

## LOS TROFOZOITOS DE *Entamoeba histolytica* INTERNALIZAN A *Trichomonas vaginalis*

C. Rodríguez-Bandala<sup>1</sup>, M. A. Díaz-Orea<sup>2</sup>, C. R. Téllez-Santillán<sup>1,2</sup>, G. Delgado-López<sup>2</sup>, P. Reyes-Páramo<sup>1</sup>, P. Hernández-Jauregui<sup>1</sup>, A. Pimentel-Morales<sup>1</sup>, A. J. Montiel-Jarquín<sup>1</sup>, E. Gómez Cortes<sup>1</sup>, M. A. Huerta-Orea<sup>2</sup> and E. Gómez-Conde<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Unidad Médica de Alta Especialidad. Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional "General de División Manuel Ávila Camacho". Instituto Mexicano del Seguro Social, Puebla, Puebla. México.

<sup>2</sup>Laboratorio de Investigación en Biología Celular y Patología Experimental, Facultad de Medicina. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

\*Autor de Correspondencia: Dr. Eduardo Gómez-Conde, Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE). Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional "General de División Manuel Ávila Camacho". Instituto Mexicano del Seguro Social. 2 Norte 2004. Colonia Centro. Puebla, Puebla. México. C. P. 72000.

E-mail: gom\_cond@yahoo.com. Tel. 001 (222) 2424520.

Recibido: Abril 2010. Aprobado: Mayo 2010.

Publicado: Mayo 2010.

### RESUMEN

*Entamoeba histolytica* es un protozoo patógeno del ser humano capaz de adherirse a las células que afecta e inducir su lisis y fagocitosis. En este trabajo describimos la interacción de los trofozoitos de *E. histolytica* con los de *Trichomonas vaginalis* y el mecanismo por el cual esta última es internalizada en el citoplasma de las amibas. Para favorecer la interacción de ambos parásitos, primero se cultivaron en medio TYI-S-33 suplementado con suero bovino y vitaminas hasta la fase estacionaria de crecimiento (72h). Posteriormente se cultivaron juntos en un tubo Eppendorf en proporción 1:1 y se incubaron a 37°C. Se obtuvieron 2 muestras cada 30 seg durante 4 min. Todas las muestras se fijaron con Karnovsky y posfijaron con tetróxido de Osmio al 1% durante 30 min. Una muestra de cada tiempo se observó por la técnica de Nomarski y las muestras del otro grupo fueron deshidratadas e incluidas en araldita. Se identificaron cuatro fases del proceso de internalización: 1) Adhesión entre los dos protozoarios, 2) Formación del conducto en el citoplasma de *E. histolytica*, 3) Internalización de *T. vaginalis* en el citoplasma de *E. histolytica* y 4) Estrangulación de *T. vaginalis*. Durante el estrangulamiento, *T. vaginalis* se dividió en dos vesículas: una granular interna y otra agranular externa. La reducción paulatina del tamaño de *T. vaginalis* y el vaciamiento de su contenido por los trofozoitos de *E. histolytica*, nos sugiere que la internalización es otro mecanismo de patogenicidad de este parásito a las células vivas.

