

TRICOMONIASIS VAGINAL HUMANA: ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL E HISTOQUIMICO

Jorge García Tamayo*, José T. Núñez Montiel**, Haydée Prieto de García**.

RESUMEN

Se estudian muestras de citología vaginal en casos de tricomoniasis, utilizando la toma dirigida por raspado de la superficie exocervical. Se identifican las tricomonas y se describe la ultraestructura de estos parásitos comparándola con algunos estudios previos. Se demuestra la presencia de actividad de fosfatasa ácida en el aparato de Golgi, lisosomas y fagolisosomas de la *Trichomona vaginalis*. Se presentan evidencias de que la tricomona es capaz de fagocitar bacterias y fragmentos de células epiteliales.

INTRODUCCION

La *Trichomona vaginalis* fue descrita por Donné en 1836 y durante muchos años se consideró como un parásito comensal del aparato genital. Sin embargo, ya en 1916 Hohne comenzó a hablar de la tricomoniasis como "trichomonadenkolpitis". Años más tarde Trussell, y posteriormente Jirovex y Peter, demostraron la importancia patógena de este parásito, señalando cómo la tricomona vaginal era capaz de producir lesiones del epitelio de la mucosa vaginal humana. Se pensaba que la tricomona actuaba por una especie de simbiosis patógena con las bacterias del medio vaginal contribuyendo, como factor irritativo, en los estados inflamatorios clínicamente bien conocidos como colpitis y vaginitis.

Estudios experimentales en animales de laboratorio demostraron que cultivos puros de tricomonas producen inflamación del epitelio vaginal (15); también se ha estudiado la acción patógena de cultivos axénicos de *T. vaginalis* en la serosa peritoneal de ratones, demostrándose peritonitis purulenta con focos de necrosis diseminados (6).

* Laboratorio de Microscopía Electrónica, Servicio de Patología, Hospital General del Sur, Maracaibo.

** Servicio de Ginecología y Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario, Maracaibo, Venezuela.

En los últimos años se le ha atribuido a la *T. vaginalis* un papel importante en la génesis del carcinoma apidermoide del cuello uterino. Frost llamó la atención sobre la relación estrecha entre tricomonas y displasia, carcinoma *in situ* y carcinoma invasivo del cervix (2). Koss y Wolinska también habían señalado que se observa mayor incidencia de tricomoniasis en pacientes con carcinoma *in situ*, que en aquellas que tienen únicamente cervicitis (7).

Algunos reportes sobre la ultraestructura de la *T. vaginalis* (3,4,6,11,14) han demostrado las características submicroscópicas de este protozooario, así como la citoquímica y la bioquímica del parásito (6). Sin embargo, hasta el presente, no conocemos estudios que muestren la relación existente entre este agente y los otros elementos del medio vaginal; este tipo de información creemos puede proporcionar mayores datos sobre la biología de la *T. vaginalis* y en especial sobre su actividad patógena.

En esta comunicación presentamos algunos aspectos ultraestructurales de la *T. vaginalis* en el medio habitual, y demostramos la actividad histoquímica de la fosfatasa ácida en el aparato de Golgi, lisosomas y fagolisosomas de la tricomona y en otros elementos celulares como son los macrófagos, los leucocitos y las células descamadas del epitelio cervical y vaginal humano.

MATERIAL Y METODO

En varias pacientes con diagnóstico clínico, colposcópico y citológico de tricomoniasis, se tomaron muestras del exudado que cubría el exocervix, previo examen *in fresco* e identificación de las tricomonas con tinción de azul brillante cresil. Se practicó raspado de la superficie exocervical con una espátula de Ayre, y la muestra se fijó en glutaraldehído al 3% en solución reguladora de fosfato de sodio, pH 7,2.

Para el estudio histoquímico se utilizó buffer cacodilato 0,1 M, pH 7,2 y a 4°C; la fijación en glutaraldehído se mantuvo por una hora, practicándose posteriormente incubación en un medio de Gomori con acetato de plomo, beta glicerofosfato de sodio al 2% y buffer acetato 0,1 M con pH 5,2 durante 90 minutos en estufa a 37°C.

