

1993

CODIGO: 084941646

# *Universidad de Guadalajara*

*Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias*  
*División de Ciencias Biológicas y Ambientales*  
*Biología*

---



**" FAGOCITOSIS Y DIGESTION DE  
TRICHOMONAS VAGINALIS POR  
DIFERENTES CEPAS DE ENTAMOEBAS "**

**T E S I S   P R O F E S I O N A L**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**

**LICENCIADO EN BIOLOGIA**

**P R E S E N T A**

**RODOLFO HERNANDEZ GUTIERREZ**

**GUADALAJARA, JALISCO OCTUBRE DE 1994**



1163/94

Centro Universitaria de Ciencias Biológicas y Agropecuarias  
División de Ciencias Biológicas y Ambientales  
Biología

C. RODOLFO HERNANDEZ GUTIERREZ  
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis "FAGOCITOSIS Y DIGESTION DE Trichomonas vaginalis POR DIFERENTES CEPAS DE Entamoeba" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha tesis el M.C. Juan Mora Galindo.

A T E N T A M E N T E  
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas Zapopan, Jal 5 de Octubre de 1994

EL DIRECTOR

DR.  ALFARO BUSTAMANTE

EL SECRETARIO

FACULTAD  
DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

  
BIOL. GUILLERMO BARBA CALVILLO

c.c.p.- M.C. Juan Mora Galindo, Director de Tesis.-pte.

c.c.p.- El expediente del alumno

- FAB/GBC/cglr.

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES  
HONORABLE CONSEJO

Dr. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE

Srío. ENCARGADO DEL DESPACHO DE LA DIRECCION DE LA  
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES.  
P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el pasante RODOLFO HERNANDEZ GUTIERREZ con el título "FAGOCITOSIS Y DIGESTION DE Tricomonas vaginalis POR DOS DIFERENTES ESPECIES Y CEPAS DE Entamoeba" consideramos que reúne los meritos necesarios para la impresion de la misma y la realización de los exámenes profesionales respectivos.

Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

A T E N T A M E N T E

Guadalajara, Jal. a 10 de OCTUBRE 1994

EL DIRECTOR DE LA TESIS

M. en C. Juan Mora Galindo

SINDICALES

- 1.- Dr. Alfonso Islas Rodriguez .....  
2.- Dr. Sergio Aguilar Benavides .....  
3.- Biol. Aurora Rosas Ramirez .....

A MIS PAPAS

Miguel y Ma. Elena que gracias  
a su amor, esfuerzo y sacrificio  
he llegado a cumplir esta meta.

A MIS ABUELITOS

Roberto y Antonia por la  
confianza que pusieron en mi.

A MIS HERMANOS

Por su gran cariño y apoyo.

A MIS TIOS

Por estar conmigo en los  
momentos más difíciles.

A JESUS Y ALEJANDRO

Por su incomparable amistad.

A CRISTINA

Por tí...

Para tí...

Con gratitud...

Con cariño...

Con AMOR.

Agradezco de una manera muy especial por su amistad, interés, apoyo y confianza al M. en C. Juan Mora Galindo.

A Alejandra García Zapién por su ayuda, apoyo y amistad.

A Susanita por sus enseñanzas y amistad.

A Magie por su amistad y colaboración en la realización de este trabajo.

Este trabajo se realizó en  
la Sección de Biología Celular  
de la División de Biología del Desarrollo,  
Centro de Investigación Biomédica de Occidente.  
Instituto Mexicano del Seguro Social.

Bajo la dirección del  
M. en C. Juan Mora Galindo  
y la asesoría de la  
Q. F. B. Alejandra García Zapién.

T I T U L O :

Fagocitosis y digestion de Tricomonas vaginalis por  
dos diferentes especies y cepas de Entamoeba.

## RESUMEN

Los trofozoítos de E. histolytica fagocitan gran variedad de células, tanto in vivo como in vitro y se ha demostrado su habilidad para fagocitar otros protozoarios.

Nuestro objetivo fue determinar si E. histolytica y E. invadens son capaces de fagocitar Tricomonas vaginalis y establecer si existen diferencias en la habilidad de ingestión y digestión de las células blanco entre diferentes cepas amebianas. Se utilizaron trofozoítos de T. vaginalis de la cepa GT-1 y de las cepas de HK9 y HM1 de E. histolytica; las cepas de amibas se caracterizan por tener diferente virulencia, y fueron cultivados en BI-S-33 a 37°C. Se usaron además amibas de Entamoeba invadens cepa IP-1 cultivados en mismo medio a 26°C. Para los ensayos de fagocitosis se mezclaron suspensiones de tricomonas con las amibas en proporción de 5:1 y se incubaron durante 15, 30 y 60 min; para evaluar la digestión las proporciones fueron de 1:1 y los tiempos de incubación de 1.5, 3, 4.5 y 6 h posfagocitosis, los ensayos se realizaron a la temperatura óptima de cada especie de amiba. Para inhibir la fagocitosis las muestras se incubaron en un baño de hielo-agua y se realizaron preparaciones en fresco para determinar el porcentaje de amibas fagocíticas y el número promedio de tricomonas fagocitadas, en cien células amebianas de cuando menos tres experimentos por triplicado. El análisis estadístico

se realizó mediante análisis de varianza y la t de Student para determinar si existen diferencias entre cepas y la vida media de las tricomonas se calculó mediante regresión lineal. Las tres cepas amebianas fueron capaces de fagocitar T. vaginalis y se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos cepas de E. histolytica a los 15 min de interacción. Entre E. histolytica y E. invadens esta diferencia fue más evidente, en los ensayos de digestión no se observaron diferencias significativas entre las cepas de E. histolytica. Al ser fagocitadas las tricomonas mostraban gran movilidad en el interior de las vacuolas amebianas, característica que disminuyó paulatinamente, posterior a esta pérdida de movilidad se observó la degradación progresiva de las tricomonas hasta desaparecer por completo después de las seis horas de digestión. La vida media promedio de las tricomonas fue de 3 h en ambas cepas de E. histolytica.

## I N D I C E

INTRODUCCION.....	1
JUSTIFICACION.....	3
ANTECEDENTES.....	4
HIPOTESIS.....	16
OBJETIVOS.....	17
MATERIALES Y METODOS.....	18
RESULTADOS.....	24
DISCUSIONES.....	42
CONCLUSIONES .....	50
BIBLIOGRAFIA.....	52

# INTRODUCCION

## INTRODUCCION

Entamoeba histolytica es un protozooario parásito del humano descubierta por Lesh en 1875 y denominada así por Schaudinn en 1903, esta amiba puede habitar en forma de comensal en el intestino del hombre o bien bajo ciertas circunstancias puede cambiar su comportamiento y causar enfermedad, incluso la muerte. Las características de las amibas que han sido relacionadas con la patogenicidad son: a) susceptibilidad a aglutinar con concanavalina A, b) cargas de superficie, c) Adhesión a células epiteliales, d) capacidad de producir efectos líticos en células cultivadas, e) Fagocitosis y f) producción de colagenasa y otras enzimas. La fagocitosis es una de las propiedades que ha sido ampliamente estudiada y se ha determinado que los trofozoítos de diferentes cepas de E. histolytica pueden fagocitar eritrocitos humanos, tanto in vivo como in vitro y que esta actividad es mayor en cepas con alta virulencia que en cepas de virulencia atenuada. E. invadens, amiba parásita de reptiles también posee la habilidad de fagocitar eritrocitos de mamifero. La capacidad fagocítica de Entamoeba no se limita solo a eritrocitos sino que va más allá, pues se ha observado en diferentes estudios, fagocitosis de granulos de almidon, bacterias, esferas de latex y protozoarios. Así mismo, se ha reportado la presencia de enzimas líticas que pudieran estar involucradas en el proceso de digestión. Este último proceso, sin embargo, ha sido poco estudiado.

Las investigaciones realizadas para conocer el proceso de fagocitosis han sido realizadas con partículas inertes, o bien con células inmóviles. A pesar de que en la literatura existe un reporte de fagocitosis de Leishmania mexicana por Entamoeba histolytica, se desconoce si la fagocitosis de células móviles (por ejemplo tricomonas) por Entamoeba depende de la virulencia de la cepa amibiana; además no se sabe si el número promedio de células móviles fagocitadas por cada trofozoíto amibiano es similar o diferente a lo que sucede con eritrocitos. En cuanto a la cinética de digestión, únicamente se ha analizado la relacionada con eritrocitos. En el presente trabajo estudiamos la actividad fagocítica in vitro de trofozoítos de E. histolytica y de E. invadens, mediante el uso de Trichomonas vaginales como célula blanco; así mismo se evalúa la actividad digestiva en las amibas después del pulso determinado de trofozoítos de T. vaginalis.