**Palabras clave:** *Entamoeba histolytica*, internalización, *Trichomonas vaginalis*, Nomarski.

### INTERNALIZATION OF *T. vaginalis* INTO THE CYTOPLASM OF *E. histolytica*

#### ABSTRACT

The human pathogenic protozoa *Entamoeba histolytica* adheres to cells inducing lysis and further *E. histolytica* phagocytosis. The present paper describes interaction process and *E. histolytica* mechanism of internalization of *Trichomonas vaginalis* into its cytoplasm. Both protozoa were individually cultured in TYI-S-33 with adult bovine serum and vitamin supplement for 72 h at 37°C. One ml of each culture was then incubated in Eppendorf tubes at 37°C and two samples were obtained every 30 seconds for a period of four minutes. All samples were fixed with a Karnovsky buffer solution and post fixed with 1% Osmiun tetroxide for 30 minutes. Part of the samples were dehydrated and further embedded in Araldite resin and studied with a light microscope. A sample of each time period was analyzed under Nomarski contrast microscopy technique. We observed four different interactions between *E. histolytica* and *T. vaginalis* namely; 1) Adhesion of both protozoa, 2) organization of a duct within the *E. histolytica* cytoplasm, 3) Internalization of *T. vaginalis* into the cytoplasm of *E. histolytica* and 4) Strangulation of the incorporated vesicle giving rise to two vesicles. One of the vesicles contained a granular matrix and the other was agranular, with a progressive diminish of the protozoa size. The observed steps of internalization of *T. vaginalis* into *E. histolytica* suggest an attack mechanism of the last for live cells.

**Keywords:** *Entamoeba histolytica*, internalization, *Trichomonas vaginalis*, Nomarski.

## INTRODUCCIÓN

*Entamoeba histolytica* es un protozooario parásito del ser humano capaz de dañar el intestino grueso, la piel, el hígado y el cerebro. Para invadir y destruir los tejidos de estos órganos, emplea mecanismos de patogenicidad como el desprendimiento de las células de las mucosas, la lisis, la fagocitosis y la degradación de las células ingeridas [1]. De manera simultánea a estos procesos, los trofozoitos de *E. histolytica* liberan proteínas formadoras de poros, proteasas, fosfolipasas y colagenasas [2].

La primera observación de la succión de células fue reportada en la cepa HK-9:NIH de los trofozoitos de *E. histolytica* al ponerlos a interactuar con eritrocitos [3,4] y leucocitos humanos [5]. Más tarde se observó en la cepas Laredo [6] y HM1-IMSS [7] de *E. histolytica*. También este proceso ha sido descrito en amibas de vida libre como *Naegleria fowleri* [8], en dos cepas de *Acanthamoeba* [9] y en *Dictyostelium caveatum* [10]. Aún cuando se ha reportado la succión en diferentes protozoarios, ninguno de los trabajos ha descrito el proceso de internalización de *Trichomonas vaginalis* por *E. histolytica*.

El propósito de este trabajo fue describir las fases de la internalización de *T. vaginalis* por los trofozoitos de *E. histolytica*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Parásitos y condiciones de cultivo*

En este trabajo se emplearon los trofozoitos de *E. histolytica* cepa HMI:IMSS y de *T. vaginalis* del aislado axénico CNC-190.

Los trofozoitos de *E. histolytica* y de *T. vaginalis* fueron cultivados, por separado, en medio TYI-S-33 suplementado con suero de bovino adulto al 10% y vitaminas.

### *Interacción de los parásitos*

Para favorecer la interacción de los trofozoitos de *E. histolytica* con los de *T. vaginalis*, se cultivaron por

separado en botellas de plástico (Nunc®) hasta llegar a la fase estacionaria de crecimiento (72h). Ambos parásitos fueron retirados de la superficie del plástico, se decantaron en tubos cónicos de 50 ml (Nunc®) y se centrifugaron a 500 x g por 3 min. Se eliminó el sobrenadante y los parásitos obtenidos fueron resuspendidos en 20 ml de medio de cultivo fresco. Luego se contaron, se pusieron en contacto en un tubo Eppendorf en proporción 1:1 y se incubaron a 37°C. Se obtuvieron dos muestras de este tubo cada 30 seg durante 4 min. Las muestras obtenidas de cada condición se fijaron con Karnovsky, se lavaron tres veces con amortiguador de fosfato 0.15 M pH 7.3 a 37°C y se posfijaron con tetróxido de osmio al 1% por 30 min. Una de las muestras de cada tiempo de interacción se observaron en el microscopio óptico (Nikon E600®) con la técnica de contraste de interferencia diferencial de Nomarki. Las otras muestras se deshidrataron con concentraciones ascendentes de etanol, se incluyeron en araldita, se obtuvieron cortes semifinos que se tiñeron con azul de toluidina-fuchsina básica y se observaron en el microscopio óptico (Nikon E600®) en campo claro a 100X.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Fases del proceso de internalización de T. vaginalis*