Se practicó post-fijación en tetraóxido de osmio al 2%, deshidratación en acetona a concentraciones crecientes, inclusión en Araldita y polimerización a 60° por 48 horas. Los cortes gruesos, de una micra, fueron practicados en un ultramicrotomo utilizando cuchillo de diamante; se tiñeron con azul de toluidina y safranina y se examinaron al microscopio de luz para identificar las tricomonas.

Los cortes finos se colocaron en rejillas de cobre o de níquel, se tñieron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron en un microscopio electrónico JEM 7A utilizando un voltaje acelerador de 80 Kv y con aumentos entre 8.000 y 65.000 X.

RESULTADOS

En los cortes de una micra observados con el microscopio de luz, la *Trichomona vaginalis* se ve teñida de azul violáceo con la toluidina, y mide entre 10 y 20 micras de diámetro. Presenta forma de media luna o redondeada, con citoplasma denso o vacuolizado y con frecuencia en íntima asociación con otras tricomonas o con las células epiteliales descamadas a las cuales se adhiere aisladamente o en grupos. Con el microscopio electrónico la *T. vaginalis* muestra un aspecto variable de acuerdo con el plano de sección; con frecuencia se le ve en forma de media luna o redondeada con cortos pseudópodos, siendo su citoplasma de densidad variable. La tricomona está rodeada por una membrana con la estructura trilaminar característica de la unidad de membrana, con un espesor aproximado de 100 Å y observándose en ocasiones un ligero engrosamiento de la hoja externa provocado por la presencia de una delgada capa pelúcida (Fig. 3a). En las áreas invaginadas del citoplasma o en vesículas pinocitóticas o de fagocitosis, la capa pelúcida se observa mejor, llegando a medir hasta 300 Å de espesor. En el citoplasma periférico, y en ocasiones haciendo contacto con la membrana que rodea la tricomona, se observan estructuras membranosas en forma de bastones cortos y curvos, generalmente con sus extremos dilatados y los cuales en ocasiones parecen contribuir a formar parte de la membrana de las flagosomas (Figs. 3 y 3a).

El núcleo de la tricomona es redondo, ligeramente ovalado con cisterna perinuclear, poros nucleares y cromatina irregularmente distribuida (Figs. 1 y 4). El retículo endoplasmático rugoso se encuentra ubicado alrededor del núcleo, formado por unas 7 a 8 cisternas, con ribosomas adheridos a la membrana, pudiendo observarse también algunos ribosomas, libres o en grupos de 3 a 5 con aspecto de polirribosomas. En el extremo anterior del parásito se observan cuatro flagelos con 9 pares de filamentos periféricos y un par central, todos longitudinales, huecos, de 200 a 400 Å de diámetro, estando cubierto el flagelo por una unidad de membrana similar a la membrana plasmática (Fig. 1). Un quinto flagelo, considerado como el flagelo recurrente, se ve adosado a la membrana plasmática en la profundación que constituye la membrana ondulante. El flagelo recurrente nace de un centriolo central que se ubica transversalmente a los 4 centriolos que en un mismo plano dan origen a los otros flagelos.



Figura 1.— Microfotografía electrónica que muestra parte del citoplasma de una tricomona cortado a nivel de la base de los flagelos. En el extremo superior derecho se ven los cuatro flagelos y el flagelo recurrente (flechas) cortado transversalmente y adosado a la membrana celular. El núcleo (N) muestra en su periferia cisternas de retículo endoplasmático rugoso y un pequeño complejo de Golgi (g). Desde la base de los flagelos y rodeando el núcleo se ve el axostilo (Ax). En el extremo inferior se observa una célula epitelial (Ep). 24.000X.

En el extremo de la prolongación citoplasmática que forma la membrana ondulante se observa una estructura laminar con una periodicidad de 100 Å aproximadamente; esta estructura se encuentra adosada al flagelo recurrente.

