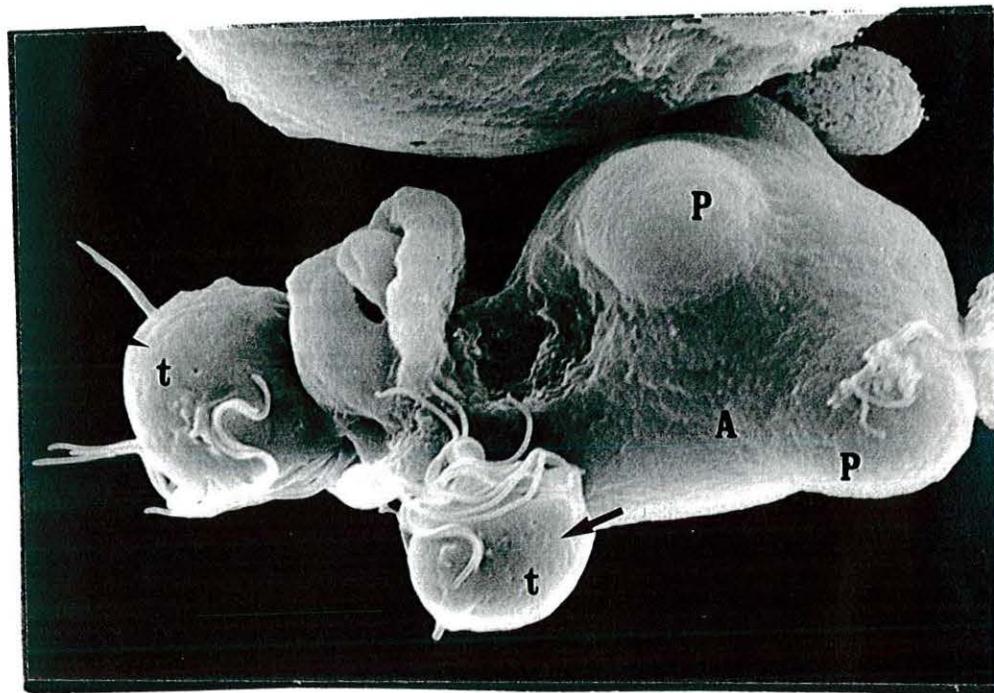
**CUCBA****BIBLIOTECA CENTRAL**

Fig. 14.- Fagocitosis de *T. vaginalis* por *E. Histolytica*. La adhesión y la fagocitosis de varias tricomonas (T) son asincrónicas, de manera tal que se pueden observar tricomonas en fases iniciales de adhesión (flecha), otras parcialmente ingeridas (punta de flecha) y aunque no se observan directamente, la presencia de protusiones esferoidales (P) en la superficie de las amibas es una evidencia de la presencia de tricomonas en los fagosomas. Microscopio electrónico de barrido. Barra = 15  $\mu$ m.

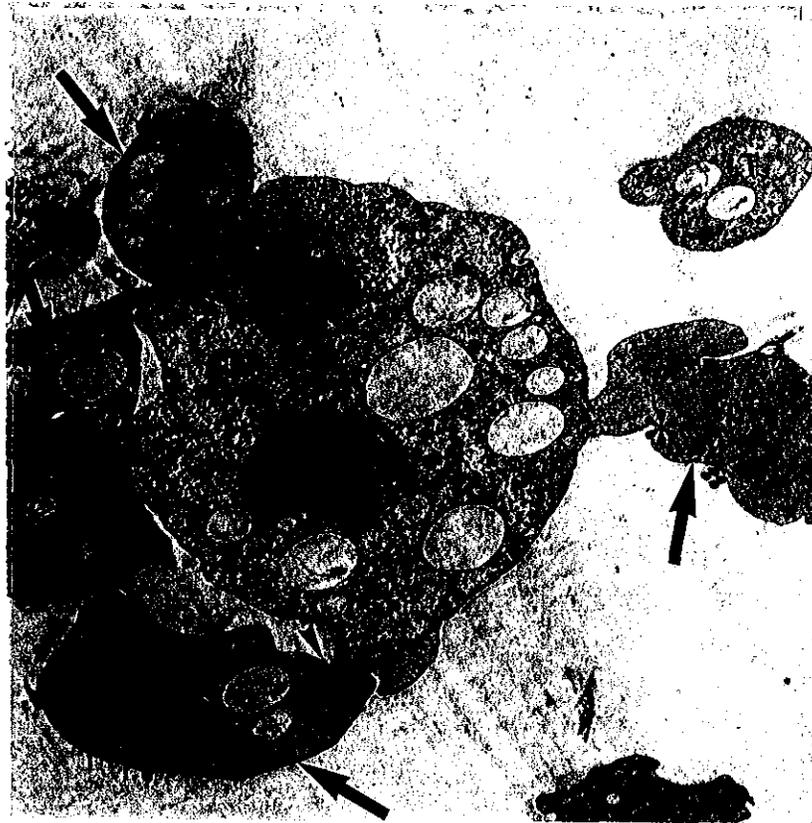


Fig. 15.- Adhesión de tricomonas a las células amebianas. La adhesión de las tricomonas (T) a las amebas (A) ocurre al azar y por cualquier parte de la ameba (flechas), esta adhesión así como la fagocitosis es asincrónica observamos tricomonas solo adheridas (punta de flecha), otras comenzando a ser rodeadas por los pseudopodos de las amebas (asterisco) y otras más parcialmente fagocitadas (estrella). Microscopio electrónico de Transmisión. Tinción con plomo y uranilo. Barra = 15  $\mu$ m.

