

30322  
68



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“ESTUDIO DEL DESARROLLO DE LA AMBIASIS  
INTESTINAL EN EL RATON C57BL/6”

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIATURA EN LA CARRERA  
DE BIOLOGIA

PRESENTA

ARIADNA MEDINA MARTINEZ



IZTACALA

MEXICO, D.F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

NOVIEMBRE DE 2003

3  
A



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 esta 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.

# PAGINACIÓN DISCONTINUA

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
CELULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL, BAJO LA TUTORIA DEL DR.  
JESUS CALDERON TINOCO Y LA ASESORIA DE LOS DRS. JESUS AGUIRRE  
GARCIA Y JESUS SERRANO LUNA, CON EL APOYO DEL DONATIVO N°  
30761-M OTORGADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y  
TECNOLOGIA.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ***DEDICATORIA***

A mis padres Zuleika y Jose Luis gracias por ser ejemplo de integridad, constancia y firmeza y por perseguir con igual entereza mi realización como mujer y profesionista.

A mi corazón por ser compañero en los momentos difíciles y motivo de numerosos momentos inolvidables.

A mis queridos hermanos Ulises, Ingrid y Zule con los que he de compartir siempre todos los buenos y malos momentos.

A mi abuelita Angeles por ser sinónimo de entrega, amor y fortaleza.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## **AGRADECIMIENTOS**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Agradezco:

A mis asesores Dr. Jesús Calderón Tinoco y Dr. Jesús Serrano Luna que con su sapiencia, comentarios y observaciones me condujeron satisfactoriamente a la culminación de este proyecto personal y profesional.

Al Dr. Jesús Aguirre García por compartir conmigo su sabiduría y conocimiento.

A la Biol. María Luisa Labra Barrios y QFB Silvia Galindo Gómez por asistirme tan pacientemente en la comprensión y realización de las metodologías.

A Yolanda Sánchez Chávez y Celso Sánchez Islas por su apoyo técnico en las cirugías y en la preparación de soluciones.

Al bioterio del CINVESTAV por el cuidado y la manutención de los animales.

**INDICE**

	página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
Definición de amibiasis.....	3
Epidemiología.....	3
Ciclo de vida.....	4
Patogenicidad.....	5
Relación huésped-parásito.....	6
Modelos amibianos.....	7
ANTECEDENTES.....	12
Modelos amibianos intestinales.....	12
Cobayo.....	12
Rata.....	12
Jerbo.....	13
Hámster.....	13
Ratón.....	13
JUSTIFICACION.....	17
OBJETIVOS.....	18
MATERIAL Y METODOS.....	18
Cultivo axénico de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	18
Obtención de lisado amibiano y medio condicionado.....	19
Manutención de los ratones C57BL/6.....	19
Tratamiento antiparasitario.....	20
Técnica quirúrgica.....	20
Eutanasia y toma de tejido.....	21
Cuantificación de trofozoítos en el contenido cecal .....	21
Preparación de tejidos para el análisis histológico.....	22
Análisis estadístico.....	22

## ***Índice***

---

Localización inmunohistoquímica de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	22
RESULTADOS.....	24
Aspecto macroscópico y examen en fresco.....	24
Microscopía de luz.....	25
Inmunohistoquímica.....	27
Análisis estadístico.....	27
Frecuencia de lesiones en relación al sexo y al tiempo de inoculación.....	28
Trofozoítos recuperados del contenido cecal.....	28
Frecuencia de lesiones en animales inoculados con lisado amibiano.....	29
Frecuencia de lesiones en animales inoculados con medio condicionado.....	29
Figuras.....	30
DISCUSION.....	37
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	44
BIBLIOGRAFIA.....	45
ANEXO.....	51
Características de la cepa C57BL/6.....	51
Anatomía comparada del ciego del humano y del ratón.....	52
Mecanismos de defensa del huésped contra infecciones.....	53



LISTA DE ABREVIATURAS

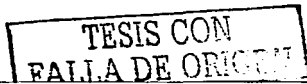
BI-S-33	Biosate Suero 33
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
PMN	Polimorfonucleares
TNF	Factor de necrosis tumoral
INF- $\gamma$	Interferon gamma
NO	Oxido nítrico
CMI	Inmunidad mediada por células
SCID	Deficiencia inmunológica combinada grave
SPF	Libre de patógenos específicos
PBS	Amortiguador fosfato-salino

**LISTA DE TABLAS Y FIGURAS**

	página
Tabla 1	Susceptibilidad de los roedores..... 10
Tabla 2	Número de animales utilizados por tiempo y grupos de estudio..... 20
Tabla 3	Frecuencia de lesiones en relación al sexo y al tiempo de inoculación con trofozoítos..... 28
Tabla 4	Trofozoítos recuperados del contenido cecal en hembras y machos..... 28
Tabla 5	Frecuencia de lesiones en animales inoculados con lisado amibiano..... 29
Tabla 6	Frecuencia de lesiones en animales inoculados con medio condicionado. 29
Figura 1	Mucosa normal de colon..... 30
Figura 2	Ratón a las 3h posinoculación..... 31
Figura 3	Ratón a las 6h posinoculación..... 32
Figura 4	Inmunohistoquímica de trofozoítos ..... 33
Figura 5	Ratón a las 12h posinoculación..... 34
Figura 6	Ratón a las 24h posinoculación..... 35
Figura 7	Ratón a las 48h posinoculación..... 36
Figura 8	Gráfica de crecimiento de la cepa C57BL/6..... 52

**RESUMEN**

La amibiasis intestinal es el tipo más común de amibiasis invasora. Para conocer los mecanismos involucrados en la relación huésped-parásito que determinan la producción de la enfermedad se han desarrollado numerosos modelos animales (Martínez-Palomo, 1989). Varias especies se han utilizado para el estudio de la amibiasis intestinal. Sin embargo, el uso del ratón como modelo experimental de amibiasis representa varias ventajas, ya que es altamente sensible a la manipulación experimental, de bajo costo y con un sistema inmunológico bien detallado (Lancastre y col., 1968). Algunos autores (Gold y Kagan, 1978; Ghadirian y Kongshavn, 1984) postulan que el ratón posee una resistencia innata a la infección por *Entamoeba histolytica*, por lo que es ideal para estudiar la participación de algunos mecanismos inmunes en la resistencia a dicha infección. En este estudio establecimos el desarrollo de amibiasis intestinal en la cepa C57BL/6 mediante el empleo de ratones de ambos sexos, entre 6 y 8 semanas de edad y mantenidos en condiciones estériles de cama, agua y alimento en contenedores gnotobióticos. Se les administró un tratamiento antiparasitario de metronidazol a una dosis de 200mg/Kg de peso durante tres días consecutivos para asegurar que estuvieran libres de *Entamoeba muris*, diez días después, previo a la cirugía se les mantuvo 24h en ayuno y posteriormente les fueron inoculados  $1 \times 10^7$  trofozoítos, lisado amibiano equivalente a  $1 \times 10^7$  trofozoítos y medio condicionado sin amibas, todos los tratamientos resuspendidos en un volumen de 500 $\mu$ l. La eutanasia de los animales se realizó a las 3, 6, 12, 24 y 48h después de la inoculación. La frecuencia de lesiones en hembras fue de 29% (9/31) y en machos de 27% (9/33), obteniendo una frecuencia total de lesiones en ésta cepa de 28% (18/64). Las lesiones se definieron como úlceras superficiales, delimitadas a la mucosa con infiltrado inflamatorio moderado a intenso compuesto principalmente de neutrófilos. El desarrollo agudo de



## ***Resumen***

---

infección apareció en las seis primeras horas, mostrando signos de regeneración a partir de las 12h y evolución a la remisión en menos de 48h. Los resultados obtenidos sugieren un modelo agudo resistente a la amibiasis intestinal, a pesar de que otros estudios revelan a la cepa C57BL/6 como un modelo susceptible a la amibiasis (Ghadirian y Kongshavn, 1984) o como modelo de resistencia pero en estados de desarrollo crónico de enfermedad (Haupt y col., 2002).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**INTRODUCCION**

La amibiasis o entamoebosis se define como la infección en el ser humano producida por el protozooario parásito *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), con o sin manifestaciones clínicas. El parásito se encuentra en forma de quiste (que es la fase infectiva) y de trofozoíto, con dos estadios intermedios de prequiste y metaquiste. El trofozoíto es capaz de invadir la pared del intestino grueso del hombre y de diseminarse a otros órganos, como el pulmón, el cerebro y principalmente el hígado (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000).