En el citoplasma existe una banda densa, formada por fibrillas que originan discos claros y oscuros y que muestran una periodicidad de 400 Å. Esta banda septada de un ancho aproximado de 200 Å se origina en la región anterior en contacto con los centríolos, dirigiéndose hacia el extremo caudal entre la base de la membrana ondulante, el núcleo y el aparato de Golgi (Figs. 5 y 6). Una estructura similar muestra el filamento parabasal, el cual se extiende paralelo a la banda previamente descrita también denominada costa. Tanto la costa como el filamento parabasal presentan un diámetro semejante, aproximadamente igual al de un centríolo, y la periodicidad de sus líneas transversales es de 400 a 450 Å. El aparato de Golgi está formado por una serie de 3 a 6 cisternas, mostrando vacuolas y vesículas en sus extremos (Fig. 1, 5 y 6).



Figura 2.— Citoplasma de una tricomona englobando partes de una célula epitelial (Ep). A nivel de las áreas de fagocitosis (flechas) el citoplasma del parásito se observa más homogéneo y desprovisto de organelos. 27.000 X.

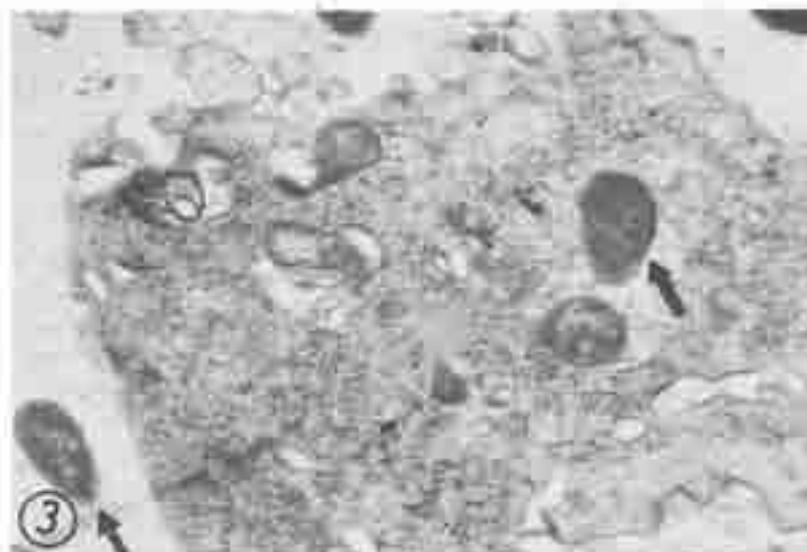


Figura 3.— Se demuestra el proceso de fagocitosis bacteriana en la tricomona. Las flechas señalan las bacterias en el medio vaginal y dentro de fagolisosomas en el interior del parásito. 24.000 X.



Figura 3a.— Detalle del citoplasma de una tricomona que demuestra la membrana celular con su hoja externa algo engrosada y membranas en forma de bastones curvos (flechas) conteniendo material electrodensso. Se observan también ribosomas y gránulos de glicógeno. 50.000 X.

El axostilo se extiende desde el extremo anterior hacia la parte posterior del parásito y está formado por una vaina de filamentos con

aspecto de microtúbulos de 200 Å de diámetro, los cuales en la región anterior parecen originarse cerca de la base de los centriolos (Fig. 1). Los filamentos rodean los 4 centriolos que dan origen a los flagelos y al hacerlo forman una estructura caracterizada por una serie de microtúbulos en hilera unidos por una fina membrana la cual muestra en ocasiones la apariencia de una cadena (Fig. 7). Esta formación hace contacto con la membrana del parásito en la base de los flagelos y se le puede ver en algunos cortes llegando hasta la región vecina al flagelo del axostilo que da origen a la membrana ondulante; a este nivel el aparato fibrilar descrito se ha denominado pelta (Fig. 1). Hacia la parte posterior los filamentos, después de pasar el nivel del núcleo, se van curvando anteriormente tomando una organización muy característica que se aprecia, de acuerdo con el plano de sección, como grupos de túbulos que se cruzan o que se dirigen hacia adelante rodeando al núcleo y formando una estructura con perfiles estriados (Fig. 4). En el citoplasma se pueden observar también una serie de inclusiones en forma de gránulos redondos, limitados por una unidad de membrana, que contienen material homogéneo de mediana densidad electrónica (Figs. 4,5,7). Se observan también una serie de vacuolas, unas pequeñas, en relación con las vesículas del complejo de Golgi, que muestran discreta osmiofilia en su interior (Figs. 5,6) y otras en contacto con las membranas curvas en forma de bastones que han sido descritas previamente (Figs. 3 y 3a). Algunas tricomonas mostraron vacuolas más grandes con apariencia de fagosomas y en ocasiones mostrando restos de células epiteliales. Se observó con frecuencia fagocitosis de bacterias y en el interior de las vacuolas se pudieron observar bacterias en diversas etapas de degeneración (Figs. 3 y 5). El citoplasma de la tricomona mostró también pequeños gránulos de glicógeno que en algunos parásitos presentaban una apariencia grumosa o finamente vacuolizada (Fig. 3a). Se observó la emisión de cortos pseudópodos, con disminución de la densidad electrónica en su citoplasma (Figs. 2,4). Con frecuencia las tricomonas se disponían adheriéndose a la superficie de células epiteliales descamadas o a otras tricomonas, tomando en ocasiones la apariencia de digitaciones que unían a varias tricomonas o a las tricomonas y las células epiteliales (Figs. 2,4). Se pudo observar también cómo partes de las células epiteliales eran atrapadas por el citoplasma de las tricomonas (Figs. 2,4).

