

OBSERVACIONES MICROSCÓPICO-ELECTRÓNICAS EN
TRICHOMONAS VAGINALIS DONNE 1.836

(NOTE ON THE ELECTRON-MICROSCOPICAL STRUCTURE OF
TRICHOMONAS VAGINALIS)

p o r

MANUEL BUSTOS RUIZ*

Introducción

El empleo del microscopio electrónico para el estudio de la ultraestructura de diferentes protozoos ha tenido gran importancia para establecer la presencia de algunos orgánulos celulares característicos de determinadas especies.

Todavía no se ha podido determinar la función de ciertas formaciones citoplasmáticas presentes en *Trichomonas* spp., como son la costa, las fibras parabasales, el axostilo y la lámina marginal, así como las relaciones íntimas que existen entre los distintos componentes del sistema cinetosómico. Llama poderosamente la atención comprobar cómo la mayoría de los orgánulos más importantes de los tricomonádidos se localizan e interconexionan en el tercio anterior del cuerpo celular, muy próximos al núcleo.

El presente trabajo es una aportación al estudio de ciertos detalles ultraestructurales de *Trichomonas vaginalis* (Protozoa: Mastigophora), y presta principal atención al sistema cinetosómico y microtubular de este flagelado.

El esclarecimiento de la constitución y disposición de los orgánulos característicos de esta especie puede contribuir a los estudios de las posibles líneas evolutivas dentro del género y al perfeccionamiento de su encuadramiento taxonómico.

* Universidad de Córdoba. Cátedra de biología. Sección de biología aplicada. Instituto de zootecnia. C. S. I. C. Facultad de veterinaria. Córdoba. (España).

Recibido para publicación el 2-4-76.

Revisión bibliográfica

Donné (1836) describió por primera vez la estructura microscópica de *T. vaginalis*. En este estudio sólo apreció las estructuras celulares que destacan por su prominencia al exterior: membrana ondulante, flagelos anteriores y tallo axostilar.

Desde entonces, la mayoría de los trabajos microscópicos son análogos y faltos de precisión en cuanto a estructura y localización de los orgánulos internos.

Los primeros en acometer el estudio de la ultraestructura fueron Inoki, Nakanishi y Nakabayashi (1959). Encontraron una estructura yuxtannuclear que no pudieron identificar. Las estriaciones transversas que observaron en las fibras las hacen similares a fibras de colágeno y desempeñan un importante papel en el movimiento del parásito.

Cavier, Georges y Savel (1965) hicieron la principal aportación al estudio citológico de *T. vaginalis*, mediante el empleo de digitonina como agente dispersante del citoplasma, puesto que el grosor de este protozoo hace difícil la observación microscópica en contraste de fases.

Yeh, Huang y Lien (1966) estudiaron en *T. vaginalis* la ultraestructura del sistema cinetosómico y de los gránulos densos, que identificaron con las mitocondrias.

Nielsen y Ludvik (1966) efectuaron otro estudio electromicroscópico de *T. vaginalis* y observaron cómo se producían internaciones citoplasmáticas del sistema flagelar y de la membrana ondulante, en tricomonádidos que se encontraban en división.

De los estudios más recientes sobre la composición enzimática de este protozoo, destacan los realizados por Brugerolle y Metenier (1971-1973). Investigan la actividad fosfatásica ácida a nivel de los gránulos densos y la localización intracelular de dos tipos de malato-deshidrogenasa. No consiguieron evidenciar ningún citocromo pero sí una flavoproteína-oxidasa.

Levine (1973) ha hecho revisión y puesta al día de los distintos aspectos bibliográficos referentes a patogenia y distribución de *T. vaginalis*. Aporta también algunos estudios ultraestructurales sobre este protozoo, pero dichos trabajos carecen de iconografía.

Material y métodos

Trichomonas vaginalis se aisló de la mucosa vaginal de varias pacientes afectadas de tricomoniasis, en la Residencia Sanitaria del Seguro de Enfermedad de Córdoba.

El aislamiento inicial se hizo en caldo Trichosel (B. B. L.), y el pH del medio se ajustó a 6, con ácido clorhídrico 0,1 N. A cada tubo, que contenía 9 ml. de caldo estéril y 0,5 ml de suero humano estéril e inactivado, se le añadió 0,1 ml de líquido procedente del lavado vaginal. En la mayoría de los casos también se añadía penicilina y estreptomycin, para evitar la contaminación bacteriana.

Los tubos se incubaron a 37° C, de 48 a 72 horas, al final de las cuales se hacían controles microscópicos en contraste de fases y objetivo de larga distancia, para comprobar si existía o no crecimiento.

A continuación los tricomonádidos se transferían al medio C.P.L.M. (Johnson y Trussell, 1943), modificado por supresión de agar y adición de 5 p. 100 de suero humano estéril e inactivado.

Después de 72 horas de cultivo a 37° C, los tubos de tricomonádidos se centrifugaron a 450-500 g, durante 10 minutos, se decantaron los sobrenadantes y las pellas se fijaron en glutaraldehído al 5 p. 100, en tampón fosfato (pH 7,3), según el procedimiento de Sabatini y colaboradores, a lo que siguió una posfijación en tetróxido de osmio al 1 p. 100, en el mismo tampón.