## JUSTIFICACION

### JUSTIFICACION:

Los diferentes estudios sobre la fagocitosis por Entamoeba se han realizado con material particulado inerte y/o con células inmóviles y se ha determinado su capacidad de fagocitarlas y digerirlas, pero no se ha determinado si estas actividades amebianas se efectúan con células que poseen gran movilidad como es el caso de Trichomonas vaginalis.

## ANTECEDENTES

## ANTECEDENTES

Entre los organismos clasificados como protozoarios, existen diferentes especies de amibas del género Entamoeba; las especies que han sido más estudiadas son E. histolytica y E. invadens. La primera por ser una amiba parásita del hombre la cual fue descubierta por Lesh en 1875 y nombrada así por Schaudinn en 1903. E. invadens (Rodhain, 1934) es una amiba parásita de reptiles, y la importancia para su estudio radica principalmente en la gran similitud que presenta en su ciclo vital con el de Entamoeba histolytica y porque se ha logrado enquistar masivamente en cultivos axénicos. Ambas especies presentan una fase móvil llamada trofozoíto, el cual es una célula altamente dinámica y pleomórfica y otra fase inmóvil e infectante denominada quíste, este último es la forma de resistencia del parásito.

La infección por Entamoeba histolytica puede ser asintomática o sintomática, cuando se presenta esta última puede causar enfermedad severa e incluso la muerte. Lo anterior puede depender de factores relacionados con el parásito o con el huésped o ambos. Los trofozoítos 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, además se pueden observar

pseudopodos de diversos tamaños, abundantes filopodios de diferente longitud y protusiones esferoidales lisas, la mayor parte de su superficie 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 de 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 trofozoítos cultivados axénica y monoaxénicamente. 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 aparece como una región de material fibrogranular de baja densidad a los electrones.

Estudios con microscopía electrónica han revelado que los trofozoítos 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 esta ocupado por vesículas y vacuolas de tamaño muy variable que va desde 0.5 a 9  $\mu\text{m}$  de diámetro, las cuales estan limitadas de membrana derivada de regiones internalizadas por micro y macropinocitosis, así como por fagocitosis, 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 primarios, e) lisosomas secundarios, f) cuerpos residuales y g) vacuolas autofágicas, los primeros tipos probablemente representan algún fenómeno de endocitosis (Martínez-Palomo 1982).

Las enzimas se encuentran en forma soluble en los lisosomas típicos; en el caso de las vacuolas de E. histolytica, mediante ensayos de aislamiento y posteriormente análisis citoquímicos y bioquímicos de porciones de membrana, indican que la fosfatasa ácida no se encuentra en forma soluble, sino que constituye parte integral de la membrana 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 trofozoítos también contienen actividad de fosfatasa ácida.

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).

Aunque E. histolytica carece de un retículo endoplásmico y complejo de Golgi, se ha notado la presencia de un retículo membranoso compuesto de finos tubulos; este sistema puede ser

interpretado como contraparte del típico retículo endoplasmico liso; cuando esta presente se encuentra formado por tubulos de aproximadamente 20 nm de diámetro.

Ciertos productos amibianos son liberados por los trofozoítos, 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. Por otra parte se ha reportado la presencia de proteasas en membrana. La membrana plasmática de E. histolytica y la cubierta celular es más gruesa (aproximadamente 10 nm de espesor) que los componentes correspondientes de los globulos rojos de mamíferos y presenta la clásica unidad de membrana de las membranas biológicas, esta membrana esta 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 trofozoítos activos, se determinó la existencia de endocitosis y exocitosis, E. histolytica presenta además la capacidad para 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 es generalmente poco notable cuando las amibas son estudiadas con microscopía óptica de campo claro, pero es notorio cuando son observadas al microscopio de contraste de fases o microscopía de interferencia de Normasky, el núcleo mide entre 4 y 7  $\mu\text{m}$  de diámetro. La membrana nuclear esta resaltada por una capa delgada y uniforme de granulos cromatínicos, los cuales le dan al núcleo la apariencia de un anillo. Cuando se examinan trofozoítos vivos, se observa que el núcleo no esta fijo en un sitio del citoplasma, pues se mueve en forma libre y algunas veces rota rapidamente.

#### CICLO VITAL DE ENTAMOEBAS.

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 Dobell 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 parasito comprende 4 etapas consecutivas, 1) trofozoíto, 2) prequiste, 3) quiste y 4) amiba metaquistica. Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria, en el estado avanzado de la división celular se forma una estructura filiforme entre las células que se estan 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 tambien dividirse en tres, las células hijas pueden tener el mismo tamaño o ser unas más grandes que las otras hasta 3 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 despues de dos divisiones de un quiste uninucleado. En el desenquistamiento, una amiba metaquistica tetranucleada emerge de cada quiste y produce 8 amibas uninucleadas despues de su división (Martínez-Palomo 1982).

#### VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD.

Una de las principales incognitas acerca de la biología de E. histolytica radica en los factores que determinan la virulencia del parásito y de los factores que determinan que cambie su comportamiento de forma comensal a forma invasiva. El termino 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 del protozoario (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 plásmatica y que resulta en la ruptura de la célula y la subsecuente lisis celular (Martínez-Palomo, 1985). Por otra parte se ha demostrado que sonicados de E. invadens y E. histolytica contienen compuestos tóxicos para células de mamífero así como para eritrocitos de hamster y ratón (López-Revilla y Said-Fernández, 1980).

#### FAGOCITOSIS.

La actividad fagocítica se ha analizado mediante el uso de globulos rojos como células blanco, la fagocitosis de Entamoeba se ha relacionado con la nutrición del microorganismo y con la virulencia del mismo. Se ha encontrado que la fagocitosis en E. histolytica es mayor en cepas que son altamente virulentas, que en cepas que no lo son (Trissl y col. 1978; Martínez-Palomo y col. 1980; Orozco y col. 1982a; Orozco y col. 1983). Pero se ha encontrado que los trofozoítos tanto de E. histolytica, como de otras especies de Entamoeba fagocitan diversos materiales particulados, como granos de almidón, células inflamatorias (Griffin, 1972), bacterias, esferas de latex (Orozco y col. 1983), protozoarios (Anaya-Velázquez, 1983; Martínez-Palomo y col. 1985).

E. histolytica y E. invadens contienen enzimas hidrolíticas las cuales conforman su sistema degradativo, estas enzimas se pueden encontrar unidas a las membranas de las vacuolas o en forma soluble.

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. Se han identificado además diversas actividades enzimáticas en ambas especies de amibas, se detectó una ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  sobre la membrana plasmática y en la superficie interna de la mayoría de las vacuolas, además se identificó una ADPasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ , timino pirofosfatasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  y fosfatasa ácida en el interior de las vacuolas (Kobayashi y col 1982). La velocidad digestiva de las especies y cepas de Entamoeba puede ser dependiente de la existencia o ausencia de enzimas degradativas en los trofozoítos, así como de la naturaleza del material fagocitado.

En Entamoeba invadens una amiba parásita de reptiles también se ha reportado fagocitosis de granos de almidón (Zaman 1962), de eritrocitos de carnero (Zaman, 1970) y humanos (Trissl y col. 1978) además se ha demostrado la capacidad de esta amiba para digerir trofozoítos humanos in vitro (Ramírez-Córdoba y col. 1990), proceso también descrito para E. histolytica (Mora-Galindo y Anaya-Velázquez, 1993).

Trichomonas vaginalis es un protozoario flagelado descubierto por Donné en 1836, parásito causante de tricomoniasis infección del aparato urogenital femenino principalmente, y clasificada como enfermedad sexualmente transmisible. Este protozoario presenta formas variables como organismo vivo y en preparaciones teñidas y fijadas, por lo tanto se ha establecido

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 y tamaño de las tricomonas varían de acuerdo con su origen, en general las células mantenidas en cultivos presentan una forma más uniforme, ovoide o periforme, que las observadas en secreciones vaginales u orina. Se ha visto que la forma de este flagelado depende también 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 de las tricomonas tienden a ser irregulares, su membrana ondulante y la costa son grandes en relación con la longitud del cuerpo 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 individuos los flagelos parecen estar organizados en dos grupos, en donde cada grupo contiene dos flagelos, el flagelo anterior más largo puede medir hasta  $12.5 \mu\text{m}$  en promedio. La membrana ondulante y la costa se originan del cinetosoma un poco posterior a los flagelos y en el dorso del cuerpo de la tricomona, la membrana es típicamente más corta que el cuerpo y relativamente baja. El margen externo libre de la membrana consiste de el filamento accesorio y un flagelo recurrente unido, el cual no continúa

más alla 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 adelgazando cada vez más, la proyección axostilar mide en promedio  $4.9 \mu\text{m}$  de longitud. Uno de los aspectos más notables de Tricomonas vaginalis es el arreglo de los denominados granulos paraxostilares, los cuales aparecen en tres hileras paralelas al axostilo, más del doble de estos granulos 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 Tricomonas vaginalis y la importancia de las características que presenta en la invasión del tejido del huésped, como pueden ser la presencia de proteínas de membrana que le permiten el reconocimiento y adhesión a proteínas de la matriz extracelular, como la laminina y la fibronectina 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, capacidades también demostradas con eritrocitos humanos, mecanismo que se propone es utilizado por las tricomonas para la obtención de lípidos y hierro (Lehker y col.