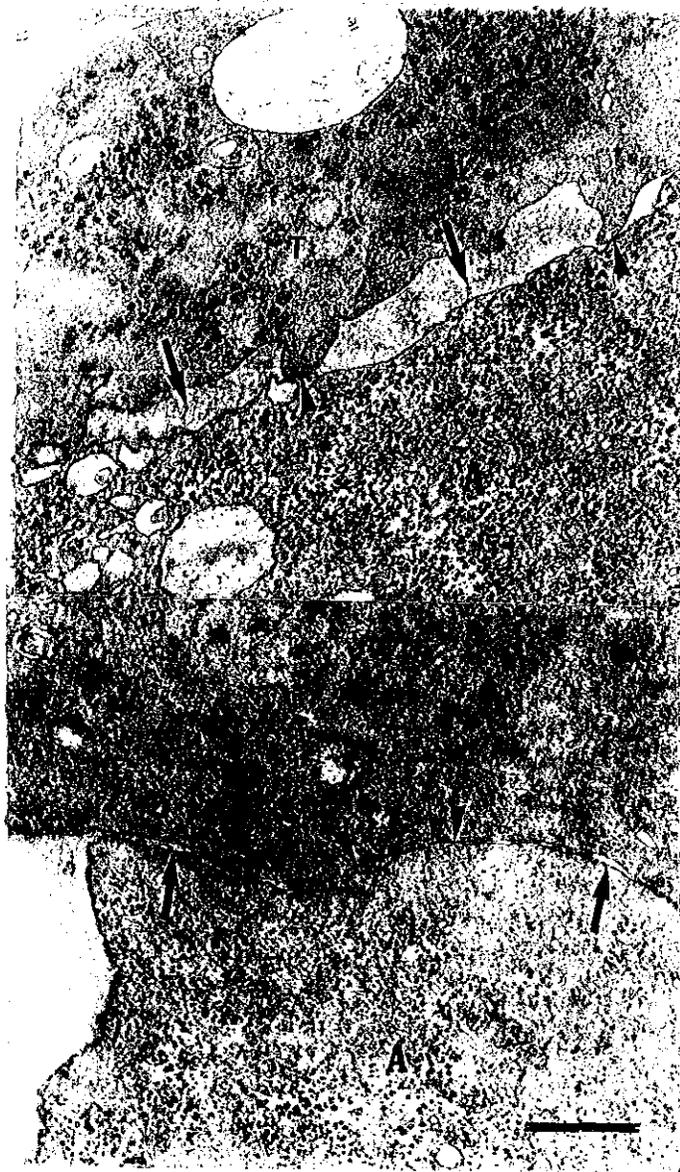


Fig. 16.- Adhesión de tricomonas a las células amebianas. **A)** La adhesión entre las tricomonas (T) y las amebas (A) en las fases iniciales de éste proceso, se observan pequeñas regiones de las membranas plasmáticas de ambos tipos celulares en contacto estrecho (puntas de flecha), así como también se observan espacios significativos entre ambos tipos celulares (flechas). **B)** En etapas más avanzadas de la adhesión entre las amebas (A) y las tricomonas (T) se observa que una gran superficie de ambas células se encuentran estrechamente unidas (flechas) y en algunas áreas se aprecia la oclusión del espacio intercelular a esta amplificación (puntas de flecha). Microscopio electrónico de Transmisión. Tinción con plomo y uranilo. Barra = 1  $\mu$ m.



Fig. 17.- Adhesión de tricomonas a las células amibianas. Una vez que las tricomonas (T) se encuentran adheridas a las amibas (A), estas llevan a cabo la formación de una región fibrogranular en su citoplasma, la cual se sitúa exactamente por debajo de la zona en la cual se adhirió a la tricomona (flechas). La amiba inicia de esta manera la emisión de los pseudopodos para llevar a cabo la fagocitosis de las tricomonas. Microscopio electrónico de transmisión. Tinción con plomo y uranilo. Barra = 1  $\mu$ m.



Fig. 18.- Fagocitosis de tricomonas por las células amibianas. La ingestión de las tricomonas (T) por las amibas (A) ocurre mediante la emisión de los pseudopodos (P) sobre la superficie de la tricomona, y la formación de un canal fagocítico (flechas) el cual se aprecia con una forma irregular (puntas de flecha) y variable. Subyacente a la membrana que se encuentra constituyendo el canal fagocítico se aprecia la región fibrogranular (puntas de flecha), constituida por componentes del citoesqueleto. Microscopio electrónico de transmisión. Tinción con plomo y uranilo. Barra = 1  $\mu$ m.

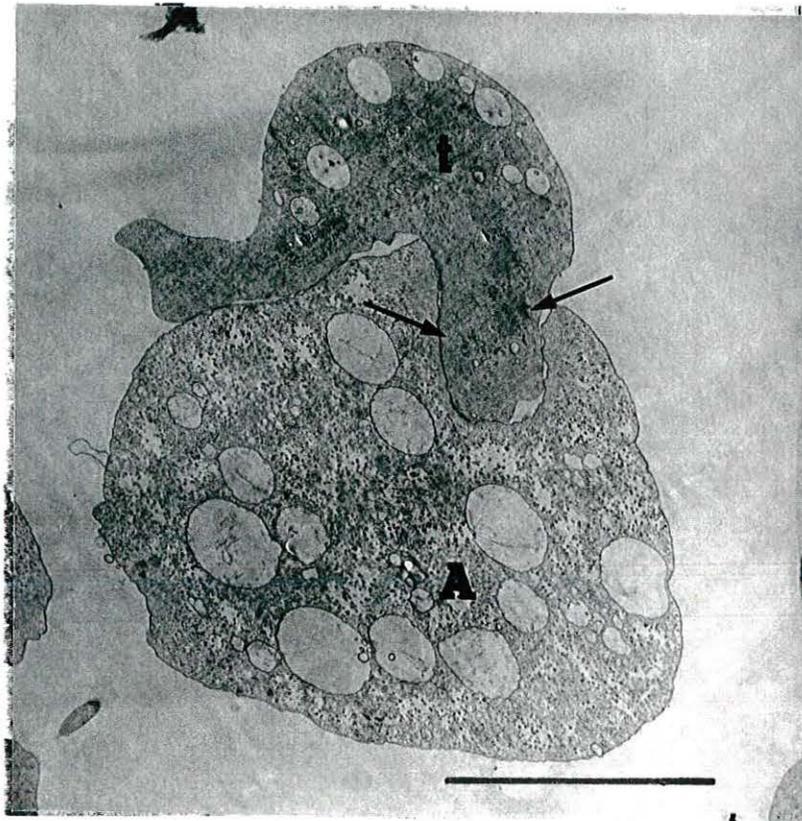


Fig. 19.- Fagocitosis de tricomonas por las amibas. La fagocitosis de las tricomonas (T) por las amibas (A) puede ocurrir de diferentes maneras, la más comun fue la ilustrada en la figura 18 pero la fagocitosis de las tricomonas ocurrió tambien por hundimiento sin la formación o emisión de pseudopodos, pero si a través del canal fagocítico (flechas). Microscopio electrónico de transmisión. Tinción con plomo y uranilo. Barra = 10  $\mu$ m.

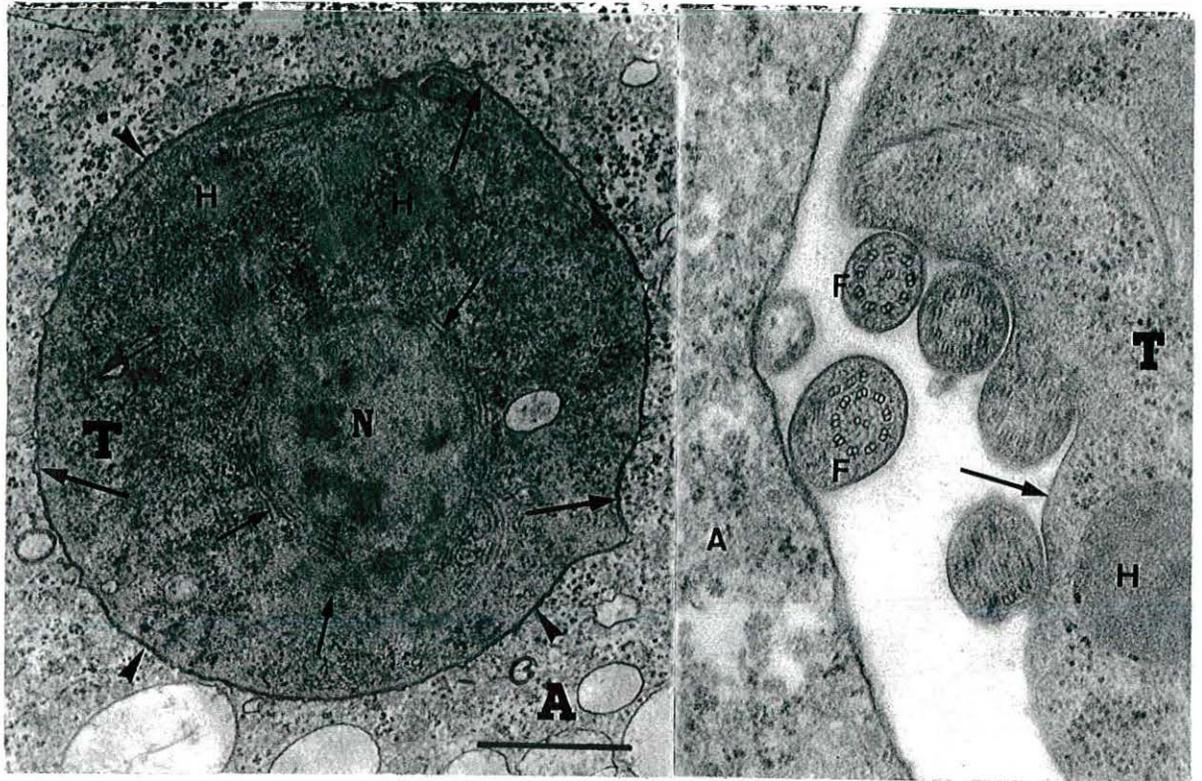


Fig. 20.- Fagocitosis de Tricomonas por *E. histolytica*. Una vez que se ha completado el proceso de fagocitosis, las tricomonas (T) ingeridas por las amibas (A), se observan redondeadas en el interior de las vacuolas amibianas, las membranas de ambos tipos celulares se aprecian unidas estrechamente (puntas de flecha) y la region fibrogranular ha desaparecido en esta etapa. Algunas estructuras de las tricomonas como los son; membrana plasmática (flechas), el núcleo (N), el reticulo endoplásmico (flechas pequeñas), los hidrogenosomas (H) y los flagelos se observan íntegros y normales. Microscopio electrónico de transmisión. Tinción con plomo y uranilo. Barra = 2.5  $\mu$ m.