La amibiasis invasora debida a *E. histolytica* afecta predominantemente a individuos de nivel socioeconómico bajo que viven en países en vías de desarrollo (Ravdin, 1995). En áreas de infección endémica, una variedad de factores incluyendo la ignorancia, la pobreza, la sobrepoblación, los suministros inadecuados y contaminados de agua y el bajo nivel de higiene, favorecen directamente la transmisión fecal-oral de amibas de una persona a otra (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000). Se estima que el 10% de la población mundial está infectada por *E. histolytica*, de los cuales 50 millones de casos presentan amibiasis invasora y cerca de 100,000 mueren por la enfermedad, sin embargo, se dice que esta prevalencia en ciertas áreas de desarrollo puede ser tan alta como del 50% (Walsh, 1988), pero no para áreas no endémicas, donde los patrones modernos de viaje e inmigración ponen principalmente en riesgo a dos grupos específicos de la población, la de homosexuales y la de viajeros que regresan de los trópicos (Weinke y col., 1990; Walderich y col., 1997). Estudios hechos en nuestro medio indican que la amibiasis es endémica en la República Mexicana, con zonas de alta seroprevalencia no relacionadas a condiciones climáticas, pero sin duda con gran incidencia en los estados sureños del país como Chiapas y Oaxaca, en niños de edad preescolar y con un doble incremento durante el

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Introducción

verano (Caballero y col., 1994; Treviño y col., 1997). Sin embargo, México ha mostrado un lento, pero progresivo decremento desde 1963 hasta 1979 en la incidencia y mortalidad causada por la amibiasis invasora en todas sus formas clínicas, descendiendo del séptimo al décimo sitio entre las enfermedades más frecuentes en necropsias (Ramos-Martínez y col., 1986); así como también lo sugiere un estudio realizado en el periodo de 1979 a 1991, donde se observa esta reducción progresiva como resultado del avance social y económico del país, al mejoramiento en las condiciones sanitarias, al desarrollo médico y tecnológico, así como al uso del metronidazol ante la menor sospecha clínica de la amibiasis o por su empleo profiláctico (Treviño y col., 1994). Ahora bien, acorde a estimaciones recientes de la Organización Mundial de la Salud, la amibiasis es responsable de aproximadamente 70 mil muertes anuales, lo que la coloca como la cuarta causa principal de muertes por protozoarios, después de la malaria, la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis y la tercera causa de morbilidad en este grupo de organismos, después de la malaria y la tricomoniasis (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000).

La infección se adquiere por ingestión de la forma quística, la cual es resistente a cualquier efecto dañino del pH ácido del estómago. El desenquistamiento ocurre en el intestino delgado con división del quiste maduro tetranucleado en ocho trofozoítos móviles por división nuclear y citoplásmica. Los trofozoítos emigran hacia la región del colon donde proliferan en un ambiente microaerofílico junto con la flora bacteriana residente de la cual se alimentan. En la mayoría de los casos, los trofozoítos viven como comensales en el intestino, sin causar daño evidente al hospedero, sin embargo, en algunas ocasiones los trofozoítos manifiestan una conducta agresiva, atacando e invadiendo la mucosa intestinal. Una vez que degradan la capa mucosa protectora por la acción lítica de enzimas, los trofozoítos invaden el epitelio colónico mediante la unión de lectinas y la posterior

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Introducción

proteólisis de los tejidos y de las uniones intracelulares, produciendo lesiones que se pueden manifestar como engrosamientos no específicos de la mucosa o como úlceras "en botón de camisa". Los trofozoítos que permanecen en la luz del intestino se pueden enquistar (proceso que es aparentemente estimulado por las condiciones lumbinales que son menos ideales para los trofozoítos) o salir del hospedero con las heces, o bien como trofozoítos, invadir el epitelio y viajar a otros órganos por dos posibles rutas, una por torrente circulatorio vía vena porta y venas mesentéricas hacia hígado, y posteriormente pulmón y (o) cerebro, o por perforación y lisis de las capas del intestino hasta llegar al peritoneo. Las divisiones nucleares y el metabolismo continúan dentro del quiste, el cual permanece viable por semanas o meses de acuerdo a las condiciones ambientales a las que se encuentre expuesto desde su excreción (Ravdin, 1995).

La lisis de la mucosa colónica en la amibiasis intestinal ha sido relacionada con una variedad de moléculas producidas por *E. histolytica* como adhesinas, ameboporos y proteasas. La adhesina Gal-GalNAc es una proteína multifuncional compuesta por un heterodímero con una subunidad pesada de 170kDa y una subunidad ligera de 35.34kDa, la cual le permite al parásito adherirse a la capa de moco para evitar que este sea eliminado a través del flujo intestinal (Espinosa-Castellano y Martínez-Palomo, 2000); esta lectina también se involucra en la señalización de citólisis uniéndose a los componentes C8 y C9 del complemento, lo cual evita el ensamble del complejo de ataque de membrana del complemento a la membrana plasmática amibiana (Braga y col., 1992). Se sabe también, que la subunidad pesada de esta adhesina podría participar en el anclaje de la amiba a ciertos proteoglicanos durante el proceso de invasión y que la subunidad ligera modula la actividad citopática del parásito (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000). Otras moléculas involucradas en el proceso de invasión son los ameboporos o péptidos

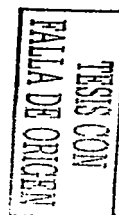
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **Introducción**

---

formadores de canales, las proteasas, los esterases de forbol y las hemolisinas. El ameboporo de *E. histolytica* que es una proteína de 77 aminoácidos parecida a las ionóforas, induce escape de iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y en menor grado de iones  $\text{Ca}^{++}$  por vesículas a través de la bicapa lipídica y al parecer resulta como mecanismo principal de defensa contra bacterias ingeridas, más que para la lisis de los tejidos del hospedero (Leippe y col., 1994). Las cistein proteasas pueden ser usadas para degradar la matriz extracelular durante el proceso de invasión y auxiliar en la lisis de células blanco (Kelsall y Ravdin, 1993). Los esterases de forbol y los activadores de la proteína quinasa C aumentan la actividad citolítica del parásito (Weikel y col., 1988) y numerosas hemolisinas han resultado ser citotóxicas a la línea celular de la mucosa intestinal (Caco-2) y al parecer se encuentran asociadas a las cepas más patógenas de *E. histolytica* (Jansson y col., 1994). Los mecanismos interesantes de modulación parasítica de la respuesta inmune del hospedero están empezando a ser comprendidos. Dentro de los principales blancos de esta modulación se encuentran los macrófagos y los neutrófilos (PMN) que al parecer emigran al sitio de la lesión, pero son incapaces de eliminar la infección en el hombre (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000).

Por otro lado, la respuesta inmune humana se caracteriza por desarrollar altos títulos de anticuerpos anti-*Amoeba* en pacientes con absceso hepático amebiano, sin embargo, se ha visto que estos anticuerpos anti-lectina, que pueden persistir durante más de 10 años en el cuerpo humano y que son capaces de inhibir la adherencia amebiana *in vitro*, no tienen ningún efecto protector, mas aún resultan ser un indicador de infección invasora por *E. histolytica* (Ravdin, 1995).





## Introducción

---

La respuesta de IgA mucosoide a *E. histolytica* sucede durante la amibiasis invasora como se evidencia por la presencia de anticuerpos en calostro y saliva, pero no está claro todavía si la infección asintomática por *E. histolytica* promueve la respuesta secretoria intestinal de IgA y que ésta además, sea efectiva en la eliminación del parásito del intestino (Sharma y col., 1978; Grundy y col., 1983; Acosta y col., 1985; Del Muro y col., 1990; Mazanec y col., 1993; Ortiz, 1998). Por otra parte, la inmunidad mediada por células juega un papel importante en la limitación de la extensión de la enfermedad y en la protección del hospedero de subsecuentes recaídas después de una apropiada administración de quimioterapia. La respuesta antigénica específica, que estimula la producción de linfocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF) y el interferon (INF-  $\gamma$ ), promueve la actividad amebicida de células como los neutrófilos y los macrófagos (Stern y col., 1984; Salata y col., 1986, 1987; Velázquez y col., 1998), los cuales por mecanismos dependientes de contacto, vías oxidativas y no oxidativas, así como también por la ruta del óxido nítrico (NO), tienden a eliminar la infección (Lin y Chadee, 1992; Salata y col., 1985). Por otro lado, durante la amibiasis invasora aguda, la respuesta de los linfocitos T del huésped ante los antígenos amibianos parece estar específicamente reprimida por un factor sérico inducido por el propio parásito (Salata y col., 1990).

La amibiasis es la única zoonosis conocida en la cual el hombre es el reservorio, aunque se ha encontrado que es patógena en primates del nuevo mundo, tal es el caso en monos del género *Ateles* (mono araña) y *Cebus* (Miller, 1952). Otras especies como el gato, el perro, la rata y el cerdo se consideran huéspedes accidentales. El estudio experimental de la amibiasis se inició simultáneamente con el descubrimiento de *E. histolytica* como el agente causal de la disentería amibiana por Lösch a fines del siglo XIX, quien reportó la primera

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

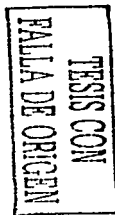
## **Introducción**

---

producción exitosa de disentería experimental en uno de cuatro perros alimentados con heces disintéricas de un paciente. A partir de entonces se han empleado numerosos modelos *in vitro* e *in vivo* para abordar el estudio de la amibiasis; sin embargo, en la actualidad todavía no existe un modelo animal que reproduzca la amibiasis tal como ocurre en el humano, esto es, que a través de la administración oral de quistes, se produzca el desenquistamiento y formación de trofozoitos a nivel del ileon terminal y el consecuente daño al intestino grueso y otros órganos, principalmente el hígado; a pesar de ello, varios modelos experimentales restringidos han resultado adecuados para aclarar cuestiones específicas que se han planteado (Martínez-Palomo, 1989).

