

106  
2 Gen



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"RESPUESTA DE ANTICUERPOS Y REACCION INFLAMATORIA LOCAL EN RATAS INYECTADAS CON E. HIS TOLYTICA HK-9 POR VIA SUBCUTANEA"

T E S I S

LETICIA TAJONAR GARCIA

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1985



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## C O N T E N I D O

- I. INTRODUCCION.
- II. GENERALIDADES.
  - 1. Amibiasis invasora.
  - 2. Relación huésped-parásito.
  - 3. Modelos animales de amibiasis experimental.
  - 4. Amibiasis cutánea.
- III. MATERIAL Y METODOS.
  - 1. Ratas.
  - 2. Entamoeba histolytica.
  - 3. Reactivos biológicos.
  - 4. Reactivos químicos.
  - 5. Material de laboratorio.
  - 6. Procedimientos experimentales.
  - 7. Técnica de Hemaglutinación indirecta.
  - 8. Técnica de Lowry.
  - 9. Técnica de histoquímica.
- IV. RESULTADOS.
- V. DISCUSION.
- VI. RESUMEN.
- VII. BIBLIOGRAFIA.

## I. INTRODUCCION.

Diferentes cepas de Entamoeba histolytica obtenidas de cultivos axénicos se han utilizado para inyectar los tejidos de varios animales de laboratorio. Estos estudios experimentales han tratado de aumentar el conocimiento sobre la relación huésped-parásito en el curso de la amibiasis. Según la cepa de amiba, su procedencia de un cultivo axénico o monoxénico, la cantidad de trofozoitos, la especie animal receptora, su edad, el tejido que recibe las amibas, etc., se han provocado lesiones con un área de necrosis variable, una moderada reacción inflamatoria y notables diferencias en cuanto al tiempo que los trofozoitos pueden persistir en el sitio de la inyección y también en relación a su posibilidad de extenderse a los tejidos vecinos. En general se ha demostrado que, a pesar de su virulencia atenuada, las amibas obtenidas axénicamente pueden provocar lesiones y estimular una buena respuesta inmune en el animal. Cuando los trofozoitos de E. histolytica se inyectan experimentalmente por vías -- que no son las fisiológicas, en el hígado, cerebro o intestino de algunas especies animales, generalmente causan lesiones que no se pueden comparar completamente con las de la enfermedad natural y que, hasta ahora, no explican todos los mecanismos de invasividad del protozoario ni revelan -- cuales son los factores del huésped que actúan más efectivamente

en la resistencia contra la parasitosis. Sin embargo, el diseño de diferentes modelos de infección experimental en animales de laboratorio continúa siendo un recurso que se utiliza frecuentemente para relacionar los cambios antigénicos y enzimáticos de los trofozoitos con el grado de virulencia de los mismos. - Algunas observaciones que han resultado de estos estudios, no se hubieran logrado solamente con investigaciones en pacientes.

En este trabajo se presentan los resultados de un estudio sobre la evolución de la lesión y la respuesta del huésped, -- cuando un grupo de ratas Wistar son inyectadas en el tejido -- subcutáneo con trofozoitos de E. histolytica HK-9 cultivada en condiciones axénicas.

Aunque las ratas y otros animales de laboratorio han sido utilizados muchas veces como modelos de amibiasis experimental, hasta ahora la mayor parte de los trabajos publicados estudian casi exclusivamente los resultados de inoculaciones intracecales, cerebrales e intrahepáticas, particularmente estas últimas. No existen publicaciones sobre las características de la lesión cuando los trofozoitos se inyectan por vía subcutánea. Esto -- llama la atención porque en la literatura médica es frecuente encontrar el registro de casos clínicos con extensas zonas de necrosis cutánea provocadas por E. histolytica (33,54).

El intestino de las ratas no es el ambiente natural de E. histolytica. Lo mismo se puede decir de todos los órganos y tejidos de los animales que usualmente se han utilizado en los modelos de amibiasis experimental. Sin embargo, en la mayor parte de los casos los resultados obtenidos han sido útiles para medir la virulencia del protozoario o para estudiar los mecanismos bioquímicos que facilitan la invasividad de la amiba o que reparan el daño de los tejidos.

La inoculación de trofozoitos en el tejido subcutáneo de las ratas Wistar puede servir como un modelo para el estudio de las relaciones entre los protozoarios y la colágena que sintetizan los fibroblastos. Con el propósito de conocer las características de lesión, las ratas serán inyectadas con amibas en el tejido subcutáneo y luego se procederá a sacrificarlas a intervalos regulares. Se tratará de relacionar la persistencia de los trofozoitos y su invasividad con los cambios tisulares, macro y microscópicos, que se puedan observar en la piel y en el tejido subcutáneo.

Se espera que este modelo de amibiasis murina experimental se caracterice por causar una lesión transitoria y poco extendida que no comprometa la función de otros tejidos vecinos, de tal modo que el animal quede con una amibiasis localizada, pero en condiciones de sobrevivir. Estas ratas servirán para estudiar

algunas reacciones ante la inoculación subcutánea de una gran cantidad de trofozoitos de E. histolytica.

Además se intenta demostrar que, después de haber sido -inyectadas las ratas, los trofozoitos permanecen en el animal durante el tiempo necesario para inducir una buena respuesta inmune humoral contra los principales determinantes antigénicos de E. histolytica. La cantidad de anticuerpos sintetizados en el curso del experimento deberá ser significativamente superior a la que resulta después de inyectar un extracto preparado con el mismo número de trofozoitos muertos.

En los humanos, la localización cutánea y subcutánea de las amibas patógenas tiene mucha importancia tanto por la naturaleza necrosante de las lesiones, como por el hecho de que los trofozoitos que participan en la destrucción se encuentran en un micro-habitat cuyas condiciones son completamente diferentes a las que, por ejemplo, participan en la formación de un absceso hepático. La amibiasis de la piel no tiene la característica de esterilidad y de anaerobiosis de la amibiasis del hígado. Por otra parte, la reacción inflamatoria en el tejido subcutáneo y los elementos celulares que participan en ella (74) también son diferentes a los de la reacción local del parénquima hepático ante la agresión de los trofozoitos. Sin embargo, aparentemente E. histolytica del zimodemo II puede

indistintamente ulcerar el intestino, causar un absceso en hígado o necrosar la piel (45), aunque las condiciones que regulan la interacción huésped-parásito resultan diferentes al cambiar la anatomía del órgano de choque.

Finalmente, se tratará de comprobar si la lesión subcutánea tiene una evolución particular y si presenta características que la puedan hacer diferente a las lesiones descritas cuando los trofozoitos de E. histolytica han sido inyectados en -- otros tejidos, particularmente los de naturaleza parenquimatosa como el hígado y el cerebro.

En los últimos años se le ha dado particular énfasis a la síntesis de colagenasa por los trofozoitos de E. histolytica.-- El grado de invasividad que puede tener el protozoario ha sido relacionado con la cantidad y la clase de colagenasa producida, ya que esta enzima puede romper las mallas de colágena del tejido conectivo.

Se ha propuesto que la habilidad para sintetizar colagenasa puede servir como parámetro para distinguir diferentes cepas que tienen distintos grados de virulencia.

Por otro lado, se conoce que existen diferentes tipos de colágena y que el huésped de las ambas los puede tener reparados en diferentes tejidos (19). Algunos estudios in vitro han



demostrado que las colagenasas de E. histolytica no tienen el mismo efecto sobre los diferentes tipos de colágena (68). Normalmente, se pueden infiltrar una gran cantidad de fibroblastos para sintetizar colágena alrededor de cualquier proceso inflamatorio. Por esta razón creemos que el modelo que se propone tiene singular importancia, ya que representa un modelo in vivo para observar las colagenasas que puede sintetizar E. histolytica HK-9 que ha sido cultivada en condiciones exénicas.

En resumen, hasta el momento no se han publicado trabajos con modelos experimentales de amibiasis cutánea en animales de laboratorio. Como la amibiasis cutánea es una entidad patológica relativamente frecuente, consideramos justificado proponer un estudio experimental con los siguientes objetivos:

1. Obtener un modelo de amibiasis en ratas Wistar, inoculadas por vía S.C. que permita aumentar nuestro conocimiento sobre la relación huésped-parásito.

2. Estudiar la inmunogenicidad del parásito cuando las lesiones se localizan en la piel y el tejido S.C.

## II. GENERALIDADES.

### 1. Amibiasis invasora.

La amibiasis es una de las enfermedades parasitarias más importantes en México. Ha sido clasificada como uno de los -- principales problemas de salud pública por su incidencia, por las pérdidas económicas que ocasiona y también por el elevado número de muertes que se observa en estos pacientes.

La amibiasis es una enfermedad endémica, causada por el protozoario Entamoeba histolytica (Schaudin 1903). Este parásito tiene la capacidad de invadir el intestino humano puede ulcerar la mucosa y, además, en algunos casos abandona el tubo digestivo hasta alcanzar una localización extraintestinal en otros tejidos que también son vulnerables a su efecto citolítico. E. histolytica fue identificada por primera vez por -- Lambl (1860) en las materias fecales de niños con diarrea. -- Posteriormente Losch, en 1875, también la encontró en las heces de un campesino enfermo con disentería, hospitalizado en la - ciudad de San Petersburgo, cerca del círculo polar ártico (61).

Antes de la llegada de Hernán Cortés, los aztecas llamaban "tlecoaciuiztli" a la disentería que evolucionaba con pujo y evacuaciones sanguinolentas. Estos pacientes recibían como

tratamiento algunos medicamentos preparados con varias raíces - (56). En una monografía que se publicó en México durante el año 1856, el Doctor Jiménez describió los síntomas que causaban los abscesos hepáticos, así como el color achocolatado como (champu rreado) del pus, aunque, lógicamente no pudo aclarar la etiología de estas lesiones (32). Durante esa época y también en los años siguientes, se mantuvo la creencia de que la causa de tales abscesos en el hígado era la falta de moderación al beber el -- "pulque" debido al uso de materia fecal humano para la fermentación de este. Estas primeras observaciones que relacionan los abscesos del hígado con bebidas de dudosa limpieza que se dejaban durante cierto tiempo en reposo, tiene una importancia epidemiológicamente notable. Finalmente, los trabajos de Kartulis en 1886 y de Councilman y Lafleur en 1891 (61), aportaron pruebas definitivas en favor de que el protozoario de E. histolytica era el agente causal de la disentería y del absceso hepático.

Boeck y Drbohlav cultivaron E. histolytica en medios artificiales monoxénicos, es decir, en los cuales crecía una sola clase de bacterias u otro protozoario (16). En 1961, Diamond -- (25), obtuvo un cultivo axénico o caldo completamente estéril -- en donde sólo crecían amibas. Esto último permitió el aislamiento de grandes cantidades de trofozoitos, con lo cual aumentaron los estudios sobre la morfología y el comportamiento biológico del protozoario, así como la preparación de extractos antigénicos

de origen exclusivamente amibiano. Este último ha sido muy útil para preparar pruebas de laboratorio que ayudan al diagnóstico serológico de esta parasitosis (solamente de su forma "invasora"), ya que permiten estimar, cualitativamente, la cantidad de anticuerpos anti-E. histolytica.

La amibiasis es una parasitosis cosmopolita, la infección tiene su mayor incidencia en los países con clima cálidos, templados y húmedos, así como también en todas aquellas regiones en donde existen deficiencias sanitarias, económicas, sociales y culturales. Se transmite de humano a humano, sin necesidad de un huésped intermediario. Su prevalencia se encuentra condicionada principalmente por la práctica del fecalismo al aire libre, la contaminación de alimentos y luego la ingestión de los quistes con la comida. La falta de aseo en las manos después de ir al baño es un problema cultural y sanitario que también ha contribuido para que aumente la cantidad de personas contagiadas, principalmente cuando esta mala costumbre la tienen los manejadores de alimentos. En otros países, la incidencia de amibiasis a sido relacionada con factores culturales diferentes, como el homosexualismo en Norteamérica (31). Excepcionalmente la infección puede adquirirse mediante trofozoitos procedentes del exterior, que se anidan en la piel o mucosas. Habitualmente la infección se establece en la

luz del intestino grueso, a donde suelen llegar los quistes que se ingieren por vía oral (12).

Diferentes encuestas realizadas en México, han encontrado que la frecuencia de la infección por E. histolytica es variable. Estos resultados van desde un 5 por ciento hasta un 85 por ciento, según la edad de las personas estudiadas y el sistema ecológico que habitan. Se ha estimado que, como promedio, probablemente el 27 por ciento de la población mexicana se encuentra parasitada por E. histolytica (49, 80).

En otros países, las tasas de infección amibiana también son variables según los trabajos de diferentes autores. Algunas de estas estimaciones son como sigue: en Colombia, la incidencia de la amibiasis ha sido calculada para un 45 al 65 por ciento de la población; en Ecuador, entre el 40 y el 65 por ciento; en Chile entre el 3 y el 12 por ciento y en los Estados Unidos de Norteamérica entre el 5 y el 8 por ciento (88).

La amibiasis de los humanos se puede dividir en dos formas: la invasiva y la no invasiva (61). La amibiasis no-invasiva es la de todos aquellos individuos que tienen E. histolytica en su intestino grueso pero que, sin embargo, se encuentran asintomáticas y por lo mismo son llamados "portadores sanos". En estos casos los protozoarios viven como comensales en la luz del intestino, pero sus quistes se eliminan

con las heces y pueden ser una fuente de contagio tan importante como los de los enfermos con amebiasis invasora. Por esta razón, en las dos situaciones se debe procurar el tratamiento anti-amibiano, aunque algunos sugieren que previamente se debe tipificar el zimodemo para comprobar si se trata de una cepa patógena o no. De todos modos, se acepta que el portador asintomático está expuesto a que, en cualquier momento, sus trofozoitos comensales se conviertan en trofozoitos virulentos, invadan los tejidos y den lugar a los síntomas característicos de la enfermedad.

La amebiasis invasora puede presentarse con una localización intestinal y/o extra-intestinal. La primera es la más frecuente y lesiona principalmente el colon descendente y el ciego. Algunos pacientes tienen manifestaciones agudas y otros crónicas. La segunda, la amebiasis extra-intestinal, suele causar una enfermedad mas grave, pero afortunadamente esta es la forma menos frecuente. Las lesiones generalmente son hepáticas, pulmonares, cutáneas y/o cerebrales (61).

Se ha observado que la expresión de la patogenicidad de un parásito está condicionada por diversos factores, los cuales se pueden clasificar como dependientes del huésped, del parásito y del medio ambiente.

## 2. Relación huésped-parásito.

El ciclo biológico de E. histolytica consta de varios estadios que se pueden resumir de la siguiente forma:

- a) el trofozoito,
- b) el prequiste,
- c) el metaquiste,
- d) el quiste.

El primero es el protozoario móvil. Los dos siguientes son fases intermedias y el quiste es la forma resistente e infectante. La capacidad que tienen las amibas para enquistarse les permite sobrevivir a pesar de los cambios en el medio ambiente, el cual a su vez también influye para que los quistes liberen los trofozoitos.

En el intestino de los humanos el parásito patógeno -- puede expresar diversos grados de virulencia o bien mantenerse enquistado o como trofozoito avirulento. En todo esto intervienen diversos factores. Algunos de ellos han sido estudiados en sus hospederos habituales y se ha observado que la invasividad se encuentra facilitada por la desnutrición, por cambios en el pH y en el potencial de óxido-reducción -

del contenido del intestino, por la flora bacteriana que se asocia a los trofozoitos (51), por varias sustancias como los esteroides (14) o el colesterol de la dieta (15), etc. Además, se ha observado que la patogenicidad de las amibas también puede estar modificada por otros factores, de los cuales se citan con mayor frecuencia a los genéticos, dietéticos, fisiológicos e inmunológicos, todos ellos variables según la condición de cada huésped en particular.

Se ha propuesto que las deficiencias nutricionales facilitan la instalación de la amibiasis invasora y que probablemente esto sea una consecuencia de la hipoplasia que tiene la mucosa intestinal del desnutrido. El intestino de los desnutridos parece más susceptible al efecto lítico de las enzimas que liberan los trofozoitos.

En las ratas infectadas experimentalmente con E. histolytica, la parasitosis desaparece rápidamente cuando los animales son alimentados con una dieta hiperproteica (30). Al contrario, la amibiasis se agrava cuando las ratas aumentan su ingestión de carbohidratos (89). Las dietas deficientes en ácido escórbico también facilitan la persistencia de la parasitosis provocada experimentalmente en cobayos (77).