1990); por consiguiente también se ha reportado que presentan actividades beta-hemolíticas que están relacionadas 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 pero la cual también es dependiente de la adherencia entre ambos tipos celulares (Potamianos y col. 1992). Se ha propuesto que los efectos citopáticos de Trichomonas vaginalis puedan depender o estar mediados por lectinas (Roussel y col. 1991). El descubrimiento de dos fosfohidrolasas intracelulares; la fosfatasa ácida y la nucleosido trifosfatasa, cuyas actividades se encuentran principalmente en los saculos del complejo de Golgi, aunque ambas enzimas se han encontrado en los fagolisosomas, lo cual indica que ambas enzimas son activas en los procesos hidrolíticos asociados con la endocitosis y degradación de material extraño (Nielsen, 1974).

POSICION TAXONOMICA  
DE

Entamoeba histolytica      Trichomonas vaginalis  
Entamoeba invadens

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

(Levine y col. 1980)

HIPOTESIS

#### HIPOTESIS :

La capacidad fagocítica de Entamoeba es tan amplia y eficaz que le permite fagocitar células que se desplazan activamente en cultivo como es el caso de Trichomonas vaginalis, posteriormente las tricomonas son digeridas.

## OBJETIVOS

## O B J E T I V O S :

### Objetivo General;

Evaluar si E. histolytica y E. invadens tienen la capacidad de fagocitar y digerir trofozoítos de T. vaginalis.

### Objetivos particulares;

-- Determinar el número de trofozoítos de T. vaginalis fagocitados por los trofozoítos de E. histolytica y E. invadens en diferentes tiempos.

-- Determinar si existen variaciones de la actividad fagocítica entre cepas de E. histolytica con diferente virulencia.

-- Determinar si existen diferencias en la capacidad de fagocitar tricomonas entre E. histolytica y E. invadens

-- Determinar si existen diferencias en la capacidad para digerir T. vaginalis entre dos cepas de E. histolytica con diferente virulencia.

MATERIALES

Y

METODOS

## MATERIALES Y METODOS

### CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se utilizaron trofozoítos de Entamoeba histolytica de la cepa HM1:IMSS donada por el Dr. Victor Tsutsumi (CINVESTAV del IPN) y probada su elevada virulencia por su capacidad para producir absceso hepático en Hamsters y la cepa HK9:NIH, 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 13x100 mm con tapón de rosca y cosechados en fase logarítmica de crecimiento. Se usaron además trofozoítos de Entamoeba invadens de la cepa IP-1 aislada originalmente en 1952 de una vibora Natrix cyclopion en el Institute of Parasitology, McGill University, Quebec, Canada. cultivados en la misma forma a los anteriores e incubados a 26°C.

Los trofozoítos de Trichomonas vaginalis utilizados fueron de la cepa GT-1, obtenidos de una paciente de tricomoniasis por el Dr. Fernando Anaya Velázquez (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 13x100 mm con tapón de rosca y fueron cosechados en fase logarítmica de crecimiento.

### CUANTIFICACION DE TROFOZOITOS

Para determinar el número de trofozoítos de E. histolytica, éstos fueron cuantificados en cámaras de Neubauer para lo cual los tubos de cultivos se colocaron en baño de hielo-agua durante 5 min y se agitaron por inversión continua para desprender los trofozoítos de la pared y tener una suspensión homogénea. El mismo procedimiento se realizó para la cuantificación de los trofozoítos de E. invadens.

En virtud de la gran movilidad de los trofozoítos de I. vaginalis el número de ellos se determinó previa dilución del cultivo con formol al 4% en amortiguador de fosfatos 0.1M en proporción 1:1, lo anterior para inmovilizarlos y facilitar su conteo. Una vez determinada la densidad celular de los cultivos, se prepararon suspensiones de ellos para tener una proporción de 5 tricomonas por cada trofozoíto amibiano.

### FAGOCITOSIS

Para determinar si E. histolytica es capaz de fagocitar trofozoítos de tricomonas a temperatura ambiente los cultivos de amibas se enfriaron 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 dejaron a temperatura ambiente durante 30, 60 y 90 min, en cada período de tiempo se revisaron muestras en preparaciones en fresco y al azar se contabilizaron 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 éstos fueron incubados a 37°C durante 45 min, al término de los cuales se procedió a determinar la actividad fagocítica de las amibas, se encontró un 67% de amibas fagocíticas y en promedio 1.45 tricomonas/amiba. Lo anterior nos permite establecer que E. histolytica es incapaz de fagocitar tricomonas a temperatura ambiente.

Una vez que se determinó la densidad celular y se prepararon las suspensiones de ambos protozoarios para los experimentos, cada uno de ellos se lavaron por separado, para eliminar posibles componentes tóxicos del medio usado. Para ello, los cultivos se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante, ambas pastillas de células se resuspendieron nuevamente en 1 ml de medio nuevo, estas suspensiones contenían  $7.5 \times 10^6$  de tricomonas y  $1.5 \times 10^6$  amibas cada tubo, se agitaron y centrifugaron de la forma antes señalada, se descartó el sobrenadante y para el caso de los cultivos amibianos la pastilla se resuspendió en 600  $\mu$ l de medio, se agitó y se tomaron 3 alícuotas de 200  $\mu$ l cada una, para cada cepa amibiana. Los trofozoítos de Trichomonas vaginalis se resuspendieron en 300  $\mu$ l de medio.

Una vez lavadas y en medio nuevo las alícuotas se incubaron a 37°C ó 26°C, según la especie de amibas usada, durante 15 min para que recuperaran la movilidad y se adherieran a las paredes del tubo; una vez estabilizadas las

amibas se le agregaron a cada alicuota 100  $\mu$ l de la suspensión de tricomonas y se incubaron durante 15, 30 y 60 min para E. histolytica y 60, 90 y 120 min para E. invadens a la temperatura correspondiente.

Para detener el proceso de fagocitosis, una vez terminado el tiempo de interacción las alicuotas se incubaron en baño de hielo-agua; inmediatamente se elaboraron preparaciones para examinarlas en el microscopio de contraste de fases y determinar el número de tricomonas fagocitadas/amiba y el porcentaje de amibas fagocíticas.

#### CONTEO DE CELULAS FAGOCITADAS

Se evaluaron al azar 100 trofozoítos amibianos (E. histolytica o E. invadens) que se encontraron en el campo y se contaron las tricomonas fagocitadas por ellos. Todos los experimentos se realizaron al menos 3 veces por triplicado.

#### DIGESTION

Para el proceso de digestión los cultivos celulares se ajustaron a 1 trofozoíto amibiano por 1 trofozoíto de tricomonas, cada tipo de cultivo se ajusto a una densidad celular de  $2 \times 10^6$  células x ml. y se siguió el mismo procedimiento que se utilizó para el proceso de fagocitosis. Para realizar la interacción de los trofozoítos de E. histolytica, éstos se distribuyeron en 15 alicuotas de 100  $\mu$ l cada una de ellas y se les agregaron 100  $\mu$ l de la suspensión

de tricomonas. Para facilitar el proceso de fagocitosis se utilizó el método establecido por Arias-Negrete y col. (1991), las muestras con amibas y tricomonas se centrifugaron durante 2 min a 400 rpm e inmediatamente se incubaron a 37°C, el grupo se subdividió en 5 subgrupos de 3 tubos cada uno. A los 30 min se evaluó el número de tricomonas fagocitadas por amiba, así como el porcentaje de amibas fagocíticas en una serie de tubos; en los cuatro subgrupos restantes se evaluaron los mismos parámetros a las 1.5, 3.0, 4.5 y 6h. En estos cuatro subgrupos se evaluó particularmente el grado de destrucción de las tricomonas que se encontraron en el interior de las amibas, mediante análisis de preparaciones en fresco en el microscopio de contraste de fases. Para la evaluación se distinguieron tricomonas completas, tricomonas en proceso de digestión y restos celulares.

Los experimentos se realizaron por lo menos 3 veces. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante regresión lineal para determinar la vida media de las tricomonas en las vacuolas amibianas y por la prueba t de Student y análisis de varianza (programa de computadora SPSS) para determinar si existen diferencias en la capacidad digestiva entre las cepas HM1 y HK9.