Los modelos de amibiasis en perro o gato se utilizan poco en la actualidad; estos animales han sido sustituidos por numerosas especies de roedores, como conejos, cobayos, ratas, ratones, hámsteres y jerbos, ya que se cuenta con una mayor uniformidad genética de los animales, facilidad en el manejo y susceptibilidad aceptable a *E. histolytica*, lo cual ha permitido el estudio de procesos moleculares, inmunológicos y celulares (como la inflamación y la muerte celular programada) que ocurren a nivel orgánico cuando *E. histolytica* entra en contacto con el intestino o el hígado (Stanley, 2001).

En los modelos *in vivo*, las amibas se introducen directamente en el ciego o en el hígado, generalmente por inyección después de una laparotomía o a través del peritoneo. Se han utilizado también otras vías como la inoculación intraportal, el depósito directo en el recto o la inyección intracerebral. En varios estudios, se han utilizado cultivos axénicos de trofozoitos, aunque experimentos iniciales sugirieron que *E. histolytica* cultivada axénicamente perdía de manera uniforme su virulencia por su incapacidad para producir abscesos hepáticos en roedores, más tarde se observó que esto quedaba resuelto si se aumentaba el tamaño del inóculo (Martínez-Palomo, 1989).



## **Introducción**

---

Se ha reportado también que el grado de patogenicidad, resulta ser inverso a la edad del animal experimental, es decir que los animales jóvenes son más susceptibles que los viejos a la infección amibiana (Mattern y Keister, 1977; Ghadirian y Meerovitch, 1979), así como también, que los pasos por hígado de hámster tienen la propiedad de aumentar la virulencia de *E. histolytica* (Neal y Vincent, 1956; Lushbaugh y col., 1978). El uso de ciertas cepas bacterianas como *Fusobacterium symbiosus* en cultivos monoxénicos de *E. histolytica* ha surgido como otra forma de aumentar la patogenicidad, incluso se ha probado una alternancia de pasos por hígado de hámster con crecimiento intermitente de los trofozoítos en una mezcla de cultivos bacterianos, para conseguir este fenómeno (Gold y Norman, 1979). Sin embargo, algunos sugieren que la mera combinación de amibas con bacterias no es suficiente para la producción de enfermedad, sino que debe desarrollarse cierto sinérgismo entre el parásito y la bacteria para que resulte un efecto patógeno, puesto que se ha encontrado que trofozoítos de *E. histolytica* ignoran a bacterias que no tienen sitios de unión a manosa (Mirelman, 1987). Por otro lado, estudios *in vitro* con cultivos axénicos de amibas patógenas eliminan definitivamente la necesidad de la participación bacteriana en la virulencia de las amibas (Martínez-Palomo, 1989), por lo que el papel de las bacterias en la patogenia de la amibiasis continúa incierto hasta la fecha.

Los modelos *in vivo* de la amibiasis pueden usarse para estudiar muchos otros factores en la enfermedad además de la patogenicidad, como la edad, el sexo, el estado nutricional, el equilibrio hormonal, el estrés y las drogas terapéuticas; así como también, en estudios de la respuesta inmune no solo se investiga la susceptibilidad del animal a la infección, sino también su resistencia natural, ya que la información sobre los procesos o fenómenos de resistencia natural a la infección amibiana resulta útil entre otros aspectos en el

## **Introducción**

mejoramiento de estudios relacionados con el tratamiento y la prevención de la enfermedad (Rivero-Nava y col., 1997; Velázquez y col., 1998).

En general, los animales que se utilizan para el estudio de la amibiasis intestinal son diferentes a los que se utilizan para el estudio de la amibiasis hepática, debido a las diferencias de susceptibilidad que presenta cada especie. En el siguiente cuadro podemos observar los modelos animales comúnmente utilizados de acuerdo a la susceptibilidad que presentan en la amibiasis experimental (Tabla 1)

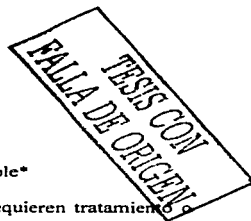
**Tabla 1 Susceptibilidad de los roedores**

	AMIBIASIS INTESTINAL	AMIBIASIS HEPÁTICA
HAMSTER	-	+
COBAYO	±	-
RATA	±	-
JERBO	±	+
RATÓN	±	-

- resiste; + susceptible; ± parcialmente susceptible\*

\*Se dice que son parcialmente susceptibles ya que los animales requieren tratamiento de manipulación especial, o las lesiones que se producen son temporales.

En estas especies de roedores existen a su vez cepas con diferente susceptibilidad, lo que se observa normalmente en estudios de amibiasis intestinal, donde la flora microbiana está



## ***Introducción***

---

poco caracterizada, así como otros factores bioquímicos y celulares que en general se consideran como elementos adversos a los parásitos (**Ghadirian y Kongshavn, 1984**).

A pesar de estas limitantes, al ratón se le ha considerado por varios autores como un hospedero ideal para estudiar los mecanismos de resistencia a la amibiasis experimental porque es altamente sensible a la manipulación, su sistema inmunológico ha sido bien detallado y permite el estudio de factores genéticos que regulan la defensa del hospedero (**Lancastre y col., 1968**).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**ANTECEDENTES**

Los modelos intestinales desarrollados no se encuentran aún claramente establecidos, debido a que la producción de lesiones no es constante ni uniforme y, como ya se ha mencionado, en ocasiones requiere de condiciones y manipulaciones especiales de los animales; sin embargo, constituyen la base para un mejor conocimiento sobre los mecanismos de patogenicidad que finalmente resultan en la manifestación de la enfermedad.

En estudios previos realizados en cobayos se observó que la producción de lesiones colónicas no era constante y dependía de múltiples factores. A partir de los estudios de **Carrera y Faust (1949)** se realizaron diversas variaciones metodológicas como el tipo de cultivo amibiano, rutas de inoculación y modificaciones en las condiciones fisiológicas como de manipulación del modelo; sin embargo, hay muy pocos reportes concernientes a la producción de lesiones intestinales con amibas axénicas. **Diamond y col., (1978)** indujo lesiones intestinales por vía intracecal en cobayos recién nacidos, pero los resultados no fueron reproducidos en un gran número de animales. Posteriormente, **Anaya-Velázquez y col., (1985)** con su modelo llamado "asa cecal lavada y cerrada" produjo lesiones amibianas típicas en el ciego de hámsteres y cobayos, con trofozoitos cultivados en condiciones axénicas y monoxénicas que le permitieron analizar los estadios tempranos de la amibiasis intestinal y cuantificar el contenido luminal durante el establecimiento de las lesiones invasoras amibianas.

La rata se ha empleado como modelo de amibiasis experimental desde las primeras décadas del siglo pasado, sin embargo, los resultados no han sido claros, ya que se han utilizado ratas recién destetadas (**Jones, 1946; Neal y Vincent, 1956**) cuya susceptibilidad a la infección es mayor, pero debido probablemente a que su sistema inmunológico está

## Antecedentes

pobremente desarrollado, así como al uso de aislados amibianos poco caracterizados o asociados en algunos casos a bacterias no caracterizadas (Das y col., 1979; Ishaq y Padma, 1980), lo cual puede enmascarar el fenómeno real de la patogénesis (Tsutsumi, 1988).

El jerbo (*Mertones unguiculatus*) es otro de los roedores comúnmente utilizados en el estudio de la amibiasis experimental desde mediados del siglo pasado (Carrera y Faust, 1949), y en la mayoría de los casos se han inoculado cultivos monoxénicos de *E. histolytica*. Los primeros resultados obtenidos en el jerbo no fueron claros en la descripción de las etapas tempranas de infección ni en la participación de las células huésped durante la invasión tisular (Chakravarty, 1977; Chadee y Meerovitch, 1984a, 1984b, 1985a, 1985b); estudios posteriores han descrito el desarrollo de lesiones microulcerativas con infiltrado inflamatorio y edema en la lámina propia asociadas a focos de necrosis que evolucionan espontáneamente a la curación y que bien, podrían ser útiles en el entendimiento de las lesiones producidas por *E. histolytica* en humanos asintomáticos (Shibayama y col., 1992).

Por otro lado, aunque el hámster ha sido el modelo animal más frecuentemente utilizado en estudios de amibiasis hepática, el desarrollo de amibiasis intestinal ha resultado difícil en este roedor, sin embargo, hay algunos reportes de lesiones cecales desarrolladas con cultivos axénicos pasados previamente por hígado antes de su inoculación (Ghadirian y Meerovitch, 1979) y con cultivos monoxénicos inoculados en el modelo del asa lavada y cerrada mencionado anteriormente en el cobayo (Anaya-Velázquez y col., 1985; Tsutsumi y col., 1990).