A continuación, las pellas se preincluían en agar al 3 p. 100, enfriando en un baño de hielo y deshidratando en la serie de acetonas.

La inclusión se hizo en Durcupán A. C. M. (araldita). Una vez obtenidas las cápsulas, los cortes, cuyo grosor oscilaba entre 40 y 50 nm, se obtuvieron con un ultramicrotomo L. K. B. III. El contraste se efectuó con acetato de uranio y citrato de plomo.

Las observaciones y electromicrofotografías se hicieron en un microscopio Philips, modelo 300, con placas Agfa Gevaert-Scientia, de 6,5 × 9 cm.

Resultados y discusión

Con contraste de fases e *in vivo*, sólo es posible diferenciar claramente la forma característica de este protozoo y los orgánulos que salen

al exterior, tales como los flagelos anteriores, el tallo axostilar y la membrana ondulante) Lámina I, fig. a).

A veces es posible la identificación de formaciones esféricas, irregularmente repartidas por el citoplasma, que hemos identificado como vacuolas (Lámina I, fig. b).

En el extremo anterior, más puntiagudo, se observa la presencia de los flagelos anteriores; y el posterior, más redondeado, se encuentra delimitado por el tallo axostilar. Todas estas características determinan la forma de pera de *T. vaginalis*.

A diferencia de lo que observan otros autores (Brugerolle y col., 1974, y Nielsen, 1966) la forma normal de este flagelado es la descrita por nosotros, si bien las formas irregulares, con las proyecciones citoplasmáticas que a veces aparecen (Cavier y col., 1965) son debidas, posiblemente, al envejecimiento de los cultivos.

La identificación de orgánulos citoplasmáticos, como costa, el cuerpo parabasal, el núcleo, las formas parabasales y los gránulos densos, sólo es posible en el organismo fijado y teñido.

Con el microscopio electrónico es posible determinar la disposición y estructura característica de los orgánulos de *T. vaginalis*.

En el extremo anterior se localiza el sistema cinetosómico y el origen de dos formaciones microtubulares: la pelta y el axostilo.

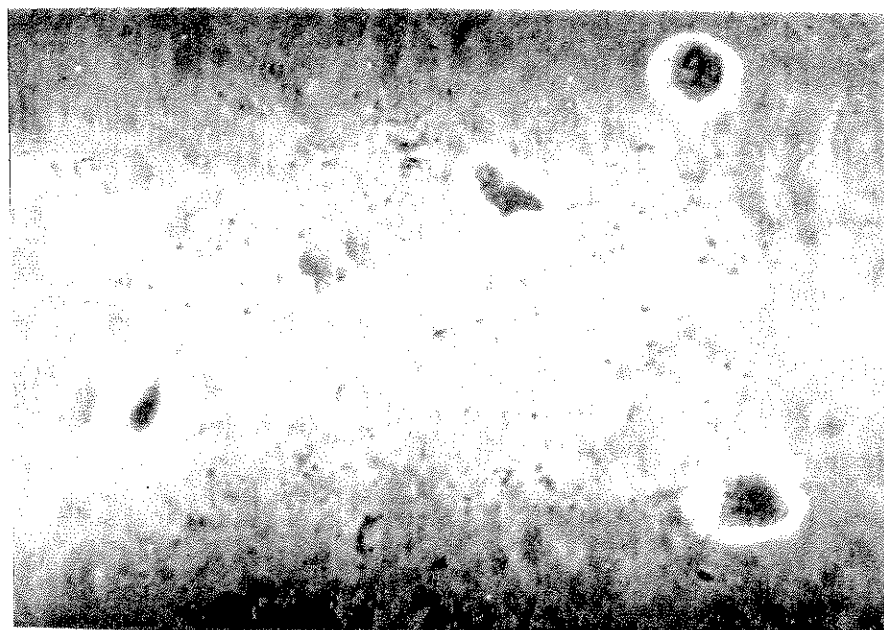
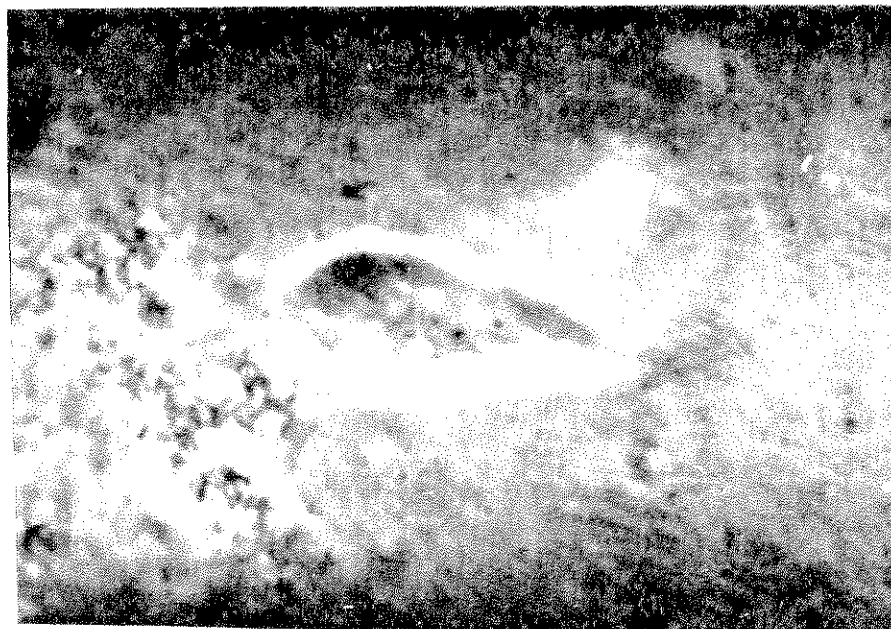
A partir de la mitad posterior del tricomonádido hay escasez de orgánulos celulares y sólo se aprecia el tronco axostilar, rodeado de gránulos densos endoaxostilares.