Fig. 21.- Fagocitosis de tricomonas por *E. histolytica*. La fagocitosis de las tricomonas (T) por las amibas (A) ocurre con algunas variantes, en tiempos cortos de interacción (5, 10 y 15 min) encontramos en el interior de las vacuolas amibianas porciones de tricomas; citoplasma (flechas gruesas) y fragmentos de membrana (flechas delgadas), así mismo observamos también vacuolas amibianas con únicamente porciones de citoplasma del flagelado en su interior (puntas de flecha). Microscopio electrónico de transmisión. Tinción con plomo y uranilo. Barra = 10  $\mu$ m.

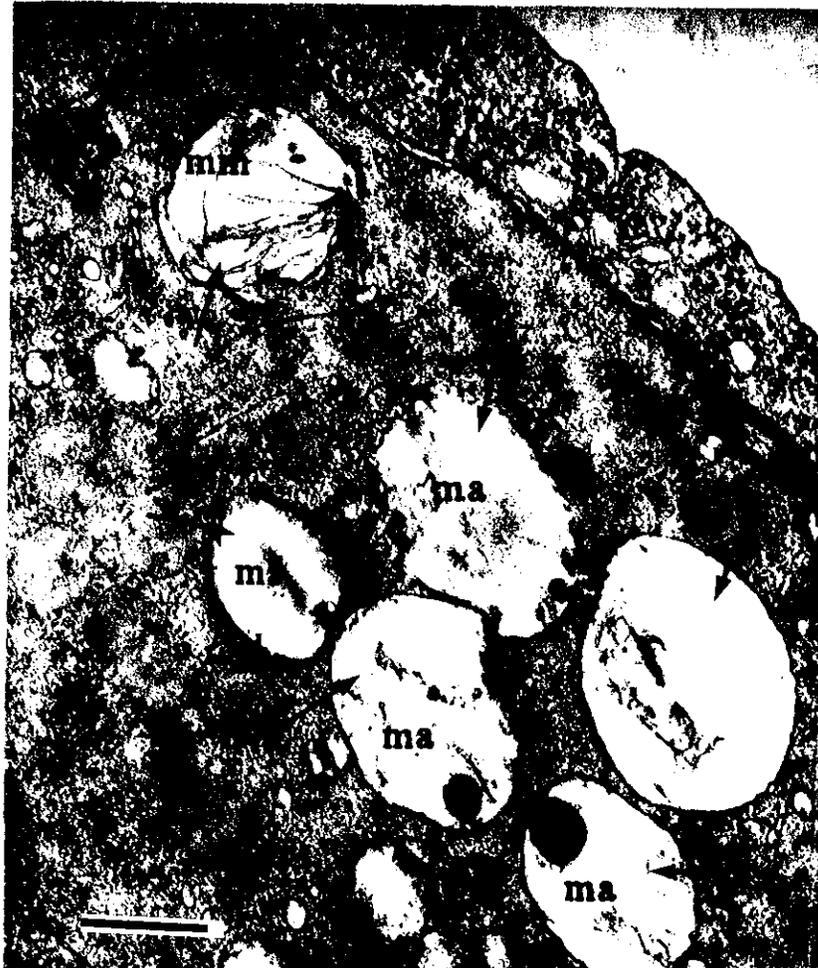


Fig. 22.- Fagocitosis de tricomonas por *E.histolytica*. Una vez que ocurrió la fagocitosis de las tricomonas por las amibas (A), algunas tricomonas (T) que se observan en el interior de las vacuolas amibianas, presentaron vacuolas (flechas), estas vacuolas del flagelado presentaron contenido de material amorfo (ma) y material membranoso (mm) en su interior, probablemente como resultado de un proceso de fagocitosis llevado a cabo por la tricomonas previo a ser fagocitadas por las amibas. Microscopio electrónico de transmisión. Tinción con plomo y uranilo. Barra = 1  $\mu$ m.



Fig.- 23.- Fagocitosis de fragmentos de amibas por tricomonas. En la fig. 22 se describen tricomonas (T) en el interior de las amibas, que contienen vacuolas con material diverso en su interior, la presente micrografia muestra como las tricomonas fagocitan (flechas) restos de amibas (RA) así como algunas vacuolas con restos amibianos en su interior de las mismas en su interior (puntas de flecha). Esto se observó previo a la fagocitosis de las tricomonas por las amibas. Microscopio electrónico de transmisión. Tinción con plomo y uranilo Barra =5  $\mu\text{m}$ .



Fig. 24.- Digestión de tricomonas por *E. histolytica*. A los 20 min. de interacción además de las tricomonas completas, también se observaron tricomonas (T) con alteraciones estructurales, el citoplasma se aprecia irregular, con espacios translucidos, algunas vacuolas (v), los hidrogenosomas (h) con un borde irregular, se observan algunas porciones de membrana plasmática (flechas), la membrana plasmática que se encuentra rodeando a la tricomona se observa con una apariencia normal (puntas de flecha), algunas veces completamente unida a la membrana plasmática de la vacuolas y otras más con un espacio significativo entre ambas. Microscopio electrónico de Transmisión. Tinción con plomo y uranilo Barra = 5  $\mu$ m.

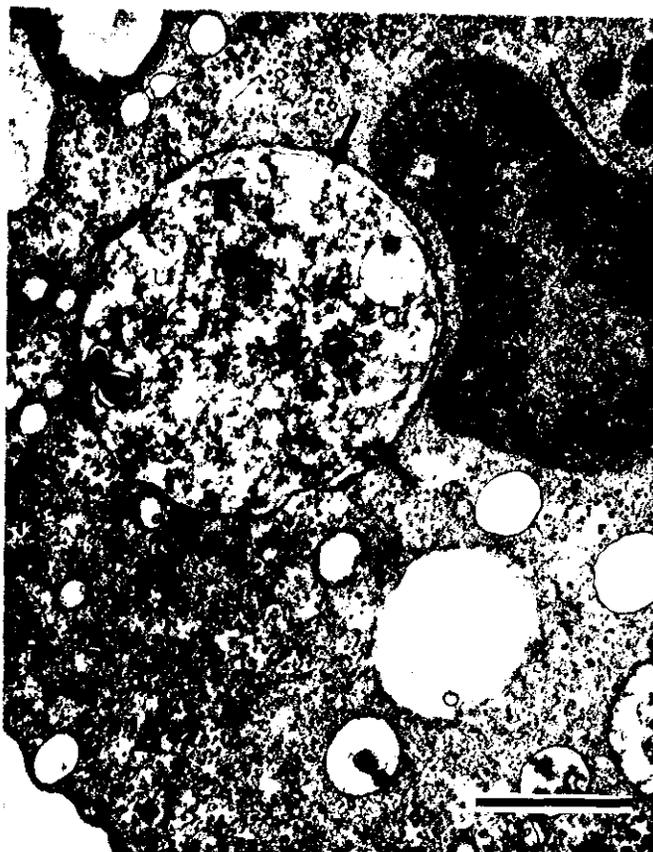


Fig. 25.- Digestión de tricomonas por *E. histolytica*. Después de 30 min de interacción el citoplasma de las tricomonas (T) que se observan en las vacuolas amibianas (A) se observa como un material amorfo, con grandes espacios translúcidos y grumos densos a los electrones, así como también algunas vacuolas, la membrana plasmática de las mismas se observa en algunos casos como una línea (puntas de flecha), en otros casos es difusa (flechas). Microscopio electrónico de Transmisión. Tinción con plomo y uranilo Barra = 5  $\mu\text{m}$ .