El ratón a su vez, ha sido un modelo difícil de infectar tanto intracecal como intrahepáticamente con *E. histolytica*, sin embargo, desde los estudios hechos por

## **Antecedentes**

---

Lancastre y col., (1968) se le ha empleado como modelo para estudiar los mecanismos de resistencia a la amibiasis. Neal y Harris (1977) reportaron que las cepas C<sub>3</sub>H/mg y CBA/ca son susceptibles a cultivo polixénico de *E. histolytica* por vía intracecal, sin embargo, Gold y cols. (1978) fracasaron en el intento de encontrar una cepa consistentemente susceptible a la amibiasis tras inocular intrahepáticamente en nueve cepas de ratón, diferentes cepas de *E. histolytica* mantenidas en condiciones axénicas y monoxénicas. En 1984, Ghadirian y Kongshavn reportaron el desarrollo de úlceras a nivel de mucosa en seis de diez cepas de ratón inoculadas vía intracecal con amibas axénicas, además de reconocer la participación de un gen dominante, provisionalmente designado Enh, el cual no esta ligado al complejo mayor de histocompatibilidad, pero se presume se encuentra asociado con la resistencia innata a la amibiasis más que con los mecanismos específicos de la respuesta inmune, sin embargo, no se sabe aún a que nivel y a través de que tipos celulares opera este gen responsable de la susceptibilidad a la amibiasis en estos roedores. Más tarde Owen (1985) inoculó por vía intracecal dos cepas de *E. histolytica*, SAW 760 y SAW 408 (zimodemo no invasor IX y zimodemo invasor II, respectivamente, Sargeant y Williams, 1979) mantenidas en condiciones polixénicas de cultivo en dieciocho cepas de ratón, y reportó que ambos zimodemos fueron capaces de invadir la mucosa intestinal de las cepas genéticamente susceptibles, mostrando alta mortalidad, particularmente con la cepa invasora. En el mismo año, Ghadirian y Kongshavn usaron la cepa C57BL/6 (considerada por ellos como susceptible a la amibiasis) y la A/J (considerada como resistente), para estudiar el papel del bazo en la resistencia innata de estos roedores y encontraron un aumento obvio en la resistencia a la amibiasis con la esplenectomía, tanto en la cepa de ratón genéticamente resistente como en la susceptible, la cual desarrolló numerosas úlceras sobre la mucosa de los animales no esplenectomizados y en el grupo esplenectomizado se



obtuvieron solo lesiones superficiales; lo cual sugiere que la esplenectomía exacerba la resistencia temprana a la amibiasis, incrementando dramáticamente su efecto cuando el intervalo entre la esplenectomía y la infección se prolonga hasta 12 y 15 días. Se presume que los monocitos de la médula espinal se movilizan en la sangre con mayor rapidez en los animales esplenectomizados y además al no ser secuestrados por el bazo, estos emigran en grandes grupos al sitio de la infección y proveen de un aumento en la protección. Stern y col., (1984) utilizaron ratones atímicos nu/nu (BALB/c) y sus crías nu/+ intactas del timo para evaluar la respuesta inmune humoral y la inmunidad mediada por células, además de delinear el papel del macrófago durante la amibiasis hepática; pero no produjeron lesiones hepáticas en forma constante y concluyeron que la presencia de macrófagos activados (por infección con *Trichinella*, pretratamiento con sílica o inmunización con lipopolisacárido) no parecía ser un factor crucial en la defensa del hospedero, así como tampoco que la inmunidad mediada por células (CMI) fuera un mecanismo crítico en la defensa contra *E. histolytica* en el ratón. La respuesta humoral evaluada después del reto con los trofozoítos mostró que la síntesis de anticuerpos IgG parecía no estar relacionada con la formación de absceso hepático y que la respuesta de anticuerpos IgM parecía no contribuir en eliminar al organismo durante las etapas tempranas de infección en el hígado del ratón. Rivero-Nava y col., (1997) y Velázquez y col., (1998) estudiaron el papel del neutrófilo en ratones neutropénicos (BALB/c) durante la amibiasis intestinal y el absceso hepático amibiano, respectivamente y encontraron que en el caso de los ratones neutropénicos inoculados por vía intracecal, el desarrollo de lesiones ulcerativas a tiempos tempranos tuvo una frecuencia mayor y un número mayor de lesiones cecales por ratón, que las desarrolladas en los ratones normales, lo cual sugirió que el neutrófilo tiene una participación importante en limitar el daño tisular durante la infección. De nueva cuenta, los ratones neutropénicos

## ***Antecedentes***

---

inoculados por vía intrahepática mostraron una extensión de las lesiones considerablemente mayor que la desarrollada en los normales, pero en ambos se observaron áreas de necrosis licuefactiva (lítica) con gran número de amibas, que en el caso de los ratones normales aparecieron entremezcladas con la reacción inflamatoria, pero no en el caso de los neutropénicos, en los que por el contrario, el infiltrado inflamatorio fue raramente visto, lo cual sugiere que el neutrófilo desempeña un importante papel como mecanismo de resistencia a la infección durante la amibiasis hepática en el ratón. Estos estudios además, permitieron observar que *E. histolytica* es capaz de producir daño al hígado en ausencia de células inflamatorias, lo cual contrasta con lo reportado en el hámster durante el absceso hepático experimental, animal en el que se sugirió que el daño producido en el parénquima hepático era ocasionado probablemente por la afluencia y destrucción de neutrófilos (Tsumi y col., 1984). En estudios hechos por Seydel y col., (1997) sobre las interacciones específicas entre los trofozoítos amibianos y el intestino humano se estableció el modelo de enfermedad SCID-HU-INT, en el se empleó un injerto de intestino humano en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) y propuso la participación activa de las células epiteliales intestinales en la repuesta inmune e inflamatoria del hospedero durante la amibiasis intestinal a través de la secreción de una variedad de citocinas como IL-1 $\beta$  e IL-8. En 1998 Seydel y Stanley reportaron en un modelo de amibiasis hepática la inducción de apoptosis en los hepatocitos y células inflamatorias de ratones SCID, sin embargo, mediante el uso de ratones C57/BL6 en los que se eliminó el gen que codifica para el receptor I del TNF sugirieron que *E. histolytica* induce muerte celular sin emplear las dos vías comunes de apoptosis que es la del ligando Fas/Fas y la mediada por el TNF- $\alpha$ . Actualmente se ha incrementado el uso de los animales transgénicos y nuligénicos o "knockout" como herramienta útil para el estudio específico de moléculas efectoras que se

## Antecedentes

---

piensa pudieran estar participando en la inmunidad innata del ratón a la amibiasis, ejemplo de ello es el trabajo realizado por Seydel y col., (2000) en el cual demuestran el papel protector del (INF- $\gamma$ ) y de la sintasa inducible del óxido nítrico en el absceso hepático amibiano en ratones SCID.

En el departamento de Biología Celular del CINVESTAV del IPN, en el laboratorio del Dr. Jesús Calderón Tinoco, se tiene la inquietud de conocer de que manera el óxido nítrico, el TNF- $\alpha$  y el TNF- $\gamma$  participan o son responsables de impedir el establecimiento de *E. histolytica* en el ratón. Para ello se propuso el empleo de ratones "knockout", que no sintetizan NO, TNF- $\alpha$  e INF-  $\gamma$ , los que se adquirieron en la casa comercial de Jackson Labs. con el parentesco genético de la cepa C57BL/6. Cepa que no se ha caracterizado como modelo para la amibiasis pero que se ha incluido en estudios de susceptibilidad a *E. histolytica* realizados en hígado (Gold y Kagan, 1978) y en intestino (Ghadirian y Kongshavn, 1984), en estudios de resistencia, examinando el efecto de la esplenectomía durante la infección intestinal por *E. histolytica* (Ghadirian y Kongshavn, 1985) y como modelo para estudiar las posibles rutas de inducción de apoptosis durante el absceso hepático amibiano (Seydel y Stanley, 1998). Por lo anterior, se estableció como propósito de este estudio el desarrollo de amibiasis intestinal en ratones C57BL/6 para conocer el comportamiento anatomopatológico de las lesiones y su evolución.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**OBJETIVO PRINCIPAL**

Conocer la frecuencia y características anatomopatológicas de las lesiones amebianas intestinales en ratones de la cepa C57BL/6 inoculados con trofozoítos axénicos de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS

**OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Conocer la evolución de las lesiones.
- Establecer si existe relación entre el número de trofozoítos presentes en la luz intestinal y la frecuencia de lesiones.
- Determinar la influencia del sexo en el desarrollo de la infección.

**MATERIAL Y METODOS**

**Cultivo axénico de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* (cepa HM1:IMSS)**

Los trofozoítos de la cepa HM1:IMSS de *E. histolytica* se cultivaron axénicamente sin antibiótico en botellas de cultivo de 162cm<sup>2</sup> (Costar, USA), en medio BI-S-33 de acuerdo al procedimiento de **Diamond y col., (1978)** suplementado con 15% de suero de bovino adulto (SBA) (Biofluids, USA) a 37°C. Una vez en confluencia a las 48h. se incubaron en un baño de agua-hielo durante 10 minutos y se cosecharon por centrifugación a 400g durante 5 minutos a 4°C en una centrífuga Damond, CRU-5000. Los trofozoítos se contaron en una cámara de Neubauer (Bright Line) y se ajustaron a una concentración de 10X10<sup>6</sup> trofozoítos en 500µl del mismo medio de cultivo donde se desarrollaron (medio condicionado).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **Material y métodos**

---

### **Obtención de medio condicionado y lisado amibiano**

El medio condicionado se obtuvo de la cosecha de un tubo de cultivo de 130x15mm (Bellco) en fase logarítmica de 48h de crecimiento a 37°C con medio BI-S-33 suplementado con 15% de suero de bovino adulto. El tubo se incubó en un baño de agua-hielo durante 10 minutos, se centrifugó a 400g durante 5 minutos a 4°C y por decantación suave se aisló el sobrenadante del paquete celular.