Actividad de fosfatasa ácida: Los depósitos de acetato de plomo que marcan la actividad de la enzima se observaron en las cisternas y vesículas del complejo de Golgi (Fig. 6). Asimismo se observó actividad de fosfatasa ácida en vacuolas ubicadas en la vecindad del complejo de Golgi y en las dilataciones de las estructuras membranosas con aspecto de bastones curvos que describimos previamente. También se observó actividad en la hoja interna de la membrana de los gránulos de contenido ligeramente

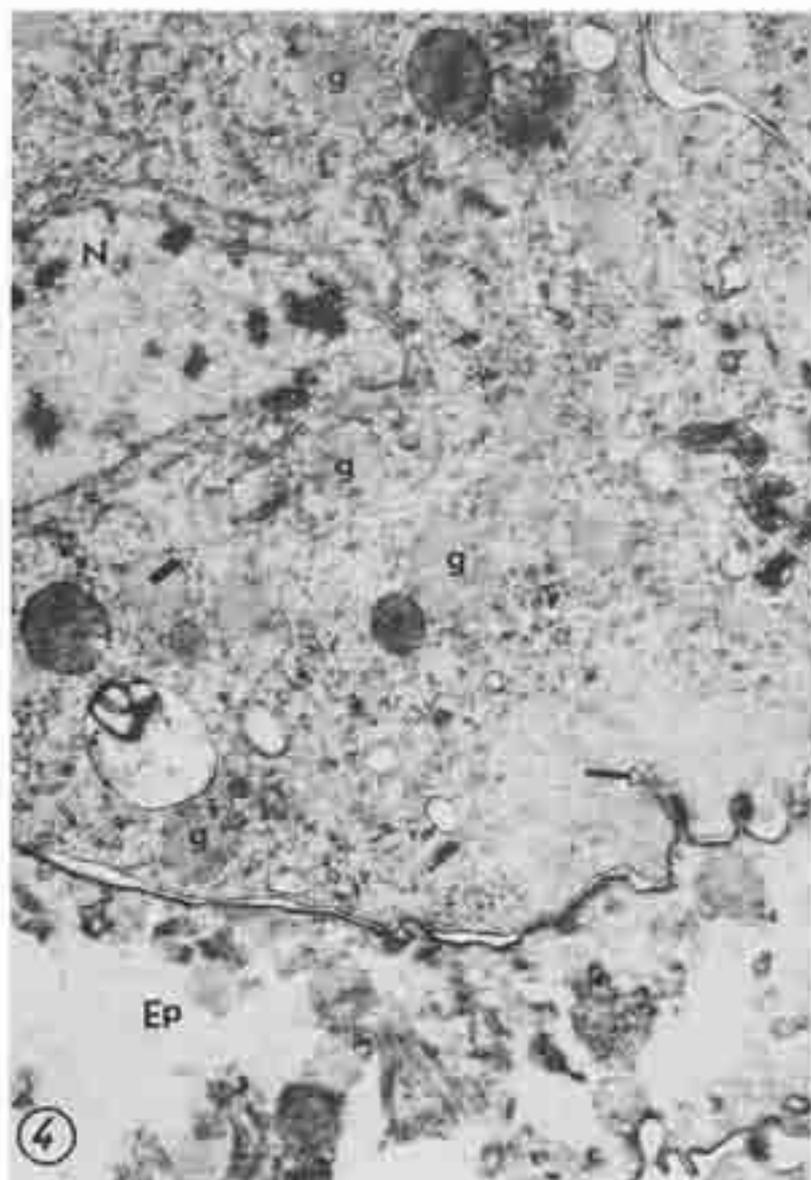


Figura 4.— La *Tricomonavaginalis* emite un pseudópodo y engloba algunas prolongaciones (flecha) de una célula epitelial (Ep). En la zona descrita, el citoplasma de la tricomona no muestra organelos; en otras áreas se ven granulaciones (g), vacuolas, ribosomas y cisternas de retículo endoplasmático rugoso alrededor del núcleo (N). La flecha grande señala perfiles estriados de los filamentos axostilares. 24.000 X.

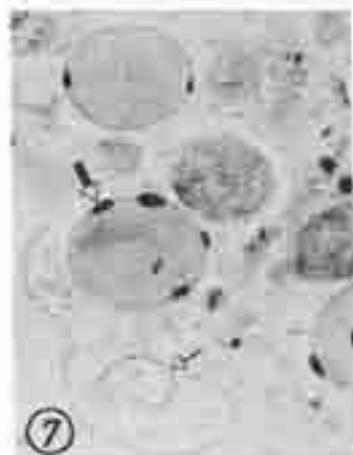


Figura 5.— Citoplasma de una tricomona que ha fagocitado bacterias (b) y que muestra actividad de fosfatasa ácida en los fagolisosomas y en la membrana de los gránulos (flechas pequeños). Una bacteria (B) adherida a la membrana del parásito también muestra intensa actividad de fosfatasa ácida en la pared. En la vecindad del aparato de Golgi (G) de la tricomona se observa la costa (flecha grande). 24.000 X.

Figura 6.— Actividad de fosfatasa ácida en las cisternas y vesículas del complejo de Golgi (G). En el extremo superior derecho se observa el núcleo y la cisterna perinuclear (flecha). Entre ésta y el complejo de Golgi se ven las estriaciones transversales de la costa (c). 60.000 X.