#### ANALISIS MORFOLOGICO

Al término de cada uno de los tiempos de interacción las muestras se enfriaron en un baño de hielo-agua durante 5 min,

posteriormente se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 200  $\mu$ l de medio y se le agregaron 200  $\mu$ l de glutaraldehído al 2.5% diluido en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M, pH 7.4 a cada tubo y se incubaron durante 1 h. Al término de este tiempo las muestras se centrifugaron y se descartó el sobrenadante; las amibas se resuspendieron 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. Posteriormente las muestras se posfijaron con tetraóxido de osmio al 1% diluido en amortiguador de cacodilato 0.1M a pH 7.4, durante una hora, en seguida se descartó el fijador después de centrifugar las amibas a 2000 rpm y se lavaron con cacodilato de sodio 0.1M a pH 7.4. Inmediatamente después se procedió a la deshidratación de las muestras con alcohol etílico en concentraciones ascendentes, desde 50% al 100%, 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 20 h a temperatura ambiente para favorecer la infiltración y finalmente se incluyeron en resina epóxica a 60°C durante 24 h.

De los bloques con amibas se hicieron cortes semifinos de aproximadamente 1  $\mu$ m de espesor en ultramicrotomos equipados con cuchillas de vidrio. Los cortes se tiñeron con azul de Toluidina para ser analizados con el microscopio óptico.

## RESULTADOS

## RESULTADOS

### FAGOCITOSIS.

En los primeros 15 min de interacción entre los trofozoítos de E. histolytica de la cepa HK9:NIH y los de T. vaginalis, el 82.5 % de las amibas contenían al menos una tricomona en su interior (Fig. 1); el promedio de tricomonas por amiba fue de 2.1 (Fig. 2), en general se observó una tricomona por vacuola, sin embargo fué común encontrar hasta 4 tricomonas por vacuola y hasta 10 en el interior del trofozoíto amibiano (Fig. 3a). A los 30 min de interacción el porcentaje promedio de amibas fagocíticas se elevó hasta 98% (Fig. 1), por otro lado el número promedio de células fagocitadas por los trofozoítos amibianos aumentó a 4.8 tricomonas por amiba (Fig. 2), en estas condiciones se pudieron observar en algunas amibas hasta 16 tricomonas (Fig 3b). Finalmente a los 60 min de interacción el porcentaje de amibas fagocíticas se mantuvo en 99.3 (Fig. 1), mientras que el número de tricomonas por amiba disminuyó a 3.3 (Fig. 2), se pueden observar tricomonas claramente en el interior de los trofozoítos amibianos y algunas de ellas en proceso de digestión (Fig. 3c).

En el caso de la cepa HM1:IMSS de E. histolytica, después de 15 min de interacción se observó que las amibas de esta cepa tuvieron una mayor capacidad para fagocitar tricomonas que la cepa HK9:NIH, en la primera se observó el 100% de amibas fagocíticas (Fig. 1) que en promedio contenían 3.7 tricomonas/amiba (Fig. 2). En esta cepa también fue posible

observar más de una tricomona por vacuola y algunas amibas fagocitaron hasta 14 tricomonas (Fig. 4a). A los 30 minutos de interacción la cantidad de amibas fagocíticas se mantuvo en 100% (Fig. 1) y el número promedio de tricomonas por amiba no se modificó significativamente en relación al primer intervalo de tiempo analizado, ya que se registró en promedio 4 tricomonas/amiba (Fig. 2) y número variable de tricomonas por amiba (Fig. 4b). Al cuantificar la fagocitosis a los 60 min, no se modificó el porcentaje de amibas fagocíticas (Fig. 1) aunque el número promedio de tricomonas en el interior de los trofozoítos amibianos disminuyó a 3.1 (Fig. 2) se observaron tricomonas enteras en el interior de los trofozoítos amibianos (Fig. 4c). Un gran número de las tricomonas fagocitadas por los trofozoítos amibianos presentaban una gran movilidad dentro de las vacuolas, particularmente a los 15 min, actividad que disminuyó posteriormente hasta desaparecer.

Al realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos para ambas cepas mediante la *t* de Student se encontró que existe una diferencia estadísticamente significativa únicamente a los 15 min de interacción, lo anterior permite establecer que la cepa HMI es más fagocítica que la cepa HK9 en tiempos cortos.

En el caso de los trofozoítos de *E. invadens* cepa IP1, inicialmente determinamos su habilidad para fagocitar tricomonas en los tiempos indicados para *E. histolytica*. A los 15 min no se observó fagocitosis de tricomonas por los trofozoítos amibianos; a los 30 min de interacción (Figs. 1 y

2) esta situación se mantuvo y solo se observaron entre 1 y 4 tricomonas adheridas a la superficie de los trofozoitos amibianos y algunas en proceso de fagocitosis, las cuales después fueron expulsadas y las que estaban adheridas eran liberadas por las amibas. En base a estos resultados se ampliaron los tiempos de interacción a 60, 90 y 120 min. En el primer periodo evaluado, solo el 22% de las amibas fueron capaces de fagocitar tricomonas (Fig. 1) y contenían en promedio de 0.3 de ellas por amiba (Fig. 2); a los 90 min de interacción ambos valores se elevaron a 35% y 0.5 respectivamente (Figs. 1 y 2). Finalmente, el 55% de amibas fagocíticas (Fig. 1) y un promedio de una tricomona por amiba se registraron a los 120 min de incubación (Fig. 2).

#### DIGESTION.

Las amibas de la cepa HK9:NIH incubadas en las condiciones mencionadas y descritas en materiales y métodos para evaluar la actividad digestiva, fagocitaron en promedio una tricomona por amiba a los 30 min de interacción (Fig. 5) y el 60.7% de las amibas mostraron capacidad fagocítica (Fig. 6). En este caso el 100 % de las tricomonas observadas dentro de las amibas se encontraron íntegras (Fig. 7 y 8A). Durante el proceso de digestión los parámetros antes indicados se modificaron, a las 1.5 h el número de tricomonas por amiba fue de 0.76 (Fig. 5), en estas condiciones sólo el 52.7% de las amibas contenían tricomonas en su interior (Fig. 6); el 28% de las tricomonas se

observaron íntegras dentro de la vacuola, mientras que el 72% restante se observaron en proceso de digestión (Fig. 7 y 8B). A las 3 h el número de tricomonas por amiba disminuyó a 0.42 (Fig. 5), mientras que el porcentaje de amibas con tricomonas en su interior fue de 33.8% (Fig. 6); el 3.5% de las tricomonas se encontraron íntegras y el 96.5 restante en proceso de digestión (Fig. 7 y 8C), a partir de este período y hasta las 4.5 h la degradación de las tricomonas fue amplia y las 0.40 tricomonas por amiba presentes en este intervalo (Fig. 5) se encontraron en su totalidad en estado avanzado de digestión (Fig. 7 y 8C), y 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 trofozoítos 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 (Figs. 5-7 y 8D), lo cual indica que las tricomonas fagocitadas fueron digeridas en su totalidad por los trofozoítos amibianos.

Las amibas de la cepa HM1:IMSS presentaron 1.41 tricomonas por trofozoíto amibiano en el pulso de 30 min (Fig. 5) y un porcentaje de 71.5% de amibas con tricomonas en su interior (Fig. 6), la totalidad de las tricomonas cuantificadas en este período se encontraron íntegras (Fig. 7 y 8A). En los experimentos de digestión, a las 1.5 h los valores encontrados fueron de 0.84 tricomonas por amiba (Fig. 5) el porcentaje de amibas con tricomonas disminuyó a 60% (Fig. 6), de las cuales el 39% de observaron íntegras y el 61% restante en proceso de

digestión (Fig. 7 y 8B), estos parámetros disminuyeron aún más a las 3 h de digestión y solo se encontraron 0.51 tricomonas por trofozoíto amibiano (Fig. 5), en su totalidad en proceso de digestión (Fig. 7 y 8C). Por otra parte el promedio de amibas con tricomonas fue de 40% (Fig. 4). Posteriormente a las 4.5 h éstos valores llegaron a 0.49 tricomonas por amiba (Fig. 5) y el 33.1% de amibas se presentaban en su totalidad con material en estado de degradación avanzado (restos celulares de tricomonas) (Fig. 6 - 7 y 8D). Finalmente a las 6 h de digestión no se observaron restos de tricomonas en el interior de los trofozoítos amibianos y las pocas vacuolas presentes en ellos fueron de menores dimensiones (Figs. 5 - 7 y 8D).

En cuanto al análisis estadístico de los parámetros evaluados durante la digestión, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre las dos cepas de amibas de E. histolytica. Al analizar los resultados mediante regresión lineal se encontró que la vida media de las tricomonas en el interior de los trofozoítos amibianos de la cepa HM1 fue de 3.04 h mientras que para la cepa HK9 fue de 3.1 h (Fig. 9); lo cual revela que no existen diferencias entre las amibas de la cepa HM1 y HK9 para digerir tricomonas previamente fagocitadas.

Debido a la baja fagocitosis presentada por los trofozoítos de Entamoeba invadens cepa IP-1 no se realizaron los ensayos de digestión, ya que persistieron tricomonas no fagocitadas en el medio de cultivo y al ser ingeridas

posteriormente, no permitieron una evaluación adecuada del proceso de digestión.