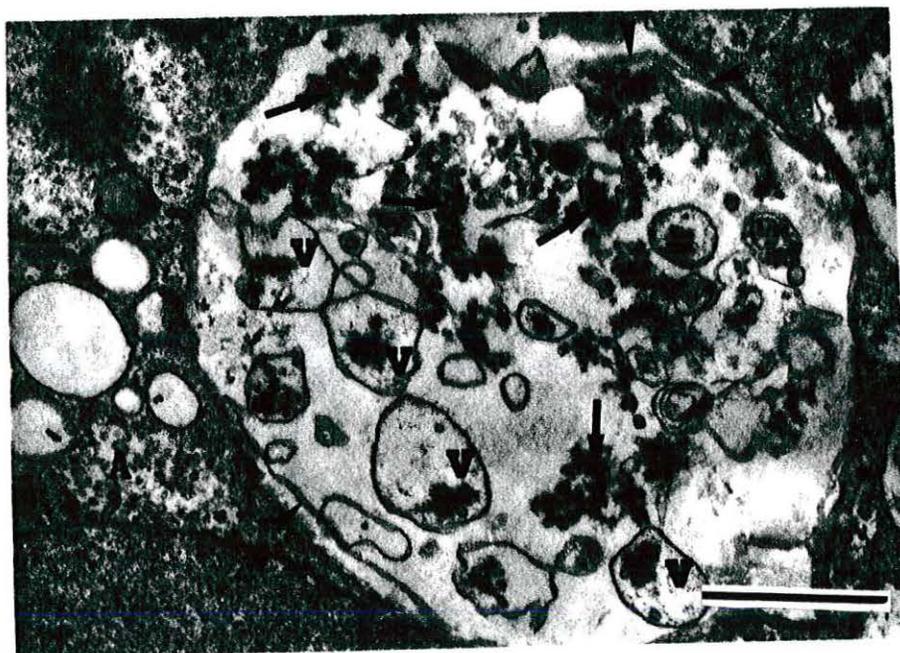


Fig. 26.- Digestión de tricomonas por *E. histolytica*. A los 45 min ocurre una disminución significativa del material citoplásmico de la tricomona (T), se observa material en forma de grumos densos (flechas) y algunas vacuolas (v) con su membrana plasmática bien definida; en la periferia la membrana plasmática que rodea este material se observa irregular (puntas de flecha). Microscopio electrónico de Transmisión. Tinción con plomo y uranilo Barra = 5  $\mu$ m.

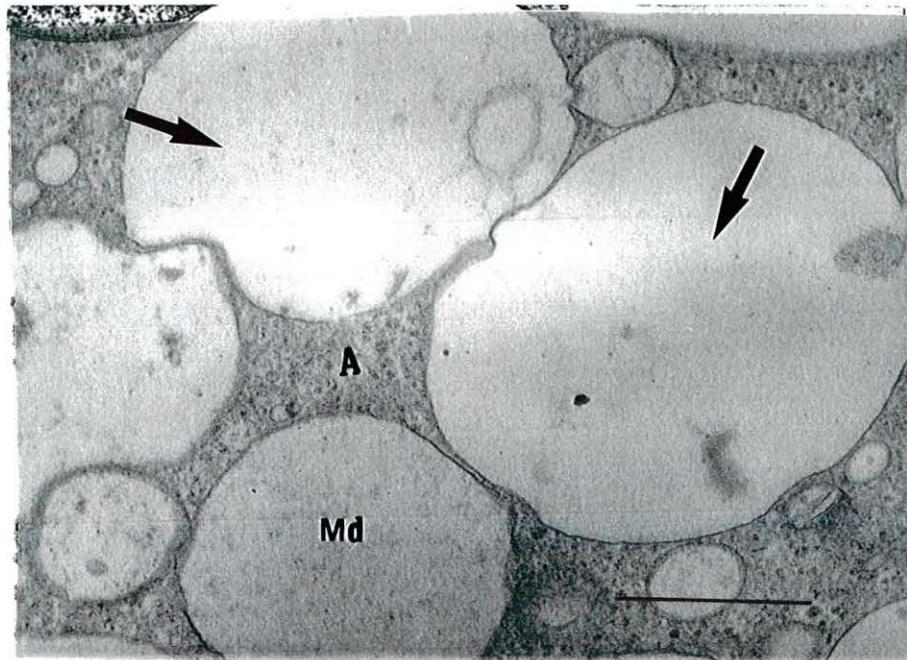


Fig. 27.- Digestión de tricomonas por *E. histolytica*. A los 60 min de interacción; las vacuolas de las amibas se aprecian solo con material en estado avanzado de digestión (Md) en su interior se observan grumos escasamente densos, no se aprecian vacuolas, y no se observa la membrana plasmática de la tricomona, algunas otras vacuolas amibianas se observan sin material en sus interior (flechas). Microscopio electrónico de Transmisión. Tinción con plomo y uranilo Barra = 5  $\mu$ m.

## DISCUSIONES

Existen numerosos trabajos sobre la fagocitosis de eritrocitos humanos, bacterias, esferas de latex, granos de almidon, células epiteliales y protozoarios por *E. histolytica*; La fagocitosis en *E. histolytica* ha sido ampliamente estudiada utilizando principalmente eritrocitos humanos como célula blanco, algunos de estos reportes aportaron valiosa información que demostró que cepas de *E. histolytica* con elevada virulencia presentaban elevada actividad eritrofagocítica, (Trissl y col. 1978, Orozco y col, 1983) que en su momento permitieron establecer a la eritrofagocitosis como un factor de virulencia, aunque posteriormente algunos autores (Montfort y col. 1992, Tsutsumi y col. 1992) no encontraron esta correlación entre eritrofagocitosis y virulencia, Tsutsumi y col, (1992), consideran que la eritrofagocitosis podría ser considerada como un aspecto cualitativo de la patogenicidad, pero no como cuantitativo de la virulencia de éste parásito. Los resultados encontrados al realizar el análisis cuantitativo de nuestro estudio concuerdan con los reportados por Trissl y col. (1978) y Orozco y col. (1983) en los que como ya se mencionó, se reporta una actividad eritrofagocítica elevada en las cepas de *E. histolytica* de alta virulencia, nosotros tambien encontramos una elevada fagocitosis de tricomonas en la cepa de *E. histolytica* con elevada virulencia (HM1) y fagocitosis significativamente menor en la cepas de baja virulencia (HK9), es preciso mencionar que el uso de eritrocitos como célula blanco, concede ventajas a las amibas ya que interaccionan con una célula inerte.