La interacción de los trofozoitos de *E. histolytica* con los de *T. vaginalis*, observada con la microscopía de contraste de interferencia diferencial de Nomarski, mostró cuatro fases del proceso de internalización: 1) Adhesión entre los dos protozoarios, 2) Formación del conducto en el citoplasma de *E. histolytica*, 3) Internalización de *T. vaginalis* en el citoplasma de *E. histolytica* y 4) Estrangulación de *T. vaginalis*. La fase de adhesión ocurrió entre los 30 y 60 seg después de iniciada la interacción. La forma, el tamaño y la membrana celular de ambos parásitos se conservó aparentemente (Figs. 1a and 2a). A los 60 segundos de interacción, los trofozoitos de *E. histolytica* presentaron

un área agranular adyacente al sitio de contacto con *T. vaginalis*. La fase de la formación del conducto en el citoplasma de *E. histolytica* ocurrió a los 90 seg. Esta se caracterizó por la presencia de un estoma a través del cual se inició la internalización de *T. vaginalis* (Fig. 1c). La fase de internalización de *T. vaginalis* en el citoplasma de *E. histolytica* ocurrió entre los 120 y 210 seg de interacción. Al inicio de esta fase se observó una estructura de forma tubular y aspecto granular localizada en el centro del estoma endocítico, la cual, más tarde, se acortó, anchó y fue ocupada por el cuerpo de *T. vaginalis* (Figs. 1d-e and 2b). En esta fase el cuerpo de *T. vaginalis* presentó un área agranular en el polo opuesto al sitio de la internalización (Figs. 1f). A los 210 seg de interacción, no se observó el estoma endocítico de *E. histolytica*, pero se identificó el material granular de *T. vaginalis* en su citoplasma (Fig. 1g). La fase de estrangulación de *T. vaginalis* se presentó a los 240 seg de interacción. Se caracterizó por la presencia de una vesícula de aspecto hialino producto del estrangulamiento de *T. vaginalis* (Fig. 1h and 2c) (Video enviado como material complementario).