La cara dorsal se encuentra definida por la presencia de la membrana ondulante; y la cara ventral, por el capítulo axostilar y la unión pelta-axostilar.

En general, ésta es la orientación adoptada para la mayoría de los tricomonádidos, por los diversos autores (Brugerolle, 1971; Honigberg, 1963; Inoki y col., 1959, y Nielsen y col. 1966).

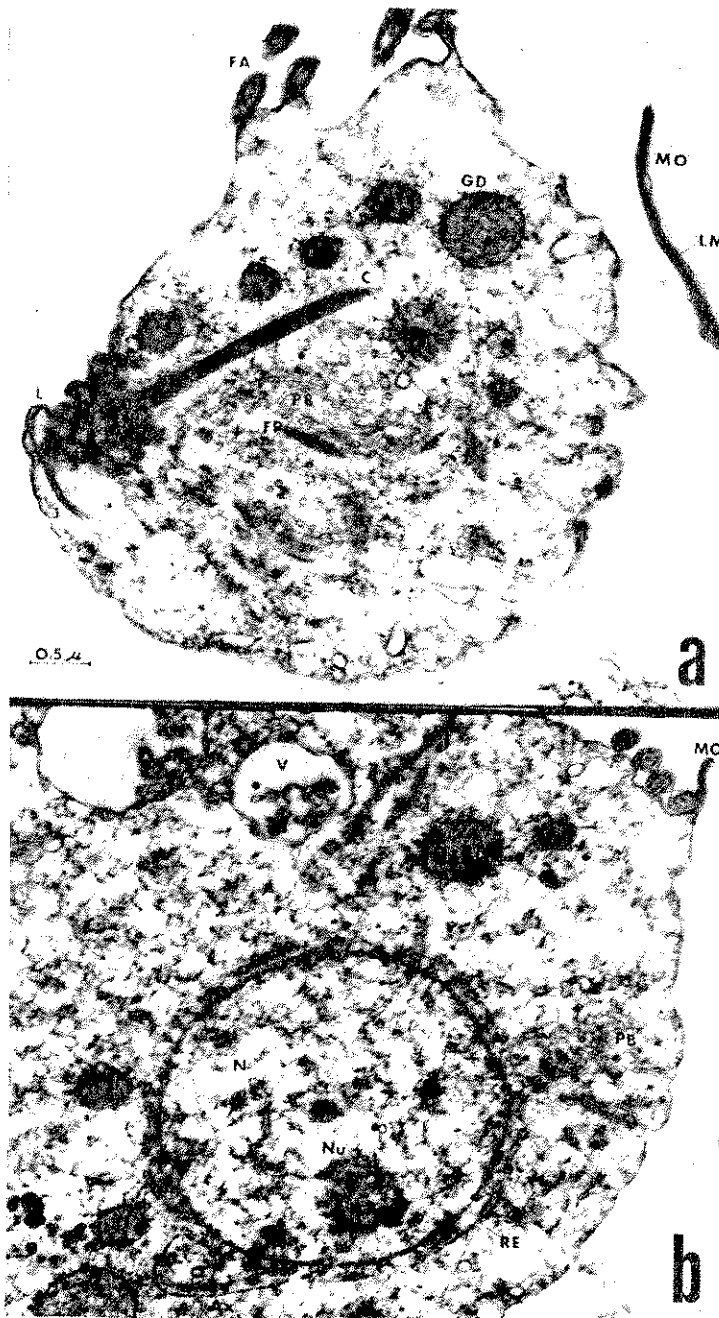
Pelta y axostilo. Ambos son unas formaciones microtubulares cuyo origen se encuentra en las proximidades del sistema cinetosómico. El diámetro de sus microtúbulos es de 20 nm, y están unidos por finas fibras que confieren a estas estructuras una disposición altamente regular (Lámina III, fig. d, flecha).

La pelta se origina en el extremo anterior más saliente del tricomonádido, que se denomina «labio», y a nivel del sistema cinetosómico se



LAMINA I. Figura a. Cultivo de *T. vaginalis*. Observación con contraste de fases e *in vivo*.
Nótese la forma característica, los flagelos anteriores y la membrana ondulante. x 400.