Figura 7.— Las granulaciones de la tricomona muestran actividad de fosfatasa ácida en la lámina interna de la membrana (flecha grande). La flecha pequeña señala los filamentos del axostilo que cortados transversalmente se disponen en forma de cadenas semicirculares. 60.000 X.

osmitófilo descritos en el citoplasma (Figs. 5,7), en algunas vesículas que contenían detritus celulares y membranas, y en los fagosomas y fagolisosomas que contenían bacterias en diversas etapas de degradación.

DISCUSION

El estudio de la *Tricomona vaginalis* con el microscopio electrónico demostró una serie de características previamente descritas en otros trabajos sobre este protozario (3,4,6,11,14) y sobre otras especies de tricomonas (5,9,10). A estos hallazgos podemos añadir algunas observaciones sobre la relación existente entre la tricomona y los elementos presentes en el medio vaginal y sobre la actividad de la enzima fosfatasa ácida en el citoplasma del parásito.

Hemos descrito en el citoplasma de la tricomona, estructuras redondeadas, revestidas por una membrana y en las cuales se evidenció la actividad de fosfatasa ácida. Es importante destacar que hasta el presente la función y el origen de estos organelos no se conoce. Algunos autores han denominado estas estructuras, gránulos cromáticos (11), gránulos mitocondriales o simplemente granulaciones periaxostilares (6). La posibilidad que estos gránulos sean mitocondrias ha sido discutida en varios trabajos sobre la ultraestructura de la tricomona (1,3,10), sosteniéndose también la hipótesis de que ellos estaban constituidos por grasa (3).