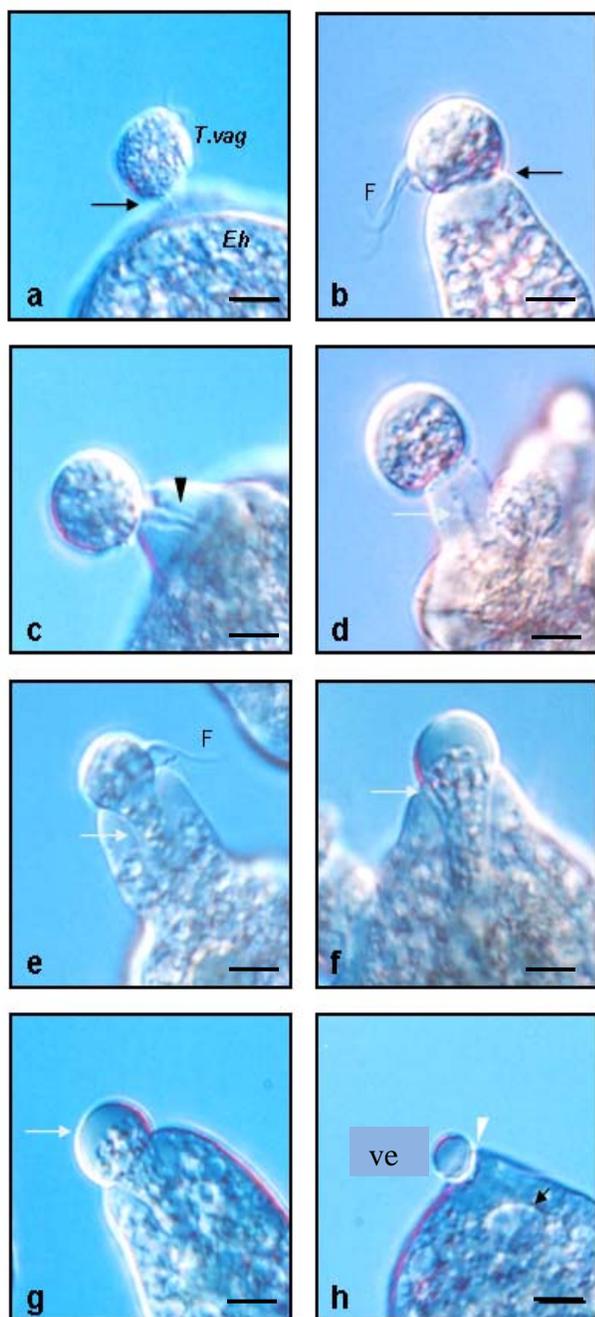
Los protozoarios usados en este estudio, *E. histolytica* y *T. vaginalis*, frecuentemente dañan la membrana de las células de intestino y vagina, respectivamente. Este daño lo producen mediante la liberación de proteasas que ocasionan la lisis de los tejidos o bien por fagocitosis [1,11]. Un mecanismo de patogenicidad parecido a la internalización de *T. vaginalis* por los trofozoitos de *E. histolytica*, descrito en este trabajo, es la succión de los eritrocitos [6]. Mediante la microscopía de contraste de interferencia diferencial de Nomarski, fuimos capaces de identificar 4 fases del proceso de internalización de *T. vaginalis* por los trofozoitos de *E. histolytica*: 1) Adhesión entre los dos protozoarios, 2) Formación del conducto en el citoplasma de *E. histolytica*, 3) Internalización de *T. vaginalis* en el citoplasma de *E. histolytica* y 4) Estrangulación de *T. vaginalis* (Figs. 1 and 2).

La fase de adhesión entre los parásitos fue semejante a lo descrito al inicio de la fagocitosis [12]. Sin embargo, si consideramos el diámetro que ocupó la internalización de *T. vaginalis* en el citoplasma de *E. histolytica*, este mecanismo es completamente diferente de la pinocitosis [13].

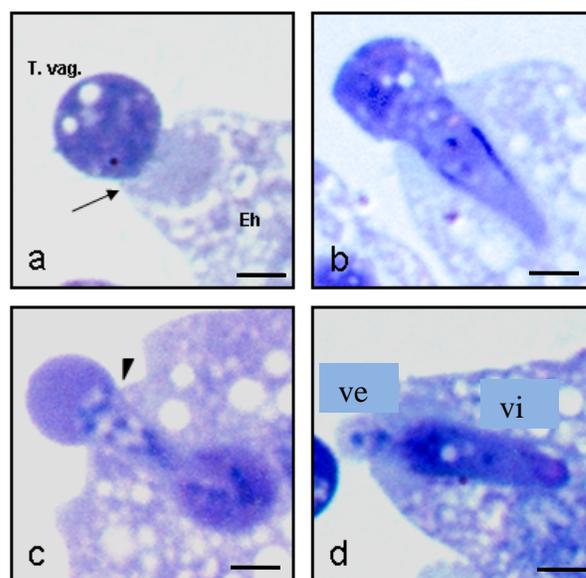
La primera fase ocurrió al ponerse en contacto las membranas celulares de ambos parásitos en un tiempo máximo de 60 seg. Adhesiones semejantes se han descrito entre los eritrocitos humanos y los trofozoitos de *E. histolytica* cepa HK-9:NIH [4]. La adhesión observada en nuestro estudio entre *T. vaginalis* y *E. histolytica* no mostró preferencia por alguna área específica en ambos parásitos. Es probable que este reconocimiento sea mediado por moléculas del glicocalix de los dos protozoarios [14,15,16] o por proteínas de *E. histolytica* involucradas en la adhesión, como ocurre en la interacción de estos parásitos con los eritrocitos de humano [17,18,19,20].