Figura b. Un organismo solo en el que se aprecian depresiones citoplasmáticas, posiblemente vacuolas, y otras estructuras prominentes difíciles de identificar. Contraste de fases obscuro.
x 100.



LAMINA II. Figura a. Corte transversal de *T. vaginalis*. Se observan tres cinetosomas de los flagelos anteriores y el cinetosoma del flagelo recurrente. La costa se presenta en sección longitudinal. La unión pelto-axostilar, próxima al sistema cinetosómico. x 29.857.

Figura b. Corte transversal a nivel del núcleo. El retículo endoplasmático es concéntrico al núcleo. Abajo, a la izquierda, tres de los flagelos anterior, el flagelo recurrente y la membrana ondulante. x 31.486.

superpone a los microtúbulos del axostilo constituyendo la unión pelto-axostilar (Lámina II, fig. a). A esta unión van a parar igualmente los filamentos sigmoideos, que tienen su común origen en el cinetosoma 3.º; y a este nivel se disocian en varios, aunque no hemos podido determinar su número (Lámina IV, fig. a).

Algunos autores (Brugerolle, 1971 y Pitelka, 1963) denominan a estos filamentos fibras preaxostilares; no obstante, creemos más acertada la primera denominación, pues su estructura corresponde más a la que muestran diversos filamentos que a estructuras microtubulares.

Las estructuras microtubulares de la pelta y del axostilo se abren en abanico, formando los respectivos «capítulos». El capítulo de la pelta se forma a nivel del sistema cinetosómico; y el del axostilo, a la altura del núcleo. (Lámina III, figs. a y b).

Sistema cinetosómico. Está constituido por cinco cinetosomas correspondientes a los cinco flagelos que posee *T. vaginalis*. Los cinetosomas de los cuatro flagelos anteriores son paralelos entre sí, y el quinto, que corresponde al cinetosoma del flagelo recurrente, se dispone perpendicularmente a los anteriores (Lámina III, fig. b). Asimismo, es el origen de algunas formaciones filamentosas y de otras estructuras que presentan periodicidad transversa, como son la costa y la fibra parabasal.

A nivel del cinetosoma 2.º se presentan unos filamentos con disposición radial muy similares a los encontrados por Mattern y col. (1967) en *T. gallinae*. (Lámina II, fig. a). También es posible observar estructuras filamentosas al nivel de los cinetosomas 1.º y 4.º.

Los cinetosomas miden 160 nm de largo por 90 de ancho.

Los flagelos salen al exterior por una abertura situada encima del sistema cinetosómico denominada «pozo flagelar» (Lámina III, fig. a).

No hemos podido identificar el origen de la lámina marginal en este sistema, si bien, de acuerdo con diferentes autores (Honigberg, 1968; Inoki y col., 1959; Levine, 1973 y Nielsen y col. 1966), el origen podría ser posiblemente alguna de las estructuras filamentosas anteriormente descritas.

Costa y fibra parabasal. Son filamentos característicos presentes en los tricomonádidos. Poseen estriación transversa similar y sólo se diferencian en el grosor y por la posición que ocupan en el citoplasma.

La costa tiene un grosor de 170 nm aproximadamente; se origina en las inmediaciones del cinetosoma del flagelo recurrente y forma con éste un ángulo de 45°.

El período de la estriación transversa lo origina dos bandas muy osmiófilas, de 10 nm de grosor, separadas entre sí por 35 nm; entre ambas aparece una banda más fina de 5 nm de espesor (Lámina V, fig. a).

A ciertos niveles la costa parece constituida sólo por bandas finas (Lámina V, fig. b).

Estudiadas las imágenes presentadas por otros autores (Brugerolle y col., 1974; Nielsen y col., 1966, y Yeh y col., 1966), en las que se aprecian fibras longitudinales como constituyentes de este orgánulo, creemos que la costa varía en su ultraestructura con arreglo al nivel de corte.

La fibra parabasal posee un grosor de 75 nm. Se origina en la base del cinetosoma 3.º y a nivel del núcleo se sitúa próxima al cuerpo parabasal (Lámina II, fig. a). Posiblemente, *T. vaginalis*, lo misma que *T. gallinae* (Rivolta), posee dos fibras parabasales, si bien no hemos podido determinar con precisión las características de esta segunda fibra (Lámina II, fig. a).