De acuerdo con nuestros hallazgos histoquímicos, los gránulos cromáticos pertenecerían al sistema lisosómico, junto con el aparato de Golgi, las vesículas que nacen de él y los fagolisosomas que contienen detritus celulares y bacterias; todas estas estructuras mostraron actividad de fosfatasa ácida. A pesar de que en base a los resultados descritos deben considerarse a los gránulos cromáticos como lisosomas, la actividad de fosfatasa ácida se encuentra limitada a la superficie interna de la membrana que los rodea y la apariencia uniforme de los gránulos recuerda la estructura de los peroxisomas; deben hacerse estudios más detallados sobre esta posibilidad, con el fin de aclarar la verdadera función de los gránulos citoplasmáticos de la *Tricomona vaginalis*.

Hemos llamado la atención sobre la asociación de las tricomonas entre ellas, contactando su citoplasma a través de múltiples invaginaciones y de cortos pseudópodos, e igualmente hemos demostrado cómo en forma parecida la tricomona se adhiere a la superficie de las células epiteliales. También hemos destacado la frecuente aparición de pseudópodos y la fagocitosis de fragmentos de las células epiteliales descamadas. Es indudable que la fosfatasa ácida y posiblemente otras enzimas hidrolíticas juegan un papel importante en la digestión de estos fragmentos celulares englobados por las tricomonas en vacuolas fagocíticas. Hasta el presente no

conocemos reportes de hallazgos similares a nivel ultraestructural en protozoarios de este género. Estudios con el microscopio electrónico sobre el *Trypanosoma cruzi* (12) presentan observaciones semejantes a las descritas por nosotros en la tricomona cuando se examina su actividad de fosfatasa ácida; estos hallazgos hacen comparables los mecanismos utilizados por el tripanosoma y por la tricomona para ejercer su acción patógena. Posiblemente la escasa información que se tiene sobre las bases morfológicas y funcionales de la manera de actuar la tricomona para producir lesiones tisulares, se debe a que los estudios se hacen con tricomonas cultivadas en medios artificiales.

Es probable que la movilidad rotativa y de traslación de las tricomonas ejerza cierta influencia irritativa sobre la superficie del epitelio planoestratificado de la vagina o del cuello uterino. Es sabido que la tricomona utiliza sus flagelos y membrana ondulante para desplazarse; probablemente su citoplasma también sufre contracciones y emite pseudópodos que juegan un papel importante en la relación entre el parásito y los elementos que lo rodean en el medio vaginal. Reportes recientes sobre la variación de la periodicidad en los anillos del rizoplasto en otros protozoarios (14) nos inducen a creer que tanto la costa como el aparato parabasal, intervienen en los fenómenos de contractibilidad y movilización del citoplasma de la tricomona. A pesar de estos factores, que influirán en la actividad motriz de la tricomona facilitando su asociación con las células epiteliales, consideramos muy factible que la acción patógena de este parásito sea provocada por la digestión celular utilizando las enzimas lisosómicas.

Las células epiteliales del exocervix y de la vagina son ricas en glicógeno (8). Hemos descrito en el citoplasma de la tricomona gránulos de glicógeno y creemos que éste representa una fuente de energía en el metabolismo del parásito. Nuestras observaciones corroboran la ausencia de mitocondrias en el citoplasma de la tricomona. Los mecanismos utilizados por el parásito en la adquisición del potencial energético necesario para desarrollar su intensa actividad motora y fagocítica, son todavía oscuros; sin embargo, no debe pasarse por alto el hecho de que la tricomona utiliza el glicógeno de las células epiteliales en una competencia con los bacilos de Doderlein y que del uso del mismo y de las condiciones de pH vaginal que se derivan de esta interacción entre los bacilos y los protozoarios, dependerá en gran parte la sobrevivencia de la tricomona.

Entre los elementos que se observaron en el examen del medio vaginal con el microscopio electrónico, llamaron la atención la abundante cantidad de macrófagos y leucocitos polimorfonucleares. También se observaron eosinófilos, células plasmáticas y algunos linfocitos. Se demostró actividad de fosfatasa ácida en los fagolisosomas y lisosomas de los macrófagos y leucocitos, especialmente cuando existía fagocitosis bacteriana. En algunos casos este fenómeno resultó muy intenso, con presencia de fenómenos de lisis celular.