Para la obtención de lisado amibiano se realizó el mismo procedimiento descrito para el cultivo axénico de trofozoitos, pero a diferencia de que una vez obtenido el paquete celular y ajustarlo a la concentración de  $10 \times 10^6$  trofozoitos en 500 $\mu$ l del mismo medio, éste se conservó en tubos estériles de 15ml (Falcon) a -20°C por un tiempo aproximado de tres a cuatro meses, momento en el cual se planeo arbitrariamente su uso.

### **Manutención de los ratones C57BL/6 y grupos de estudio**

Un pie de cría de diez parejas de ratones (*Mus musculus musculus*) de la cepa C57BL/6 (Harlan, Lab.) libres de patógenos específicos (SPF) se mantuvieron en aisladores gnotobióticos (Micro-aislador, Lab Products Inc.) bajo condiciones estériles de alimento (purina), cama y agua, por el tiempo requerido para el abastecimiento de animales.

Se empleó un total de 124 ratones para la realización de este estudio, divididos de la siguiente manera (tabla 2)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 2 Número de animales utilizados por tiempo y grupo de estudio**

TIEMPOS (h)	Tratamiento de $1 \times 10^7$ trofozoítos		Tratamiento de lisado amibiano equivalente a $1 \times 10^7$ trofozoítos*	Tratamiento con medio condicionado*
	♀	♂		
3	6	4	6	6
6	6	6	6	6
12	6	6	6	6
24	7	11	6	6
48	6	6	6	6
TOTAL	31	33	30	30

\* En estos grupos se trabajo indistintamente el sexo

#### Tratamiento antiparasitario

Hembras y machos de 6 a 7 semanas de edad se les desparasitó por vía oral con una sonda esofágica-Endocal calibre del catéter 16, calibre de la aguja 14, radio opaco y con una longitud aproximada de 2.5cm. Se les administro metronidazol (Flagyl<sup>MR</sup>) a una dosis de 200mg/Kg de peso durante tres días consecutivos (Smith y col., 1985), momento a partir del cual se dejaron 10 días de reposo más 24h de ayuno previo a la inoculación intracecal de trofozoítos, lisado amibiano y medio condicionado.

#### Técnica quirúrgica

Los animales desparasitados se anestesiaron intraperitonealmente con pentobarbital sódico (Anestestal<sup>MR</sup>) a una dosis de 63mg/Kg de peso con una jeringa para insulina con aguja N° 29. Con crema depiladora comercial se removió el pelo del abdomen el cual se humedeció

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ***Material y métodos***

---

previamente con Antibenzil. Sujetados en posición de decúbito dorsal en una camilla para disección, bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar horizontal y con previa asepsia de la región abdominal, se les realizó una laparotomía en dos planos y exposición del ciego, donde se inocularon con una jeringa de insulina  $1 \times 10^7$  trofozoítos resuspendidos en  $500 \mu\text{l}$  de medio condicionado, lisado amibiano equivalente a  $1 \times 10^7$  trofozoítos y medio condicionado sin amibas. Se suturo en un sólo plano con hilo quirúrgico Dermalon 4-0.

### **Eutanasia y toma de tejido**

A los tiempos de 3, 6, 12, 24 y 48h después de la inoculación intracecal de los diferentes tratamientos, se realizó la eutanasia de los animales con cloroformo inhalado en un desecador. Para la remoción del ciego se cortó por la unión ileocecal y se abrió longitudinalmente para eliminar el material luminal cecal con agitación suave en 6ml de PBS a  $37^\circ\text{C}$ , lo cual se utilizó posteriormente para conocer la carga parasitaria del intestino. Las piezas de tejido se sujetaron con agujas en placas de cera dental y se fijaron con formalina amortiguada al 10% durante 48h, tiempo después del cual se pasaron a etanol al 70% hasta su inclusión en parafina.

### **Cuantificación de trofozoítos en el contenido cecal**

Con la finalidad de cuantificar el número de trofozoítos viables presentes en la luz intestinal, se removió el contenido cecal con 6ml de PBS previamente calentado a  $37^\circ\text{C}$ . La suspensión entera se depositó en tubos Falcon de 15ml y se centrifugo a 400g durante 5 minutos a temperatura ambiente en una centrifuga Damond, CRU-5000. El paquete se

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## **Material y métodos**

---

resuspensión en 1 ml de sobrenadante y se cuantificaron los trofozoítos en una cámara de Neubauer.

### **Preparación de tejidos para el análisis histológico**

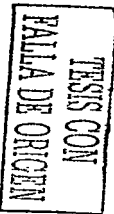
Los tejidos se deshidrataron en alcoholes graduados al 70%, 96%, absoluto, xilol-alcohol 1:2 y xilol, se incluyeron en parafina y se tomaron secciones de 5 micras para tinción con hematoxilina y eosina (H&E) e inmunohistoquímica para *E. histolytica*.

### **Análisis estadístico**

Se analizó la frecuencia de los animales infectados a los diferentes tiempos, sexos y tratamientos y la frecuencia de lesiones desarrolladas en cada ratón con el número de trofozoítos recuperados del contenido cecal mediante la prueba de chi-cuadrada en el paquete estadístico STATA 6.0 (Stata Corporation, USA).

### **Localización inmunohistoquímica de trofozoítos de *E. histolytica***

Para desparafinar los tejidos recuperados de animales inoculados con trofozoítos, se les dejó 1 h a 55°C previo a un baño con xilol (J.T.Baker) durante 10 minutos. Se inhibieron las peroxidasas endógenas con solución de metanol 100%-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 20 minutos y se hidrataron los cortes por medio de alcoholes graduados que fue absoluto, 96%, 80%, 70% y agua destilada. Se bloqueó con albúmina (Sigma) al 1% en PBS-Tween durante 30 minutos y se incubó con inmunoglobulinas (Ig) precipitadas de un suero humano con absceso hepático amibiano a una dilución 1:20 en PBS al 1% durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron lavados exhaustivos con PBS-Tween y se incubó IgG<sub>1</sub> de caballo anti-humano peroxidado (Becton) a una dilución de 1:30 en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Se





## ***Material y métodos***

---

reveló con Diaminobenzidina (Sigma) 10mg/50ml en agua destilada y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 30% y se realizó una contratinción con hematoxilina de la forma acostumbrada. Se maneja un control del segundo anticuerpo peroxidado.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**RESULTADOS**

**ASPECTO MACROSCOPICO Y EXAMEN EN FRESCO**

El aspecto macroscópico de los ciegos mostró tamaño y consistencia normales en todos los tiempos después de la inoculación con trofozoítos, lisado ambiente y medio condicionado aún a la observación bajo el microscopio estereoscópico.

El examen en fresco del contenido cecal en campo claro de los tres tratamientos mostró una consistencia que varió de semilíquida a sólida, en algunos casos abundante y en ocasiones escaso; el grupo inoculado con trofozoítos presentó además trofozoítos móviles a los tiempos de 3, 6 y 12h (Tabla 4). La media muestral del número de trofozoítos recuperados del contenido cecal fue similar en ambos sexos, sin diferencias estadísticas significativas. Al tiempo de 3h el número de trofozoítos recuperados en hembras fue de  $9.7 \times 10^5$ , en machos no fue cuantificado; a las 6h en hembras se recuperaron  $3.3 \times 10^5$  y en machos  $5.5 \times 10^4$ ; a las 12h el número de trofozoítos en hembras fue de  $9.5 \times 10^4$  y en machos  $7 \times 10^4$ , en los tiempos posteriores el número de trofozoítos fue escaso e incluso ausente. Este descenso en el tiempo se dio de igual modo en los porcentajes de frecuencia de lesión obtenidos con trofozoítos, sin embargo, no fueron precisamente los animales con mayor número de trofozoítos en su contenido cecal los que desarrollaron una mayor frecuencia de lesión. El resultado de esta asociación no pudo ser comprobado estadísticamente por las diferencias encontradas en el número de lesiones desarrolladas y el número relativamente pequeño de animales utilizados.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## **Resultados**

---

### **MICROSCOPIA DE LUZ**

La frecuencia total de lesiones en hembras inoculadas con trofozoítos fue de 29% y en machos de 27%. La frecuencia total de esta cepa considerando ambos sexos fue de 28% y por tiempos fue de 60% a las 3h, 58% a las 6h, 16% a las 12h, momento a partir del cual decreció abruptamente, 11% a las 24h y 8% a las 48h. El porcentaje total de lesiones con los tratamientos de lisado amibiano y medio condicionado fue de 16 (5/30) para ambos casos, con diferencias de porcentaje por tiempo que no resultaron significativas estadísticamente (Tablas 5 y 6)

Los tejidos obtenidos de hembras y machos inoculados con trofozoítos mostraron lesiones semejantes en todos los tiempos, aunque se observaron pequeñas diferencias en relación a la extensión y a la frecuencia de lesión, sin embargo, no fueron estadísticamente significativas, razón por la cual se usó indistintamente el sexo en los animales inoculados con lisado amibiano y medio condicionado. A las 3h el grupo inoculado con trofozoítos presentó pérdida del epitelio superficial con abundantes trofozoítos en la luz, o bien penetrando en la mucosa que fue parcialmente destruida, con escaso y en ocasiones abundante infiltrado inflamatorio principalmente de tipo agudo en la lámina propia y submucosa. El grupo inoculado con lisado amibiano presentó a este tiempo una frecuencia de lesión de 16% (1/6), con pérdida del epitelio superficial e infiltrado focal de neutrófilos en mucosa; el grupo inoculado con medio condicionado no produjo lesión (Fig. 2)