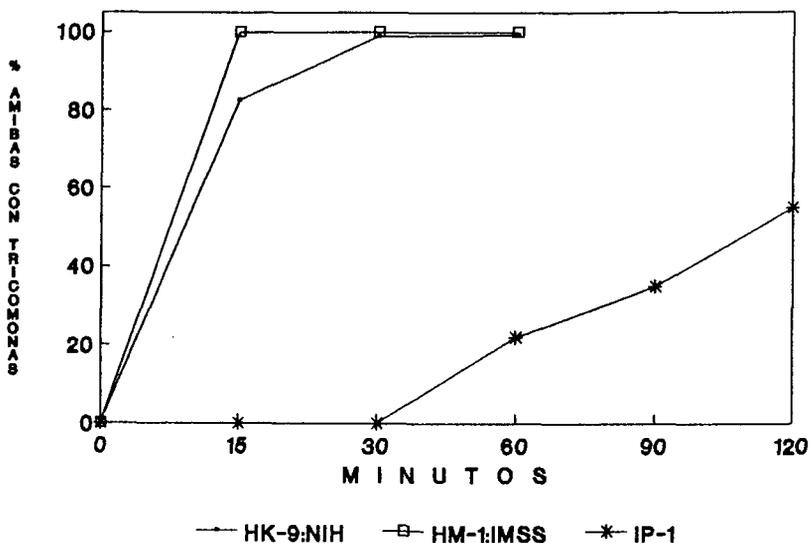


Fig. 1 .- Fagocitosis de tricomonas por Entamoeba.  
 Después de 15 min de interacción entre E. histolytica y tricomonas, el 100% de las amibas de la cepa HM1 contenían éstas, en cambio únicamente el 82.5% de las amibas de la cepa HK9 fagocitaron el flagelado; el 100% de las amibas de ambas cepas fueron fagocíticas a los 30 y 60 min de incubación. La actividad fagocítica de E. invadens solo fué evidente a los 60 min de incubación y a las 2 h únicamente el 50% de las amibas contenían tricomonas.

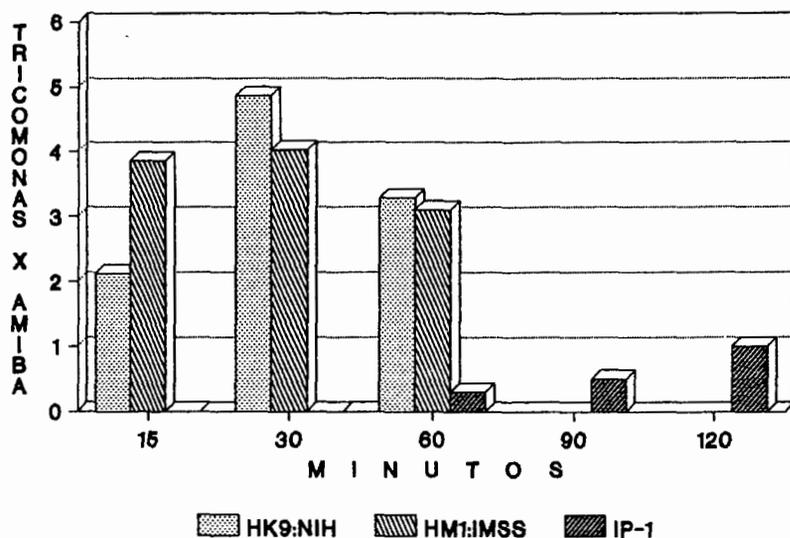
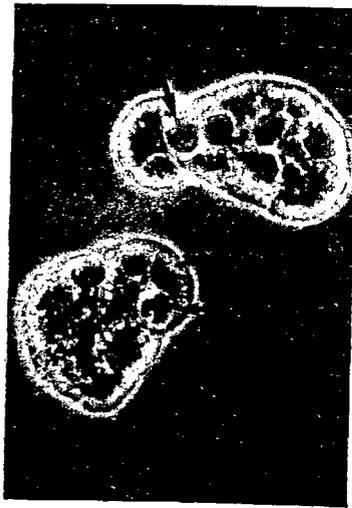
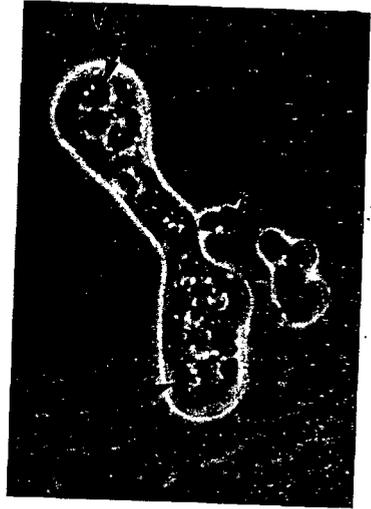


Fig. 2.- Fagocitosis de tricomonas por Entamoeba.  
 El número promedio de tricomonas por ameba aumentó conforme el tiempo de incubación, a los 15 min fué mayor para la cepa HM1, a los 30 min para la cepa HK9; a los 60 min en ambos casos disminuyó. En E. invadens se obtuvo 1 tricomona por ameba solo después de 2 h de incubación.

Fig. 3.- Fagocitosis de T. vaginalis por E. histolytica cepa HK9.

A) En los primeros 15 min de interacción entre los trofozoítos de tricomonas y las amibas se pudieron observar claramente las tricomonas fagocitadas las cuales modificaron su forma una vez en el interior de las amibas (↗), y algunas se distinguieron en el exterior (\*) del trofozoíto amibiano. B) a los 30 min de interacción el número de tricomonas que se observaron en el interior (↗) de las amibas fue claramente mayor que el apreciado en el primer intervalo, consecuentemente la cantidad de tricomonas que se observan en el exterior (\*) también fue menor. C) todas las tricomonas que se observaron en este intervalo de 60 min se localizaron en el interior (↗) del trofozoíto amibiano sin apreciarse alguna fuera de éstos. Barra = 20 µm.



**FIG. 3**

Fig. 4.- Fagocitosis de T. vaginalis por E. histolytica cepa HM1.

A) Se pudieron observar en número variable tricomonas en el interior (↗) de los trofozoítos amibianos, así como una cantidad no determinada de tricomonas fuera (\*) de la amiba. B) Fue posible apreciar a los 30 min de fagocitosis que el número de tricomonas en el interior (↗) de las amibas aumento considerablemente mientras que las observadas en el exterior (\*) de las amibas fue menor en comparacion con el primer intervalo. C) Encontramos que las únicas tricomonas apreciables en el intervalo de 60 min fueron las que se encontraban en el interior (↗) de los trofozoítos amibianos y fue imposible localizarlas en el exterior de éstos. Barra = 20 µm.

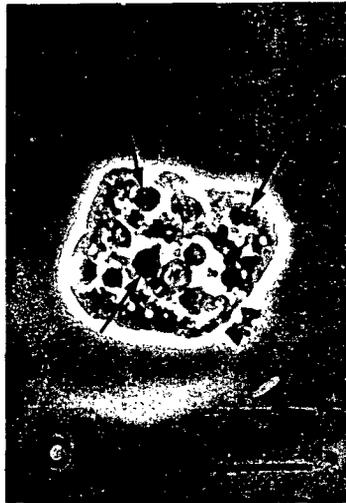
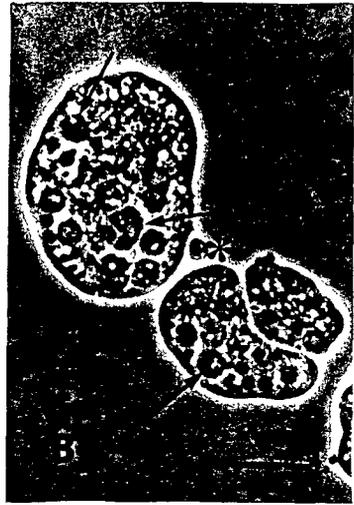


FIG. 4

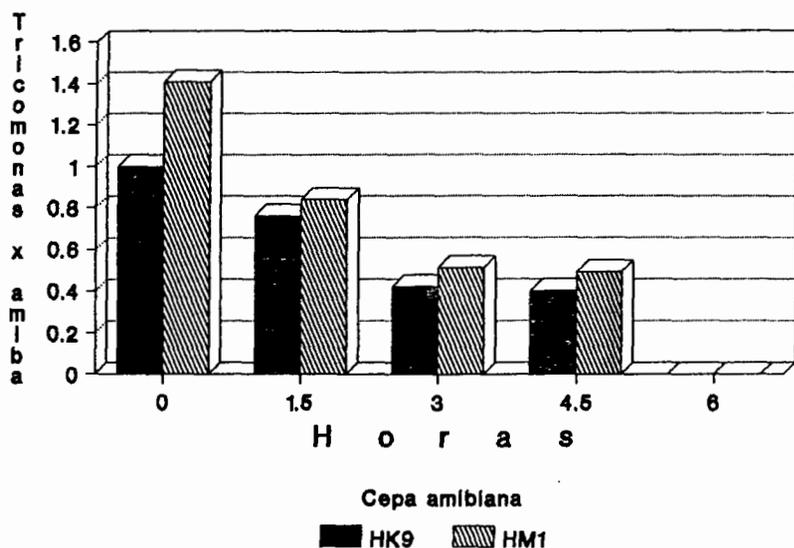


Fig. 5.- Digestión de tricomonas por E. histolytica. La actividad digestiva de E. histolytica fué evidenciada por la disminución del número promedio de tricomonas contenidas. En ambas cepas amibianas la degradación intracelular de tricomonas fué mayor a las 3 h posfagocitosis, después de 6 h no se observaron tricomonas dentro de las amibas.