Los trofozoitos de E. histolytica se multiplican principalmente en el intestino grueso y en condiciones de anaerobiosis, o sea cuando existe un potencial bajo en óxido-reducción (72).



Experimentalmente se ha demostrado que la progesterona, la testosterona y la cortisona son hormonas que pueden favorecer la formación de abscesos amibianos en el hígado de animales previamente infectados. Además, se ha encontrado una cantidad de lesiones, tanto intestinales como hepáticas, en los cobayos a los cuales se les provoca un aumento en la concentración del colesterol sérico (15).

Otro aspecto de la amibiasis que ha sido muy discutido y que se relaciona con las interacciones huésped-parásito, es el papel que desempeñan los anticuerpos séricos que puede sintetizar el huésped. Según algunos autores (83), los anticuerpos anti-E. histolytica tienen una función fundamentalmente protectora. Sin embargo, otros investigadores han presentado pruebas en favor de que la exposición previa al protozoario y la respuesta inmune en contra del mismo facilitan la invasividad de E. histolytica en el hígado de algunos animales (58). Otros estudios (11) también apoyan la idea de que la amibiasis invasora puede estar relacionada con fenómenos de hipersensibilidad. Estos últimos estarían desencadenados por la infección de un huésped sensibilizado y servirían como mecanismos facilitadores de la localización hepática de los trofozoitos. Otras investigaciones (44) han demostrado que los humanos con absceso hepático amibiano poseen una mayor cantidad de anticuerpos contra una proteína de la dieta,

la albúmina bovina, y han propuesto que probablemente algunos mecanismos de hipersensibilidad a los antígenos de la dieta - (y no a los del parásito) podían ser factores facilitadores - de la invasividad.

La susceptibilidad a la infección también varía de acuerdo a la especie animal. Los gatos, hamsters y cobayos han resultado muy susceptibles. En cambio, los perros, conejos, monos, ratas y ratones son poco susceptibles aún a las cepas patógenas de E. histolytica. Además, se conoce que las ratas de la cepa Sherman son resistentes, mientras que las ratas de la cepa Wistar lo son menos (18).

Las amibas atraviesan el epitelio y la membrana basal de la mucosa intestinal, gracias a sus movimientos y probablemente también con la ayuda de las enzimas que liberan al exterior. En los trofozoitos se han encontrado carboxipeptidasas, glutaminasa, caseasa, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, succinildehidrogenasa, fosfomonoesterasa, hialuronidasa, amilasa, maltasa, esterasa y gelatinasa. Pero ninguna de estas enzimas parece ser un factor importante en la patogenicidad del parásito, ya que excepto la carboxipeptidasa, todas las demás enzimas - también han sido encontradas en cepas avirulentas de E. histolytica (51).

Recientemente se ha encontrado actividad de colagenasa -

en la parte externa de la membrana citoplásmica de los trofozoitos (68). Como se conoce que la lámina basal del intestino contiene colágena y que ésta es una de las primeras barreras que los trofozoitos deben cruzar, entonces se ha propuesto -- que esta enzima puede tener reacción con la capacidad invasora del parásito. En otro estudio al respecto, se encontró que la cepa HM-1:IMSS contiene 4.6 veces más colagenasa que la cepa HK-9:NIH (67). La primera es una cepa mucho más virulenta que la segunda.

Entamoeba histolytica también tiene propiedades citotóxicas y puede causar la lisis de leucocitos (7). Este efecto depende de que primero se establezca un contacto entre la amiba y el leucocito. También se ha demostrado que el leucocito tiene propiedades citotóxicas y puede, a su vez, lisar las amibas (23). Se ha observado que cuando los trofozoitos vuelven a -- ser retados nuevamente con el mismo suero anti-amiba, ya no -- presentan el fenómeno de la inmovilización característico de la primera vez (12). Esto puede ocurrir a causa de un cambio en la exposición de los antígenos de superficie, lo cual quizás se encuentre relacionado con cierta capacidad para evitar la respuesta del sistema inmune.

Se ha demostrado (36) que algunas proteínas séricas del medio de cultivo axénico (particularmente la albúmina), puede

adherirse a la membrana de los trofozoitos. Esto mismo sucede con otros parásitos que tienen un ciclo sanguíneo en roedores (28). Cuando los trofozoitos quedan "envueltos" por algunas proteínas de su micro-habitat, pueden tener cubiertos sus determinantes antigénicos y, teóricamente, esto representa un mecanismo de evasión ante la respuesta inmune.

Récientemente también se ha demostrado (35), que los trofozoitos cultivados en un medio axénico comparten algunos determinantes antigénicos con la alfa-fetoproteína (AFP). Como previamente se había comunicado (76) que, después de reducida y alquilada la albúmina expone algunas secuencias de aminoácidos similares a las de AFP, entonces el hallazgo anterior se relacionó con la degradación de la albúmina sérica del medio de cultivo por la acción de las enzimas proteolíticas de los trofozoitos. El significado biológico de este cruce antigénico quedo sujeto a especulación.

La virulencia de una cepa de E. histolytica puede tener variaciones muy amplias, aunque ahora no se tiene una explicación clara para este fenómeno. Cuando E. histolytica se ha inyectado a varios animales de laboratorio, se ha comprobado -- que los trofozoitos de una misma cepa o de cepas diferentes -- pueden tener grados variables de virulencia (10). Se ha observado que la virulencia de los trofozoitos disminuye a medida que se mantienen más tiempo en condiciones axénicas (13). --

Probablemente en esto influya la falta de una fase prequística y quística durante el cultivo (71).

Morfológicamente no es posible diferenciar los trofozoitos patógenos de los que no lo son. Por esta razón se ha intentado medir el grado de virulencia de E. histolytica mediante varias técnicas. Las más conocidas son la capacidad para fagocitar eritrocitos, su unión a la concanavalina A, demostrar su contenido de colagenasa, la tipificación de su zimodemo, etc.

Recientemente Sargeant (78) ha propuesto una nueva forma de clasificar las diferentes cepas de E. histolytica. El procedimiento consiste en investigar la migración electroforética que tienen varias isoenzimas, hasta obtener el zimodemo del protozoario. Algunos de estos patrones enzimáticos parecen relacionarse más que otros con la capacidad de algunas cepas para causar enfermedad (50).

Se han observado tres etapas sucesivas en la muerte de células blanco que son atacadas por E. histolytica. Primero ocurre la adherencia de la amiba a la célula blanco, luego viene la citólisis de esta última y finalmente todo el proceso termina con la fagocitosis. La actividad que puede lograr la amiba en cada una de estas tres etapas ha sido relacionada con la virulencia que tienen diferentes cepas. Pero de acuerdo a los resultados, las cepas que tienen una virulencia diferente pueden

tener una capacidad de adherencia semejante. Por esta razón -- solamente se ha podido concluir que la adherencia es un evento necesario para que, a continuación, ocurra la citólisis -- (70).

El huésped tiene diferentes mecanismos defensivos contra la amibiasis invasora, algunos específicos y otros inespecíficos. De ellos ya se ha mencionado la importancia de los anticuerpos humorales. También los anticuerpos de secreción, fundamentalmente las IgA, parecen intervenir como factores limitantes de la invasividad del protozoario a través de la mucosa intestinal (1). La actividad de la vía alterna del sistema -- complemento ha sido considerada por algunos como otro probable mecanismo defensivo del huésped. El complemento parece tener un efecto citolítico sobre los trofozoitos de E. histolytica (21). Se ha propuesto que la activación de este sistema se -- inicia por la interacción del sistema properdina con algunos componentes superficiales de los trofozoitos. También las enzimas proteolíticas de las amibas pueden actuar directamente sobre los primeros componentes del sistema, particularmente -- sobre  $C_3$ .

Estudios recientes (6) sobre la concentración de algunas proteínas de fase aguda en el suero de pacientes con amibiasis invasora del hígado revelan un aumento característico de algunas de estas sustancias que están relacionadas con el --

fenómeno inflamatorio. Probablemente ellas también participan activamente como un mecanismo defensivo ante la invasividad de E. histolytica. A pesar de la acumulación de células fagocíticas alrededor de las amibas que lesionan los tejidos, los leucocitos polimorfonucleares (PMN) de la sangre periférica no tienen aumentada su capacidad para reducir el nitroazul de tetrazolio (34). El aumento de la concentración sérica de la alfa-fetoproteína (46) sólo ha sido demostrada durante las etapas de regeneración del tejido hepático que ha sido destruido por los trofozoitos que intervienen en la formación del absceso hepático amibiano.

### 3. Modelos animales de amibiasis experimental.

E. histolytica ha sido inoculada en diferentes especies de animales de laboratorio. Los modelos han proporcionado resultados sumamente variables porque se han utilizado desde monos hasta ratones, inyectados una o varias veces con diferentes cantidades de trofozoitos que proceden de cultivos axénicos o monoaxénicos de diversas cepas que tienen grados de virulencia completamente diferentes. Por todo lo anterior, las lesiones obtenidas han sido variables, tanto por su extensión como histológicamente.

El estudio de la activación de varios mecanismos defensivos que usualmente ayudan a limitar la invasividad del protozoario,

han contribuido bastante para mejorar nuestro conocimiento sobre la fisiopatología de la amebiasis invasora del humano y, concretamente, sobre las relaciones entre la respuesta - del sistema inmune y las relaciones que causa esta parasito- sis y/o la posibilidad de manipularse en beneficio del pa- ciente. Cuando Diamond informó sobre el cultivo de E. histo- lytica en un medio axénico (25), algunos opinaron que las - amibas cultivadas en condiciones estériles no eran capaces de provocar infecciones o daño de los tejidos, es decir, -- que habían atenuado completamente su virulencia. Tanimoto y colaboradores (84) fueron los primeros en comprobar que esto no era cierto. Desde entonces se han informado numerosos ex- perimentos sobre animales de laboratorio que se han inocula- do con trofozoitos obtenidos de cultivos axénicos. Como ya se mencionó, se han encontrado resultados sumamente varia- bles. Pero también han sido diferentes los propósitos y me- todologías de los investigadores que han trabajado la ami- biasis experimental. Se pueden encontrar publicados los re- sultados de algunos trabajos que solamente tratan de medir el grado de virulencia de una cepa. En cambio, otros inten- tan comprobar la efectividad de un medicamento, la inmunidad que deja el inóculo o las características histológicas de - la lesión.

A continuación se presenta un resumen de los trabajos



experimentales más importantes que se han publicado en los últimos años acerca de la inoculación experimental de algunas cepas de E. histolytica.

- 1971 (84): Inoculación intrahepática de la cepa HK-9 en hamsters de dos meses. Cada inyección contenía  $12.4 \times 10^4$  trofozoitos y los animales se sacrificaron 10 días después. El 91 por ciento de los hamsters tenían lesiones, únicas o múltiples de un diámetro variable.
- 1971 (85): Inoculación intracerebral, por el ángulo interno del ojo, de la cepa RSRM de hamsters. Los animales fueron inyectados con  $10^4$  trofozoitos de una cepa monoxénica y sacrificados 8 días después. No presentaron meningitis ni áreas de necrosis, pero sí congestión venosa. Microscópicamente se observaron pequeñas zonas de necrosis, sin inflamación, infiltrados con muy pocas células mononucleares y con trofozoitos en la periferia.
- 1972 (3): Inoculación intrahepática de la cepa HK-9 de E. histolytica en hamsters adultos. La dosis fue de  $12.5 \times 10^6$  trofozoitos de cepa axénica. Los animales se sacrificaron 1, 2, 4, 6, 8 y 10 días después. A los dos días se encontraron muy pocos trofozoitos, depósitos de fibrina y las células que caracterizan los

procesos inflamatorios agudos y crónicos. Al cuarto día había una zona de necrosis rodeada de una reacción granulomatosa, con PMN y macrófagos. Al décimo día, granulomas rodeados de una cápsula fibrosa, con células plasmáticas y células gigantes multinucleadas en la periferia.

- 1972 (95): Inoculación subaracnoidea de la cepa HM-2: IMSS - en conejos adultos. Se inyectaron de  $15-85 \times 10^6$  trofozoitos de esta cepa monoxénica. Se encontró necrosis, edema y hemorragia. El infiltrado inflamatorio fue moderado y estuvo formado por PMN y macrófagos. Los trofozoitos pasaron al tejido cerebral sin reacción inflamatoria.
- 1972) (38): Inoculación intrahepática de la cepa HM-2:IMSS en conejos adultos. Se inyectaron  $10-30 \times 10^6$  trofozoitos monoxénicos y los animales se sacrificaron cada 24 horas durante 14 días. Hubo zonas de necrosis con cavitaciones. El infiltrado inflamatorio fue de PMN, macrófagos, fibroblastos y fibras de colágena que rodeaban la zona de necrosis. En algunos casos se observaron granulomas con células multinucleadas.
- 1973 (27): Inoculación intrahepática de hamsters, con  $1.5 \times 10^7$  trofozoitos de varias cepas axénicas. Los animales fueron sacrificados 7 y 9 días después. Con la cepa -- HK-9, el 32 por ciento de los animales presentaron abscesos

primarios menores de 15 mm. Con la cepa HB-301, el 30 por ciento de los animales presentaron abscesos primarios mayores de 15 mm. En el 6 por ciento de estos casos hubo daño de más del 85 por ciento del lóbulo. Con la cepa HM-1:IMSS, el 79 por ciento de los animales -- presentaron abscesos grandes con metástasis; 10 por-- ciento de estos últimos tenían dañado más del 75 por cien-- to del hígado.

Cuando se utilizó el jerbo como receptor de los trofozoitos,  $37 \times 10^4$  amibas de la cepa HK-9 no causaron lesiones hepáticas. En cambio, con  $1.5 \times 10^7$  trofozoitos de la cepa HM:1:IMSS, el cien por ciento de los -- animales presentó abscesos primarios grandes más me-- tástasis.

1973 (5): Inoculación intrahepática de hamsters con distintas cepas de E. histolytica. Los animales fueron sacrificados 2, 3, 4, 5 y 6 días después. Con  $1.5 \times 10^6$  trofozoitos de la cepa axénica HM:3:IMSS, se formaron nódulos amarillentos en todos los lóbulos. Microscópicamente se comprobó necrosis, trofozoitos vivos, PMN y macrófagos y escasos fibroblastos. Con  $12.5 \times 10^6$  - trofozoitos de la cepa axénica HK-9, las lesiones fueron pequeñas y subcapsulares. Con  $1.5 \times 10^6$  trofozoitos de la cepa monoxénica HM-2:IMSS, hubo una necrosis

extensa, sin inflamación ni fibrosis.

- 1973 (87): Inoculación intrahepática de hamsters de tres meses, con cepas obtenidas de pacientes asintomáticos. - Con  $1.5 \times 10^6$  trofozoitos de la cepa HM-7:IMSS, en el 80 por ciento de los animales no se observaron lesiones en el hígado, mientras el 20 por ciento tenían lesiones granulomatosas, pero sin que el estudio microscópico - revelara trofozoitos vivos.
- 1974 (90): Inoculación en vena mesentérica superior de hamsters, con  $1.5 \times 10^6$  trofozoitos de la cepa monoxénica HM-2:IMSS. Los animales fueron sacrificados 4, 6, 8, - 20 y 24 horas después. El hígado mostró lesiones blanco amarillentas. Microscópicamente había zonas de necrosis que contenían trofozoitos vivos rodeados por leucocitos.
- 1974 (93): Inoculación de trofozoitos en la vena subaracnoidea de conejos, los cuales fueron sacrificados 12, 24 y 48 horas después. Al inyectar un filtrado de materia fecal, los animales mostraron una congestión intensa, edema y - opalescencia de meninges. Microscópicamente se observó - un infiltrado de PMN, macrófagos y linfocitos, con exudado fibrinopurulento. Al inyectar trofozoitos de un cultivo áxenico se encontró dilatación vascular y edema. Mi--croscópicamente fueron visibles los trofozoitos, PMN y -

linfocitos, pero faltaron los macrófagos. Al reinocular los trofozoitos de un cultivo áxenico, las lesiones de los animales contenían un infiltrado de PMN, - linfocitos y eosinófilos, pero los macrófagos continuaban ausentes.