Varios grupos de trabajo que investigan la biología de *Entamoeba histolytica* concuerdan en la importancia de mantener a las cepas de esta especie de amiba en condiciones que permitan que el parásito mantenga en lo posible sus propiedades y/o características de patogenicidad y virulencia, para la realización de los estudios de los cuales son objeto. Particularmente del proceso de fagocitosis se ha reportado que cepas de *E. histolytica* mantenidas en cultivo por tiempo prolongado experimentan perdida en su capacidad de fagocitosis, con el fin de provocar que estas cepas readquieran o desarrollen nuevamente su capacidad fagocítica, se ha desarrollado una estrategia que consiste en realizar

inoculaciones intrahepáticas de amibas en hámsters y recuperarlas de los abscesos formados. Las amibas así recuperadas muestran una elevada capacidad eritrofagocítica, tal recuperación o elevación en la capacidad fagocítica depende del número de pases por hígado que se realicen. En el presente trabajo nos propusimos corroborar si lo establecido previamente para la eritrofagocitosis, se cumple también para la fagocitosis de otra célula blanco que nada tiene que ver con el hospedero y que además es móvil.

Encontramos que existen diferencias en la capacidad fagocítica entre la cepa original HM1 y la misma cepa pasada una vez por hígado de Hámster HM1H<sub>1</sub>, así como en otra pasada tres veces por hígado de hámster HM1H<sub>3</sub>. Las diferencias en la capacidad fagocítica fue gradual, la población H<sub>1</sub> mostró una elevada actividad fagocítica, significativamente mayor a la cepa original únicamente en tiempos largos (45 y 60 min), en cambio la población H<sub>3</sub> mostró diferencias significativas mayores tanto con la cepa original como con la población H<sub>1</sub> desde los 15 min de interacción. La disminución del número de tricomonas fagocitadas después de los 45 y 60 se debió probablemente a que el número de tricomonas disponibles para fagocitar se agotó y todas aquellas que habían sido fagocitadas en los tiempos cortos de interacción (5 y 10 min) comenzaron a ser digeridas en el interior de las vacuolas amibianas. Tales resultados nos permiten mencionar que lo establecido previamente para la actividad de eritrofagocitosis (los pases por hígado de hámster) es válido y se mantiene también con otras células blanco (tricomonas).

El proceso de fagocitosis en *Entamoeba histolytica* ha sido ampliamente estudiado. Se ha determinado que la capacidad de este protozoo parásito para fagocitar es amplia y diversificada, se pueden encontrar reportes de fagocitosis de células en monocapa (Ravdin y col. 1980, Martínez-Palomo y col. 1985), células inflamatorias (Griffin 1972), bacterias (Orozco y col. 1983), eritrocitos humanos y de otras especies animales (Chávez y col. 1972, Chávez y col 1974), granos de almidón, esferas de látex (Orozco y col. 1983) , y otros protozoarios (Anaya-Velazquez y Chang, 1983, Martínez-Palomo y col. 1985). Algunos de los estudios realizados con eritrocitos humanos muestran el proceso de fagocitosis,

en los cuales se describen los mecanismos y los cambios que experimentan tanto los trofozoitos, como los eritrocitos.

El proceso típico de la fagocitosis involucra la adhesión de la célula blanco a la célula fagocítica, la emisión de los pseudopodos por parte de la célula fagocítica para envolver a la célula blanco, y una vez en el interior ocurre la digestión de la célula fagocitada. Estos pasos mencionados han sido descritos ampliamente durante la interacción entre *E. histolytica* y eritrocitos humanos, en tal caso la adhesión entre la célula fagocítica y los eritrocitos podría no presentar alguna resistencia por ser una célula inmóvil, para el caso de las tricomonas la movilidad podría dificultar o evitar la adhesión las mismas por las amibas y evitar así la fagocitosis.

Como la adhesión es el primer paso para que se lleve a cabo la fagocitosis tenemos que citar que para el caso de los trofozoitos amibianos se han reportado algunas proteínas que están involucradas o intervienen en el proceso de adhesión de los trofozoitos amibianos a diferentes substratos, a tales receptores se les ha denominado adhesinas, lectinas y/o adhemibas (Kolíber y Mirelman, 1982). En lo que se refiere a las células de *Trichomonas vaginalis* también se han reportado que estas presentan receptores que intervienen en la adhesión del parásito a células del epitelio vaginal *in vitro* (Arroyo y col. 1993), esto nos permite suponer que las proteínas de adhesión presentes tanto en las tricomonas como en las amibas intervienen de manera importante en la interacción (adhesión), que se presenta entre ambos tipos celulares cuando se confrontan *in vitro*. Cuando realizamos la interacción de las amibas y las tricomonas observamos que la adhesión es al azar, una vez que las tricomonas se encuentran adheridas a la superficie amibiana se observan con gran movilidad, pero aun a pesar de su movimiento estas no se liberan de las amibas y finalmente son ingeridas. Estas observaciones nos permiten indicar que la interacción que se establece entre ambos tipos celulares es lo suficientemente fuerte como para evitar que se rompa por el movimiento que presentan las tricomonas.

Ravdin y col. (1980) y Martínez-Palomo y col. (1985) realizaron estudios con diferentes tipos celulares cultivados en monocapas. el primero con células

de ovario de hámster chino (CHO) y el segundo con células de la línea MDCK, ellos reportaron que la fagocitosis de éstas células ocurre una vez que ha habido una lisis por contacto previa de las células blanco por los trofozoítos amibianos, ahora ya se sabe que ciertos mecanismos propios de la amiba como la liberación de proteasas, colagenasas, fosfatasa ácida y el ameboporo son utilizados por la amiba para lisar las células y llevar a cabo la ingestión de porciones de células lisadas. En nuestro estudio, observamos que las tricomonas aun a pesar de la gran movilidad que presentan en cultivo son fagocitadas completas, contrario a lo observado con los cultivos de monocapas celulares. Una vez que las tricomonas han sido fagocitadas se observan móviles en el interior de las vacuolas amibianas lo cual es una evidencia clara que nos indica que las tricomonas son fagocitadas vivas y no sufren una lisis previa a su ingestión. Aunque generalmente ocurrió lo anterior, no podemos descartar la existencia de una lisis de las tricomonas por las amibas previo a la ingestión de las mismas, es importante señalar que regularmente en los tiempos cortos de interacción (5 y 10 min) observamos pequeñas vacuolas amibianas con material de tricomonas en su interior lo que nos sugiere que éstas son fagocitadas en pequeñas porciones, o bien que las amibas fagocitan restos de tricomonas previamente destruidas por factores desconocidos.

En algunos de los reportes de fagocitosis de eritrocitos humanos por *Entamoeba histolytica* (Chevez y col. 1972) señala la formación de los pseudopodos de tamaño considerable para llevar a cabo la ingestión de la célula blanco. Se han evidenciado también canales fagocíticos de gran longitud, que se forman y a través de los cuales los eritrocitos son fagocitados por los trofozoítos amibianos. Estos canales fagocíticos se pueden observar de diferente longitud y diferente diámetro, en nuestro modelo observamos lo antes mencionado, pero a diferencia de lo descrito anteriormente en donde no se establece si las células blanco se encuentran vivas en el interior de los trofozoítos amibianos, nuestro modelo nos permite establecer que aunque las tricomonas son deformadas al ser ingeridas a través del canal fagocítico, éstas se pueden observar íntegras y vivas en el interior de las vacuolas amibianas, evidenciado esto último por la movilidad que presentan las tricomonas dentro de las vacuolas amibianas.

No se han realizado estudios en los cuales se establezcan el gasto de energía necesario para que las amibas lleven a cabo el proceso de fagocitosis, tampoco se ha establecido la fuerza que se produce o que la amiba ejerce sobre las células blanco al pasar éstas a través del canal fagocítico. No fué nuestro objetivo demostrarlo, pero sí podemos hacer hincapié en que la fuerza que se produce y que es ejercida sobre las tricomonas al ser ingeridas a través del canal fagocítico, es lo suficientemente fuerte como para desestabilizar y deformar el citoesqueleto de la tricomona que le confiere su forma periforme característica.