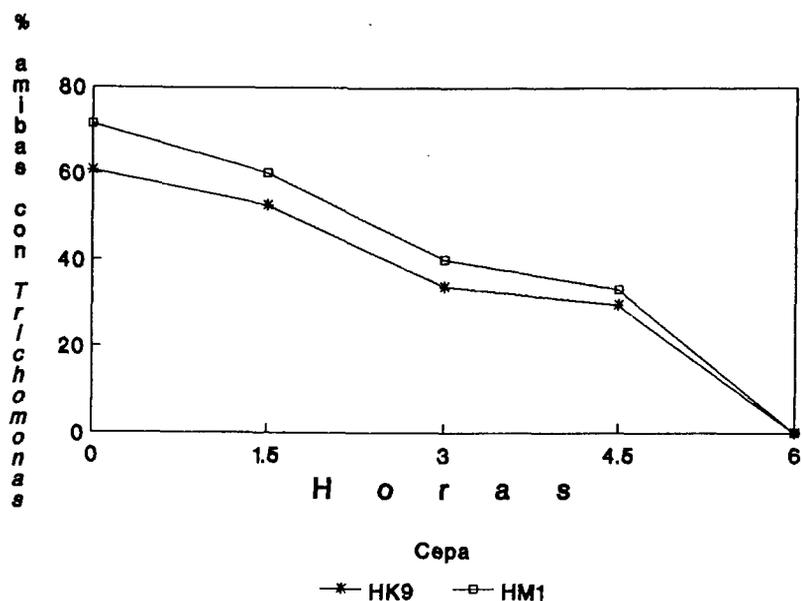


Fig. 6.- Digestión de tricomonas por E. histolytica  
 La actividad digestiva de E. histolytica se demuestra también por la disminución del porcentaje de amibas que contienen tricomonas, nuevamente la mayor disminución del parámetro evaluado fué a las 3h; después de 6 h no se observaron amibas con tricomonas.

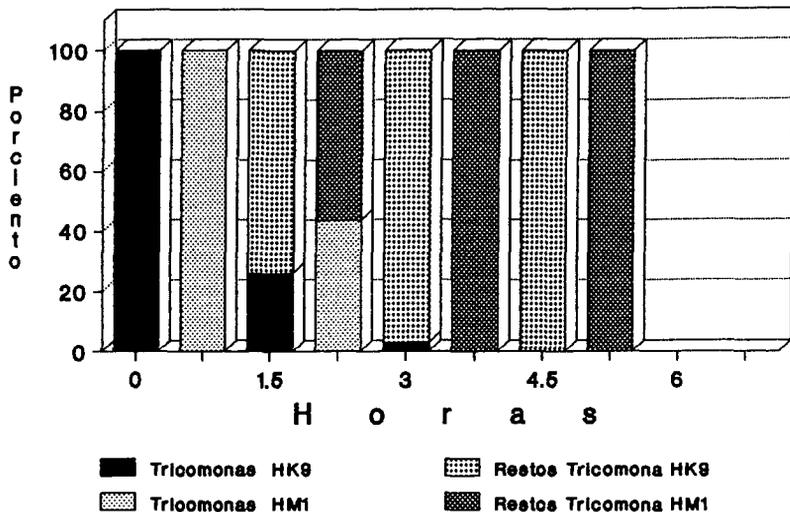


Fig. 7.- Digestion de tricomonas por E. histolytica. Las tricomonas contenidas en las amibas después del pulso de fagocitosis estuvieron íntegras; después de 1.5 h de digestión el 28% de las tricomonas contenidas en las amibas de la cepa HK9 y el 39% de las contenidas en las de la cepa HM1 se observaron completas. En los periodos de 3 y 4.5 h las amibas contenían principalmente restos de tricomonas, los cuales desaparecieron a las 6 h.

Fig. 8.- Digestion de tricomonas por E. histolytica cepas  
HM1 y HK9.

A. Después del pulso de fagocitosis (30 min) se pueden observar claramente en el interior de varios trofozoítos amibianos tricomonas enteras (↗), las cuales se pueden diferenciar fácilmente del núcleo (◼) y en algunas amibas se pueden observar algunas vacuolas translúcidas (\*). B. A las 1.5 h de digestión se observa menor número de tricomonas enteras (↗), otras se encuentran en proceso de digestión intravacuolar (\*). C. Después de 3 h de digestión, solo se pueden observar restos celulares de tricomonas en el interior de las vacuolas amibianas (\*) mientras que otras se encuentran vacías y en mayor número que en los intervalos anteriores (\*). D. Finalmente, a las 4.5 y 6 h no es posible encontrar tricomonas ni restos de ellas en el interior de las amibas, sólo se pueden observar en algunas su núcleo (◼) y algunas vacuolas translúcidas (\*). Azul de toluidina. Barra = 20 µm.

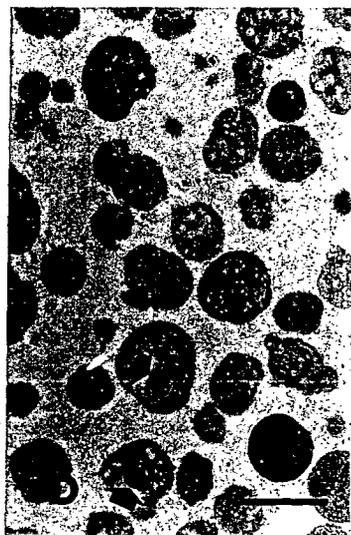
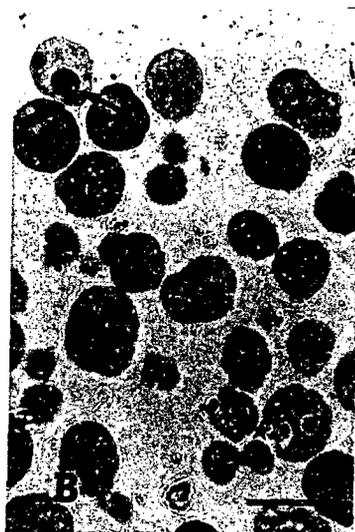
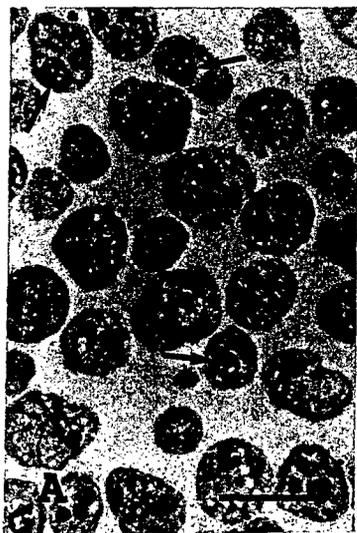
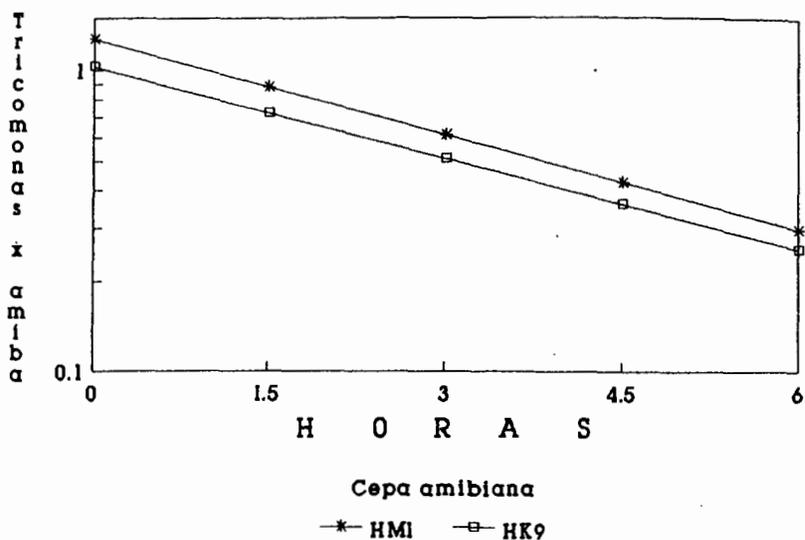


FIG. 8



semilog.