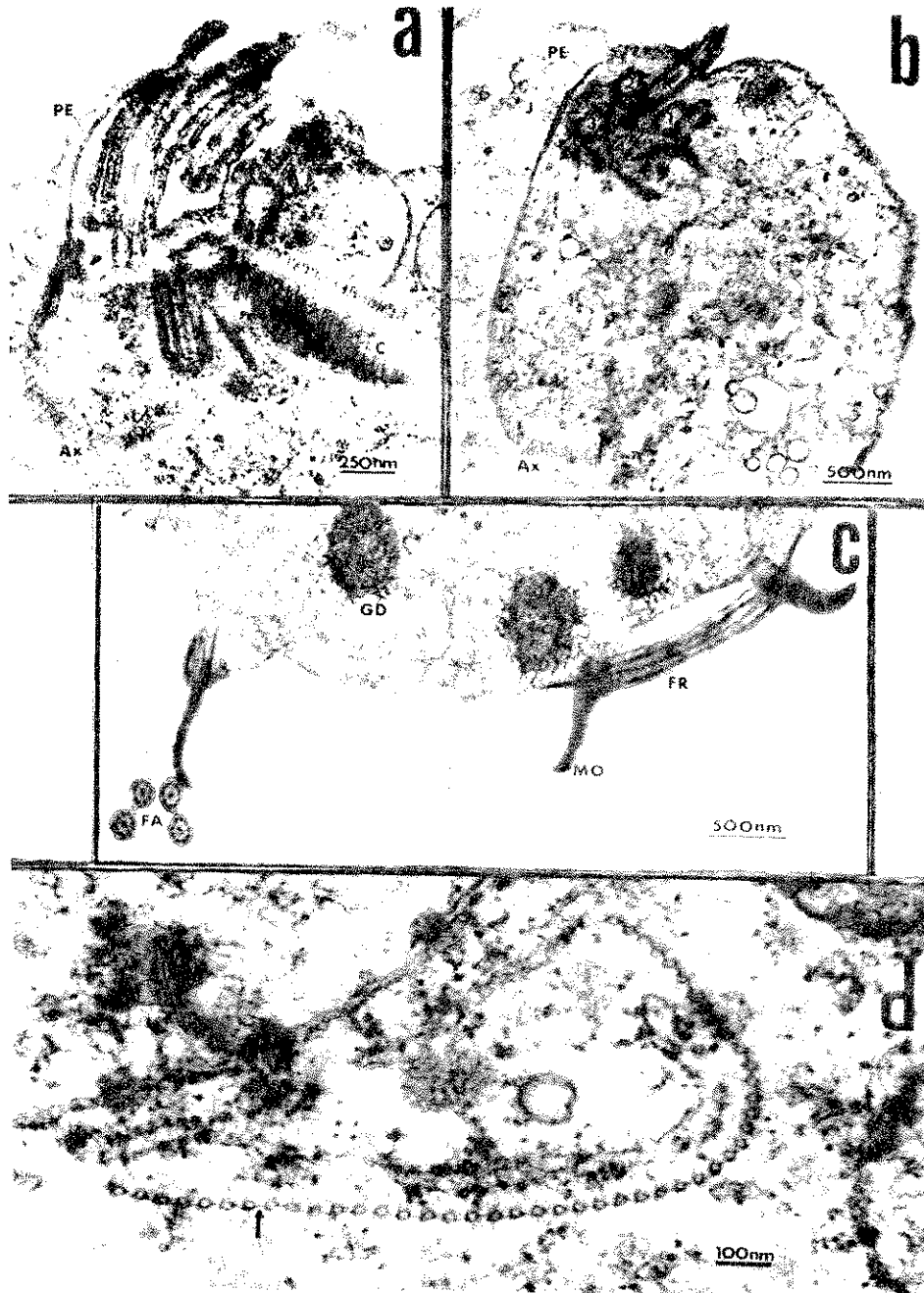
Membrana ondulante y flagelo recurrente. La membrana ondulante está formada por un pliegue dorsal del cuerpo del protozoo. Se origina en el pozo flagelar y se extiende hasta la mitad del cuerpo. Su grosor es de 100 nm, aproximadamente; no obstante, en su base, a nivel de la localización del flagelo recurrente, suele estrecharse.

En su interior se observa una formación muy osmiófila que se denomina «lámina marginal». Presenta estriación transversa similar a la de la costa, pero sin bandas finas (Lámina II, figs. a y b; lámina III, fig. c, y lámina IV, fig. c).

El flagelo recurrente acompaña en todo su recorrido a la membrana ondulante y una vez que desaparece esta formación el flagelo recurrente se independiza como flagelo libre.

La relación entre dichas estructuras es tan sólo de proximidad, pues en ningún caso hemos observado unión entre la membrana flagelar y la citoplasmática.

Núcleo, retículo endoplasmático y cuerpo parabasal. El núcleo se sitúa en la región anterior del protozoo, próximo al sistema cinetosómico.