- 1976 (92): Inoculación intracecal de cobayos con  $5 \times 10^5$  - trofozoitos de la cepa HM-2:IMSS, plurixénica. Los -- animales fueron sacrificados 6 días después. Se formaron úlceras de varios tamaños que contenían abundante fibrina. La lámina propia estaba infiltrada por trofozoitos vivos, macrófagos, linfocitos y células cebadas. No se observaron PMN.
- 1977 (66): Inoculación intrahepática de hamsters recién nacidos con  $2 \times 10^3$  a  $2 \times 10^4$  trofozoitos de dos cepas axénicas. Los animales fueron sacrificados 10 días - después. Con la HM-1:IMSS, hubo cien por ciento de daño hepático y se formaron abscesos multilobulares. Se comprobó necrosis de los hepatocitos y un infiltrado de linfocitos, PMN y macrófagos. Con la cepa HK-9, sólo 4 por ciento de los animales presentaron daño hepático y las lesiones fueron menos extensas.
- 1977 (65): Inoculación intracerebral de ratones recién nacidos, con dos cepas axénicas. Con  $2 \times 10^4$  a  $2 \times 10^5$

trofozoitos de la cepa HM-1:IMSS, los animales mostraron signos de enfermedad neurológica y murieron durante las primeras 48 horas. Microscópicamente se observaron múltiples abscesos con abundante tejido necrótico. Las lesiones contenían trofozoitos, PMN, linfocitos y macrófagos. No hubo meningitis hiperémica. Con  $2 \times 10^4$  a  $4 \times 10^4$  trofozoitos de la cepa HK-9 se observó que solamente una parte de los animales murieron después de 2 a 5 semanas. Algunos de los ratones sobrevivientes presentaron hidrocefalia.

1978 (62): Inoculación intrahepática de hamsters recién nacidos, con  $2.5 \times 10^4$  trofozoitos de la cepa HM-1:IMSS. Los animales fueron sacrificados 7 días después. Presentaron pequeñas lesiones granulomatosas, con una zona de necrosis central rodeada por un infiltrado pluricelular de macrófagos, células epitelioides, PMN, fibroblastos, eosinófilos y células plasmáticas.

1978 (91): Inoculación intracecal de cobayos recién nacidos con  $1.5 \times 10^6$  trofozoitos de la cepa axénica HM-1-IMSS. Los animales fueron sacrificados 7 días después. La reacción inflamatoria fue mínima y no se pudo demostrar un infiltrado de PMN.

1980 (42): Inoculación intrahepática con  $1 \times 10^6$  trofozoitos

de la cepa HM-2:IMSS; Los animales fueron sacrificados 15 días después. Las dos cepas provocaron la formación de amplias zonas necróticas rodeadas de fibrosis, con una reacción granulomatosa periférica.

1980 (63): Inoculación intrahepática de hamsters recién nacidos con  $2.5 \times 10^4$  trofozoitos de la cepa HM-1:IMSS. Se sacrificaron los animales que sobrevivieron tres semanas después (sólo un 19.3 por ciento del total). Se encontraron grandes zonas de necrosis rodeada de una reacción granulomatosa que contenía macrófagos, células plasmáticas y células gigantes.

1980 (57): Inoculación intrahepática de hamsters con la cepa HM-1:IMSS y con una subcepa de la anterior que había sido "pasada" tres veces por el hígado de otros hamsters. Los animales inyectados con la cepa HM-1:IMSS fueron sacrificados 6 días después. Formaron pequeños nódulos hepáticos. Microscópicamente se observó la formación de un granuloma alrededor de una necrosis central. La lesión contenía macrófagos epitelioides, trofozoitos, células gigantes, linfocitos, células plasmáticas, PMN y fibroblastos. Los animales que fueron sacrificados 4-6 semanas después, no tenían lesiones hepáticas. Los hamsters inyectados con la subcepa HL-3 lambda fueron sacrificados 6 días después. Se observaron nódulos --

grandes en el hígado. Microscópicamente hubo mayor cantidad de granulomas con necrosis central y se comprobó que contenían trofozoitos, macrófagos y fibroblastos. Los animales sacrificados 4 a 6 semanas después presentaron abscesos cavitados, con fluido viscoso amarillento e inodoro, rodeados por una pared de tejido conectivo. En el líquido habían trofozoitos y fibroblastos - pero no macrófagos.

#### 4. Amibiasis cutánea.

Cuando Entamoeba histolytica invade la piel y el tejido subcutáneo de los humanos y causa ulceraciones y necrosis, se dice que el paciente tiene una "amibiasis cutánea" (81). Su presentación clínica puede ser variable, desde la forma aguda ulcerofagadénica hasta la forma crónica vegetante. Estas lesiones se pueden presentar en personas que no tienen amibiasis visceral (amibiasis primaria), pero generalmente resultan de una extensión a piel de una amibiasis invasora intestinal y en estos casos se habla de una amibiasis secundaria (59).

Las regiones perianales, genitales y de la pared abdominal son los sitios que E. histolytica invade más frecuentemente. La amibiasis cutánea se caracteriza por ulceraciones que tienen una extensión variable, con un fondo rojo oscuro cuyo centro está mamelonado y casi se encuentra cubierto por una -



secreción purulenta. Los bordes de la lesión son irregulares pero bien definidos y contienen un moderado infiltrado pluri celular. Las ulceraciones son dolorosas (81). En México, la frecuencia de la amibiasis cutánea oscila entre 0.03-0.05 -- por ciento de todas las consultas dermatológicas; en el Centro Dermatológico de la ciudad de México, se ha comprobado una incidencia similar (22).

Una revisión (60) que reunió el trabajo realizado en 30 centros dermatológicos de México y América Central encontró que de 18 500 pacientes con enfermedades de la piel, sólo 52 (0.028 por ciento) tenían amibiasis cutánea. De este grupo, - 38 fueron adultos y 14 menores de 15 años.

La amibiasis cutánea era considerada una entidad nosológica poco frecuente hasta 1949 cuando se publicó el primer caso en México (54). La segunda comunicación sobre esta enfermedad se demoró hasta el año 1956. Este último trabajo informó el caso de una mujer de 45 años con lesiones destructivas de la nariz, parpado inferior y mejilla izquierda. La autopsia reveló la presencia de trofozoitos en la piel mientras -- que el hígado y el intestino no tenían lesiones amibianas -- (17). En este trabajo se informó que hasta esa fecha solamente se habían publicado aproximadamente 55 casos en la literatura mundial.

La amibiasis perianal ha sido observada en lactantes - mujeres y hombres. En 1956 se publicó el cuadro clínico que presentaba un varón de 26 años (75), al cual se le estudió la secreción de las ulceraciones en la piel y se le pudo -- comprobar la infección por trofozoitos de E. histolytica. - El estudio histopatológico mostró un infiltrado de linfocitos, eosinófilos, PMN, células plasmáticas y trofozoitos. - Más adelante también se publicó otro caso de un hombre de - 25 años (81), al cual también se le hizo el diagnóstico de amibiasis cutánea después que se encontraron los trofozoitos en el exámen directo del exudado. La lesión era una zona ulcerada con fondo necrótico y el estudio microscópico reveló un infiltrado de leucocitos, plasmocitos y macrófagos.

En 1970 se publicaron 7 casos de amibiasis cutánea en lactantes. En 5 niños la lesión fue vulvar, en otros fue pe rianal y en el último en la región inguinocrural (64). En - estos niños se propuso que el mecanismo de infección fue el contacto heces-piel, ya que en los 7 pacientes se pudo de-- mostrar una amibiasis intestinal. Existen varias publicacio nes sobre amibiasis en personas del sexo masculino (47) y - también en mujeres (33).

En 1980 se publicó el caso de una mujer de 45 años con lesiones de amibiasis cutánea que invadía pared abdominal y

que eran secundarias a un absceso hepático (22). También - existen algunos informes clínicos sobre algunos pacientes excepcionales, como el de una mujer de 54 años con lesiones en el pliegue inguinal (40) y el de una niña de cuatro meses con una extensa ulceración en el párpado izquierdo, la cual se extendió por la órbita del ojo (9).

### III. MATERIAL Y METODOS.

#### 1. Ratas.

Se utilizaron ratas Wistar, machos libres de patógenos de tres meses de edad y con un peso aproximado de 300-400 g. Los animales fueron proporcionados por el Bioterio del Hospital Infantil de México "Federico Gómez". Durante todo el experimento se alimentaron ad libitum con purina (Purina de -- México, S.A.) y agua.

En el primer experimento los animales se dividieron en 4 grupos, según el inóculo subcutáneo contuvieron diferentes cantidades de trofozoitos vivos, trofozoitos muertos por ultrasonido, yema de huevo y medio de cultivo axénico. Posteriormente, a cada una de las ratas de estos grupos se les investigaron los títulos hemaglutinantes de anticuerpos séricos anti-E. histolytica.

Las ratas del segundo experimento fueron inyectadas por vía S.C. con una cantidad constante de trofozoitos de E. histolytica, conforme al diseño experimental que se describe más adelante y sus tejidos fueron utilizados para estudiar la -- evolución de la lesión.

## 2. Entamoeba histolytica.

Se utilizó la cepa HK-9 que se había multiplicado en el medio axénico TS-Y-33 propuesto por Diamond (26). Una vez que el protozoario mantuvo su crecimiento estable (aproximadamente  $1 \times 10^6$  trofozoitos/10 ml de medio), esta cantidad se inoculó en matraces de 125 ml que contenían 90 ml del medio axénico. Se incubaron a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos para que se desprendieran los trofozoitos adheridos al vidrio. El contenido de cada matraz se decantó en varios tubos de 40 ml para centrifugar a 2000 rpm durante 30 minutos.

Los trofozoitos separados se contaron en una cámara de Neubaver y luego su número se ajustó a la concentración adecuada para inyectar a los animales.

Las ratas de un grupo testigo recibieron un inóculo de trofozoitos muertos que habían sido tratados con ultrasonido a 60 Watts, dos veces durante 5 minutos cada una a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . Las amibas estuvieron suspendidas en el medio de cultivo axénico y, antes de ser destruídas por el ultrasonido su concentración fue ajustada al mismo número de amibas/ml que las del inóculo de trofozoitos vivos.

Aproximadamente  $5 \times 10^8$  trofozoitos fueron utilizados para preparar un extracto de antígeno amibiano que sirvió -

para titular por hemaglutinación indirecta (HGI) los anticuerpos anti-E. histolytica del suero de las ratas del primer experimento. Estos trofozoitos fueron separados del medio de cultivo y se lavaron 6 veces con solución salina isotónica estéril. Posteriormente, fueron sometidos al efecto del ultrasonido, en la misma forma que ya se mencionó. El contenido proteínico de este extracto crudo de antígenos amebianos se calculó según la técnica de Lowry (20). Después de probar varias concentraciones, se encontró que 10 mg/ml era la cantidad adecuada para ferrar los glóbulos rojos de carnero utilizados en la reacción de HAI, ya que esta fue la menor cantidad de antígeno con la cual se mantuvo la sensibilidad de la prueba. Una vez preparado el extracto crudo, se repartió en alícuotas de 1 ml y se guardó a  $-40^{\circ}\text{C}$  en un congelador Revco (Deerfield, Mich.) hasta el momento de su uso.

### 3. Reactivos biológicos.

3.1. Glóbulos rojos de carnero (GRC). Se obtuvieron por punción de la vena yugular de un carnero adulto y sano. La sangre de este animal se mezcló, volumen a volumen con la solución anticoagulante de Alsever previamente esterilizada (20) y luego se guardó a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los GRC solamente se utilizaron cinco días después de sangrar el animal y no más de cuatro

semanas de tenerlos en refrigeración. Estos GRC sirvieron como soporte para los antígenos del extracto crudo amibiano utilizado en la técnica de HAI. Se prepararon al 2.5 por ciento, suspendidos en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.15 M, NaCl 0.15 M, pH 7.2 (39).

3.2. Suero normal de conejo (SNC). Por punción intracardíaca se obtuvo sangre de conejo de la raza Nueva Zelanda, sanos, adultos, con un peso aproximado de 3 kg. La sangre fue centrifugada a 2500 rpm, durante 20 minutos. Una vez separado el suero, fue descomplementado por calor a 56°C durante 30 minutos.

Finalmente fue distribuido en alícuotas de 1 ml y conservado a -40°C hasta el momento de su uso. El SNC se utilizó al 1 por ciento en solución amortiguadora de PBS, pH 7.2 para evitar la aglutinación espontánea de los GRC tanados y forrados con el antígeno, durante la prueba de HAI.

3.3. Suero de ratas. Durante el primer experimento y mientras los animales estuvieron vivos, se tomaron 2 muestras de 2 ml de sangre cada una, de cada rata. Primero la sangre se obtuvo de las venas femorales de los animales, previa disección del paquete vasculonervioso. Al final del experimento, la sangre se obtuvo por punción del ventrículo derecho,

con el torax abierto y el corazón expuesto, mientras la --  
rata se encontraba anestesiada con éter. Cada muestra se --  
dejó coagular a la temperatura ambiente y luego fue centri-  
fugada a 2500 rpm durante 15 minutos. Con una pipeta Pas--  
teur se aspiró el sobrenadante, el cual fue calentado a --  
56°C durante 30 minutos con el fin de descomplementarlo. --  
Luego todos los sueros se conservaron a -20°C (en un conge-  
lador American) hasta el momento de su uso para titular los  
anticuerpos anti-E. histolytica.

#### 4. Reactivos químicos.

4.1. Acido tánico ( $C_{76}H_{52}O_{46}$ ), Mallinckrodt Chemical Works.  
Se preparó una dilución inicial 1:1000 (1mg/ml) en solución  
amortiguadora de PBS, pH 7.2, con volumen final de 50 ml.  
Para que el ácido tánico quedara diluido 1:20,000 en el mo-  
mento de su uso, la solución inicial fue diluida 1:20.

4.2. Albúmina sérica bovina (Sigma). A una concentración -  
de 1 mg/ml en solución 0.1 N de hidróxido de sodio, 10 ml.

4.3. Bicarbonato de sodio ( $Na_2CO_3$ ), J.T. Backer, S.A. (So-  
lución A).

A una concentración de 20 mg/ml en solución de hidró-  
xido de sodio 0.1 N, siempre se preparaba el mismo día de  
su uso.



4.4. Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), Mallinckrodt Chemical Works, (Solución B). A una concentración de 5 mg/ml, en agua destilada y luego se conservaba en frasco de color -- ambar a temperatura ambiente, 50 ml.

4.5. Tartrato de sodio y potasio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), Mallinckrodt Chemical Works (Solución C). A una concentración de 10 mg/ml en agua destilada, con volumen final de 50 ml.

4.6. Reactivo de fenol. Folin-Ciocalteu, (Merck, S.A.). A una dilución de 1:2 en agua destilada en el momento de su uso.

4.7. Hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ), J.T. Backer, S.A. A una -- concentración de 0.1 N en agua destilada, 100 ml.

4.8 Solución de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ), (J.T. Backer, S.A. A 0.15 M en agua destilada, solución salina isotónica.

4.9. Solución anticoagulante de Alsever, preparada según -- modificaciones de Cambell y Col (20) en la siguiente forma.

Glucosa	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	20.50 g
Cloruro de sodio	$\text{NaCl}$	4.20 g
Acido cítrico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	0.55 g
Citrato de sodio	$\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_7\text{Na}$	8.00 g
Agua destilada	$\text{H}_2\text{O}$ cbp	1000 ml

Esta solución se preparó el mismo día de su uso. El pH se ajustó a 6.1 (Potenciómetro Metrohm, E-520) y luego se esterilizó en autoclave (Wilmot Castle G., N.Y., H-20) a 15 libras de presión, durante 15 minutos. Se utilizó para conservar la sangre de carnero V/V de la cual se obtenían los que fueron empleados en la reacción de HAI.

4.10. Solución amortiguadora de fosfatos 0.15 M, NaCl 0.15 M, pH 7.2 (39).

Fosfato monobásico de potasio	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.15 M
Fosfato dibásico de sodio	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0.15 M

Las dos soluciones de fosfatos 0.15 M se esterilizaron por separado, mediante filtración a través de una membrana de poros de 0.20 micras de diámetro (Millipore). Después se guardaron a 4°C hasta el momento de su uso.

El pH se ajustó a 7.2 al mezclar 24 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15 M más 76 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.15 M. Luego se añadió 100 ml de NaCl 0.15 M, se checó el pH y cuando fue necesario, se ajustó con solución de HCl 0.1 N.

4.11. Solución amortiguadora de fosfatos 0.15 M, NaCl 0.15 M, pH 6.4. Se mezclaron 32.2 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  más 67.8 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.15 M más 100 ml de NaCl 0.15 M. Solamente si es necesario, el pH se ajusta a 6.4 con una solución de HCl 0.1 N.

