

# **Análisis por microscopía de luz de cepas ameboides y piriformes de *Trichomonas vaginalis***

**Fernando Anaya Velázquez\*, Lizayda N. Raya García<sup>1</sup> y Felipe Padilla Vaca**

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico de Villahermosa e IIBE, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato.

\*anayafe@quijote.ugto.mx

## Introducción

La tricomoniasis urogenital es causada en el ser humano por el protozooario *Trichomonas vaginalis*. Aunque se transmite por contacto sexual, no se ha descartado que se transmita raramente por fomites. El parásito se localiza en el tracto genital y urinario de la mujer o del hombre, en donde puede causar vaginitis o uretritis. La tricomoniasis es la enfermedad de transmisión sexual no viral más importante en el mundo. A nivel mundial, la tricomoniasis es una de las enfermedades de mayor morbilidad y se ha asociado su presencia a otros patógenos tales como el virus del VIH y el del papiloma humano. Las tricomonas pueden presentar forma piriforme, ameboide, esférica, elipsoidal, u ovoidal, asociándose la forma ameboide con la expresión de la virulencia del parásito. A nivel nacional, la tricomoniasis ha ocupado un lugar preponderante entre las primeras causas de morbilidad [1,2].

El diagnóstico de la tricomoniasis en la mujer se realiza por examen directo y en fresco de la secreción vaginal observada al microscopio, obtenida de los fondos del saco vaginal lateral y posterior. En el hombre, la infección usualmente es asintomática y el examen debe realizarse de la secreción obtenida por la mañana antes de la primera micción. La identificación y diagnóstico de las tricomonas se realiza usualmente por medio del análisis microscópico en campo claro, identificando las formas móviles del parásito. Una dificultad de tal análisis es que las formas poco móviles del parásito pasan inadvertidas. Sin embargo, cuando se observan muestras en las cuales el número de parásitos es escaso y el resultado parece negativo, se puede recurrir al cultivo en medios especiales. También es posible recurrir a técnicas inmunológicas, como la inmunofluorescencia o al PCR [1,2].

En cultivo axénico, la forma de *T. vaginalis* más frecuente es la piriforme, pero las tricomonas provenientes de otros aislados clínicos presentan parásitos con alta capacidad de adherencia al sustrato que son capaces de adquirir una apariencia ameboide cuando se cultivan in vitro o se ponen a interaccionar con células epiteliales [3]. El parásito mide de 7 a 23  $\mu\text{m}$  (promedio 13  $\mu\text{m}$ ) de longitud y transversalmente de 5 a 12  $\mu\text{m}$  (promedio 7  $\mu\text{m}$ ). Presenta cinco flagelos, cuatro de los cuales se localizan en la parte anterior. El quinto flagelo se extiende por el borde externo de la membrana ondulante del parásito. Los flagelos y la membrana ondulante dan al parásito la motilidad. *Trichomonas vaginalis* no posee mitocondrias, pero sí hidrogenosomas que se han observado alineados debajo de la membrana ondulante y a lo largo del axostilo.

El conocimiento de la morfología de los aislados clínicos y de las cepas establecidas de *T. vaginalis* en cultivo axénico es importante para relacionar estos datos morfológicos con las propiedades biológicas relacionadas con la virulencia, lo cual permite ampliar los conocimientos relacionados con la patogenicidad de las tricomonas [4].

## Objetivo

Analizar la morfología en fresco de los trofozoítos de varias cepas axénicas de *Trichomonas vaginalis*, por diferentes técnicas de microscopía de luz y en diferentes condiciones de experimentación.

## Metodología

Cepas de tricomonas. Se utilizaron varias cepas de *T. vaginalis* del banco de cepas del laboratorio de biología del parasitismo del Instituto de Investigación en Biología experimental de la Universidad de Guanajuato. Dichas cepas fueron aisladas por nosotros a partir de muestras de exudado vaginal de pacientes con vaginitis. Las cepas analizadas fueron: GT-1, GT-3, GT-6, GT-7, GT-8, GT-10, GT-11, GT-13, GT-13 PH3, GT-15, GT-20, GT-21 y GT-22, además de las cepas de referencia NIH Y RFC de ATCC. Las tricomonas fueron cultivadas axénicamente en el medio TYI-S-33 con suero bovino al 5% a 37 °C en tubos de borosilicato. Las células fueron cosechadas en fase logarítmica de crecimiento (24-48 horas). [5]