A las 6h posinoculación con trofozoítos se observaron algunas veces trofozoítos con células inflamatorias, el infiltrado inflamatorio fue moderado en mucosa y submucosa y esta última presentó edema en ocasiones. Los grupos inoculados con lisado amibiano y medio condicionado desarrollaron a este tiempo lesiones semejantes con frecuencias de 33

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **Resultados**

---

y 50% (2/3 y 3/6) respectivamente, con pérdida de la mucosa y escaso infiltrado inflamatorio en mucosa y submucosa (Fig.3)

A las 12h posinoculación con trofozoítos no se identificaron trofozoítos en el tejido, aunque en algunos casos se observaron en la luz del intestino. Aparecieron signos de regeneración en algunas áreas del tejido, como el epitelio superficial aplanado, disminución en el número de criptas y mucosa adelgazada, además de dos casos con úlceras estrechas. Los grupos de lisado amibiano y medio condicionado desarrollaron a este tiempo una frecuencia de lesión de 16% (1/6), con pérdida del epitelio superficial e infiltrado moderado en mucosa y submucosa (Fig. 5)

A las 24 (Fig. 6) y 48h (Fig. 7) se observaron úlceras con o sin trofozoítos, con edema intenso en submucosa y abundante infiltrado compuesto principalmente de neutrófilos y escasos mononucleares, que afectó mucosa, submucosa y muscular propia, además, úlceras epitelizadas con disminución en el número y tamaño de las criptas las cuales en ocasiones presentaron basofilia, núcleos apoptóticos, escaso infiltrado inflamatorio y disminución en la secreción de moco. A las 24h el grupo inoculado con lisado amibiano presentó una frecuencia de lesión de 16% (1/6), con una úlcera de apariencia similar a la desarrollada con trofozoítos. El grupo de medio condicionado a este tiempo no mostró lesión. A las 48h el grupo de lisado amibiano no desarrolló lesión y el de medio condicionado presentó una frecuencia de lesión de 16% (1/6), con pérdida de la mucosa y abundante infiltrado celular. Cabe mencionar que los animales inoculados con lisado amibiano y medio condicionado mostraron además en algunos casos edema generalizado en submucosa y focos de infiltrado de neutrófilos y escasos mononucleares a nivel de submucosa.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **Resultados**

---

### **INMUNOHISTOQUIMICA**

Cortes histológicos de ciegos obtenidos a las 6h posinoculación con trofozoitos se incubaron con IgG de suero de pacientes con absceso hepático amibiano. Los resultados mostraron la presencia de trofozoitos y el reconocimiento de rastros de amibas unidos al moco, pero no a otras estructuras (Fig. 4)

### **ANALISIS ESTADISTICO**

La frecuencia de lesiones por tiempo entre ambos sexos en el grupo inoculado con trofozoitos mostró una  $P < 0.05$ , de la misma manera que la asociación entre tratamientos a todos los tiempos, lo cual significa que las diferencias no fueron significativas entre los grupos y que los tres tratamientos aparentemente tienen la misma capacidad para producir lesión, a pesar de las frecuencias observadas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TABLA 3**

**FRECUENCIA DE LESIONES EN RELACION AL SEXO Y AL TIEMPO DE INOCULACION CON TROFOZOITOS**

TIEMPO DE INFECCION (h)	FRECUENCIA DE LESIONES		TOTAL
	♀	♂	
3	4/6	2/4	6/10 (60%)
6	3/6	4/6	7/12 (58%)
12	1/6	1/6	2/12 (16%)
24	0/7	2/11	2/18 (11%)
48	1/6	0/6	1/12 (8%)
	9/31 (29%)	9/33 (27%)	18/64(28%)

**TABLA 4**

**TROFOZOITOS RECUPERADOS DEL CONTENIDO CECAL EN HEMBRAS Y MACHOS**

TIEMPO DE INFECCION (h)	NUMERO DE TROFOZOITOS EN CONTENIDO CECAL	
	♀	♂
3	9.7X10 <sup>3</sup>	NC
6	3.3X10 <sup>3</sup>	5.5x10 <sup>3</sup>
12	9.5X10 <sup>4</sup>	7x10 <sup>4</sup>
24	0	0
48	0	0

NC = no se cuantificaron  
0 = no se observaron

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

**TABLA 5**

**FRECUENCIA DE LESIONES EN ANIMALES INOCULADOS CON LISADO AMBIANO**

<b>TIEMPO DE INFECCION (h)</b>	<b>FRECUENCIA DE LESIONES</b>
3	1/6 (16%)
6	2/6 (33%)
12	1/6 (16%)
24	1/6 (16%)
48	0/6 (0%)
<b>TOTAL</b>	<b>5/30 (16%)</b>

**TABLA 6**

**FRECUENCIA DE LESIONES EN ANIMALES INOCULADOS CON MEDIO CONDICIONADO**

<b>TIEMPO DE INFECCION (h)</b>	<b>FRECUENCIA DE LESIONES</b>
3	0/6 (0%)
6	3/6 (50%)
12	1/6 (16%)
24	0/6 (0%)
48	1/6 (16%)
<b>TOTAL</b>	<b>5/30 (16%)</b>

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



**Fig. 1** Mucosa normal de colon (m) con criptas rectas tapizadas por células caliciformes; entre las criptas (flecha) se observan escasos linfocitos; submucosa (s) con tejido fibroso laxo y capa muscular propia (mu). H&E 200X

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

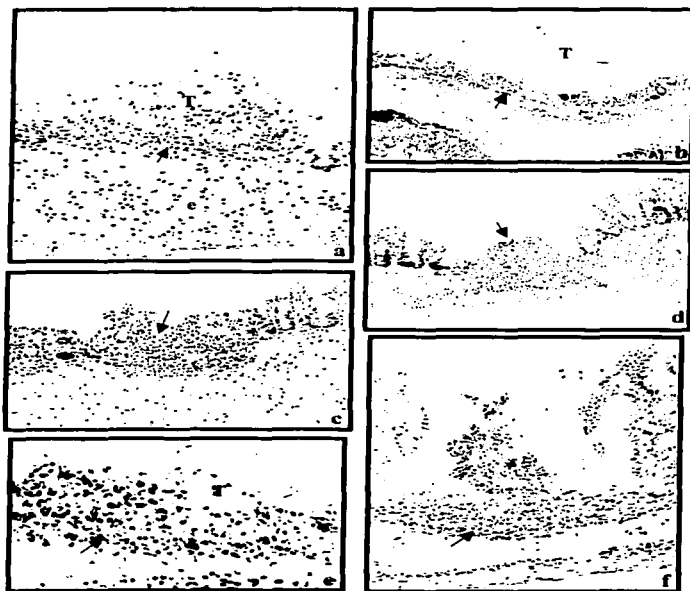




**Fig. 2** Ratón a las 3h posinoculación. a) Macho con trofozoítos: úlcera en mucosa con infiltrado abundante de neutrófilos en mucosa y submucosa (flecha). Se observan abundantes trofozoítos (T). H&E 200X b) Hembra con trofozoítos: úlcera superficial con necrosis y escaso infiltrado inflamatorio en submucosa (flecha). Se observan algunos trofozoítos (T). H&E 200X c) Con lisado amibiano: úlcera superficial con escaso infiltrado de neutrófilos en mucosa (flecha). H&E 400X d) Con medio condicionado: tejido sano. H&E 400X

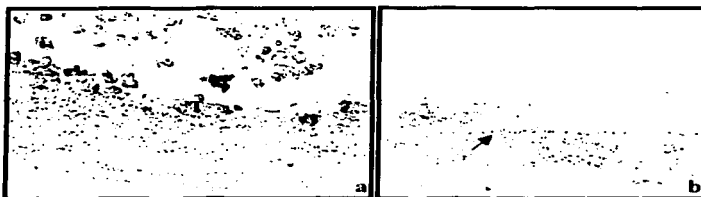
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Resultados



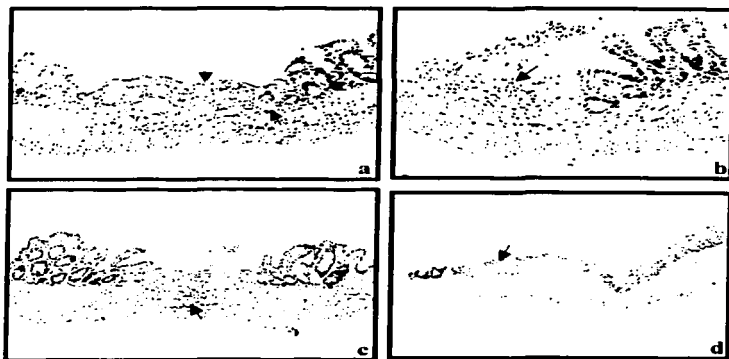
TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