En reciente reporte de fagocitosis de eritrocitos humanos (Herrera y col. 1997), estudio realizado mediante microscopía electrónica de barrido se describen tres modalidades de fagocitosis, una de ellas descrita como la clásica fagocitosis en la cual se señalan la emisión de pseudopodos por parte de la amiba para llevar a cabo la ingestión de los eritrocitos, otra modalidad es aquella denominada como succión, la cual se caracteriza por no presentar la emisión de pseudopodos y la fagocitosis de los eritrocitos se lleva a cabo a través de pequeñas bocas fagocíticas mediante la deformación de eritrocito. La tercer modalidad mencionada es aquella denominada hundimiento, en la cual se aprecian los eritrocitos en proceso de ingestión sin la formación de pseudopodos pero con bocas fagocíticas grandes y sin una considerable deformación de los eritrocitos, estos autores señalan que probablemente en esta última modalidad no intervienen filamentos de actina. En nuestro estudio observamos la fagocitosis clásica y la fagocitosis mediante el hundimiento de las tricomonas también con microscopía electrónica de barrido, y en nuestras imágenes con microscopía electrónica de transmisión se observa claramente que por debajo de la boca fagocítica y alrededor del canal fagocítico y aunque no existe una formación de pseudopodo se aprecia la región fibrogranular, la cual, como ya ha sido demostrado (Espinoza-Castellano y Martínez-Palomo, 1994) esta constituida por filamentos de actina involucrados en el proceso de fagocitosis y movimiento ameboide.

Existen varios reportes sobre la fagocitosis por *E. histolytica* en los cuales se describen las características morfológicas a nivel de microscopía electrónica de transmisión, de barrido y mediante técnicas de inmunofluorescencia.

Martínez-Palomo (1989), reporta la fagocitosis de eritrocitos y muestra claramente la región fibrogranular subyacente a membrana plasmática que forma el canal fagocítico, Mora-Galindo y col. 1978, al realizar la interacción entre trofozoítos de *E. histolytica* y epitelio cecal de cobayo reportan la fagocitosis de células epiteliales y al observar ésta mediante microscopía electrónica de transmisión, se aprecia la región fibrogranular en el canal fagocítico. Posteriormente Bailey y col. (1985) demostraron mediante técnicas de inmunofluorescencia al llevar a cabo la interacción de eritrocitos humanos con trofozoítos de *E. histolytica* que uno de los componentes que se encuentran en la región fibrogranular es la proteína miosina. Por otra parte Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo (1994) demostraron también mediante técnicas de inmunofluorescencia que, además de la miosina, la actina es otra de las proteínas que se encuentran localizadas en la región fibrogranular. En el presente trabajo, al realizar el análisis de la fagocitosis de tricomonas por las amibas mediante microscopía electrónica de transmisión observamos la región fibrogranular ya reportada por los autores arriba señalados, esta región muestra en todos los casos una distribución particular; se encuentra exactamente en la parte subyacente a la membrana plasmática, y se observa distribuida a lo largo del canal fagocítico encontrándose en mayor cantidad en la parte más anterior del mismo. Como ya se mencionó esta distribución la ilustran los autores arriba indicados mediante diferentes metodologías.

En base a lo anterior y con nuestros resultados, nosotros hemos pensado en la posible existencia de algún mecanismo mediante el cual los componentes de la región fibrogranular que se encuentran en la parte interna del canal fagocítico se solubilizan y son transportados hacia la parte en formación del canal fagocítico, los cuales una vez ahí vuelven a polimerizarse para interactuar entre sí y continuar con la emisión del pseudopodo sobre la superficie de la célula blanco.

Se han reportado actividades enzimáticas en *E. histolytica*, tanto en las membranas de sus vacuolas como en su membrana plasmática, también se han reportado actividades de proteinasas de secreción y la existencia del ameboporo amibiano. Específicamente hablando de la relación actividad enzimática:

patogenicidad, algunos autores han reportado una correlación directa entre ambas, estos autores reportan que a una actividad enzimática elevada corresponde una virulencia elevada y viceversa. Estos estudios se han realizado con extractos totales de amibas y con productos de secreción de las mismas. Aunque estos autores reportan esta correlación, en nuestro estudio no encontramos alguna diferencia, aun mínima, entre la cepa de elevada virulencia (HM1) y la cepa de baja virulencia (HK9) para digerir a las tricomonas. Probablemente la actividad secretoria de enzimas por parte de las amibas nada tenga que ver con la actividad enzimática intravacuolar de las mismas para digerir el material fagocitado.

En 1972 Griffin describe la digestión de células inflamatorias por trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, reporta cambios en el citoplasma de las células fagocitadas, sin daños evidentes en la membrana plasmática de las mismas. Bowers y Olszewski (1983), en su estudio realizado con *Acanthamoeba* describen la fagocitosis de levaduras por este protozooario y en tiempos avanzados de digestión muestran el cambio de aspecto del citoplasma y la disminución en cantidad del mismo, pero sin que las paredes celulares de las levaduras se observen con un daño evidente. Mora-Galindo y Anaya-Velazquez, (1993) realizaron un estudio de eritrofagocitosis en cual describen la digestión de eritrocitos humanos, señalan cambios estructurales en el citoplasma de los eritrocitos en diferentes tiempos de digestión, la estructura del citoplasma sufre cambios evidentes y disminuye en cantidad paulatinamente conforme avanza el tiempo de digestión, pero las membranas plasmáticas de los eritrocitos permanecen sin daños evidentes. Estos reportes coinciden con lo observado en el presente trabajo, en el que observamos cambios claros en el citoplasma de las tricomonas, disminución progresiva de la cantidad de citoplasma y la presencia de la membrana plasmática aparentemente intacta a nivel morfológico. Probablemente la acción hidrolítica sea llevada a cabo mediante enzimas que pasan a través de la membrana plasmática, o probablemente los daños en la membrana plasmática de la tricomona son imperceptibles mediante microscopía electrónica en las fases tempranas de la digestión, pues en etapas avanzadas de la misma, la membrana plasmática se observa con cambios y daños evidentes.

## CONCLUSIONES

*Entamoeba histolytica* es capaz de fagocitar y digerir células móviles como *Trichomonas vaginalis*.

La capacidad de *Entamoeba histolytica* para fagocitar células móviles (tricomonas) depende de la cepa amibiana, del tiempo de interacción y de la cantidad disponible de la célula blanco.

El paso de cepas de *Entamoeba histolytica* por hígado de hamster provoca un aumento significativo en la capacidad de las amibas para fagocitar células móviles (tricomonas).

Las amibas de las cepas de *Entamoeba histolytica* utilizadas fagocitan tricomonas utilizando diferentes mecanismos de fagocitosis y cualquiera que sea éste, las observaciones a nivel de microscopía electrónica de transmisión sugieren que intervienen activamente componentes del citoesqueleto, específicamente actina y miosina.

Aunque se han reportado diferencias en actividades enzimáticas entre cepas de *Entamoeba histolytica* con diferente virulencia, (HM1 vs HK9), no encontramos diferencias significativas en su capacidad para digerir tricomonas.