La segunda fase se caracterizó, al parecer, por la formación de un conducto en el estoma y el citoplasma de *E. histolytica* por donde fue internalizada *T. vaginalis*. Se desconocen los mecanismos celulares que ocasionan este proceso, sin embargo, es probable que ocurra un arreglo de moléculas de actina en el estoma endocítico [21,22]. La presencia del conducto por donde se internalizan células se ha descrito en *E. histolytica* cepa HK-9:NIH mediante microscopía de contraste de fase [3] y en *E. histolytica* cepa Laredo mediante microscopía de fluorescencia [23].

La tercera fase se caracterizó por la presencia de parte del cuerpo de *T. vaginalis* en el conducto localizado en el estoma y citoplasma de *E. histolytica*. Esta fase ocurrió entre los 120 y 210 seg. Si bien el proceso de internalización descrito en este trabajo es semejante a la succión reportada por otros autores, se desconoce el mecanismo por el cual ocurre dicho fenómeno. Para explicar la internalización de *T. vaginalis* por *E. histolytica*, proponemos tres mecanismos probables: El



**Fig. 1.** Fases de la internalización de *T. vaginalis* por los trofozoitos de *E. histolytica* observadas con la técnica de microscopía de interferencia diferencial (Nomarski). a) y b) Adhesión (Flecha negra), c) Formación del conducto (Cabeza de flecha negra), d-g) Aspiración (Flecha blanca), h) Estrangulamiento (Cabeza de flecha blanca). *T. vag.* = *Trichomonas vaginalis*, *Eh* = *Entamoeba histolytica*, F = Flagelos, ve = Vesícula externa, Flecha corta = Vesícula interna. a-h (Bar = 10  $\mu$ m)



**Fig. 2.** Cortes semifinos de las fases de internalización de *T. vaginalis* por el trofozoito de *E. histolytica* teñidos con azul de toluidina-fushina básica. Note la presencia de una vesícula granular alargada en el citoplasma de *E. histolytica*. a) Adhesión (Flecha negra), b) Internalización, c) and d) Estrangulamiento (Cabeza de flecha negra). *T. vag.* = *Trichomonas vaginalis*, *Eh* = *Entamoeba histolytica*, ve = vesícula externa, vi = vesícula interna. a-d (Bar = 10  $\mu$ m)

primero sería que las proteínas del citoesqueleto que se unen a su vez a las proteínas de la membrana de *E. histolytica*, al contraerse, tomaría la membrana de *T. vaginalis* y la introduciría a su citoplasma. El segundo mecanismo podría ser que, desde su citoplasma, *E. histolytica* generara una presión negativa. Esta fuerza succionaría la membrana y el contenido intracitoplasmático de *T. vaginalis* hacia el interior de *E. histolytica*. El tercer mecanismo sería una combinación de la acción de las proteasas de *E. histolytica* [24,25] y la fuerza de succión intra amibiana. En este último, las enzimas amibianas producirían la lisis de los componentes de la membrana de *T. vaginalis* y del citoplasma, lo que facilitaría la introducción de los componentes del parásito. Las observaciones muestran que primero ocurre la internalización de los componentes estructurales del citoplasma de *T. vaginalis* y al final la

vesícula residual agranular (Fig. 1). Se desconoce si las proteasas de *E. histolytica* están implicadas en esta forma de internalización de células, como ocurre con el daño que ocasionan en los eritrocitos humanos [6].