**Fig. 3** Ratón a las 6h posinoculación. **a)** Hembra con trofozoítos: hay pérdida de la mucosa con numerosos trofozoítos (T) e infiltración moderada de neutrófilos (flecha) entre los trofozoítos y en la submucosa. La submucosa muestra edema (e). H&E 400X **b)** Macho con trofozoítos: se observa una úlcera con gran cantidad de trofozoítos (T), edema leve en submucosa e infiltración de neutrófilos en mucosa y submucosa (flecha). H&E 200X **c)** Con medio condicionado: hay pérdida del epitelio superficial e infiltrado celular en mucosa (flecha). H&E 400X **d)** Úlcera presente en el tejido de una hembra inculada con trofozoítos: presenta intenso infiltrado inflamatorio en mucosa y submucosa (flecha). No hay trofozoítos. H&E 200X **e)** Macho con trofozoítos: se observa infiltrado compuesto principalmente por PMN (flecha) en mucosa y submucosa y trofozoítos con fagocitosis de eritrocitos (T). H&E 800X **f)** Con lisado amibiano: Se observa pérdida del epitelio superficial e infiltrado moderado de neutrófilos en mucosa y submucosa (flecha). H&E 400X



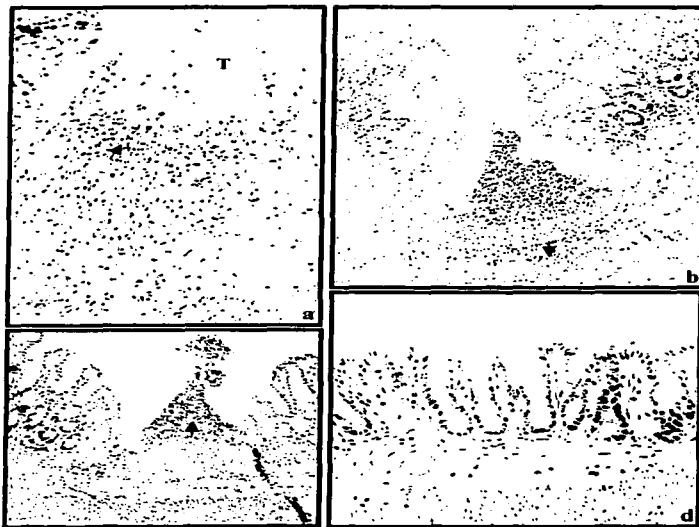
**Fig. 4** Macho a las 6h posinoculación. **a)** Localización inmunohistoquímica de trofozoitos (T) de *Entamoeba histolytica* marcados intensamente con IgG de suero de pacientes con absceso hepático amibiano. 400X **b)** Testigo del segundo anticuerpo. Se observa infiltrado inflamatorio (flecha). 400X

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



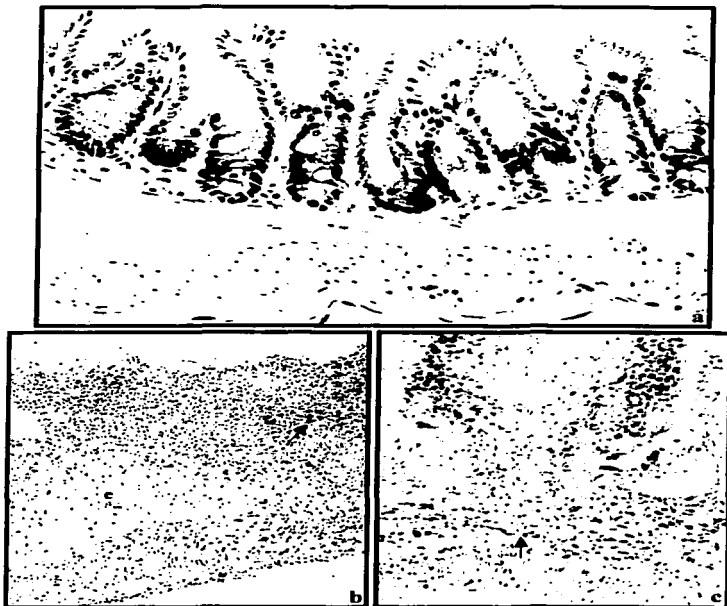
**Fig. 5** Ratón a las 12h posinoculación. **a)** Hembra inoculada con trofozoítos: úlcera epitelizada cubierta por epitelio aplanado (punta), con infiltrado leve en subucosa (flecha) y disminución en el número y tamaño de las criptas. H&E 200X **b)** Macho con trofozoítos: úlcera con escaso infiltrado inflamatorio en mucosa (flecha). H&E 400X **c)** Con lisado amibiano: pérdida del epitelio superficial con escaso infiltrado hasta la capa muscular externa (flecha). H&E 400X **d)** Con medio condicionado: pérdida del epitelio superficial con escaso infiltrado de neutrófilos en mucosa y submucosa (flecha). H&E 200X

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig. 6** Ratón a las 24h posinoculación. **a)** Macho con trofozoítos: úlcera con escaso infiltrado en mucosa. Se observan trofozoítos (T). H&E 400X **b)** Macho con trofozoítos: úlcera sin trofozoítos; hay numerosos neutrófilos en la submucosa (flecha). H&E 200X **c)** Con lisado amibiano: úlcera con infiltrado de PMN principalmente en mucosa (flecha). H&E 200X **d)** Con medio condicionado: tejido sano. H&E 200X

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig. 7** A las 48h. **a)** Hembra inoculada con trofozoitos: tejido sano. H&E 400X **b)** Hembra inoculada con trofozoitos: se observa abundante infiltrado celular principalmente de PMN con escasos mononucleares en todas las capas del intestino (flecha) y edema intenso en submucosa (e). H&E 200X **c)** Macho inoculado con medio condicionado: se presenta úlcera con infiltrado de PMN en todas las capas. H&E 400X

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**DISCUSION**

En el estudio de la amibiasis intestinal experimental *in vivo* se ha observado que son varios los factores que deben ser considerados para entender el comportamiento de los modelos animales. Estudios previos han revelado que la capacidad de los modelos para desarrollar la enfermedad depende, entre otros factores, de la virulencia del parásito, la cepa amibiana utilizada, las condiciones bajo las cuales se ha mantenido el cultivo, el tamaño del inóculo, factores genéticos, la edad y las condiciones inmunológicas de los animales. De esta manera, la frecuencia y el grado de lesión desarrollados en un modelo, pueden ser característicos de ciertas circunstancias. Por otra parte, varios autores han considerado la escala de Neal propuesta desde 1951, para caracterizar el desarrollo de la amibiasis intestinal en los modelos animales. Debido a que todas las lesiones encontradas en este estudio fueron similares, tomamos como criterio de evaluación de la intensidad de éstas, la pérdida del epitelio superficial, la pérdida parcial o total de la mucosa con necrosis e inflamación y con o sin trofozoitos en el sitio de la lesión. En todos los casos hubo lesiones ulceradas agudas, confinadas a la mucosa, con reacción inflamatoria de intensidad variable, compuesta principalmente por polimorfonucleares, que afectaban algunas o todas las capas del intestino. La lesión más aguda y más frecuente se observó a las 3 y 6h después de la inoculación con trofozoitos e infiltrado inflamatorio; a partir de las 12h aparecieron signos de regeneración de la mucosa.

En general, la lesión más comúnmente reportada en los estudios de amibiasis experimental ha sido la úlcera (Ghadirian y Kongshavn, 1984; Owen, 1985; Ghosh y col., 1994; Rivero-Nava y col., 1997), seguida en frecuencia del ameboma (Ghosh y col., 1994) y el granuloma (Rivero-Nava y col., 1997). En este estudio, las características de las lesiones desarrolladas sugieren un modelo agudo de enfermedad que procede en corto tiempo a la



## Discusión

---

regeneración y en contraste con otros autores (Ghadirian y Kongshavn, 1984; Houpt y col., 2002) no evoluciona a la cronicidad; debido probablemente a la cepa amibiana utilizada y a las condiciones bajo las cuales fue mantenida, ya que a pesar de que se desconoce aún el papel de las bacterias en la patogenia de las amibas, la mayoría de los modelos crónicos de enfermedad reportados emplean cepas amibianas crecidas con cultivos bacterianos (Owen, 1985; Ghosh y col., 1994).

La frecuencia total de lesión obtenida fue de 28%, equivalente a 18 animales infectados de un total de 64 ratones. Otros estudios realizados en esta cepa han reportado un porcentaje de lesión de 12.5 (2/16) en ratones inoculados por vía intrahepática con  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  trofozoítos de las cepas HMI y HK-9 axénicas y HM15 y HM19 cultivadas con *Bacteroides symbiosus* y sacrificados 3 a 7 días después de la inoculación (Gold y Kagan, 1978). Seydel y Stanley (1998) reportaron una frecuencia de lesión de  $22 \pm 5\%$  a las 48h posinoculación intrahepática de  $1 \times 10^6$  trofozoítos axénicos HM1:IMSS y en un estudio reciente hecho por Houpt y col., (2002) se señala una frecuencia de lesión de 15% (4/27) en hembras de seis semanas inoculadas por vía intracecal con  $1 \times 10^7$  trofozoítos xénicos HM1:IMSS a tiempos mayores de una semana. Aparentemente los modelos agudos de infección reportados en estos estudios muestran porcentajes mayores de frecuencia de lesión que los descritos para los modelos crónicos de enfermedad y además estos últimos coinciden en el uso de cepas amibianas asociadas a bacterias.