Fig. 9.- Digestion de *T. vaginalis* por *E. histolytica* cepa HK9 y HM1.

Al realizar el análisis de regresión lineal para determinar la vida media de las tricomonas en el interior de los trofozoítos amibianos se encontró que en la cepa HM:1 la vida media de las tricomonas fue de 3.04 h mientras que para la cepa HK:9 fue de 3.1 h. Solamente se observó una diferencia significativa en el tiempo cero de digestión.

## DISCUSIONES

## DISCUSIONES.

Los resultados obtenidos y las observaciones realizadas durante el desarrollo experimental, permiten confirmar que el proceso de fagocitosis involucra varios pasos, entre los cuales se encuentran la adhesión de los trofozoítos de Trichomonas vaginalis a los trofozoítos amibianos, posterior a ésto se lleva a cabo la ingestión o fagocitosis de los mismos y finalmente la digestión o degradación de las tricomonas fagocitadas por la amiba, pasos establecidos para el proceso de heterofagia observado en las células de Kupffers in vitro (Glauman y col. 1981). Esta serie de pasos involucrados en el fenómeno de fagocitosis que presenta Entamoeba histolytica ya han sido reportados por Chévez y col. (1972) en estudios realizados con eritrocitos humanos y por Martínez-Palomo y col. (1985) al estudiar los mecanismos de la amiba involucrados en el efecto citopático que ejercen éstas sobre cultivos de células MDCK. Además Senaldi y col (1989) en sus estudios de fagocitosis de eritrocitos humanos por Naegleria fowleri también reportan esta serie de eventos relacionados en el proceso de fagocitosis. El proceso de adhesión y los mecanismos involucrados en el mismo no se analizaron en el presente trabajo, pero es probable que se lleven a cabo por interacción al azar de las células en los cultivos, aunque no podemos descartar la probable intervención de factores quimiotácticos propios de los trofozoítos de Trichomonas

vaginalis y de los trofozoítos de Entamoeba histolytica (Villegas y col. 1976). El proceso de adhesión podría llevarse a cabo por receptores específicos de membrana presentes en ambos tipos celulares (Alderete y Garza 1988; Silva Filho y col. 1988; Lehker y col. 1990) como en el caso de la interacción de los trofozoítos de E. histolytica con eritrocitos (Orozco y col. 1982a; Orozco y col. 1983; Orozco y col. 1987), interacción de E. histolytica con fibronectina (Talamás y Meza, 1988) y eritrocitos con I. vaginalis (Lehker y col. 1990) y/o por receptores del tipo de lectinas (Koliber and Mirelman, 1980; Roussel y col. 1991).

El proceso de ingestión de I. vaginalis por E. histolytica de la cepa HMI se presentó en dos modalidades, en una de ellas se observa la ingestión de los trofozoítos de tricomonas completos, mientras que la otra se caracteriza por la formación de canales fagocíticos en E. histolytica mediante los cuales la amiba ingirió porciones de trofozoítos de tricomonas, con la consiguiente formación de pequeñas vacuolas fagocíticas; esta variante del proceso fagocítico ha sido reportada por Chévez y col. (1972) en estudios con E. histolytica de la cepa HK9 y otros realizados por Lejeune y col. (1987, 1992) con E. histolytica tipo Laredo, ambos investigadores usaron eritrocitos como célula blanco.

Trissl y col. (1978) señalan que la fagocitosis in vitro de eritrocitos es mayor en cepas patógenas (para mamíferos) que en cepas no patógenas, Orozco y col (1982a, 1982b y 1983) reportaron que existía una relación directa entre el grado de

virulencia y la capacidad fagocítica de cepas de E. histolytica, mientras más virulenta es la cepa mayor sería su capacidad de fagocitosis y aunque Montfort y Perez-Tamayo (1992) no encontraron relación entre la actividad fagocítica (eritrocitos como célula blanco) con la patogenicidad y reportan que la fagocitosis podría ser menor en cepas de HM1 que muestran alta patogenicidad, que en cepas que han perdido esta propiedad, nuestros resultados nos permiten observar que entre las dos cepas utilizadas de E. histolytica con diferente virulencia la que mostró mayor capacidad fagocítica fue la HM1 (más virulenta) mientras que la cepa HK9 (menos virulenta) presentó menor capacidad de fagocitosis en tiempos cortos (15 min), resultados que no coinciden con los reportados por Montfort y Perez-Tamayo (1992); es importante mencionar que ellos utilizaron 4 clones diferentes de la cepa HM1.

En nuestros experimentos con la cepa HK9 de E. histolytica, solo observamos la fagocitosis de tricomonas enteras a diferencia de lo reportado por Chévez y col. (1972), quienes describen para esta cepa las dos modalidades mencionadas cuando se usan eritrocitos como célula blanco, mientras que la cepa HM1 mostró ambas modalidades de fagocitosis, debido probablemente a las propiedades y características de su citoesqueleto.

Así como nosotros encontramos diferencia en la capacidad fagocítica entre las dos cepas de E. histolytica también se ha reportado en varios estudios que algunas propiedades como la

presencia de enzimas de membrana y de secreción (Keene y col. 1986; Schulte y col. 1989; Horstmann y col. 1992; Avila y Calderon, 1993; Jansson y col. 1994), el contenido de enzimas proteolíticas demostrado por Gadasi y col. (1983a), la actividad enzimática observada por Lushbaugh y col. (1984) y por Gadasi y col. (1983b), y la presencia del ameboporo (Young y col. 1982, Dodson y col. 1994), son mas elevadas en la cepa HM1 que en HK9.

En los experimentos de digestión de Trichomonas vaginalis por los trofozoítos de E. histolytica una vez analizados los resultados mediante análisis de varianza, t de Student y regresion lineal, no muestran que exista una diferencia que sea estadísticamente significativa entre las cepas HK9 y HM1, pues sólo se observó diferencia en el tiempo cero de digestión, ademas la vida media de las tricomonas en el interior de los trofozoítos de ambas cepas amibianas fue similar. Este proceso de digestión se caracterizó y se evidenció por la perdida de motilidad y la modificación de la estructura celular de las tricomonas en el interior de las vacuolas amibianas y posteriormente por su transformación en material amorfo. En estadios avanzados de digestión se observó una disminucion de la cantidad de restos celulares en el interior de las vacuolas, así como una reduccion del tamaño de las mismas.

Después de 6 h de digestión los trofozoítos amibianos se caracterizaron por no presentar tricomonas ni restos de éstas

en el interior de las vacuolas, y la mayoría de ellas fueron de menor tamaño; aspectos similares a los mencionados por Chévez y col. (1972) quienes mencionan en estudios con E. histolytica cepa HK9 que previamente fagocitaron eritrocitos humanos, que las vacuolas observadas se presentaron en número variable e indeterminado y señalan que los eritrocitos una vez en el interior de las vacuolas amibianas adquieren forma globular y posteriormente disminuyen paulatinamente de tamaño, hasta desaparecer después de 6 u 8 h. El proceso de digestión también fue reportado por Griffin (1972), quien describió la degradación de células inflamatorias por E. histolytica con resultados similares. Recientemente Mora-Galindo y Anaya-Velazquez (1993) realizaron estudios sobre la fagocitosis y digestión de eritrocitos humanos por E. histolytica cepa HM1 y reportan que una vez que éstos se encuentran en el interior de la vacuola del trofozoíto amibiano experimentan transformaciones en su estructura y comienzan a desintegrarse hasta desaparecer por completo. Estos cambios estructurales de la células blanco en el interior de las vacuolas amibianas fueron también observados por Hohman y Bowers (1993) en las vacuolas de Acantamoeba castellani que contenían levaduras (Saccharomyces cerevisiae). Nilsson (1987) reporta la digestión de Escherichia coli por Tetrahymena pyriformes con características similares.

Se han reportado actividades enzimáticas que intervienen en los efectos citopáticos de Tricomonas vaginalis sobre cultivos celulares, bacterias y eritrocitos humanos (Nielsen, 1974;

Francioli y col. 1983, Potamianos y col. 1992), probablemente la presencia y la carga de enzimas propias de los trofozoítos de tricomonas intervienen para que la digestión de ellos mismos sea más rápida en el interior de vacuolas de los trofozoítos amibianos.

Los resultados de la fagocitosis de tricomonas mostrados en la fig. 2 para las cepas HM1 y HK9 de E. histolytica nos muestran que las amibas nunca alcanzaron el nivel esperado de fagocitosis de 5 tricomonas por amiba en promedio, en virtud de que la interacción se realizó con una proporción de 5 tricomonas por amiba. Lo anterior es debido en parte a que sólo se cuantificaron aquellas amibas que contenían tricomonas íntegras en su interior. La diferencia observada a los 30 min, en donde existe una mayor cantidad de tricomonas por trofozoíto amibiano en el caso de la cepa HK9 que la HM1, puede deberse a que en esta última ya se inició el proceso digestivo.