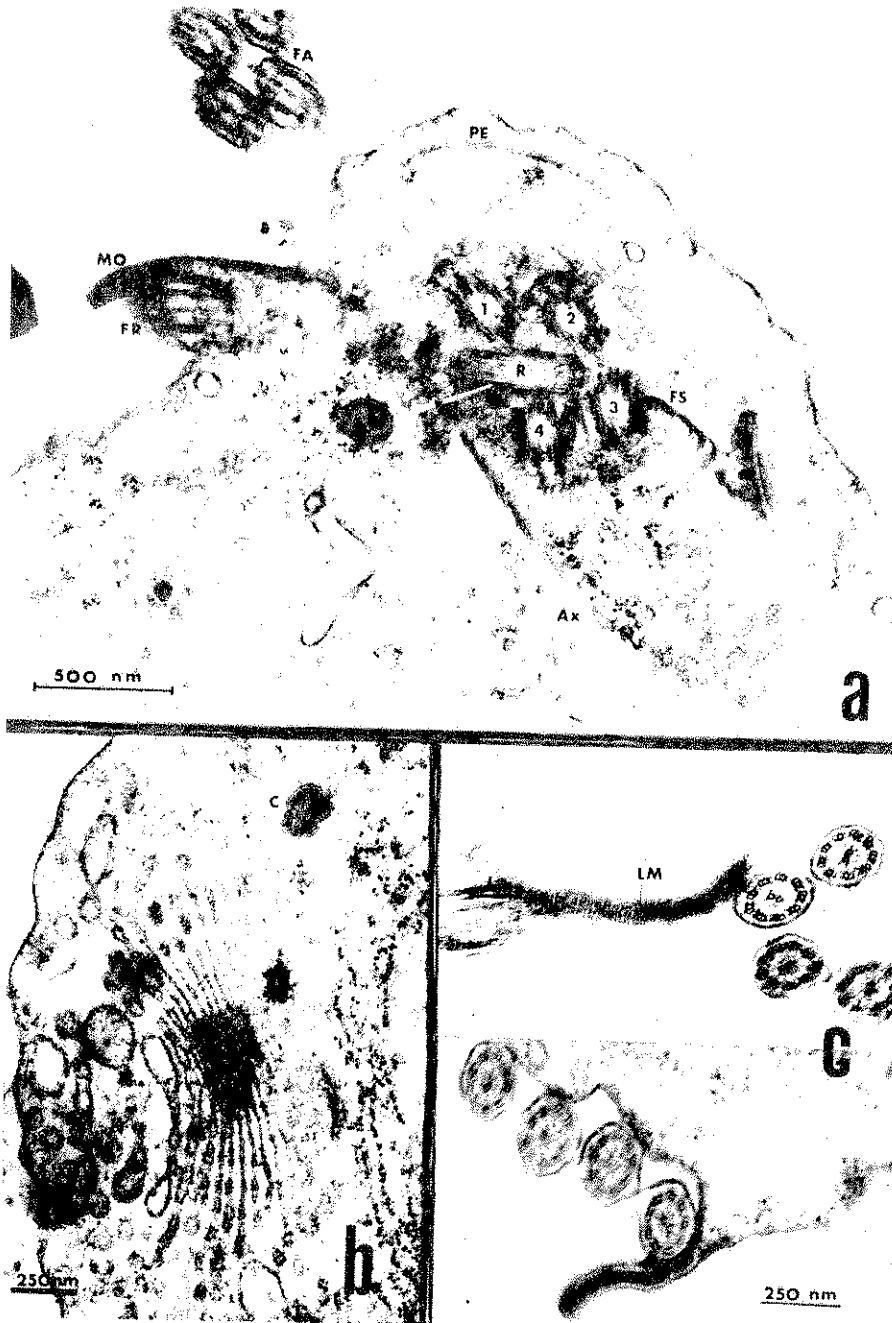


LAMINA III. Detalle del sistema cinetosómico. Figuras a y b. Pozos flagelares y origen de la costa y la fibra parabasal. x 50.667.

Nótese en la figura b la disposición característica de los cinetosomas, la unión pelto-axostilar y la constitución microtubular del axostilo. x 34.164.

Figuras c y d. Detalle de la membrana ondulante con estriación característica de la lámina marginal. x 37.206.