4.12. Medio de cultivo axénico para Entamoeba histolytica TS-Y  
33 (26).

Peptona de Biotriptasa (extracto de levadura y digerido triptico de carne (Bioxon) .....	2.6	g
Glucosa .....	1.0	g
Cloruro de sodio .....	0.2	g
Fosfato de potasio monobásico .....	0.06	g
Fosfato de potasio dibásico .....	0.1	g
L-Cisteína (hidroclorido monohidrato) .....	0.1	g
Acido L-ascórbico .....	0.02	g
Citrato férrico .....	0.0022	g
Agua destilada .....	87.00	ml

Esta solución se preparó bajo condiciones de estricta --esterilidad frente a campana de flujo laminar. El pH 6.8-6.9 --se ajustó con hidróxido de sodio 1.0 N. Esta solución se esterilizó en autoclave a 121°C con 15 libras de presión, durante 15 minutos. Se efectuó prueba de esterilidad en estufa a 35°C, durante 24 horas y solamente se conservaron para su uso, aquellos matraces en los cuales no hubo crecimiento bacteriano. En el momento de usarse al medio de cultivo, se añadió el suero --bovino (Microlab) inactivado y la mezcla vitamínica de Diamond (Microlab NCTC-107) en las siguientes cantidades y en condiciones estériles.

1 U

Medio de cultivo	87.00 ml
Suero bovino	11.60 ml
Mezcla vitamínica/-	3.48 ml
Tween 80.	

## 5. Material de laboratorio.

- 5.1 Espectrofotómetro Coleman Jr. Modelo 6/20.
- 5.2 Autoclave Wilmot Castle, Rochester N.Y., Modelo H-20.
- 5.3 Potenciómetro Metrohm Herin E-520.
- 5.4 Centrifuga Internacional Equipment Co., Serie 428-14605.
- 5.5 Congelador Revco, Mod. SZB.
- 5.6 Balanza analítica Sartorius, Modelo 2442.
- 5.7 Sonicator Lab-Line Ultratip, Lab. Sonic. Septem. No. 9100
- 5.8 Refrigerador.
- 5.9 Balanza granataria.
- 5.10 Baño de maría BTL, ajustado a 37°C.
- 5.11 Baño de maría Porta Temp, Precisión Scientific Co. a 56°C.

## 6. Procedimiento experimental.

Se diseñaron dos experimentos en dos grupos de ratas Wistar:

6.1 El primer grupo estuvo formado por 29 ratas, machos de tres meses de edad y con un peso aproximado de 300-400 g.

Inicialmente, 11 ratas fueron inyectadas por vía SC con diferentes cantidades de trofozoitos vivos de E. histolytica cultivada en condiciones axénicas (10, 30, 50, 60, 75, 80, - 90, 100 y  $120 \times 10^6$ ). La inyección se practicó siempre por vía SC, en la mitad superior de la línea media del abdomen, en un punto, que siempre quedaba 1 cm por abajo del apéndice del esternón.

Antes de la inyección, cada animal fue anestesiado con éter. Se le rasuraban los pelos de la región inguinal y también los de la mitad superior de la pared abdominal, la piel se limpiaba con alcohol y, después, con un bisturí se practicaba una incisión de aproximadamente 1 cm de largo en la región derecha. Se disecaba la vena femoral y con una jeringa de 5 ml y aguja del No. 21, se aspiraban, aproximadamente - 2 ml de sangre venosa, que pasaba a un tubo de ensayo, sin - anticoagulante.

Después de hacer presión sobre la vena femoral durante 1 ó 2 minutos, se procedía a suturar la piel con seda negra No. 000 y al final nuevamente se practicaba asepsia de la - piel. El procedimiento fue rápido, particularmente porque el animal se encontraba anestesiado y sujeto a una pequeña mesa, con sus extremidades extendidas y fijas en cuatro puntos.

Inmediatamente después se practicaba la inyección SC de trofozoitos.

Una semana más tarde, cada rata era anestesiada nuevamente, repitiendo el mismo procedimiento sobre la vena femoral - del otro lado de la cual se obtenía la misma cantidad de sangre.

Finalmente, una semana después, previa anestesia con éter, se abrió el tórax para exponer el corazón y con una jeringa de 10 ml y aguja No. 21, se procedía a puncionar el ventrículo derecho y exanguinar la rata.

A los sueros obtenidos de cada muestra de sangre, se les determinó posteriormente el título de anticuerpos anti-E. histolytica por HAI.

Como la rata no es el hospedero natural de E. histolytica y como además la cepa HK-9 resulta avirulenta después de varios años de cultivo en condiciones axénicas, se buscó algún procedimiento que aumentará tanto la invasividad de los trofozoitos como su permanencia en el tejido SC. La yema de huevo fue escogida entonces por su elevado contenido de colesterol (2) y por el efecto comprobado de esta sustancia sobre la invasividad de E. histolytica (15).

En resumen, este primer experimento se realizó en 29 ratas, de las cuales 1 rata murió por septicemia durante el --

experimento las restantes estuvieron divididas en 4 grupos.

1er. Grupo: 11 ratas que fueron inyectadas con diferentes cantidades de trofozoitos vivos de E. histolytica resuspendidos en 2 ml de medio axénico más 2 ml de yema de huevo de gallina.

2o. Grupo: 8 ratas inyectadas con  $1 \times 10^8$  trofozoitos muertos en 2 ml de medio axénico más 2 ml de yema de huevo.

3er. Grupo: 5 ratas inyectadas únicamente con yema de huevo.

4o. Grupo: 5 ratas inyectadas únicamente con medio de cultivo axénico.

6.2 Para el segundo experimento se utilizaron 52 ratas, las cuales también fueron separadas en 4 grupos.

1er. Grupo: Se trabajó sobre 20 animales inyectados con  $1 \times 10^8$  trofozoitos vivos de E. histolytica en 2 ml de medio axénico más 2 ml de yema de huevo.

2o. Grupo: 16 se inyectaron con  $1 \times 10^8$  trofozoitos muertos en 2 ml de medio axénico más 2 ml de yema de huevo.

3er. Grupo: 16 ratas se inyectaron únicamente con yema de huevo.

4o. Grupo: 4 ratas se inyectaron únicamente con medio de cultivo axénico.

Diariamente se observó y se llevó un registro de la forma como evolucionaban las alteraciones macroscópicas que aparecieran en el sitio de inyección (como color de la piel, edema, tamaño de la tumoración, consistencia, adherencia a planos profundos, etc.), así como también el estado general de la rata.

Estos animales fueron sacrificados previa anestesia con éter, de dos en dos, con intervalos de 24 horas.

Después de sacrificados se les retiró la piel y subcutáneo abdominal, correspondiente al sitio de inyección, con un exceso de tejido circundante. Los tejidos separados de las ratas fueron conservados en formol al 10 por ciento antes de procesarlos para un estudio microscópico.

#### 7. Técnica de Hemaglutinación indirecta (HAI) (20).

Se utilizó para investigar los títulos de anticuerpos contra los antígenos de E. histolytica, presentes en el suero de la ratas del primer experimento. La reacción se llevó a cabo en la siguiente forma.

7.1 Aproximadamente 3 ml de sangre de carnero en solución



de Alsever, se mezclaron con 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos PBS, pH 7.2, se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos. Cuando los GRC estuvieron lavados tres veces, entonces el sedimento se resuspendió al 2.5% en el mismo amortiguador.

7.2 En un tubo de ensayo se mezclaron 3 ml de la suspensión de GRC al 2.5% más 3 ml de la solución de ácido tánico 1:20,000. Se dejó en reposo en baño maría a 37°C durante 10 minutos.

7.3 Los GRC tratados se lavaron tres veces con PBS, pH 7.2 y al final se resuspendieron en 3 ml de PBS 0.15 M pH 6.4.

7.4 Para que los GRC tanados quedaran sensibilizados con los antígenos amibianos, se mezclaron 4 ml de PBS pH 6.4 más 1 ml de la solución que contenía los antígenos amibianos solubles más 1 ml de la suspensión de GRC tanados, la suspensión se agitó y se dejó en reposo a temperatura ambiente, durante 10 minutos.

7.5 La suspensión de GRC sin antígeno que sirven como control negativo, se prepararon en la misma forma que la anterior, solo que en lugar de 1 ml de la solución con los antígenos, se añadió al tubo 1 ml de solución salina isotónica.

7.6 Las dos suspensiones de GRC con y sin antígeno (GRC c/Ag y GRC S/Ag) absorbido, fueron centrifugados dos veces con -

SNC en PBS pH 7.2 para eliminar el antígeno libre. Finalmente los paquetes celulares se resuspendieron en 1 ml de SNC, 1% en SSI.

7.7 Se prepararon soluciones progresivas, módulo 2X, de cada suero de rata, comenzando con una dilución 1:2 y con un volumen final de 0.5 ml. Se utilizó como diluyente la solución de suero de conejo al 1% en PBS pH 7.2. A cada uno de los tubos se añadió 0.05 ml de suspensión de GRC sensibilizados. Junto con el sistema se practicaron los siguientes testigos:

Testigo positivo: 1. Suero de conejo anti-amiba (título conocido) más GRC c/Ag.

Testigos negativos: 1. Suero de conejo anti-amiba más GRC s/Ag.  
2. Diluyente más GRC c/Ag.  
3. Diluyente más GRC s/Ag.

7.8 Los tubos se agitaron hasta homogenizar la suspensión, y se dejaron en reposo toda la noche, a temperatura ambiente.

7.9 Se calificó la hemaglutinación que se formaba en cada tubo y se consideraron positivos aquellos en los cuales las células rojas tendían a extenderse como una película, fueron negativos aquellos otros en los cuales los glóbulos rojos sedimentaron formando un anillo estrecho o un botón.

8. Técnica de Lowry (20).

Utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu para la cuantificación colorimétrica de proteínas.

Para conocer el contenido proteínico del antígeno amibiano en solución se preparó una solución patrón de albúmina sérica bovina, 1 mg/ml en solución de NaOH 0.1 N. A 6 tubos numerados y por duplicado, se añadieron diferentes cantidades de esa solución de albúmina y el volumen final se llevó hasta 200 ul con la solución de NaOH 0.1 N, de la siguiente forma:

Tubo	NaOH ml	Albúmina 1 mg/ml ml	Concentración de proteína ug/ml
1	--	0.200	200
2	0.050	0.150	150
3	0.100	0.100	100
4	0.150	0.050	50
5	0.175	0.025	25
6	0.195	0.005	5
7	0.200	--	--

La solución problema, que contenía los antígenos solubles de E. histolytica, se diluye 1:2, 1:4 y 1:8 en solución de -- NaOH 0.1 N, con volumen final de 200 ul, también por duplicado.

La prueba necesita tener preparadas tres soluciones (A, B y C) que ya fueron mencionadas. Minutos antes de llevar a cabo la reacción se mezclan en la siguiente forma: 50 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2%, en NaOH 0.1 N, más 1 ml de  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$  1%, en agua destilada, más 1 ml de  $\text{CuSO}_4$  0.5%, en agua destilada.

Una vez preparada, a cada tubo se le añade 1 ml de esta mezcla más 0.1 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu o solución D. Los tubos se agitaron y se dejaron en reposo en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 60 minutos, antes de leer la absorción a 550 nm.

La absorción (Y) del contenido de los seis tubos con diferentes cantidades conocidas (X) de albúmina bovina, permiten trazar una línea recta de referencia, en la cual se interpola la absorción de los tubos problema. Los resultados se multiplicaron por el factor de dilución y así se obtuvo la cantidad de  $\mu\text{g/ml}$  de proteína en las soluciones que contenían los antígenos de E. histolytica (Fig. 1).

#### 9. Inclusión en parafina (43).

Los tejidos de las ratas que se utilizaron en el segundo experimento, fueron incluidos en parafina para poder cortarlos y luego teñirlos, antes de su estudio microscópico, el -

cual se llevó a cabo en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Infantil de México.

9.1 Fijación: Se utilizó formol al 10% neutro, el cual tiene por objeto coagular los fluidos proteicos de las células, endurecer los geles, e inactivar enzimas, además de que el formol tiene un efecto antiséptico.

9.2 Deshidratación: Consiste en extraer el agua del tejido, pasandolo por diferentes concentraciones de alcohol al 60%, 70%, 80% y 90% en forma progresiva hasta que el agua haya sido remplazada por la última concentración.

9.3 Aclaración: En este paso se substituye el alcohol 90% por xilol, el cual es soluble tanto en alcohol como en parafina.

9.4 Inclusión: El xilol es desplazado por la parafina fundida, a una temperatura de 58-60°C, formándose un bloque que incluye al tejido.

9.5 Corte: El bloque de tejido se monta en el microtomo para efectuar cortes de 6-10 micras, dependiendo de la técnica a efectuar, después los cortes se montan sobre portaobjetos.

9.6 Aclaración: En el tejido cortado se inicia la rehidratación, sustituyendo la parafina por el xilol.

9.7 Rehidratación; La hidratación es necesaria para poder teñir el tejido, ya que la mayoría de los colorantes sólo actúan en el medio acuoso. Para esto el tejido pasa por las concentraciones de alcohol mencionadas en orden decedente hasta llegar al agua.

9.8 Tinción; Para el estudio histopatológico del corte de la piel y tejido SC, se efectuaron las siguientes tinciones:

1. Hematoxilina y eosina: Para la identificación de núcleo y citoplasma.
2. Tricrómica de Masson: Permite hacer una diferenciación entre colágena del músculo y los cambios fibróticos.
3. Tinción de Wilder; Demuestra fibras reticulares específicamente.
4. Tinción del ácido peryódico de Schiff (Reacción de PAS): permite distinguir la membrana basal, fibras reticulares, fibras de colágena, glucógeno, etc.
5. Impregnación argéntica de Grocott: Permite diferenciar - las amibas, mucinas, glucógeno, etc.

## IV. RESULTADOS.

I. A partir de una solución de albúmina sérica bovina, 1 mg/ml, se prepararon varias diluciones que sirvieron para conocer los puntos de la línea recta de calibración (Fig. 1), conforme a la técnica de Lowry. En un Coleman Jr y con una longitud de onda de 550 nm, se obtuvieron las siguientes lecturas:

Tubo	Albúmina	Absorción
1	200 ug/0.2 ml	0.71
2	150 ug/0.2 ml	0.55
3	100 ug/0.2 ml	0.41
4	50 ug/0.2 ml	0.22
5	25 ug/0.2 ml	0.15
6	5 ug/0.2 ml	0.06

En la gráfica de la Fig. 1 no viene corregido el factor volumen, de modo que en el eje de las abscisas los valores se presentan como ug/0.2 ml. Por esta razón, después de tener las lecturas de las muestras problema (extracto crudo de antígenos ambianos) la concentración que se obtuvo al interpolar se multiplicó por el factor 5 (volumen) y luego por el factor 120 (dilución) para poder conocer el contenido proteínico del extracto en ug/ml.

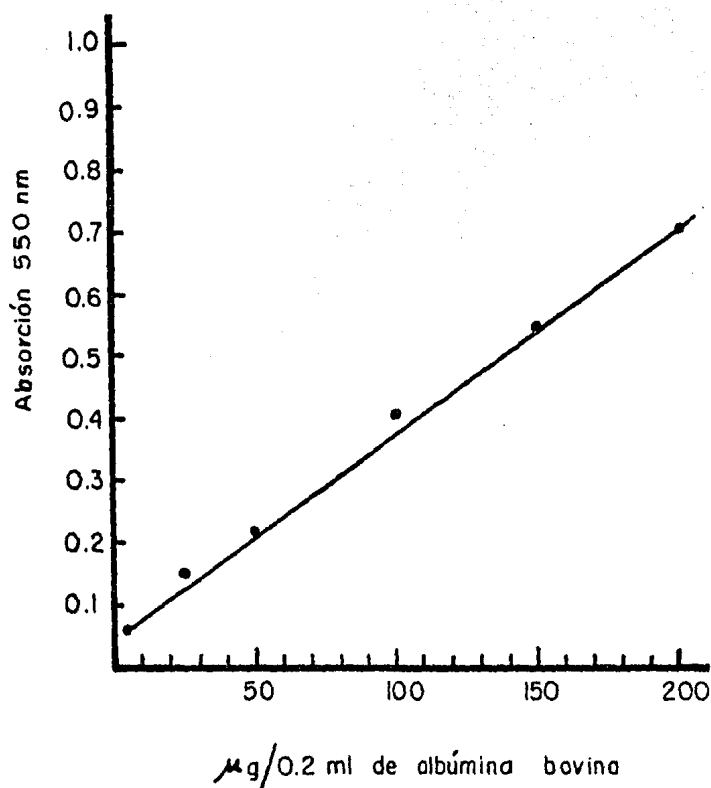


Fig. 1. Curva de calibración de proteínas  
(Técnica de Lowry).