## BIBLIOGRAFIA

- Alderete JF, Garza GE. Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* involved in cytoadherence. *Infect Immun*. 1988; 56: 28-33.
- Aley SB, Scott WA, Cohn ZA. Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med*, 1980; 152: 391-404.
- Anaya-Velázquez F, Chang PK. Phagocytosis and intralysosomal killing of *Leishmania Mexicana* by *Entamoeba histolytica*. *Biol Bull*, 1983; 165: 534.
- Arias-Negrete S, Villagómez-Castro JC, Anaya-Velázquez F, Lira-Ortiz R. *Entamoeba histolytica*: A simplified method to quantify its cytotoxicity. *Int J Parasitol*, 1991; 21: 373-375.
- Avila EE y Calderon J. *Entamoeba histolytica* trophozoites: A surface-associated cysteine proteasa. *Exp Parasitol*, 1993; 76: 232-241.
- Avron B, Bracha R, Deutsch RM, Mirelman D, *Entamoeba invadens* and *Entamoeba histolytica*: Separation and purification of precysts and cysts by centrifugation on discontinuous density gradient of Percoll. *Exp Parasitol*, 1983; 55: 265-269.
- Bailey GB, Day DB, Gasque JW. Rapid polymerization of *Entamoeba histolytica* actin induced by interaction with target cells. *J Exp Med*, 1985; 162: 546-558.
- Bos, HJ, van den Eijk, AA. Serum inhibited toxicity of *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Méd (Méx)*, 1980; 11 (supl. 1): 135-141.
- Bowers B and Olszewski TE. *Acanthamoeba* discriminates internally between digestible and indigestible particles. *J Cell Biol*. 1983; 97: 317-322.
- Clarck GC, Diamond SL. Pathogenicity, virulence and *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Today*, 1994; 10: 46-47.
- Chávez A, Iturbe-Alessio I, Segura M, Flores-Corona. Fagocitosis de eritrocitos humanos por *Entamoeba histolytica*. *Arch Inv Med (Méx)*, 1972 (sup. 2): 275-286.
- Chevez A y Segura M. Interacción entre los trofozoitos de *E. histolytica* y los leucocitos de varias especies animales. *Arch Invest Med (Méx)*, 1974 (sup. 2): 373-382..

- Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. A new method for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 1978; 72: 431-432.
- Dodson JM, Petri WA. Pore formation and cytolysis by *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Today*, 1994 ; 10: 7-8.
- Eaton RDP, Meerovith E, Costerton JW. The functional morphology of pathogenicity in *Entamoeba histolytica*. *Ann Trop Med Parasitol*, 1970; 64: 299-304.
- Espinoza-Cantellano M. y Martínez-Palomo A. *Entamoeba histolytica*: Mechanism of surface receptor capping. *Exp Parasitol*, 1994; 79: 424-435.
- Francioli P, Shio H, Roberts BR, Muller M. Phagocytosis and killing of *Neisseria gonorrhoeae* by *Trichomonas vaginalis*. *J infect Dis*, 1983; 147: 87-94.
- Gadasi H, Koliber D. *Entamoeba histolytica*: Correlation between virulence and content of proteolytic enzymes. *Exp Parasitol*, 1983a; 55: 105-110.
- Gadassi H, Kessler E. Correlation of virulence and collagenolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun*, 1983b; 39: 528-531.
- Glaumann H, Ericsson E, Marzella L. Mechanism of intralysosomal degradation with special reference to autophagocytosis and heterophagocytosis of cell organelles. *Int Rev Cytol*, 1981 ; 73 : 149-182.
- Griffin LJ. Human amebic dysentery. Electron microscopy of *Entamoeba histolytica* contacting, ingesting and digesting inflammatory cells. *Ann Trop Med Hyg*, 1972; 21: 895-905.
- González-Robles A, Martínez-Palomo A. Morfología de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* en sustratos naturales. *Arch Invest Méd (Méx.)*, 1982; 13: 145-157.
- Guillen N. Cell signalling and motility in *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Today*, 1993; 9: 364-369.
- Herrera-Verdugo D, Espinoza-Cantellano M, and Martínez-Palomo A. Erythrophagocytosis by *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res*. 1997; 28 (suppl.): 197-199.
- Hohman CT, Bowers B. Hydrolase compartmentalization limits rate of digestion in *Acanthamoeba*. *J Euk Microbiol*, 1993; 40: 589-593.

- Horstman DR, Leippe M, Tannich E. Host tissue destruction by *Entamoeba histolytica*: molecules mediating adhesion, cytolysis, and proteolysis. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1992; 87: 57-60.
- Honigberg BM. Trichomonads of importance in human medicine. Parasitic Protozoa (J. P. Kreier, ed.), 1978; vol. 2: pp 275-454. Academic Press, New York.
- Jansson A, Gillin F, Kagardt U, Hagblom P. Coding of hemolysins within the ribosomal RNA repeat on a plasmid in *Entamoeba histolytica*. Science, 1994; 263: 1440-1443.
- Keene EW, Pettitt GW, Allen S, McKerrow HJ. The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. J Exp Med. 1986; 163: 536-546.
- Kobayashi S, Takeuchi T. *Entamoeba histolytica*: Ustructural localization  $Ca^{+2}$  dependent nucleotidasas. Exp Parasitol, 1982; 54: 202-212.
- Koliber D, Mirelman D. Lectin activity in *Entamoeba histolytica* trophozoites. Infect Immun, 1980; 29: 221-225.
- Krieger NJ, Piosson AM, Rein FM. Beta-hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* correlates with virulence. Infect Immun., 1983; 41: 1291-1295.
- Kudo RR. Protozoologia. Méx: C.E.C.S.A., 1985, 405-438.
- Lehker WM, Chang HT, Daily CD, Alderete FJ. Specific erythrocyte is an additional nutrient acquisition system for *Trichomonas vaginalis*. J Exp Med, 1990; 171: 2161-2170.
- Lejeune A, Gicquaud C. Evidence for two mechanisms of human erythrocyte endocytosis by *Entamoeba histolytica*- like amoeba (Laredo strain). Biol Cell, 1987; 59: 239-246.
- Lejeune A, Gicquaud C. Target cell deformability determines the type of phagocytosis mechanism used by *Entamoeba histolytica*-like, laredo strain. Biol Cell, 1992; 74: 239-246.
- Levine ND, Corliss JO, Cox FEG y col. A newly revised clasification of protozoa. J Protozool, 1980; 27: 37-58.
- López-Revilla R, Said -Fernandez S. Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica* : hemolytic activity of trophozoite homogenates. Am J Trop Med Hyg, 1980; 29: 209-212.

- Luaces AL, Barret AJ. Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the mayor cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Biochem J*. 1988; 250: 903-909.
- Lushbaugh BW, Hofbauer FA, Kairalla AA, Cantey RJ, Pittman EF. Relationship of cytotoxins of axenically cultivated *Entamoeba histolytica* to virulence. *Gastroenterology*. 1984; 86: 1488-1495.
- Lushbaugh BW, Pittman EF, Hofbauer FA, *Entamoeba histolytica*: purification of cathepsin B. *Exp Parasitol*, 1985; 59: 326-336.
- Martínez-Palomo A, Gonzalez-Robles A. Selective agglutination of pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* induced Con A. *Nature New Biology*, 1973; 245: 186-187.
- Martínez-Palomo A, Pinto da Silva P,. Membrane structure of *Entamoeba histolytica*: fine estructure of freeze fractured membranes. *J Ultrastructural Research*, 1976; 54: 148-158.
- Martínez-Palomo A, Orozco E y Gonzalez-Robles A. *Entamoeba histolytica* : Topochemistry and dynamics of the cell surface. *The Host Invader Interplay*. H. Van den Bossche (ed. ) Elsevier North-Holland Inc. New York, 1980; 55-68.
- Martínez-Palomo A. *The biology of Entamoeba histolytica*. Research Studies Press, 1982; pp 5-59.
- Martínez-Palomo A, Gonzalez-Robles A, Chávez B, Orozco E, Fernández-Castelo S, Cervantes A. Structural bases of the cytolytic mechanism of *Entamoeba histolytica*. *J Protozool*, 1985; 32: 166-175.
- Martínez-Palomo A. *Amibiasis*. Editorial Médica panamericana S. A.México. ISBN 968-968-7157-29-1.
- Mc Gowan K, Deneke CF, Thorne GM y Sherwood LG. *Entamoeba histolytica*. cytotoxin: purification, characterization, strain virulence and proteasa activity. *J. Infect. Dis*. 1989; 146: 616-625.
- Monfort I, Pérez-Tamayo R, Gonzalez AC, Garcia de Leon MC, Olivos A, Tello E. Role of cysteine proteinases of *Entamoeba histolytica* on the cytopathogenicity of axenic trophozoites on rat and hamster hepatocytes *in vitro*. *J Parasitol* 1993; 79 (1): 98-105.
- Monfort I, Pérez-Tamayo R. Phagocytosis and proteinase activity are not related to pathogenity of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res*, 1993; 24: 347-251.