El examen del medio vaginal con el microscopio electrónico, utilizando el raspado, toma dirigida y fijación inmediata en glutaraldehído, ofrece la ventaja de proporcionar una excelente fijación con preservación de las estructuras y especialmente permite el estudio de los elementos que se observan en un examen rutinario de citología vaginal, en su hábitat natural. Estudios más completos con aplicación de algunas técnicas histoquímicas, cultivando las tricomonas y experimentando con cultivos celulares, utilizando la microscopía electrónica, la centrifugación diferencial y demás auxiliares de la biología molecular, sin duda arrojarán más luz sobre el interesante problema de la patogénesis de las lesiones en la tricomoniasis vaginal.

Ultrastructural and histochemical studies on human vaginal trichomoniasis.

García-Tamayo, J. (Laboratorio de Microscopía Electrónica, Servicio de Patología, Hospital General del Sur, Maracaibo, Venezuela), Núñez-Montiel, JT and Prieto-García, H. *Invest Clin* 13 (1): 2-14, 1972. Samples of vaginal exudate from cases of trichomoniasis were taken by scratching the surface of the cervix and vaginal epithelium, fixed in glutaraldehyde and processed for electron microscopy.

Trichomona vaginalis show ultrastructural details which are compared with those described in previous papers. Acid phosphatase activity in the Golgi area, lysosomes and phagolysosomes was observed. The phagocytic activity of *Trichomona vaginalis* on bacteria and epithelial cell debris is also demonstrated. The significance of these findings regarding the role of *Trichomona vaginalis* in the pathogenesis of cervical and vaginal lesions are discussed.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- ANDERSON E, BEAMS HW: The cytology of trichomonas as revealed by electron microscopy. *J Morph* 104: 205-219, 1959.
- 2- FROST JK: Trichomonas vaginalis and cervical epithelial changes. *Ann New York Acad Sciences* 97: 792-799, 1962.
- 3- HASHIMOTO M, KOMORI A, KURAMASU I, YKAWAKASE N, NAMAMURA T: Electronmicroscopic study on the fine structure of Trichomonas vaginalis. *J Jap Obst Gynecol Soc* 11: 162-166, 1964.
- 4- HONIGBERG BM, KING VM: Structure of Trichomonas vaginalis. *Donné. J. Parasitol* 50: 345-365, 1964.

- 5- HONIGBERG BM, MATTERN CPT, DANIEL WA: Structure of Pentatrichomonas hominis (Davaine) as revealed by electron microscopy . J Protozool 15: 419-430, 1968.
- 6- JIROVEX O, PETRU M: Trichomona vaginalis, and trichomoniasis . Advanc in Parasitol 6: 117-188, 1968.
- 7- KOSS LG, WOLINSKA AW: Trichomonas vaginalis, cervicitis and its relationship to cervical cancer . Cancer 12: 1171-1193, 1959.
- 8- LUZARDO-BAPTISTA MJ, GARCIA-TAMAYO J, NUÑEZ-MONTEIL JT: Anatomía submicroscópica del exocérvix humano normal . Invest Clin N° 30: 23-56, 1969.
- 9- MATTERN CPT, HONIGBERG BM, DANIEL WA: The mastigont system of Trichomonas gallinae (Rivolta) as revealed by electron microscopy . J Protozool 14: 320-339, 1967.
- 10- MATTERN CPT, DANIEL WA, HONIGBERG BM: Structure of Hypotrichomonas acosta (Moskowitz) (Monocercomonadidae Trichomonadida) as revealed by electron microscopy . J Protozool 16: 668-685, 1969.
- 11- NIELSEN MH, LUDVIK J, NIELSEN R: On the structure of Trichomona vaginalis Donnè . J Microscopie 5: 229-250, 1966.
- 12- SANABRIA A: Ultrastructure of Tripanosoma cruzi in mouse brain . Exper Parasitol 23: 379-391, 1968.
- 13- SIMPSON PA, DINGLE AD: Variable periodicity in the rhizoplast of Naegleria flagelates . J Cell Biol 51: 323-328, 1971.
- 14- SMITH BF, STEWART BT: Fine structure of Trichomona vaginalis . Exper Parasitol 19: 52-63, 1967.
- 15- TRUSSELL RE, PLASS ED: The pathogenicity and physiology of pure cultures of Trichomona vaginalis . Amer J Obst Gynecol 40: 883-890, 1940.

Recibido: 25-4-72

Aceptado: 23-5-72