Se ha establecido en diferentes estudios que Entamoeba invadens tiene la capacidad de fagocitar eritrocitos de mamífero (Zaman, 1970), y eritrocitos humanos (Trissl y col. 1978; Ramírez-Cordova y col. 1990). El grupo de Trissl y col. (1978) reportó en su estudio que E. invadens es capaz de fagocitar eritrocitos pero con una eficiencia considerablemente menor que E. histolytica, este reporte que señala las diferencias en la capacidad fagocítica entre ambas especies de amiba concuerda con los resultados encontrados en el presente trabajo, pues observamos una diferencia altamente

significativa entre los trofozoítos de E. histolytica la cual mostró una tasa elevada de fagocitosis y de E. invadens que presentó una baja capacidad para fagocitar trofozoítos de tricomonas. Ramírez-Córdova y col. (1990) realizaron un estudio cuantitativo para evaluar la digestion intracelular de eritrocitos humanos por parte de trofozoítos de E. invadens, los estudios los realizaron con una proporción de 10 eritrocitos por cada trofozoíto amibiano, en un pulso de 30 min se presentaron 5.6 eritrocitos por amiba y el resto de los eritrocitos no fagocitados fueron lisados con agua destilada, los eritrocitos presentes en el interior de las amibas desaparecieron paulatinamente y en su totalidad, con una vida media de 7 h. Probablemente la capacidad que presenta E. invadens para digerir los eritrocitos también le permita digerir los trofozoítos de tricomonas, desafortunadamente por no haber podido encontrar y adecuar una técnica para separar las tricomonas presentes en exceso en los cultivos no fue posible realizar el estudio cuantitativo de digestión intracelular para esta especie de amiba.

Se realizaron ensayos para separar de los cultivos mixtos los trofozoítos de T. vaginalis y de E. invadens, primero tratando de lisar las tricomonas con agua destilada en diferentes volúmenes y a diferentes tiempos, con lo cual obtuvimos un resultado negativo. Posteriormente se intentó separar ambos protozoarios mediante gradientes de percoll (Avron y col. 1983), al no obtener un solo resultado positivo se declinó en el intento de separación de los cultivos, ya que

simultaneamente a las tricomonas ingeridas, habia una gran proporción de ellas fuera de las amibas, las que al ser ingeridas en tiempos posteriores modificarían los resultados de tricomonas/amiba y las características morfológicas de las tricomonas en digestión.

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten concluir que:

1) Entamoeba histolytica y Entamoeba invadens son capaces de fagocitar in vitro células que poseen gran movilidad, como los trofozoítos de Trichomonas vaginalis.

2) La habilidad de Entamoeba para fagocitar T. vaginalis depende de la especie y de la cepa amibiana.

3) Durante los primeros 15 min de interacción la fagocitosis de T. vaginalis es mayor en cepas de E. histolytica que tienen elevada virulencia (HM1) que en cepas de virulencia atenuada (HK9), en tiempos posteriores la actividad fagocítica es similar.

4) Los trofozoítos de Entamoeba invadens poseen una habilidad significativamente menor que E. histolytica para fagocitar T. vaginalis, pues el promedio de tricomonas por amiba y el porcentaje de amibas fagocíticas fué claramente inferior al obtenido con los trofozoítos de E. histolytica

5) La incapacidad de E. invadens para lograr los niveles de fagocitosis que se obtienen con E. histolytica puede ser el

resultado de una adhesión débil de las tricomonas a las amibas y por otra parte, la lenta formacion de pseudópodos por éstas; ya que se observó que las amibas son capaces de adherir las tricomonas, pero la mayoría de ellas se liberaban.

6) Los trofozoítos de Entamoeba histolytica tienen la capacidad de digerir los trofozoítos de I. vaginalis previamente fagocitados.

7) En la capacidad para digerir los trofozoítos de Trichomonas vaginalis por las dos cepas de E. histolytica no existen diferencias estadísticamente significativas pues la vida media de las tricomonas en el interior de los trofozoítos amibianos de la cepa HK9 fue de 3.1 h, a partir de 1 tricomona en promedio, en el inicio de la digestión y para la cepa HM1 de 3.01 h con un promedio de 1.4 tricomonas al inicio de la digestión. Lo anterior nos permite concluir que los procesos de digestión o degradación intracelular de las tricomonas por E. histolytica no dependen de la virulencia de la cepa amibiana.

## BIBLIOGRAFIA

## BIBLIOGRAFIA

- Alderete JF, Garza GE. Identification and properties of Trichomonas vaginalis proteins 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 LF, 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 cytotoxicidad. 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.
- Clark GC, Diamond SL. Pathogenicity, virulence and Entamoeba histolytica. Parasitol Today, 1994; 10: 46-47.

- Chévez A, Iturbe-Alessio I, Segura M, Flores-Corona. Fagocitosis de eritrocitos humanos por Entamoeba histolytica. Arch Inv Méd (Méx), 1972 (supl. 2): 275-286.
- 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.
- 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.
- Gadasi H, Kessler E. Correlation of virulence and collagenolytic activity in E. histolytica. Infect Immun, 1983; 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 trofozoítos 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.

-- Hohman CT, Bowers B. Hydrolase compartmentalization limits rate of digestion in Acanthamoeba. J Euk Microbiol, 1993; 40: 589-593.

-- Horstmann 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, Petitt 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. Ultrastructural localization of  $Ca^{+2}$  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, Poisson AM, Rein FM. Beta-hemolytic activity of Trichomonas vaginalis correlates with virulence. Infect Immun, 1983; 41: 1291-1295.

-- Kudo RR. Protozoología. Mex: C.E.C.S.A. 1985, 405-438.

-- Lehker WM, Chang HT, Daily CD, Alderete FJ. Specific erythrocyte binding 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 phagocytic mechanism used by Entamoeba histolytica-like, Laredo strain. Biol Cell, 1992; 74: 211-216.

-- Levine ND, Corliss JO, Cox FEG y col. A newly revised

clasificación of the protozoa. J Protozool, 1980; 27: 37-58.

-- López-Revilla R, Said-Fernández S. Cytopathogenicity of Entamoeba histolytica: hemolytic activity of trophozoite homogenates. Am J Trop Med Hyg, 1980; 29: 209-212.

-- Lushbaugh BW, Hofbauer FA, Kairalla AA, Cantey RJ, Pittman EF. Relationship of cytotoxins of axenically cultivated E. histolytica to virulence. Gastroenterology. 1984; 86:1488-1495.

-- 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, Chavez B. Membrane structure of Entamoeba Histolytica: fine structure 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, González-Robles A, Chávez B, Orozco E,

Fernández-Castelo S, Cervantes A. Structural bases of the cytolytic mechanisms of E. histolytica. J Protozool, 1985; 32: 166-175.

-- Montfort IAO, Pérez-Tamayo R. Phagocytosis and proteinase activity are not related to pathogenity of Entamoeba histolytica. Arch Med Res, 1992; 23: 177-179.

-- Mora-Galindo J, Anaya-Velázquez F. Intracellular digestion of human erythrocytes by Entamoeba histolytica: a kinetic study in vitro. Arch Med Res, 1993; 24: 347-351.

-- Nielsen HM. Fine structural localization of nucleoside triphosphatasa and acid phosphatasa 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 PA. Clonas de E. 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 (Méz.), 1982b; 13: 177-183.

- Orozco E, Guarneros G, Martínez-Palomo A, Sánchez T. Phagocytosis as a virulence factor. *J Exp Med*, 1983; 158: 1511-1521.
- Orozco E, Arroyo R, Rodriguez 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 R. Liss, Inc.
- Potamianos S, Mason RP, Read SJ, Chikunguwo S. Lysis of erythrocytes by Trichomonas vaginalis. *Bioscience Reports*, 1992; 12: 387-395.
- Ramírez-Cordova JJ, Ramírez-Romo S, Mora-Galindo J. Quantitative Evaluation of intracellular degradation in Entamoeba invadens. *Int J Parasitol*, 1990; 20: 199-201.
- Rosebaum RM, Wittner M. 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 cytopathic effect of Trichomonas vaginalis probably mediated by a mannose/N-acetyl-glucosamine binding lectin. *Int J Parasitol*, 1991; 21: 941-944.
- Ravdin IJ, Croft YB, Guerrant LR. Cytopathogenic mechanism of Entamoeba histolytica. *J Exp Med*, 1980; 152: 377-390.

- Schulte W, Scholse 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.
- Treviño-Garcia MN, Feria-Velasco A, Ruiz de Chavez I, De la Torre M. Lisosomas en Entamoeba histolytica. Arch Inv med, 1971; 2: 179-186.

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

-- 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, Unkeless 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 Soc Trop Med Hyg, 1962; 57: 535-538.

-- Zaman V. Ingestion of erythrocytes by Entamoeba. Acta Trop. 1970; 27: 178-181.