TITULOS DE ANTICUERPOS		CANTIDAD DE TROFOZOITOS
7 días	14 días	X 10 <sup>6</sup>
1:8	1:16	10
1:16	1:64	30
1:32	1:32	50
1:4	1:64	60
1:8	1:64	75
1:256	1:256	80
1:64	1:256	90
1:32	1:128	100
1:256	1:512	100
1:64	1:256	120

CUADRO I. Títulos de anticuerpos hemaglutinantes anti-E. histolytica en dos muestras de suero tomadas a cada rata 7 y 14 días después de la inyección SC de diferentes cantidades de trofozoitos vivos más 2 ml de yema de huevo.

2. Después de inyectar diferentes cantidades de trofozoitos de E. histolytica en el tejido SC de 10 ratas Wistar; se tomaron dos muestras de sangre de cada uno de los animales, 7 y 14 días después de la inoculación. Los títulos de anticuerpos se investigaron por la técnica de HAI. Los resultados se presentan en el cuadro 1. Se obtuvo una correlación ( $r = 0.68$ ) entre las cantidades de trofozoitos inyectados y los títulos de anticuerpos anti-E. histolytica que se encontraron en las muestras de suero obtenidas al momento de sacrificar los animales, esto es, 14 días después de iniciado el experimento. Los valores teóricos de la línea recta se calcularon según un programa de correlación lineal (29) para una calculadora TI-59 (Texas Instruments).

$$y = mx + b$$

$$b = 36.65$$

$$m = 0.15$$

$$r = 0.68$$

Se aplicó la ecuación de la línea recta para conocer -- los valores de  $y'$ ,  $y''$ , cuando  $x' = 16$  y  $x'' = 512$ . Los resultados fueron 49.06 y  $123 \times 10^6$  trofozoitos. Con estos valores se trazó la línea recta de la (Fig. 2), conocida su pendiente ( $m$ ) y el punto de intersección del eje de las ordenadas ( $b$ ).

Un segundo grupo de 8 ratas fue inyectado con  $100 \times 10^6$

trofozoitos muertos por ultrasonido más 2 ml de yema de huevo. A estos animales también se les tomaron dos muestras de sangre 7 y 14 días después del inóculo. Los títulos de anticuerpos anti-E. histolytica se investigaron por la misma técnica de HAI. Los resultados se presentan en el (Cuadro II).

Un tercer grupo de 5 ratas fue inoculado solamente con 2 ml de yema de huevo y sus títulos de anticuerpos 7 y 14 días después, se presentan en el (Cuadro III).

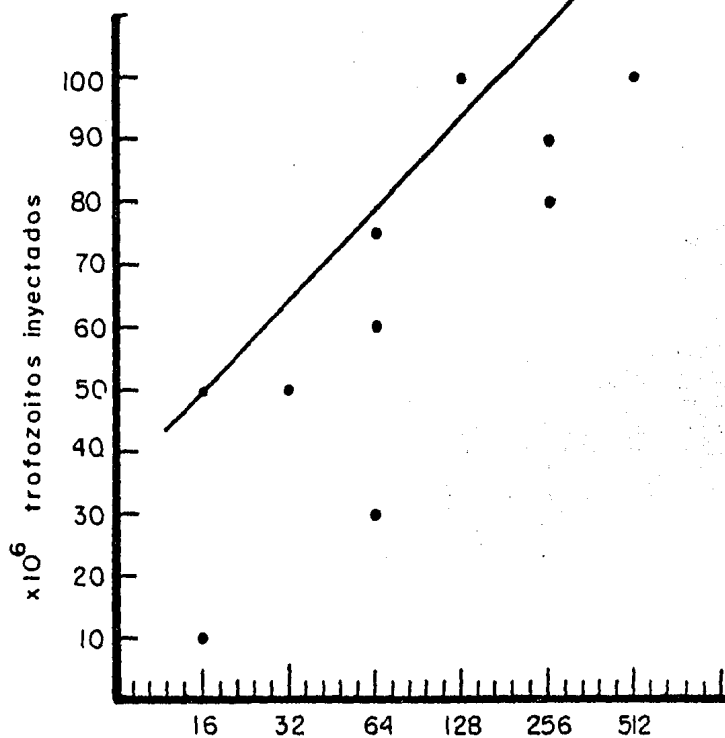
Finalmente, en el (Cuadro IV) están los resultados del último grupo de 5 ratas, las cuales fueron inyectadas solamente con medio de cultivo axénico.

Se calculó la media geométrica (MG) y la desviación estándar (DE) (24) de los títulos de anticuerpos anti-E. histolytica 7 y 14 días después de haber inyectado los inóculos en cada uno de los cuatro grupos de animales. Para estas operaciones se tomaron los valores recíprocos (R) de cada dilución.

$$MG = \text{antilog } \frac{\sum \log R}{N}$$

$$DE = \text{antilog } \sqrt{\frac{\sum (\log R^2) - (X \log R)^2}{N-1}}$$

En el (Cuadro V) se presentan los resultados obtenidos al calcular la media geométrica (MG) y desviación estándar (DE) de -



Reciproco del titulo de anticuerpos anti-E.histolytica

Fig. 2. Correlación lineal ente la cantidad de trofozoitos inyectados y los titulos de anticuerpos anti-E.histolytica

## TITULOS DE ANTICUERPOS

7 días	14 días
1:2	1:2
1:4	1:16
1:2	1:8
1:8	1:4
1:4	1:2
1:2	1:4
1:2	1:4
1:2	1:4

CUADRO II. Títulos de anticuerpos hemaglutinantes anti-E.histolytica en dos muestras de suero que fueron tomadas a cada rata 7 y 14 días después de la inyección SC de  $100 \times 10^6$  trofozoitos muertos más 2 ml de yema de huevo.

- A Trofozoitos vivos
- B Trofozoitos muertos
- C Yemas de huevo
- D Medios de cultivo

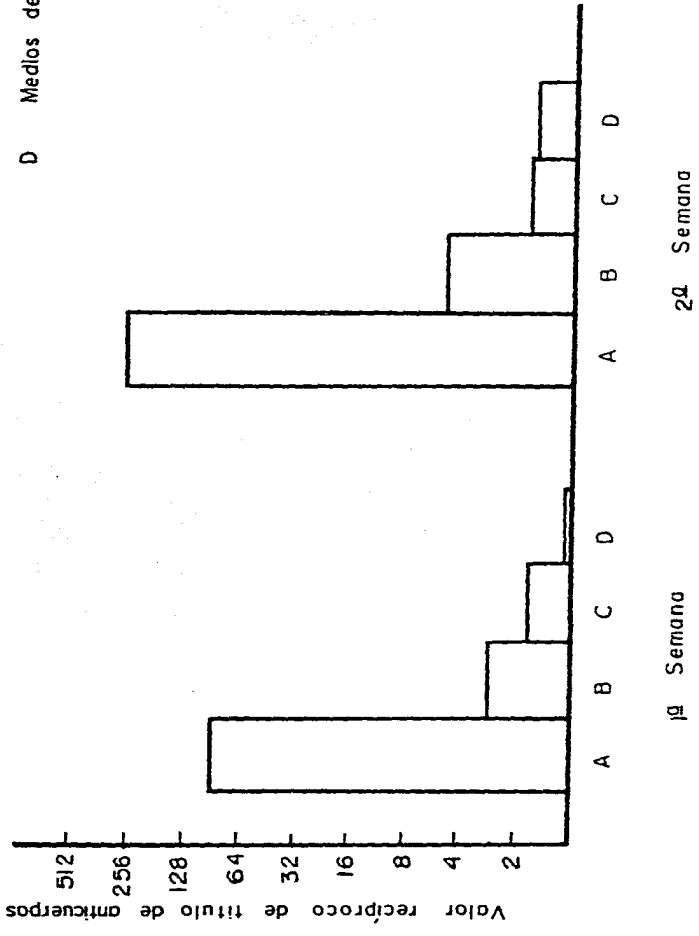


Fig. 3. Media geométrica de los títulos de anticuerpos anti-*E. histolytica*, 7 y 14 días después del inoculo en los 4 grupos de ratas.

## GRUPO CONTROL

7 días	14 días
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	NEG
1:2	1:8

CUADRO III. Títulos de anticuerpos hema-  
glutinantes anti-E. histolytica en dos  
muestras de suero que fueron tomadas a  
cada rata, 7 y 14 días después de la --  
inyección SC de 2 ml. de yema de huevo.

## GRUPO CONTROL

7 días	14 días
NEG	1:2
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	NEG
NEG	1:2

CUADRO IV. Titulos de anticuerpos hemaglutinantes anti-E. histolytica en dos muestras de suero que fueron tomadas a cada rata, 7 y 14 días después de la inyección SC de 2 ml de medio de cultivo axénico estéril.



los títulos de anticuerpos obtenidos 7 y 14 días después del inóculo en cada uno de los cuatro grupos de ratas.

Las diferencias se aprecian en la Fig. 3, al presentar en barras los valores mencionados en el párrafo anterior. Se puede observar, primero, que solamente al inocular trofozoitos vivos se obtuvo una buena respuesta de anticuerpos séricos anti-E. histolytica, con un aumento discreto de la primera a la segunda semana. Y segundo, que aún en el suero de -- las ratas que no recibieron inyecciones de trofozoitos (sino medio de cultivo axénico o yema de huevo) la prueba de HAI - fue positiva, aunque los títulos de anticuerpos fueron muy - bajos y, por consiguiente, no significativos.

No hubo diferencias estrictamente significativas ( $p > 0.5$ ) cuando se compararon entre sí los títulos correspondientes a las muestras tomadas durante la primera y la segunda semana en el primer grupo de ratas, esto es, en las que recibieron inóculos de trofozoitos vivos. El valor de "p" se obtuvo después de aplicar la prueba de Mc Nemar (82) para medidas no - parámétricas de muestras dependientes y los cálculos se presentan en el (Cuadro VI).

En cambio, sí existió una diferencia significativa intergrupos cuando, por medio de un análisis de varianza (82), se compararon los valores recíprocos de los títulos de ----

Inóculo	7 días		14 días	
	MG	DS	MG	DS
A = Trofozoitos vivos	1:95 $\pm$	11.8	1:256 $\pm$	16.7
B = Trofozoitos muertos	1:2.8 $\pm$	1.9	1:4.3 $\pm$	2.4
C = Yema de huevo	1:1.1 $\pm$	1.4	1:1.5 $\pm$	2.6
D = Medio de cultivo	0		1:1.3 $\pm$	1.5

CUADRO V. Valores de la media geométrica y desviación estandar de los títulos de anticuerpos anti-E. histolytica obtenidos 7 y 14 días después del inóculo en cada uno de los 4 grupos de ratas.

Fuente de variación o varianza.	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	F	P
Entre grupos	3	303564	101188	24.38	<0.05
Intra-grupos	19	78850	4150		
T o t a l	22	382414			

CUADRO VII. Análisis de Varianza.

Títulos

		D I A S		
		7 días	14 días	
512				
256		A	B	
256	> 256	2	4	6
256	256=Mediana	C	D	
256				
128	< 256	3	1	4
64				
64		5	5	10
32				

$$X^2 = \frac{(A - D)^2}{A + D} = \frac{(2 - 1)^2}{2 + 1} = \frac{1}{3} = 0.33$$

Grados de libertad = 1

p &gt; 0.5

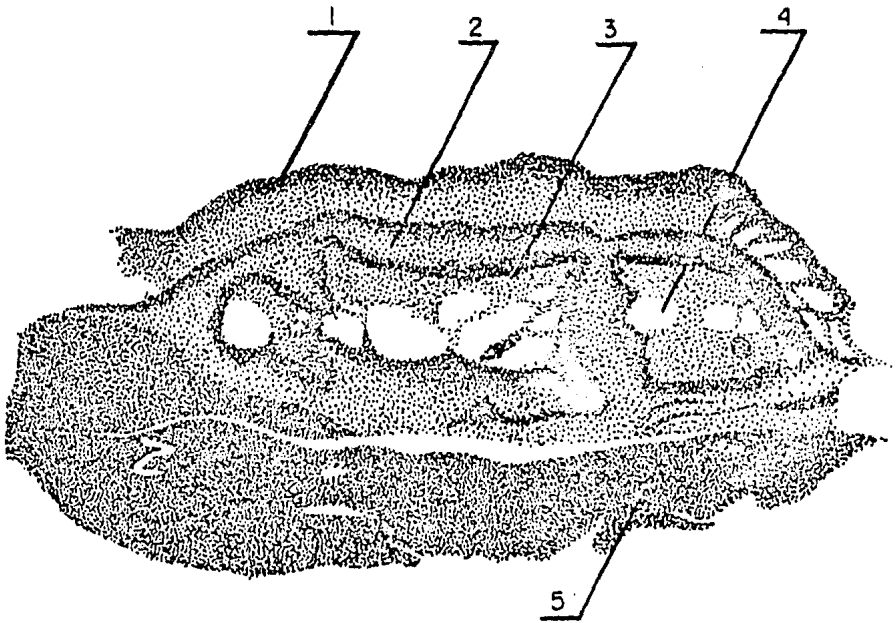
CUADRO VI. Prueba de Mc Nemar para muestras dependientes, aplicada para estudiar las diferencias entre los títulos de anticuerpos obtenidos a los 7 y 14 días en las ratas inyectadas con trofozoitos vivos de E. histolytica (Cuadro I).

anticuerpos que, al final de la segunda semana, tenían los sueros de los cuatro grupos de ratas que formaron parte del experimento. Los resultados vienen en el (Cuadro VII).

3. Todos los animales fueron examinados diariamente durante los días siguientes a la inoculación de los trofozoitos y se observaron muy pocos cambios en la condición general de las ratas. Durante los primeros días que siguieron a la inyección, hubo una ligera pérdida del apetito y cierta pasividad de los animales ante los estímulos externos. En la piel de la región abdominal se formó un nódulo de consistencia blanda y tamaño variable (aproximadamente 2.5 cm de diámetro). Este nódulo desapareció dos a tres días después cuando los animales fueron inyectados con yema de huevo, medio de cultivo o pequeñas cantidades de trofozoitos vivos; pero persistió durante más de diez días cuando los animales se inyectaron con 100 millones o más de trofozoitos vivos. No hubo cambios en el color de la piel, la cual fue rasurada antes de iniciar cada experimento.

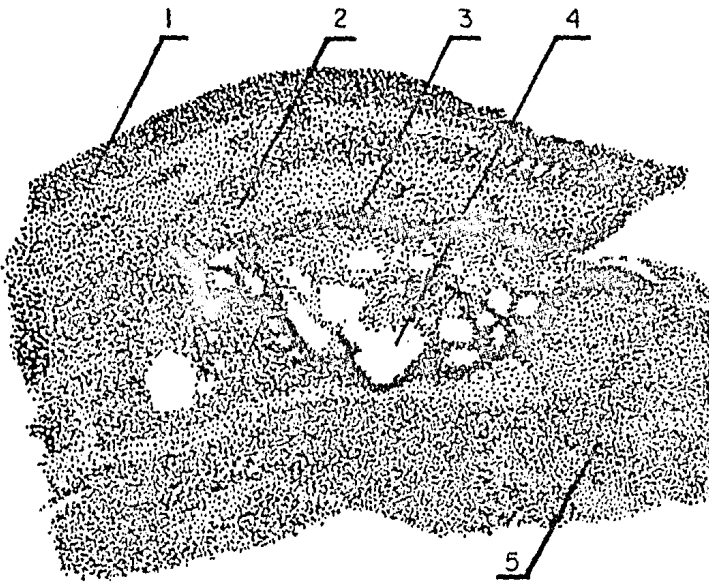
4. Cuando las ratas fueron inyectadas por vía SC con trofozoitos vivos más yema de huevo, en el sitio de la inoculación ocurrió una intensa reacción inflamatoria.

En los animales que fueron sacrificados a las 24 horas, se encontró una extensa zona de necrosis tisular central, --



1. Epidermis
2. Infiltrado de leucocitos Polimorfonucleares y Macrófagos
3. Trofozoitos de E. histolytica
4. Necrosis central
5. Tejido muscular

Fig. 4. Esquema de las lesiones en un corte de piel de rata, 48 horas después de inyectar trofozoitos vivos de E. histolytica por vía subcutánea.



1. Epidermis
2. Infiltrado de Linfocitos y Células plasmáticas
3. Tejidos de granulación, Fibroblastos y neofor-  
mación de pequeños vasos sanguíneos
4. Necrosis central que contiene trofozoitos  
y Macrófagos
5. Tejido muscular

Fig. 5. Esquema de las lesiones en un corte de piel de rata, 4 días después de inyectar trofozoitos vivos de E. histolytica por vía subcutánea.

rodeada por abundantes trofozoitos y leucocitos PMN (Fig. 4).