Preparación de las muestras. Para la observación en fresco se prepararon suspensiones celulares en medio de cultivo con el propósito de permitir la expresión de su morfología característica, en portaobjetos y cubreobjetos y se incubaron por 15 minutos a 37 grados °C, antes de ser observadas. Otras muestras se fijaron en glutaraldehído al 1% en PBS por una hora a temperatura ambiente y para observar los núcleos, el ADN de las células se tiñó específicamente con el fluorocromo Hoechst 33258 50 µM por 15 minutos. Adicionalmente, se observaron tricomonas después de varios días de ser sometidas a un proceso de criopreservación en nitrógeno líquido utilizando dimetilsulfóxido como crioprotector, para lo anterior las células recuperadas del criotubo a -196 °C se lavaron para eliminar el DMSO, se les adicionó medio fresco completo y se realizaron preparaciones en fresco como se describió anteriormente.

Observación de las muestras. Para examinar las muestras se observaron en un microscopio marca Zeiss modelo Axioskop 40\_FL con un objetivo de 40X, utilizando diferentes ópticas: campo claro, contraste de fases, contraste tipo Varel y fluorescencia (filtro UV) [6]. Después de hacer las observaciones generales se tomaron imágenes digitales con una cámara AxioCam MRC acoplada al microscopio y conectada a una computadora.

## Resultados

Campo claro. En la mayoría de las muestras se logró observar los flagelos, los núcleos y gran cantidad de vacuolas, así como el movimiento que presentan las tricomonas y sus flagelos, el cual varió según la cepa a la que correspondía, ya que algunas cepas son muy adherentes y no presentan movimiento notable.

Contraste de fases. Con esta modalidad de microscopía se lograron apreciar los flagelos y el axostilo, mejor que con el campo claro.

Contraste tipo Varel. Con el uso de esta técnica se favoreció la observación de las vacuolas y en parte los hidrogenosomas, más que con las otras modalidades de observación.

Fluorescencia. La tinción con el fluorocromo permitió la observación específica del DNA contenido en los núcleos, permitiendo ver así la forma nuclear y el número de núcleos por célula. El grado de tinción fue variable, por ejemplo los núcleos de la cepa NIH fueron bien teñidos, mientras que los de otras cepas se observaron con menos intensidad. Respecto al número de núcleos, todas las células en interfase mostraron un núcleo por célula y dos en células en proceso de división celular.

Observación de tricomonas criopreservadas. Estas observaciones sólo se realizaron en algunas cepas. Se advirtió que la morfología de las tricomonas viables se caracterizó por su birrefringencia y/o movimiento de flagelos o cuerpo celular, notándose en general el mismo patrón morfológico observado en las células en cultivo continuo.

#### Conclusiones

Las cepas de *T. vaginalis* son pleomórficas, mostrando algunas de ellas morfología piriforme y otras ameboide. Los datos sugieren la presencia de morfología característica en varias cepas de *T. vaginalis*, tanto en las que se mantienen en cultivo continuo como en aquellas que han sido criopreservadas previamente. Las cepas que muestran la morfología ameboide la expresan de manera reproducible en ausencia de células, mientras que otras cepas sólo muestran la morfología piriforme en las mismas condiciones.

#### Referencias

- [1] Sánchez, J. y Zavala J. Fundamentos de microbiología y parasitología médica. Méndez Editores, Segunda edición. México, 2003. pp. 524-526.
- [2] Ingraham J. e Ingil C. Microbiología. Editorial Reverté, segunda edición. España, 1998. pp. 609-610.
- [3] González-Robles A, Lázaro-Haller A, Espinosa-Cantellano M, Anaya-Velázquez F, Martínez-Palomo A. *Trichomonas vaginalis*: Ultrastructural bases of the cytopathic effect. J. Eukaryot. Microbiol. 42 (1995) 641-651.
- [4] Gonzalez-Robles A, Espinosa-Cantellano M, Arguello C, Anaya-Velazquez F, Lázaro-Haller A, Martinez-Palomo A. Surface properties and in vitro cytopathic effect of various strains of *Trichomonas vaginalis*. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 36 (2004) 77-83.
- [5] Padilla-Vaca F, Anaya-Velázquez F. Biochemical properties of a neuraminidase of *Trichomonas vaginalis*. J. Parasitol. 83 (1997)1001-1006.
- [6] Anaya Velázquez, L.F. Los microscopios en la biología. Secretaría de Educación Pública-Universidad de Guanajuato, 2001. pp. 13-26.