La cuarta fase o de estrangulamiento de *T. vaginalis*, involucró el cierre del conducto de internalización y del estoma endocítico, lo que ocasionó la partición del parásito en las dos vesículas. Casi un 80% del parásito fue internalizado y solo un 20% quedó como vesícula residual (Fig. 2d) que no fue internalizada (Fig. 1h and Fig. 1d). En registros por videomicroscopía (Datos no mostrados), otro trofozoito de *E. histolytica* es el que, por fagocitosis, captura la vesícula residual y probablemente la degraden las cistein proteasas [24,25]. Aún cuando el mecanismo de la succión ha sido descrito en estudios estructurales y ultraestructurales en cepas de *E. histolytica* [34,6,7] y tiene semejanza con el mecanismo de internalización de *T. vaginalis* por los trofozoitos de *E. histolytica*, ningún trabajo ha descrito las diferentes fases ni tampoco ha reportado la interacción de estos dos parásitos. Solo la co-infección de *E. gingivalis* y *T. tenax* en cavidad oral de adolescentes se ha reportado como ejemplo de interacción de protozoarios [26].

El hecho de que *E. histolytica* internalice a otro protozoario fagocítico como *T. vaginalis*, sugiere ventajas en tamaño y patogenicidad [27,28].

## CONCLUSIONES

La internalización de *T. vaginalis* por los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* es uno más de los mecanismos de patogenicidad que emplea este último parásito. Si bien con este modelo se generan muchas interrogantes, es un hecho que el proceso de internalización requiere de adhesión entre los parásitos y de mecanismos que permitan su incorporación al citoplasma de *E. histolytica*. Para tal efecto, se llevó a cabo en cuatro fases: 1) adhesión, 2) formación de una estructura aparentemente tubular 3) internalización y 4) estrangulamiento.

## REFERENCIAS

- [1] Espinosa-Cantellano M., Martínez-Palomo A. (2000) "Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease" *Clin Microbiol Rev* 13:318-331.
- [2] Pérez-Tamayo R., Montfort I., García A.O., Ramos E., Ostria C.B. (2006) "Pathogenesis of acute experimental liver amebiasis" *Arch Med Res* 37:203-209.
- [3] Chévez A., Iturbe-Alessio I., Segura M., Corona D. (1972b) "Phagocytosis of human erythrocytes by *Entamoeba histolytica*" *Arch Med Res* 2:275-286.
- [4] Treviño-García-Mazo A., Feria-Velasco A., Ruiz I. (1972) "Erythrophagocytosis by *Entamoeba histolytica*" *Arch Med Res* 3:295-302.
- [5] Chévez A., Iturbe-Alessio I., Segura M., Corona D. (1972a) "Biological relations between *Entamoeba histolytica* and other cells. I. Ameba-leukocyte association complex" *Arch Med Res* 2:241-256.
- [6] Lejeune A., Gicquaud C. (1987) "Evidence for two mechanisms of human erythrocyte endocytosis by *Entamoeba histolytica*-like amoebae (Laredo strain)" *Biol Cell* 59:239-245.
- [7] Tsutsumi V., Martínez-Palomo A., Tanikawa K. (1992) "Scanning electron microscopy of erythrophagocytosis by *Entamoeba histolytica* trophozoites" *Arch Med Res* 23:173-175.
- [8] John D.T., Cole T.B. Marciano-Cabral F.M. (1984) "Sucker-like structures on the pathogenic amoeba *Naegleria fowleri*" *Appl Environ Microbiol* 47:12-14.
- [9] Díaz J., Osuna A., Rosales M.J., Cifuentes J., Mascaro C. (1991) "Sucker-like structures in two strains of *Acanthamoeba*: scanning electron microscopy study" *Int J Parasitol* 21:365-367.
- [10] Waddell D.R., Vogel G. (1985) "Phagocytic behavior of the predatory slime mold, *Dictyostelium*