En las ratas que fueron sacrificadas varios días después de la inyección de trofozoitos vivos, el examen microscópico reveló una serie de cambios que modificaron la imagen inicial. Sin embargo, los trofozoitos siempre se mantuvieron alrededor de la lesión central, nunca se extendieron a los tejidos vecinos ni tampoco aumentaron su número. Más bien, fueron disminuyendo progresivamente hasta que, ocho días después de la inoculación, en la piel sólo quedaba un reducido número de amibas, aunque todas ellas conservaban intacta su morfología. El infiltrado de PMN también disminuyó rápidamente y siempre estuvo concentrado alrededor de la zona de necrosis.

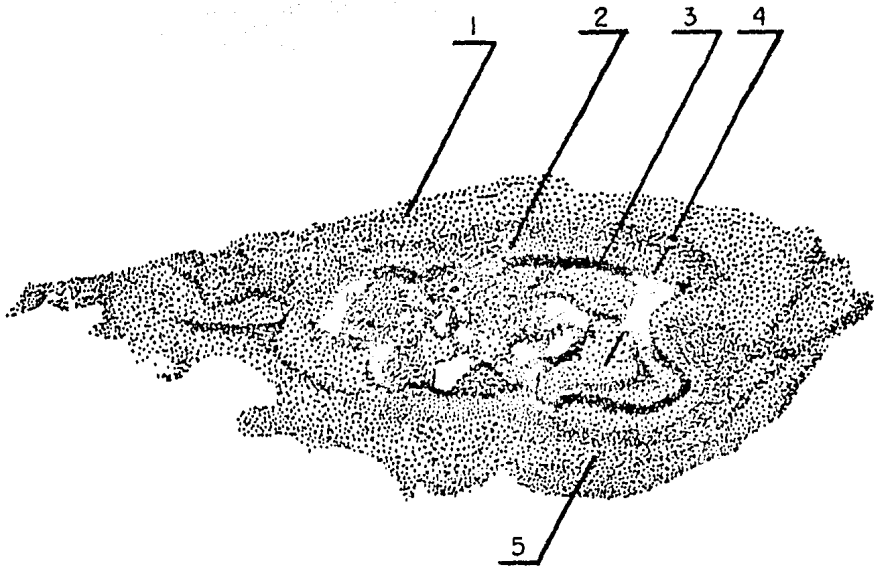
A partir de las 48 horas, los PMN comenzaron a ser desplazados por macrófagos vacuolados que, en algunos casos, adoptaron una forma epiteloide. En las ratas que fueron sacrificadas seis días después de la inyección, ya el infiltrado de linfocitos estaba compuesto casi exclusivamente por células mononucleares.

Los fibroblastos y la neoformación de pequeños vasos sanguíneos (es decir, lo que se conoce como "tejido de granulación") aparecieron alrededor de la lesión central en las ratas sacrificadas 72 horas después de recibir el inóculo. En estos mismos animales se observó una síntesis incipiente de colágena

que comenzó a formar una envoltura limitante de los trofozoitos y el tejido dañado. Este "halo" de colágena tuvo su máximo esplendor aproximadamente seis días después de la inyección. En ese momento, todavía la lesión necrótica central -- contenía trofozoitos y macrófagos, los cuales estaban localizados en su porción más extensa. Hacia afuera, entre la necrosis y el tejido de granulación, se encontró un infiltrado pluricelular en el cual predominaban los linfocitos y las células plasmáticas. Este infiltrado fue evidente a partir del cuarto día (fig. 5) y luego el número de células fue aumentando progresivamente durante tres días más, hasta que dejó de ensancharse la envoltura de tejido de granulación y la colágena comenzó a evolucionar hacia la fibrosis.

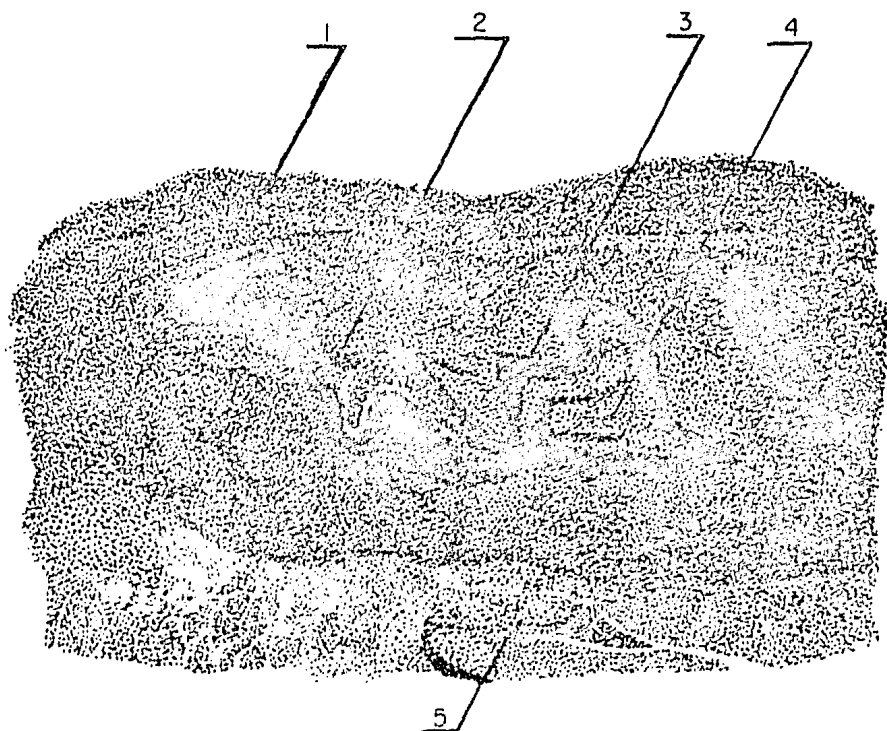
Aproximadamente entre el día sexto y el séptimo (fig.6) comenzaron a observarse células cebadas entre el infiltrado de linfocitos. En las ratas que se sacrificaron posteriormente, se encontró que la lesión estaba infiltrada por una cantidad cada vez mayor de estas células con granulaciones. -- Diez días después de la inyección de los trofozoitos, ya que no se encontraban amibas y la zona de necrosis central estaba bien limitada por una envoltura de tejido fibrótico. Continuaron presentes abundantes linfocitos, células plasmáticas y células cebadas, particularmente estas últimas, cuyo citoplasma ya no estaba cargado con abundantes granulaciones.





1. Epidermis
2. Infiltrado de Linfocitos, Células plasmáticas, Células cebadas con granulaciones
3. "Halo" de Colágena
4. Necrosis central que todavía contiene trofozoitos vivos
5. Tejido muscular

Fig. 6. Esquema de un corte de piel de rata, 7 días después de inyectar trofozoitos vivos de *E. histolytica* por vía subcutánea.



1. Epidermis
2. Infiltrado de Linfocitos, Células plasmáticas y Células cebadas degranuladas
3. "Halo" de Colágena que comienza a presentar fibrosis
4. Necrosis central limitada con escasos trofozoitos vivos
5. Tejido muscular

Fig. 7. Esquema de un corte de piel de rata, 9 días después de inyectar trofozoitos de E. histolytica por vía subcutánea.

La lesión evolucionó hacia una fibrosis (Fig. 7) que encerró un infiltrado crónico. Generalmente, ésta terminó por abrirse a la epidermis, diez a once días después de la inyección. Cuando ocurría esto, se observaba una reactivación del proceso inflamatorio y la cavidad se contaminaba con bacterias, pero los tejidos continuaban libres de trofozoitos.

5. Cuando las ratas se inyectaron con trofozoitos muertos - también se encontró, 24 horas después, una lesión necrótica subcutánea muy extensa con abundantes leucocitos PMN infiltrados alrededor y sin ninguna célula con características de amiba. Este infiltrado de leucocitos PMN predominó durante - más tiempo en comparación a las observaciones que se hicieron en las lesiones de las ratas del grupo anterior.

Por otra parte, las células cebadas aparecieron precozmente en las ratas sacrificadas a los 4 días. Su localización fue la misma, es decir, entre el infiltrado de leucocitos y células plasmáticas y, su número fue aumentando progresivamente en las lesiones que se observaban en las ratas sacrificadas durante los días siguientes. En estas ratas inyectadas con trofozoitos muertos, los macrófagos vacuolados llegaron a la lesión central dos días más tarde de lo que se observó cuando las ratas fueron inyectadas con trofozoitos vivos. - Por otra parte, el tejido de granulación se formó rápidamente para encerrar la lesión central en una envoltura de colágena.

6. En las ratas inyectadas solamente con medio de cultivo axénico estéril, no se encontró la zona de necrosis central. El infiltrado de células fagocíticas fue menor y los depósitos de colágena fueron escasos y focales.

Cuando las ratas se inyectaron solamente con yema de huevo, tampoco hubo necrosis tisular. Se observó un moderado infiltrado de células fagocíticas PMN que se mantuvieron activas durante poco tiempo. Los macrófagos substituyeron rápidamente el infiltrado inicial de modo que 48 horas después de la inyección ya predominaban las células mononucleares. El tejido de granulación formó una envoltura mucho más delgada. Estuvo presente un infiltrado de linfocitos, células plasmáticas y células cebadas que se pudo observar hasta en las ratas sacrificadas al octavo día. A partir de este momento en la parte más externa de la lesión se comenzó a organizar la fibrosis que substituyó al tejido de granulación.

## V. DISCUSION.

Con la ayuda de varias especies animales, algunos investigadores han estudiado la respuesta inmunitaria humoral anti ambiana después de infecciones experimentales que utilizan cepas axénicas o monoxénicas de E. histolytica.

Las amibas cultivadas en medio axénico han sido inoculadas intrahepáticamente a hamsters, cuya respuesta de anticuerpos séricos se han estudiado por medio de la técnica de hemaglutinación indirecta (HAI) y ELISA. La primera resultó específica y lo suficientemente sensible como para que fueran significativos los títulos de 1:16 en adelante. En cambio, la segunda técnica se tuvo que aceptar con el mismo valor de significancia solamente los títulos por encima de 1:32, aunque, en los casos de infección hepática ambiana, sólo los títulos mayores de 1:128 eran indicativos de la amibiasis invasora (69).

Otros autores han estudiado la inmunogenicidad de los -- antígenos lisosomales de E. histolytica. Este producto fue inyectado, mezclado con un adyuvante en la piel de un grupo de monos, los cuales recibieron la misma inmunización tres veces más, con intervalos de diez días entre cada inyección. Por medio de la contrainmunolectroforesis (CIEF) se comprobó una seroconversión, de negativo a positivo, en el 59.6 por ciento de los monos, con títulos significativos entre 1:2 y 1:4, los

cuales pueden considerarse sumamente bajos. Utilizando la técnica de la HAI, la seroconversión se observó en el 77.7 por ciento de los monos y los títulos oscilaron entre el 1:64 y 1:8 salvo algunos sueros que dieron títulos de 1:128. Esta última dilución ha sido considerada como el límite inferior de los valores necesarios para hacer el diagnóstico de amibiasis invasora en los humanos (8).

En otros experimentos, para comparar la respuesta inmunitaria de animales infectados o inmunizados con trofozoitos de E. histolytica, se ha utilizado como dosis infectiva la cantidad de  $1.5 \times 10^6$  trofozoitos de la cepa HM-2:IMSS inyectados por vía intrahepática. Como dosis inmunizante fue inoculada la misma cantidad, pero por vía intradérmica en el cojinete plantar de los hamsters. Los anticuerpos anti-E. histolytica fueron estudiados cualitativamente por medio de la técnica de CIEF y se encontró que la respuesta fue muy parecida en ambos grupos. La relación positivos/totales, a los 14 días de la inoculación, fue 3/5 en el grupo de animales infectados y 6/6 en el grupo inmunizado. Después de 28 días, la CIEF fue cien por ciento positiva en los dos grupos (73).

Con el objeto de desencadenar una reacción de Shwartzman en el hígado de conejos Nueva Zelanda, los animales fueron inoculados por vía intrahepática con endotoxinas de ---

Serratia mercenses y/o epinefrina. Posteriormente se les inyectaron, por vía endovenosa, trofozoitos de E. histolytica HK-9:NIH obtenidos de un cultivo axénico y también trofozoitos de la cepa monoxénica HM-2:IMSS (cultivada con Bacteroides symbiosus). Los animales fueron sacrificados cuatro días después de la inoculación. Los sueros de los animales se estudiaron por medio de la CIEF para buscar anticuerpos anti-E. histolytica, pero todos los sueros fueron negativos (96).

Krupp (53) logró inducir una buena respuesta inmunitaria en cobayos a los cuales se les inyectó tres veces por vía intramuscular con trofozoitos de E. histolytica 200:NIH, o sino con las fracciones I, II y III obtenidas por la separación cromatográfica del contenido de un extracto crudo de trofozoitos. Después de la administración de las dosis inmunizantes, los animales fueron infectados intracecalmente con  $2 \times 10^5$  trofozoitos y posteriormente fueron sacrificados siete días más tarde. La inmunización con la fracción I logró proporcionar una protección completa, ya que no se observaron lesiones en el colon de ningún animal. Cuando se inyectaron las amibas por vía intramuscular, la protección fue tan solo del 70 por ciento. Cuando se inmunizó con la fracción III, fue del 64 por ciento y, apenas del 43 por ciento, cuando se hizo lo mismo con la fracción II. Los títulos de anticuerpos, estudiados por la técnica de HAI, fueron elevados y estuvieron entre 1:243 y 1:59, 049. Fueron negativos los sueros de

algunos animales que habían sido inmunizados con la fracción II y III.

Los resultados anteriores no se pueden comparar con los obtenidos en este trabajo, ya que existen diferencias entre las especies animales, vías de inoculación, esquema de inoculación, dosis, tiempo de infección y tipo de antígeno o cepa de trofozoitos. Además, nuestro propósito no fue comprobar - el grado de inmunidad o de protección que se les podía inducir a los animales a los cuales se les inyectaron trofozoitos de E. histolytica por vía SC.

En el trabajo que utilizó monos (8) se informan títulos de anticuerpos, medidos por la técnica HAI, que son menores a los encontrados en las ratas de nuestro experimento. Pero esto puede ser a causa de la diferencia entre los animales - y también porque fueron distintos los antígenos inyectados y las cantidades de los mismos.

Por lo que respecta a la seroconversión, se encontró -- que fue del cien por ciento desde la primera semana, aún en el grupo que recibió las amibas muertas. Aunque las ratas -- que no recibieron amibas sino medio de cultivo o yema de huevo, algunas tuvieron una serología positiva muy débil en uno de los casos.



En el trabajo de Krupp (53), probablemente la inyección del antígeno tres veces durante tres semanas pudo influir en los títulos tan elevados que se obtuvieron.

Al utilizar amibas vivas en el experimento, el diseño se aproxima más a lo que podría suceder en el caso de una infección real. En los trabajos que utilizaron amiba vivas por vía intrahepática (69) o intramuscular (53), se obtuvieron títulos de anticuerpos sumamente variables, desde los que fueron negativos en algunos casos hasta otros muy elevados que fueron positivos aún con una dilución de 1:32,768.

Cuando se inoculan amibas vivas, la intensidad de la respuesta inmunitaria humoral generalmente resulta proporcional al tiempo que se mantiene la infección y el grado de la lesión tisular (69). La media geométrica de los títulos obtenidos por la reacción de HAI va aumentando progresivamente conforme se prolonga el tiempo de la infección, hasta 25 días después de la inoculación. En nuestro experimento, la media geométrica de los títulos obtenidos a los 14 días fue superior a la media que se obtuvo con los sueros separados a los 7 días. Pero las diferencias no fueron significativas, lo cual sugiere un tiempo muy reducido para la etapa durante la cual la infección experimental resultó agresiva y lesionó los tejidos.

Nuestros resultados parecen estar en favor de los comentarios acerca de que no parece existir una buena correlación entre la cantidad de anticuerpos séricos anti-E. histolytica y la capacidad del huésped para dominar la infección. El material antigénico de los trofozoitos muertos resultó muy poco inmunogénico cuando se inyectó por vía SC, aunque puede ser que el procedimiento utilizado para lisar las células no haya sido el más adecuado para conservar la inmunogenicidad. Los trofozoitos vivos estimularon la síntesis de una cantidad mayor de anticuerpos, pero estos no cambiaron las características histológicas de las lesiones y la evolución de las mismas. Seguramente que otra cepa de E. histolytica mucho más virulenta habría modificado significativamente la invasividad del protozoario y la extensión de la necrosis. Pero no parece muy probable que en los casos humanos de amibiasis cutánea, la respuesta del sistema inmunológico pueda intervenir para restringir favorablemente la evolución del cuadro clínico.