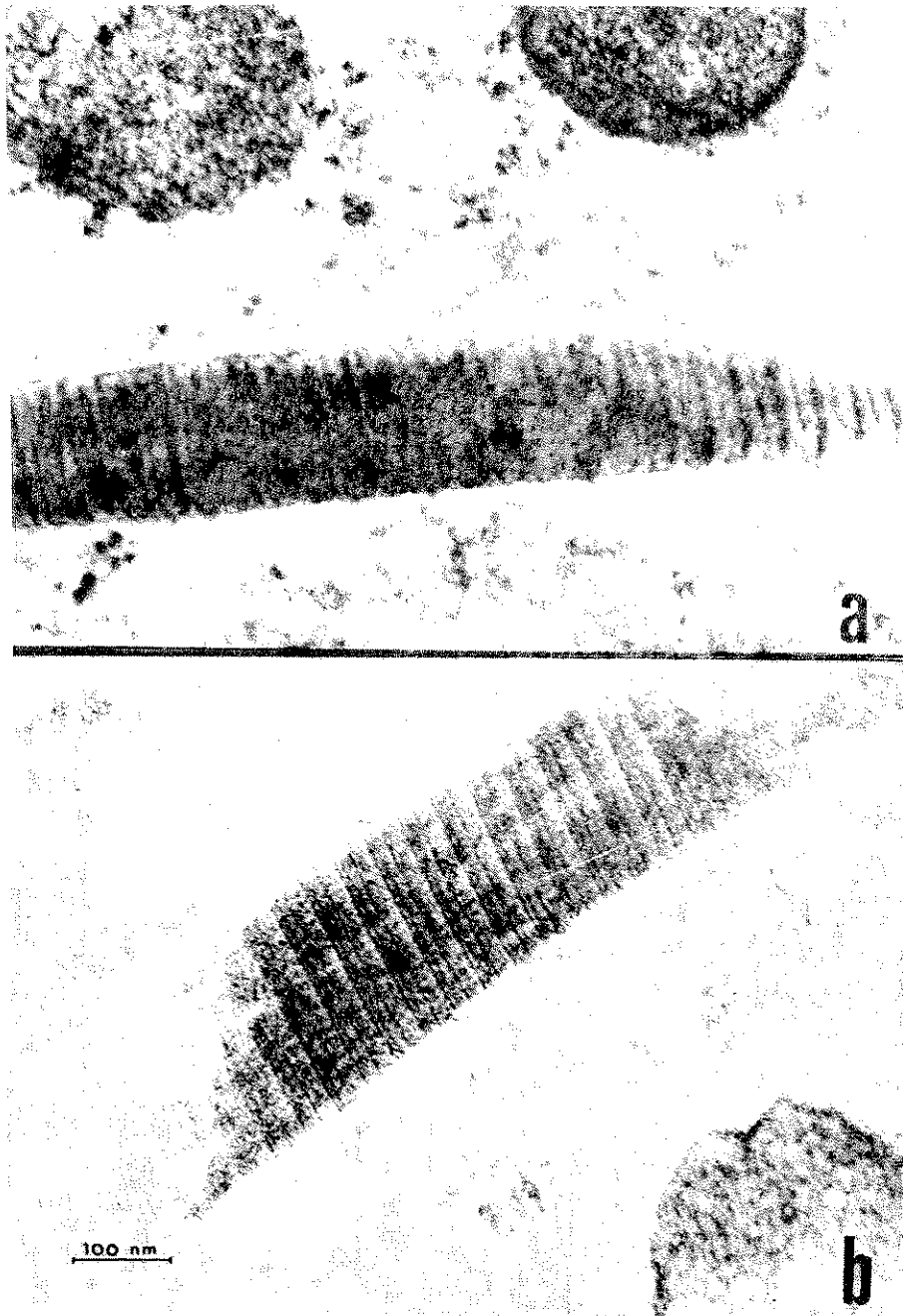
En la figura d se presenta un corte transversal del capítulo axostilar a nivel del núcleo. Nótese las conexiones de los microtubulos. x 128.386.



LAMINA IV. Figura a. Detalle del sistema cinetosómico. Se puede apreciar los filamentos sigmoideos a nivel del axostilo y el capítulo peltar encima de este sistema. x 66.228.

Figura b. Cuerpo parabasal con contenido osmiófilo. Se observa desprendimiento de vesículas golgianas en los extremos. x 63.062.

Figura c. Detalle de la lámina marginal de la membrana ondulante. Nótese la falta de unión entre las membranas del flagelo recurrente y la membrana ondulante. x 75.240.



LAMINA V. Figuras a y b.—Detalles de la costa en cortes longitudinales, nótese como se produce cambio en la estriación característica de este orgánulo.
Gránulos densos paracostales con contenido denso. Arriba a la izquierda se observa un gránulo en vías de lisis. x 228.905.

Tiene un diámetro de 2,6 micras, aproximadamente. Se encuentra envuelto por la doble membrana característica en la que no abundan los poros nucleares. En su interior se observa un nucleolo en el que predomina la parte granular sobre la fibrilar. No es rico en cromatina y ésta se distribuye de forma regular (Lámina II, fig. b).

El retículo endoplasmático se encuentra poco desarrollado en *T. vaginalis*, se sitúa formando una sola cisterna de tipo granuloso, concéntrica respecto al núcleo. A veces puede presentar proyecciones canaliculares hacia el cuerpo parabasal.

El cuerpo parabasal, que es la representación del complejo de Golgi en los tricomonádidos, se sitúa cerca del núcleo. Está constituido por sáculos aplanados de unos 18 nm de grosor, apilados unos sobre otros, que tienden a ensancharse hacia los extremos. A veces, en el interior de algunos de estos sáculos es posible observar un material muy denso a los electrones, que se desplaza a las vesículas desprendidas, por lo que algunos autores (Honigber, 1968; Inoki y col., 1959 y Nielsen y col., 1966) asignan a este orgánulo, entre otras, una función formadora de los gránulos densos (Lámina II, figs. a y b, y lámina IV, fig. b)

Gránulos densos y formaciones vacuolares. Los gránulos densos se pueden dividir en dos categorías: paracostales y endoaxostilares. La estructura es común y sólo se diferencian en cuanto a su proximidad o a la costa o al axostilo. Suelen tener forma esférica u ovoide y presentan una matriz muy densa y osmiófila rodeada por una membrana unitaria simple (Lámina II, figs. a y b, Lámina V, fig. a).

De acuerdo con varios autores (Brugerolle, 1971, 1972 y 1973) este tipo de orgánulo es similar a los lisomas, si bien en otros trabajos (Yeh y col. 1966) se apunta la posibilidad de que tengan función mitocondrial.