- Mora-Galindo J, Martínez-Palomo A, Chavez B. Interacción entre *Entamoeba histolytica* y el epitelio cecal de cobayo. Arch Invest Med, (Méx), 1978; 9 (sup. 1) 261-274.
- Mora-Galindo J, Anaya-Velázquez F. Intracellular digestion of human erythrocytes by *Entamoeba histolytica*: a kinetic study *in vitro*. Arch Med Res, 1993; 24: 347-352.
- Nielsen HM. Fine structural localization of nucleoside triphosphatase and acid phosphatase activity in *Trichomonas vaginalis* Donné. Cell Tissue Res, 1974; 151; 269-280.
- Nilsson RJ. Structural aspects of digestion of *Escherichia coli* in *Tetrahymena*. J Protozool, 1987; 34: 1-6.
- Orozco E, Guarneros G, Martínez Palomo A. Clonas de *Entamoeba histolytica* deficientes en fagocitosis presentan deficiencia en virulencia. Arch Invest Méd, 1982a; 13: 137-143.
- Orozco E, Martínez Palomo A, Guarneros G, Koliber D, Mirelman D. Receptores participantes en la adherencia de *E. histolytica* a eritrocitos humanos. Arch Invest Méd (Méx.), 1982b; 13: 177-183.
- Orozco E, Guarneros G, Martínez Palomo A, Sánchez T. *Entamoeba histolytica* phagocytosis as virulence factor. J Exp Med, 1983 ; 158 : 1511-1521.
- Orozco E, Arroyo R, Rodríguez MA, García RG. Identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin using adhesion deficient mutants and monoclonal antibodies. Molecular Strategies of Parasitic Invasion, 1987 ; 531-540, Alan Liss, Inc.
- Ostoa-Soloma P, Cabrera N, Becker I, Pérez-Monfort R. Proteinases of *Entamoeba histolytica* associated with different subcellular fractions. Mol Biochem Parasitol, 1989; 32: 133-144.
- Potamianos S, Mason RP, Read SJ, Chikunguwo S. Lysis of erythrocytes by *Trichomonas vaginalis*. Bioscience Reports, 1992 ; 12 : 387-395.
- Ramírez-Córdova JJ, Ramírez-Romo S, Mora-Galindo. Quantitative evaluation of intracellular degradation in *Entamoeba invadens*. Int J Parasitol, 1990; 20: 199-201.

- Rendon-Maldonado JG, Espinosa-Cantellano M, González-Robles and Martínez-Palomo A. *Trichomonas vaginalis*: *In vitro* Phagocytosis of Lactobacilli, vaginal Epitelial Cells, Leucocytes, and Erythrocytes. *Exp Parasitol*, 1998; 89: 241-250.
- Rosebaum RM, Wittner. Ultrastructure of bacterized and axenic trophozoites of *Entamoeba histolytica* with particular reference to helical bodies. *J Cell Biol*, 1970; 45: 367-382.
- Roussel F, De Carli G, Brasseur PH. A cythopathic effect of *Trichomonas vaginalis* probably mediated by a mannose/N acetyl-glucosamine binding lectin. *Int J Parasitol*, 1991; 21 : 941-911.
- Ravdin IJ, Croft YB, Guerrant LR. Cythopathogenic mechanism of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med*, 1980; 152: 377-390.
- Rodriguez MA, Valdez A, Orozco E. Proteínas de *Entamoeba histolytica* que participan en la adhesión a eritrocitos humanos. *Arch Invest Med (Méx.)*, 1990 (Sup. 1); 21: 257-262.
- Scholze H, Werries E. A Weakly acidic protease has a powerful proteolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*, 1984; 11: 293-300.
- Schulte W, Scholze H. action of the mayor neutral proteinase from *Entamoeba histolytica* on proteins of the extracellular matrix. *J Protozool*, 1989; 36: 538-543.
- Senaldi MG, Strosselli GM, Di perri AG, Scaglia M, Rondanelli EG. *Naegleria fowleri*: Phase contrast cinemicrographic study of phagocytosis of human erythrocytes. *Exp Parasitol*, 1989; 69: 290-293.
- Serrano R, Deas JE, Warren LG. *Entamoeba histolytica*: membrane fractions. *Exp Parasitol*, 1977 ; 41 : 370-384.
- Shaffer GJ, Scanlan MT, Iralu V. Observations on cell division of *Entamoeba histolytica* in culture. *Am J Trop Med Hyg*, 1961; 10: 167-171.
- Silva-Filho FC, Souza W, Lopes JD. Presence of laminin binding proteins in trichomonads and their role in adhesion. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1988 ; 85 : 8042-8046.
- Talamás RP, Meza I. Interaction between pathogenic amebas and fibronectina: Substrate degradation and changes in cytoskeleton organization. *J Cell Biol*, 1988 ; 106 : 1787-1794.

--Tannich E, Nickel R, Buss H, Horsmann RD. Mapping and partial sequencing of the genes coding for two different cysteine proteinases in pathogenic *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol, 1992; 54: 109-112.

--Treviño-García MN, Feria-Velasco A, Ruiz de Chavez I, De la torre M. Lisosomas en *Entamoeba histolytica*. Arch Invest Méd (Méx), 1971; 2: 179-186.

--Trissl D, Martínez-Palomo A, De la torre M, De la Hoz, De Suárez-Pérez E. Surface properties of *Entamoeba*: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. J Exp Med, 1978; 148: 1137-1145.

--Tsutsumi V, Ramirez-Rosales A, Lanz-Mendoza H, Shibayama M, Chávez B, Rangel-López E, and Martínez-Palomo A. *Entamoeba histolytica*: erythrophagocytosis, collagenolysis, and liver abscess production as virulence markers. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1992; 86: 170-172.

--Tsutsumi V, Martínez-Palomo A, and Tanikawa K. Scanning electron microscopy of erythrophagocytosis by *Entamoeba histolytica* trophozoites. Arch Med Res. 1992; 23: 173-175.

--Villegas GJ, de la hoz R. Villegas SR, Fastag de Shor A. Estudio de la interacción entre *Entamoeba histolytica* y *Toxoplasma gondii* incubados juntos durante setenta y dos horas. Amebiasis. Sepulveda B. Y Diamond L. (eds.), IMSS, México D. F. : (México) 1976 ; 164-168.

--Young DEJ, Young MT, Lu PL, Unkelles CJ, Cohn AZ. Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. J Exp Med, 1982; 152: 1677-1690.

--Zaman V. Ingestion of erythrocytes by *Entamoeba invadens*. Trans R Trop Med Hyg, 1972; 3: 345-351.

CUBA



BIBLIOTECA CENTRAL