Por lo que se refiere a los resultados de nuestro segundo experimento, los trofozoitos de E. histolytica no demostraron capacidad invasiva, después de inyectarlos en el tejido SC de ratas Wistar. Ellos solamente causaron una lesión necrótica en el sitio de la inyección, alrededor de la cual se comenzó a formar una abundante cantidad de tejido de granulación, con infiltración de fibroblastos y síntesis de colágena, diez días después de la inyección ya no se encontraban amibas vivas y la lesión evolucionaba hacia la fibrosis. La inyección simultánea de un medio natural, la yema de huevo, rico en colesterol, no modificó la virulencia de los protozoarios y ninguno de los animales presentó lesiones similares a las que se han descrito en la amibiasis cutánea de los humanos. Probablemente al inyectar las amibas en el tejido SC, en donde permanecieron atrapadas sin contaminarse con bacterias, se obtuvo un modelo experimental que limitó completamente tanto la multiplicación como la invasividad de los trofozoitos. El infiltrado inicial de leucocitos PMN y luego la aparición de macrófagos, lograron dominar a la gran cantidad de amibas que se inyectaron en el tejido SC y en ninguno de los animales estudiados se observó un progreso de la lesión inicial ni un retroceso del tejido de granulación o lisis de las fibras colágenas que estaban más cercanas a la porción central en donde había ocurrido la necrosis.

Recientemente, varios autores (41) presentaron un estudio

sobre la evolución de los cambios hispatológicos provocados por la inoculación directa de E. histolytica en el parénquima hepático de 25 hamsters recién destetados. Estos animales fueron sacrificados a intervalos de 48 horas, desde el momento de la inyección hasta doce días después. Las observaciones microscópicas realizadas sobre las fibras de colágena que envolvieron la zona de necrosis o absceso central, permitieron suponer que, en el hígado de estos animales, ocurrieron dos fenómenos en forma simultánea. Por una parte, se observó que la lesión central de los hepatocitos lisados fue rodeada rápidamente por fibroblastos que sintetizaron fibras de colágena, las cuales formaron un halo alrededor de la necrosis. Pero, al mismo tiempo se observó que los trofozoitos atrapados en el centro podían atacar las fibras de colágena que estaban en la porción más interna del halo y de este modo la lesión central tenía una tendencia a extender sus dimensiones. Es decir, que la enfermedad experimental resultaba un proceso dinámico en el cual la enfermedad experimental resultaba un proceso dinámico en el cual la afluencia de fibroblastos trataba de reparar el daño hepático que habían causado los trofozoitos, mientras, simultáneamente, los protozoarios trataban de atacar la envoltura de colágena que los mantenía limitados a la región en donde fueron inyectados. Los resultados de este balance variaron de uno a otro animal y por esta razón algunos terminaron por

sanar rápidamente y en otros aumentó el tamaño de sus abscesos. En este trabajo (41) se describen lesiones hepáticas - que tienen una evolución parecida a la que nosotros observamos en la piel al inyectar una mayor cantidad de amibas, -- solo que la necrosis del hígado fue más extensa y, además, resultó menor el infiltrado de fibroblastos y la síntesis - de colágena.

Existen diversos trabajos que han informado (27, 38, - 95) sobre amplias zonas de necrosis y formación de múltiples abscesos cuando pequeñas cantidades de E. histolytica se inyectan en el tejido parenquimatoso de varias especies de -- animales. En esos casos, el tamaño de la lesión dependió de la facilidad con la cual fue lisado el tejido parenquimatoso que recibió la inoculación de los trofozoitos, de las -- oportunidades que estos tuvieron para multiplicarse en esos micro-habitats y de las dificultades para organizar una envoltura de fibroblastos que sintetizaran la suficiente cantidad de colágena. Cada una de estas circunstancias pudo -- estar influida por diversos factores.

Otros estudios experimentales (4) con hamsters adultos que también fueron inoculados intrahepáticamente con trofozoitos vivos de E. histolytica, han demostrado que las lesiones tienden a la formación de granulomas, con cambios en la apariencia de los macrófagos que toman una forma epiteloide.

y aparición de células gigantes multinucleadas, una moderada infiltración de linfocitos y escasos fibroblastos que, - en estos animales no sintetizan una cantidad suficiente de colágena. Diferentes autores (57) están de acuerdo en que - después de la inyección intrahepática de hamsters con trofozoitos de E. histolytica siempre quedan algunos animales a los cuales no se les encuentra ninguna lesión hepática en - el momento de sacrificarlos, mientras otros que se mantienen en observación durante semanas, evolucionaban sin complicaciones y terminan completamente sanos después de varios meses. Sin embargo, aunque las observaciones anteriores parecen indicar que el hamster es un animal que cuenta con los mecanismos defensivos necesarios para resolver adecuadamente las infecciones experimentales que representan la inoculación de millones de trofozoitos vivos, también se pueden encontrar otras observaciones (86) que están en favor de -- que existen en los hamsters una aparente vulnerabilidad - para que E. histolytica les cause abscesos en el hígado. -- Cuando los trofozoitos de la cepa IP-106, que tenían once - años de estar cultivados en condiciones axénicas, se les inyectaron a varios hamsters dorados por vía intracecal e intraperitoneal, todos los animales formaron abscesos hepáticos, peritoneales y pulmonares (37).

Quando los trofozoitos de E. histolytica axénica se - han inyectado en el cerebro de ratones recién nacidos de -

mayor edad (65), las cifras de mortalidad son mucho mayores y las lesiones tienen una apariencia histológica diferente. Estos ratones presentan varias zonas de necrosis rodeada -- fundamentalmente por un infiltrado de leucocitos PMN, sin -- que se presente una acumulación de fibroblastos ni se forme un halo de colágena alrededor de la lesión. Resultados simi-- lares se han obtenido cuando E. histolytica axénica se in-- yecta intracerebralmente a los conejos (94). Tanto los rato-- nes como los conejos que sobreviven a la inoculación de tro-- fozoitos en el cerebro quedan con el daño residual que ocu-- rrió durante los primeros días y no se les puede encontrar en los animales sacrificados después de una semana, aunque lógicamente, en el cerebro permanecen los antígenos de los restos de E. histolytica. La gravedad del daño del sistema nervioso central depende de la cantidad de protozoarios in-- yectados, de la edad del animal y de la virulencia de la -- cepa.

Hasta ahora, los diferentes modelos de amibiasis expe-- rimental que utilizan inóculos de Entamoeba histolytica axé-- nica, revelan que existen diferencias entre las caracterís-- ticas de las lesiones, su evolución y la supervivencia de los -- animales, según la cantidad de trofozoitos que se inyectan y la virulencia de la cepa, la vía utilizada para introducir las amibas en los tejidos, la especie animal y la edad que tienen en el momento del experimento. Todas estas variables

explican los resultados desiguales, pero no aclaran completamente la patogenia de las diferentes lesiones, ni revelan cuales mecanismos inmunológicos participan en cada una de ellas.

En las ratas que fueron inyectadas con E. histolytica por vía SC, el fenómeno inflamatorio en la piel evolucionó en la forma usual que se conoce desde hace años (74). Pero se observaron dos fenómenos interesantes. Por una parte, la acumulación de fibroblastos y la síntesis de colágena alrededor de la lesión fue una reacción mucho más intensa que la referida por otros autores que también han inyectado E. histolytica en otros tejidos de varias especies animales. Esta actividad de los fibroblastos puede ser aprovechada para el diseño de experimentos que estudien, in vivo, la síntesis de colagenasas por los trofozoitos como parte de sus mecanismos de invasividad o, también, la producción de colágena por parte del huésped como una barrera defensiva contra la amibiasis. Naturalmente, la inyección subcutánea de trofozoitos vivos de E. histolytica va a provocar lesiones cuyas características histológicas deben variar cuando se utilicen otras cepas que posean un mayor grado de virulencia o la capacidad para sintetizar una mayor cantidad de colagenasas, así como también cuando se cambie la especie o la edad del animal receptor o cuando se inocule un menor número de trofozoitos. Más adelante, también será --



necesario correlacionar las características de las lesiones con el zimodemo u otros patrones bioquímicos de los trofozoitos utilizados. Las lesiones poco extensas que se observaron en las ratas inoculadas por vía SC, pueden ser una consecuencia de que la cepa HK-9 haya atenuado su virulencia después de varios años de cultivo en un medio axénico.

La segunda observación se refiere al infiltrado de células cebadas alrededor de la zona necrosada por los trofozoitos. Las observaciones histológicas en los animales utilizados como testigos permiten suponer que las células cebadas no aparecen exclusivamente como una consecuencia de la inyección de yema de huevo en el tejido SC aunque, aparentemente la respuesta no es específica contra los trofozoitos vivos o muertos, sino que forman parte de cualquier reacción inflamatoria en el tejido SC de estos roedores. De acuerdo a nuestros resultados 6 a 7 días después de la inyección ya era evidente que había un elevado número de estas células alrededor de la lesión y también que al principio contenían granulaciones en el citoplasma, pero que luego estas ya no eran apreciables. Por todo lo cual se puede inferir que las células cebadas liberaron su contenido de aminas vasoactivas. Queda por estudiar la naturaleza de los factores que contribuyeron a su infiltración alrededor del tejido dañado y también el efecto de la histamina y las otras sustancias sobre la evolución de la lesión y sobre la actividad biológica

de los trofozoitos. Las células cebadas no aparecen alrededor de las lesiones que provoca E. histolytica cuando este protozoario se inyecta en el hígado o en el cerebro, en cambio si están presentes en la submucosa del intestino invadido por -- los trofozoitos, pero en esos casos las lesiones tienen caracté-- rísticas completamente diferentes a las que se observaron - en el presente estudio. Es conveniente mencionar que ya se co-- noce el caso de algunas parasitosis, como la esquistosomiasis, en las cuales los antígenos de los tremátodos pueden estimu-- lar la liberación de histamina y esto inhibe la competencia - de los linfocitos (48). El efecto inmunosupresor de la histamina se conoce desde hace años (55), pero hasta hace poco --- tiempo sólo se le había relacionado con los fenómenos de hi-- persensibilidad (52) en los cuales participan las IgE y la - acumulación de eosinófilos. Los antígenos de E. histolytica - pueden estimular la síntesis de esta clase inmunoglobulinas - (79). En algunos casos de amibiasis cutánea se ha informado - que existe una infiltración de eosinófilos en los bordes de - la lesión necrótica (75). Queda por aclarar la reacción que - puede existir entre la aparición de IgE anti-E. histolytica y la participación de las células cebadas en el fenómeno infla-- matorio que limita la invasividad de los trofozoitos. El cono-- cimiento experimental de todos los factores que ayudan a controlar naturalmente la invasividad de E. histolytica, pueden ayudar - para comprender las relaciones entre huésped y parásito en los casos de - amibiasis invasora de los humanos.

## VI. RESUMEN

Aunque desde hace tiempo se conocen los cuadros clínicos de la amibiasis cutánea en el hombre, hasta ahora no existen estudios en animales de experimentación sobre las lesiones -- que los trofozoitos pueden causar en la piel. Nosotros justificamos esta investigación por dos razones. Primero, la relación huésped-parásito en el caso de la amibiasis cutánea, -- puede activar mecanismos defensivos o facilitar la invasividad de una manera diferente a lo que hasta ahora se ha estudiado como los trofozoitos lesionan otros tejidos. Por otra parte, el estudio de la inmunogenicidad que tienen los antígenos de E. histolytica cuando son introducidos en la piel, resulta un complemento indispensable para los trabajos que -- actualmente tratan de inducir una inmunidad duradera contra este protozoario. La intensidad de la respuesta inmunitaria y su utilidad para el huésped dependen fundamentalmente de -- la necrosis del tejido, de su infiltración por macrófagos y la rapidez con que se inicia el trabajo reparador de los fibroblastos.

Varios grupos de ratas Wistar fueron inoculadas por vía subcutánea con trofozoitos vivos o muertos de E. histolytica HK-9 cultivada en un medio axénico. La respuesta inmunitaria humoral se estudió por la reacción de hemaglutinación indirecta (HAI). Para conocer la evolución de las lesiones en el

tejido subcutáneo de las ratas, se practicó un estudio microscópico seriado de los cortes de piel obtenidos de los animales sacrificados.

Se encontró que la respuesta de anticuerpos séricos anti E. histolytica fue superior 7 y 14 días después de la inoculación cuando las ratas se inyectaron con trofozoitos vivos. Los títulos de anticuerpos fueron significativamente más bajos -- cuando se inyectaron trofozoitos muertos, aunque en los dos casos la lesión se infiltró con abundantes macrófagos y linfocitos. Las ratas limitaron la invasividad de E. histolytica - organizando una envoltura de colágena alrededor del sitio donde se localizaban los trofozoitos y el tejido necrosado. Tardíamente la lesión se infiltró con células cebadas que se desgranularon. A pesar de la acción colagenolítica de los trofozoitos, sus enzimas no lograron vencer la barrera de colágena que sintetizaron los fibroblastos de la piel de las ratas.

## VII. BIBLIOGRAFIA.

- 1) Acosta, G., Barranco, C., Campos, R., Ramírez, A., Isibasi, A., Kumate, J.: Induction of antibodies of secretory IgA class in the bile of rats immunized with trophozoites of Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx.) (Supl. 2) 12 (4): 64, 1981.
- 2) Agricultural Research Service. United States. Department of Agriculture. Composition of foods No. 8. Reprinting October, Washington, D.C. 1975.
- 3) Aguirre-García, J., Calderón, P., Tanimoto-Weki, M.: - Examen histopatológico de las lesiones hepáticas en hamsters inoculados con cultivo axénico de E. histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx) 3, Supl. 2: 341, 1972.
- 4) Aguirre-García, J., Calderón, P., Tanimoto-Weki, M.: - Examen histopatológico de las lesiones hepáticas en hamsters inoculados con cultivo axénico de E. histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 11, (Supl. 1): 163, 1980.
- 5) Aguirre García, J., Calderón-Lara, P., Vázquez-Saavedra, J.A., Tanimoto-Weki, M.: Estudio histopatológico de las lesiones hepáticas en hamsters inoculados con distintas cepas de E. histolytica desarrollada en condiciones axénicas. Arch. Invest. -

Méd. (Méx.) 4, Supl. 1: s109, 1973.

- 6) Angarita, Lia., Hashimoto-Yañez., García Tamayo, F.: Proteínas de fase aguda en el suero de pacientes con absceso hepático amibiano. Bol. Méd. Hosp. Inf. Méx. 39: 603, 1982.
- 7) Artigas, J., Otto, I., Kawada, M.E.: Acción de E. histolytica sobre leucocitos polimorfonucleares humanos vivos. Bol. Chil. Parasit. 21: 114, 1966.
- 8) Aubanel, M., Gómez, R.I., Sepúlveda, B.: Introducción a la inmunidad anti-amibiánica en primates subhumanos con antígeno lisosomal de E. histolytica III. Reacción de -- contrainmunolectroforesis y hemaglutinación indirecta - en el suero de monos. Arch. Invest. Méd. (Méx.) II, --- (Supl. 1): 251, 1980.
- 9) Beaver, A., López, V., Cuello, C., D'Alessandro, A.: Cutaneous amebiasis of the eyelid with extension into the orbit. Am. J. Trop. Méd. Hyg. 27 (6): 1133, 1978.
- 10) Beltran, H.F., Marván, G., Ortega, P., Monterrosa, S., - Biagi, F.F.: Poder patógeno de diferentes cepas de E. histolytica, La Prensa Méd. Méx. 30: 13, 1965.
- 11) Beltran, H.F., Monterrosa, M., Banquero, H., Biagi, F.F.:

- Invasión de la pared intestinal e hipersensibilidad a E. histolytica. La Prensa Méd. Méx. 23(11): 416, 1968.
- 12) Biagi, F.F., Beltran, H.F.: Amibiasis, un reto a la -  
compresión de los mecanismos patogénicos. Gac. Méd. -  
Méx. Tomo XCVII: 71, 1967.
  - 13) Biagi, F.F., Marván, G.: El poder patogénico de E. --  
histolytica como característica inestable. La Prensa  
Méd. Méx. 29: 15, 1965.
  - 14) Biagi, F.F., Robledo, E., Servín, H., Marván, G.: In-  
fluence of some steroids on the experimental produc--  
tion of amibic hepatic abcess. Am. J. Trop. Méd. Hyg.  
12: 318, 1963.
  - 15) Biagi, F.F., Robledo, E., Servín, H., Martuschelli, -  
Q.: The effect of cholesterol on the pathogenicity -  
of E. histolytica. Am J. Trop. Méd. Hyg. 11 (3): 333,  
1962.
  - 16) Boeck, W. y Drbohlav, J.: Cultivation of E. histolyti-  
ca. Am J. Hyg. 5: 371, 1925.
  - 17) Brandt, H. y Pérez-Tamayo, R.: Amibiasis cutánea. Pre-  
sentación de un caso. La Prensa Méd. Méx. 21: 1, 1956.