Las vaculas se encuentran distribuidas por el citoplasma de *T. vaginalis* y se acumulan varias más en la mitad posterior del organismo. El contenido es vario y no hemos encontrado formaciones vacuolares isofágicas.

Resumen

Hemos estudiado la ultraestructura de *T. vaginalis* aislados de pacientes humanos afectados de tricomoniasis. Posteriormente se mante

nían cultivos de este tricomonádido. Se hace principal referencia al sistema cinetosómico, la costa, el cuerpo parabasal y a la estructura microtubular del axostilo y la pelta. También se describe la constitución de la membrana ondulante y de los flagelos, como principales orgánulos de locomoción en este protozoo.

S u m m a r y

In the present research we have studied the fine structure of *T. vaginalis* isolated from patients with trichomoniasis. The protozoan was preserved by culture *in vitro*. The special reference is to the mastigont system, costa, parabasal body and the microtubular structure of axostyle and pelta. The undulating membrane and flagella are also studied.

A g r a d e c i m i e n t o

Agradecemos al profesor D. Juan García Martín la colaboración prestada en la obtención del material iconográfico.

B i b l i o g r a f í a

- Barrow, G. I. and C. Ellis, 1970.—Direct microscopical examination of tube cultures for the detection of trichomonads. *J. Clin. Path.*, 23: 90.
- Brugerolle, G. 1971.—Mise en évidence du processus d'endocytose et des structures lisosomique chez *Trichomonas vaginalis*. *R. D. Acad. Sc. Paris*. 272: 2558-2560.
- 1972.—Caracterisation ultrastructurale et cytochimique de deux types de granules cytoplasmiques chez les *Trichomonas*. *Prostitologica*, 8: 353-363.
- 1973.—Localisation intracellulaire et caracterization de deux types de malate dehydrogenase chez *Trichomonas vaginalis* Donné. 1.836. *J. Protozool*, 20: 320-327.
- Gobert, J. G. et J. Savel, 1974.—Etude ultrastructurale des lésions viscérales provoquées par l'injection intraperitonéale de *Trichomonas vaginalis* chez la souris. *Ann. Parasitol.*, 49: 301-318.

- Capet, R. G. 1968.—Amelioration des milieux de culture du *Trichomonas* en vue du diagnostic rapide. *Can. J. Pub. Heal.*, 59: 201-203.
- P. Payment, 1969.—Diagnostic staining of dry smears for *Trichomonas*. *Obst. Ginecol.*, 33: 564-568.
- Carneri, I., A. Emanuelli and I. Signorelli, 1968.—Efficiency of microscopic examination of fresh smears and cultures in diagnosis of *Trichomonas vaginalis*, Donné 1.836. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 40: 407-420.
- Cavier, R., P. Georges et J. Savel, 1965.—Contribution a l'étude cytologique de *Trichomonas vaginalis*, Donné 1.836. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 40: 407-420.
- Diamond, L. S. 1957.—The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *Parasitol.*, 43: 488-490.
- Gibbons, I. R. and A. V. Grimstone, 1969.—On flagellar structure in certain flagellates. *J. Biochem. Cytol.*, 7: 697-716.
- Honigberg, B. M., 1963.—Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. *J. Protozool.* 10: 20-63.
- 1968.—Some recent advances in our understanding of parasitic protozoa. *J. Protozool.*, 15: 223-230.
- Inoki, S., K. Nakanishi and T. Nakabayashi, 1959.—Observations on *Trichomonas vaginalis* by electron microscopy. *Biken's J.*, 2: 21-24.
- Levine, N. D. 1973.—Protozoan parasites of domestic animals and of man. Burgess Publishing Company, Minneapolis,
- Nielsen, M. H., J. Ludvik and R. Nielsen, 1966.—On the ultrastructure of *Trichomonas vaginalis* Donné. *J. Microscopic*, 5: 229-250.
- Pitelka, D. R., 1963.—Electron microscopic structure of protozoa. *Intern. Series Monogr. Pure and applied Biol.*, 13. Pergamon Press. Oxford.
- Sjostrand, F. S., 1967.—Electron microscopy of cells and tissues. Academic Press. London.

- Taylor, A. E. R., and J. R. Baker, 1968.—The cultivation of parasites in vitro. Blackwell Scientific Publications. Oxford and Edinburg.
- Yeh, Y., M. Y. Huang and W. N. Lien, 1966.—Fine estructura of *Trichomonas vaginalis* with special reference to the mastigont system and the structure of mitochondria. Chinese Med. J., 85: 375-390.

Abreviaturas empleadas

- 1, 2, 3, 4, y R = cinetosomas.
Ax = axostilo.
C = costa.
FA = flagelos anteriores.
FR = flagelo recurrente.
FS = filamentos sigmoideos.
F = raíces filamentosas asociadas a los cinetosomas correspondientes
FP = fibra parabasal.
GD = gránulos densos.
J = unión pelto-axostilar.
L = labio.
LM = lámina marginal.
MO = membrana ondulante.
N = núcleo.
Nu = nucleolo.
PB = cuerpo parabasal.
PE = pelta.
RE = retículo endoplasmático.
V = vacuola.