- caveatum*. Cell nibbling” *Exp Cell Res* 159:323-334.
- [11] Schwabke J.R., Burgess D. (2004) “Trichomoniasis” *Clin Microbiol Rev* 17:794-803.
- [12] Voigt H., Guillen N. (1999) “New insights into the role of the cytoskeleton in phagocytosis of *Entamoeba histolytica*” *Cell Microbiol* 1:195-203.
- [13] Mellman I., Fuchs R., Helenius A. (1986) “Acidification of the endocytic and exocytic pathways” *Annu Rev Biochem* 55:663-700.
- [14] Feria-Velasco A., Treviño-García-Mazo A., Ruiz de Chavez I. (1972) “Mucopolysaccharides in glycocalix of *E. histolytica*. An electron microscopic study” *Arch Med Res* 3: 302-310.
- [15] Mirhaghani A., Warton, A. (1998) “Involvement of *Trichomonas vaginalis* surface-associated glycoconjugates in the parasite/target cell interaction. A quantitative electron microscopy study” *Parasitol Res* 84:374-381.
- [16] González-Robles A., Cristóbal-Ramos A.R. (2002) “Ultrastructural cytochemical observations of the cell coat of two *Trichomonas vaginalis* isolates with different degree of virulence” *J Submicrosc Cytol Pathol* 34:207-210.
- [17] Arroyo R., Orozco E. (1987) “Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesion” *Mol Biochem Parasitol* 23:151-158.
- [18] Rodríguez M.A., Orozco E., Arroyo R. (1994) “Proteins of *Entamoeba histolytica* trophozoites involved in the adhesion to target cells” *Arch Med Res* 25:205-210.
- [19] García-Rivera G., Rodríguez M.A., Ocadiz R., Martínez-Lopez M.C., Arroyo R., González-Robles A., Orozco E. (1999) “*Entamoeba histolytica* : a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein” *Mol Microbiol* 33:556-568.
- [20] Petri W.A. Jr., Ravdin J.I. (1987) “Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*: the role of amebic adherence and contact-dependent cytolysis in pathogenesis” *Eur J Epidemiol* 3:123-136.
- [21] Bailey G.B., Day D.B., Gasque J.W. (1985) “Rapid polymerization of *Entamoeba histolytica* actin induced by interaction with target cells” *J Exp Med* 162:546-558.
- [22] Bailey G.B., Day D.B., Nokkaew C., Harper C.C. (1987) “Stimulation by target cell membrane lipid of actin polymerization and phagocytosis by *Entamoeba histolytica*” *Infect Immun* 55:1848-1853.
- [23] Lejeune A., Gicquaud C. (1992) “Target cell deformability determines the type of phagocytic mechanism used by *Entamoeba histolytica*-like, Laredo strain” *Biol Cell* 74:211-216.
- [24] Becker I., Pérez-Montfort R., Pérez-Torres A., Rondan-Zarate A., Montfort I., Pérez-Tamayo R. (1996) “*Entamoeba histolytica*: localization of a 30-kDa cysteine proteinase using a monoclonal antibody” *Exp Parasitol* 82:171-181.
- [25] Nakada-Tsukui K., Saito-Nakano Y., Ali V., Nozaki T. (2005) “A retromerlike complex is a novel Rab7 effector that is involved in the transport of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*” *Mol Biol Cell* 16:5294-5303.
- [26] Vrablic J., Tomova S., Catar G. (1992) “Occurrence of the protozoa, *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* in the mouths of children and adolescents with hyperplastic gingivitis caused by phenytoin” *Bratisl Lek Listy* 93:136-140.
- [27] Rendón-Maldonado J.G., Espinosa-Cantellano M., González-Robles A., Martínez-Palomo A. (1998) “*Trichomonas vaginalis*: in vitro phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes, and erythrocytes” *Exp Parasitol* 89:241-250.
- [28] A. Martínez-Palomo. “Biología de la *Entamoeba histolytica*. Amibiasis. Editorial Médica Panamericana, México, D.F. 1989.