- 18) Brandt, H. y Pérez-Tamayo, R.: Amibiasis. La Prensa Méd. Méx. México, 1970.
- 19) Byers, H.P., Barsh, S.G., Holbrook, A.K.: Molecular Pathology in inherited disorders of collagen metabolism. *Human Pathology* 13 (2): 89, 1982.
- 20) Cambell, D.H., Garvey, J.S., Cremer, N.E., Sussdorf, D.H.: *Methods in Immunology*. Second edition. W.A. -- Benjamin, N.Y. 1970.
- 21) Capín, R.N., Capín, R., Zamacona, G., Ortíz-Ortíz, - L.: Activación de la vía alterna del complemento por varias cepas axénicas de E. histolytica. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 9, Supl. 1: 291, 1978.
- 22) Chávez, R.M.: Absceso hepático amibiano abierto a pa red costal. *Dermatología, Rev. Méx.* 24 (2-3): 270, - 1980.
- 23) Chévez, A., Iturbe, A.J., Segura, M., Corona, D.: Re laciones biológicas entre E. histolytica y otras cé- lulas 1: Complejo de asociación amiba leucocito. -- *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 3, Supl. 2: 241, 1972.
- 24) Croxton, F.E.: *Elementary statistics with application in medi cine and the biological sciences*. Dever Publications, Inc. N.Y. 1953.



- 25) Diamond, L.S.: Axenic cultivation of E. histolytica. Science, 134: 336, 1961.
- 26) Diamond, L.S.: Axenic cultivation of E. histolytica. Progress and problems. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 11, (Supl. 1): 47, 1980.
- 27) Diamond, L.S., Phillips, B.P., Bartgis, L.: Virulence of axenically cultivated E. histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 4, Supl. 1: s99, 1973.
- 28) Diffley, P.: Comparative immunological analysis of -- host plasma proteins bound to blood stream forms of - Trypanosoma brucei subspecies. Infect. Imm. 21: 605, 1978.
- 29) Edwards, A.L.: An introduction to linear regression - and correlation W.H. Freeman and Company. San Francis co, 1976.
- 30) Eskridge, L. y Hegner, R.: Elimination of amoeba from rats with a high protein diet. J. Parasit. 23: 105, - 1937.
- 31) Felman, Y.M.: Approaches to sexually transmitted ame-biasis. Bull, N.Y. Acad. Sc. 57: 201, 1981.

- 32) Flores y Troncoso, F. de Asis.: Historia de la medicina de México. Tomo III. Editado por el IMSS. México, 1982.
- 33) Fujita, W.H., Barr, J.R., Gotschalk, H.R.: Cutaneous -- amebiasis. Arch. Dermatology 117: 309, 1981.
- 34) García-Tamayo, F., Ayala, L., Kumate, J.: La prueba de Nitroazul de tetrazolio en la amibiasis hepática de los niños. Bol. Méd. Hosp. Inf. Méx. 31: 683, 1974.
- 35) García-Tamayo, F., Hashimoto-Yañez, B.: Probable reacción antigenica entre E. histolytica y alfafetoproteína. Bol. Méd. Hosp. Inf. Méx. 39: 81, 1982.
- 36) García-Tamayo, F., Hashimoto-Yañez, B., Kumate, J.: -- Proteínas propias y del medio de cultivo en los trofozoitos de E. histolytica obtenidos experimentalmente. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 11, (Supl. 1) 159, 1980.
- 37) Ghadirian, E., Meerovitch, E.: Behavior of axenic IP-106 strain of E. histolytica in the golden hamster. - Am J. Trop. Méd. Hyg. 27: 241, 1978.
- 38) Gil-Barbosa, M., Fastag de Shor, A., De la Torre, M., Villegas González, J.: Secuencia de las lesiones hepáticas amibianas en el conejo. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 3, Supl. 2: 349, 1972.

- 39) Gomori, G.: Preparation of buffers for use in enzyme studies. Colowich, S.P. y Kaptan, N.O. Methods in - Enzymology. Academic press, N.Y. 1955.
- 40) González, B.J.: Amibiasis cutánea. Dermatología. Rev. Méx. 10 (3): 302, 1966.
- 41) Guerrero, M., Larriva-Sahd, J., Ramírez, M.E., Ríos, D., Ruíz Molina, A.: Collagen fibers in liver experimental amebic lesion; an ultrastructured study. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13, (Supl. 3): 223, 1982.
- 42) Guerrero, M., Velázquez, S., Ríos, D.: Aspectos histológicos de las lesiones hepáticas en hamsters producida por inoculación de E. histolytica en cultivo axénico. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 11, Supl. 1: 189, 1980.
- 43) Hamm, A.W.: Tratado de Histología. Séptima edición. - Editorial Interamericana, Méx. 1975.
- 44) Hashimoto-Yañez, B., García-Tamayo, F., Kumate, J.: - Anticuerpos anti-albúmina bovina en el suero de pacientes con absceso hepático amibiano. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 11, (Supl. 1): 229, 1980.
- 45) Hernández-Barrios, M., Rangel, E., De Muñoz, M., Rivas, J.G.: Amibiasis cutánea: Cultivo y caracterización ---

enzimática de una cepa. Bol. Méd. Hosp. Inf. Méx. 40: 299, 1983.

- 46) Hernández-Barrios, M., Zapata, R., García-Tamayo, F., Gutiérrez, G., Kumate, J.: Determinación de alfa-1-fetoproteína en el suero de niños con amibiasis invasora. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 5 (Supl. 2): 501, 1974.
- 47) Hernández, P.E.: Amibiasis cutánea en el pene. Dermatología, Rev. Méx. 10 (2): 186, 1966.
- 48) Hofstetter, M., Fasano, M.B., Ottesen, E.A.: Modulation of the host response in human Schistosomiasis. IV. Parasite antigen induces release of histamine that inhibits lymphocyte responsiveness in vitro. J. Immunol. 130: 1376, 1983.
- 49) Islas, J.: Frecuencia, localización y complicaciones de la amibiasis severa en los estudios post mortem en el Centro Hospitalario 20 de noviembre. ISSSTE. Tesis a ceptional, UNAM. 1968.
- 50) Jiménez, C.E., Kumate, J.: Correlación clínica de Zimodemos de E. histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13, Supl. 3: 77, 1982.
- 51) Kagan, G.I.: Patogenicidad de E. histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 5, Supl. 2: 457, 1974.

- 52) Kay, A.B., Austen, K.F.: The IgE-mediated release of an eosinophilleukocyte chomotactic factor from human lung. *J. Immunol.* 107: 899, 1971.
- 53) Krupp, M. Iris.: Experimental induction of protective - immunity to amebic infection. *Arch. Invest. Méd. (Méx)* 5, (Supl. 2): 415, 1974.
- 54) Latapi, F.: Amibiasis cutánea: Comunicación de un caso con lesiones ulcerosas perianales y anales. *La Prensa - Méd. Méx.* 14: 268, 1949.
- 55) Lichtenstein, L.M., De Bernardo, R.: The inmediate aller<sup>gic</sup> response: in vitro action of cyclic AMP-active and other drugs on th two stages of histamine release. *J. - Immunol.* 107: 1131, 1971.
- 56) López, Austin, A.: *Textos de Medicina Náhuatl*. Editado por el Instituto de Investigaciones Históricas de la -- UNAM. México, 1975.
- 57) Lushbaugh, W., Kairalla, A., Hofbauer, A., Pittman, F.: Sequential histopathology of cavitary liver abscess -- formation induced by axenically grown E. histolytica - *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 11, Supl. 1: 163, 1980.
- 58) Maegraith, B.G. y Harmasuta, O.: Experimental amoebic.

- Infections of the liver in guinea pigs. I. Infection via the mesenteric vein and via the portal vein. Am. J. Trop. Méd. Parasit. 48: 421, 1954.
- 59) Macotela, R.E.: Amibiasis invasora cutánea. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 2, Supl. 1: 373, 1971.
- 60) Macotela, R.E.: Encuesta sobre amibiasis cutánea invasora. En: Amibiasis. Editado por: Sepúlveda B. y Diamond, L.S. IMSS, México, 1976.
- 61) Martínez, Báez, M.: Historia de la amibiasis. En: Amibiasis. Editado por: Sepúlveda, B. y Diamond, L.S. IMSS, -- México, 1976.
- 62) Martínez-Palomo, A.: Inducción de inmunidad protectora antiambiana con "nuevos" antígenos en el hamster lactante: histopatología. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 1, Supl. 1: 321, 1978.
- 63) Martínez-Palomo, A., Tanimoto-Weki, M., Tena-Betancourt, E.: Evolución de las lesiones producidas en hamster por inoculación de E. histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 11, Supl. 1: 169, 1980.
- 64) Martscelli, Q.A. y Villa, M.D.M.: Amibiasis cutánea en los lactantes. La Prensa Méd. Méx. 35 (1-2): 19, 1970.

- 65) Mattern, C. y Keister, D.: Experimental amebiasis I. Pa-  
thogenicity of axenically cultured E. histolytica in --  
the brain of the newborn mouse. Amer. J. Trop. Méd. Hyg.  
26 (3): 393, 1977.
- 66) Mattern, C. y Keister, D.: Experimental amebiasis II. -  
Hepatic amebiasis in the newborn hamster. Amer. J. Trop.  
Méd. Hyg. 26 (3): 402, 1977.
- 67) Muñoz, Ma. de L., Calderón, J. y Rodkind, M.: Presencia  
de actividad colgenolítica de trofozoitos de E. histoly-  
tica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13, Supl. 3: 191, 1982.
- 68) Muñoz, Ma. de L., Calderón, J. y Rodkind, M.: The colla-  
genase of E. histolytica. J. Exp. Méd. 155: 42, 1982.
- 69) Norman, L., Gold, D., Kagan, I.G.: The serologic respon-  
se of hamsters to experimental liver inoculation with E.  
histolytica as measured by indirect hemagglutination test  
and enzyme linked immunosorbent assay. Am. J. Trop. Méd.  
Hyg. 28 (2): 198, 1979.
- 70) Orozco, Ma. Esther., Martínez, P.A., González, R.A., y  
col.: Las interacciones entre lectina y receptor median-  
te la adherencia de E. histolytica a células apitelia--  
les. Relación de la adherencia con la virulencia de la  
cepa. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13, Supl. 3: 159, 1982.

- 71) Phillips, B.P.: E. histolytica, concurrent irreversible loss of infectivity. I. Pathogenecity and encystment potential after prolonged maintenance of axenic culture - in vitro. *Exp. Parasitol.* 34: 163, 1973.
- 72) Phillips, B.P., Wolfe, P.A., Rus, C.W., Godron, H.A., - Wrigh, W.A.: Studies on the ameba bacteria relation ship in amebiasis comparative reults of the intracecals inoculation of germ free non contaminated and conventional guinea pigs with E. histolytica. *Am J. Trop. Méd. Hyg.* 4: 675, 1955.
- 73) Ríos, D., Capín, R., Ortiz-Ortiz, L.: Reacción inmunitaria de hamsters infectados e inmunizados con E. histolytica. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 9, Supl. 1: 303, 1978.
- 74) Robbins, S.L., Cotran, R.S.: Inflammation and repair. En: *Pathologic basis of disease*. W.B. Saunders, Philadelphia. 1979.
- 75) Rodríguez, O.: Amibiasis cutánea. *Dermatología, Rev. Méx.* 1 (1): 51, 1956.
- 76) Ruoslahti, E., Engrall, E.: Immunological crossreaction between alpha-fetoprotein and albumin. *Proc. Nat. Acad. Sx.* 73: 4641, 1976.



- 77) Saum, E.H., Bradin, J.L., Faust, E.C.: The effect of -- ascorbic acid deficiency on the resistance of guinea -- pigs to infection with E. histolytica of human origin. Am. J. Trop. Méd. 31: 425, 1951.
- 78) Sargeant, P.G. y Williams, J.E.: The diferentation of invasive and non invasive E. histolytica by isoenzyme - electrophoresis. Trans. Roy Soc. Trop. Méd. Hyg. 72: -- 164, 1978.
- 79) Savanat, T., Thammapalerd, N., Jaroonvesma, N., Bunnag, D.: Total serum IgE level in patients with amoebic li-- ver abscess and other parasitic infections. Southeast - Asian. J. Trop. Méd. Pub. Hlth. 8: 149, 1977.
- 80) Sepúlveda, B.: Amibiasis invasora por E. histolytica. - Gac. Méd. Méx. 100: 201, 1970.
- 81) Sosa, C.B. y Beiran, L.: Amibiasis cutánea genital. Co- municación de un caso. Dermatología. Rev. Méx. 3 (2): - 127, 1959.
- 82) Spiegel, S.: Estadística no paramétrica. Editorial Tri- llas, México, 1978.
- 83) Swartzswelder, J.C. y Avant, W.H.: Immunity to amebic. Infection in dogs. Am. J. Trop. Méd. Hyg 6 (3): 499, 1957.

- 84) Tanimoto, M., Sepúlveda, B., Vázquez-Saavedra, J.A., -- Landa, L.: Lesiones producidas en el hígado del hamster por inoculación de E. histolytica cultivada en medio -- axénico. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 2, Supl. 1: 275, 1971.
- 85) Tanimoto, M. Villegas-González, J., Alcalá-Negrete, H., Gómez Garza, R.: Inoculación amibiana intracraneal en -- el hamster. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 2, Supl. 1: 285, 1971.
- 86) Tanimoto-Weki, M., Vázquez-Saavedra, J.A., Calderón-Lara, P., Aguirre-García, J.: Inmunidad consecutiva a la in-- yección de antígeno amibiano axénico en el hamster. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 4, Supl. 1: 147, 1973.
- 87) Tanimoto-Weki, M., Vázquez-Saavedra, J.A., Calderón, P., Aguirre-García, J.: Resultados de la inoculación al hams-- ter de trofozoitos obtenidos de portadores asintomáticos de E. histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 4, Supl. 1: s105, 1973.
- 88) Tay, Z.J., Lara, A.R., Velazco, C.O., Gutiérrez, Q.M. : Parasitología Médica. Francisco Méndez Cervantes. Méxi-- co, 1982.
- 89) Taylor, D.J., Greenberg, J.Y., Jhosepson, E.S.: The effect of two different diet on experimental amoebiasis in guinea-- pig and in the rat. Am J. Trop. Méd. 1: 559, 1952.

- 90) Treviño-García, N., Castañeda, M., Tanomoto-Weki, M.: Probable mecanismo de acción de E. histolytica en el hígado de hamster: Estudio submicroscópico. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 5, Supl. 2: 393, 1974.
- 91) Treviño-García, N., Cruz de Lavín, E., Tanimoto-Weki, M.: Estudio ultramicroscópico de la invasión de la mucosa del colon por E. histolytica en cultivo axénico. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9, Supl. 1: 275, 1978.
- 92) Treviño, N., Cruz de Lavín, E., Tanimoto-Weki, M., -- González, A. A.: Estudio ultramicroscópico de la invasión de la mucosa del colon por E. histolytica. En -- amibiasis. Editado por: Sepúlveda, B. y Diamond, L.S. IMSS, México, 1976.
- 93) Villegas-González, J., Fastag de Shor, A., De la Hoz, R., De la Torre, M.: Interacciones celulares con el trofozoito de E. histolytica en las infecciones celulares, Arch. Invest. Méd. (Méx.) 5, Supl. 2: 433, 1974.
- 94) Villegas-González, J., Fastag de Shor, A., De la Hoz, R., De la Torre M.: Reacción tisular en la primoinfección y en la reinfección experimental con cultivos axénicos y monoxénicos de E. histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 4, Supl. 1: 131, 1973.

- 95) Villegas-González, J., Fastag de Shor, A., De la Torre, M., Gil Barbosa, M.: Producción de meningoencefalitis - amibiana en el conejo. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 3, -- Supl. 2: 355, 1972.
- 96) Zamacona, R.G., Guggiari, Ch. J., Garmilla, S.C., Ortíz-Ortíz, L., Aguirre, G.J.: Reacción de Shwartzman experimental en el hígado. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 5, Supl. 2: 427, 1974.