La preferencia por el uso de los machos surge desde el inicio del desarrollo de los modelos amibianos *in vivo*, sin embargo, las hembras también han sido utilizadas por algunos autores (Lushbaugh y col., 1978; Ghadirian y Meerovitch, 1979; Stern y cols., 1984; Rivero-Nava y col., 1997; Velázquez y col., 1998). Estudios que tratan la influencia del sexo en la amibiasis invasora del hígado en seres humanos (González-Montesinos y col.,



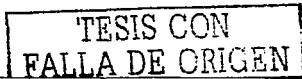
1971) y estudios serológicos realizados en muestras procedentes del Banco Nacional de Suero (Caballero-Salcedo y col., 1994) revelan que existe una relación entre las hormonas sexuales femeninas y la respuesta inmune desencadenada durante la amibiasis. Es sabido que existe una cercana relación entre hormonas sexuales y el sistema inmune, lo cual es importante porque las hormonas sexuales influyen en la diferenciación, madurez y migración de los linfocitos, que son de vital importancia en términos de capacidad inmune. Se conoce que el principal blanco de acción de las hormonas sexuales son los linfocitos y afectan su habilidad para interactuar con otras células, su función como productores de factores inmunoreguladores y la expresión de antígenos de superficie. Las hormonas sexuales modulan además el curso de las enfermedades autoinmunes, actuando en múltiples células y sistemas e influyendo en una respuesta inmune supresora o activadora dependiendo del lugar donde actúan (Ansar-Ahmed y col., 1985). Así, se sabe que los estrógenos estimulan el sistema fagocítico mononuclear, resultando en una mejor respuesta inmune humoral y celular contra la amiba y limitando la invasión del organismo por el parásito. Se cree que esto puede explicar en parte el hecho de que la amibiasis invasora en el hígado, pero no en el colon, sea más frecuente en hombres que en mujeres (Caballero-Salcedo y col., 1994). Por otro lado, la frecuencia total de lesión obtenida en nuestro estudio con la inoculación de trofozoítos fue de 29% (9/31) en hembras y de 27% (9/33) en machos. El análisis estadístico de estos porcentajes no mostró diferencias significativas entre ambos sexos y el resultado histológico demostró también semejanza de las lesiones, caracterizadas por ser superficiales, con pérdida de la mucosa y focales en su mayoría, por lo que decidimos utilizar indistintamente el sexo en los tratamientos de lisado amibiano y medio condicionado; sin embargo, el balance hormonal en las hembras puede variar durante el ciclo estral y a lo largo de toda su vida, proveyendo quizá al hospedero de

## Discusión

---

mecanismos inespecíficos de defensa contra agentes infecciosos, o deshabilitándolo de una respuesta inmune competente, como es el caso del incremento en la mortalidad causada por el absceso hepático amibiano debido al hipoestrogenismo en el humano (Ansar-Ahmed y col., 1985).

Por otra parte, un tercio del 72% de los animales que no desarrollaron lesiones en nuestro estudio presentó signos de regeneración del tejido y algunas alteraciones en su morfología como zonas con infiltrado inflamatorio en mucosa y submucosa, edema focal, congestión y núcleos apoptóticos, consideramos que estos cambios se debieron probablemente a la presencia de úlceras vecinas ya que el epitelio superficial y en general toda la mucosa estaban conservados. Como signos de regeneración presentes a las 12h, momento a partir del cual la frecuencia de lesión disminuyó abruptamente y las lesiones evolucionaron a la remisión, se encontró la mucosa adelgazada, el epitelio superficial aplanado, disminución en el número de criptas, basofilia citoplásmica, figuras mitóticas, fibrosis e infiltrado inflamatorio en submucosa. Cambios que en la mayoría de los casos se observaron de manera focal en sitios reconocidos como úlceras epitelizadas o en proceso de epitelización. Otros estudios en modelos crónicos de enfermedad como el de Chadee y Meeroovitch (1985b) realizado en gerbos inoculados intracecalmente con trofozoítos monoxénicos de *E. histolytica*, reportaron regeneración glandular e interglandular de los tejidos epiteliales a los 60 días después de la inoculación con migración de las células epiteliales, intenso infiltrado de neutrófilos en lámina propia, mitosis en criptas y en el epitelio, infiltración de fibroblastos en lámina propia y ausencia de células caliciformes. Ghosh y col., (1994) mencionaron regeneración de la mucosa ulcerada a partir del décimo día posinoculación intracecal de trofozoítos monoxénicos de *E. histolytica* en ratones C3H/HeJ, que caracterizaron como una organización papilar de las glándulas o como pequeñas glándulas



redondeadas y amontonadas; observaron hiperplasia de los folículos linfoides de la submucosa y fibrogénesis en la vecindad de las úlceras amibianas al comienzo de su progresión. **Rivero-Nava y col., (1997)** encontraron regeneración de las capas epiteliales a las 48h posinoculación intracecal de amibas axénicas en ratones BALB/c, la cual se caracterizó por basofilia citoplásmica, reducción del moco epitelial, aumento de la mitosis y presencia de amibas en el lumen intestinal próximo a la lesión. Esto nos permite concluir que la cepa C57BL/6 además de presentar una frecuencia de lesión menor que la de otras cepas muestra una evolución de las lesiones más rápida a la curación.

La cuantificación de trofozoítos en el contenido cecal ha sido en el estudio de la amibiasis intestinal una herramienta útil e incluso un parámetro para caracterizar la infección (**Ghadirian y Kongshavn, 1984; Ghadirian y Kongshavn, 1985; Rivero-Nava y col., 1997**); para dicho fin se han empleado diferentes metodologías, nosotros disolvimos el contenido cecal en 6ml de amortiguador de fosfatos (PBS) previamente calentado a 37°C y lo centrifugamos durante 5 minutos a 400g; resuspendimos el paquete en 1ml del sobrenadante y cuantificamos en una cámara de Neubauer. Los resultados que obtuvimos nos muestran que los trofozoítos disminuyen con el tiempo, de la misma manera como ocurre con la frecuencia de lesión y que a partir de las 12h hay un número escaso o incluso ausente de trofozoítos en el contenido cecal. Nuestros resultados difieren con lo propuesto por **Ghadirian y Kongshavn (1984)** para esta cepa, a la cual definen como susceptible debido a que el número de trofozoítos encontrados en el ciego aumenta con el tiempo e incluso permanece en niveles altos hasta el día veinticinco, momento a partir del cual decrece gradualmente, sin embargo, coinciden en parte con lo recientemente propuesto por **Haupt y col., (2002)** quienes describen que la cepa C57BL/6 con una frecuencia de 15% de lesión (4/27), posee una resistencia innata al reto intestinal con trofozoítos de *E. histolytica*,

## Discusión

incluyendo ratones "knockout" con parentesco genético en esta cepa, pero que por otro lado logra establecer un modelo crónico de enfermedad semejante al desarrollado en la cepa C3H/HeJ. Aunque el propósito de evaluar la relación entre el número de trofozoitos presentes en el contenido cecal con la frecuencia de lesiones desarrolladas no pudo ser llevado a cabo, es importante mencionar que no fueron precisamente los animales infectados los que tuvieron las cifras más altas de trofozoitos en el contenido cecal, esto es, que a pesar de que la mayor carga parasitaria encontrada coincide con los tiempos en los cuales se obtuvieron los porcentajes más altos de frecuencia de lesión, no todos los ratones que tuvieron una carga parasitaria elevada desarrollaron lesión. Por su parte, **Rivero-Nava y col., (1997)** reportaron que en ratones BALB/c los tiempos en los que se desarrollan los porcentajes más altos de lesión, no son a los que se recuperan las cargas parasitarias más altas, y **Ghadirian y Kongshavn (1984)** como ya se había dicho, reportan que en la cepa C57BL/6 la carga parasitaria del ciego se incrementa de tres a cuatro semanas antes de declinar gradualmente, mientras que en la cepa A/J los parásitos nunca son vistos. Estos resultados nos confirman que la resistencia de cada organismo contra agentes infecciosos depende en gran parte de sus mecanismos inespecíficos de defensa.

Algunos autores sustentan que se requiere necesariamente del contacto físico de los trofozoitos para producir lesión en las células blanco, es por ello que a través del lisado amibiano y el medio condicionado nos interesamos en conocer que acción lítica podían tener proteasas liberadas al medio sin la unión previa de lectinas. En los animales inoculados con lisado amibiano y medio condicionado se observó una frecuencia de lesión de 16% (5/30) en ambos tratamientos y el desarrollo de úlceras estrechas de características semejantes a las descritas anteriormente, esto es, con pérdida del epitelio superficial, edema en submucosa e infiltrado inflamatorio en mucosa y submucosa compuesto principalmente

## ***Discusión***

---

de neutrófilos. Cabe mencionar que a pesar del 28% de frecuencia de lesión desarrollado en el grupo inoculado de trofozoitos, el análisis estadístico de todos los grupos no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, lo cual sugiere que todos tienen la misma capacidad para producir lesión. El resultado histológico no obstante varió en la extensión de las lesiones y en la intensidad del infiltrado celular, lo que nos lleva a pensar que posiblemente los trofozoitos se valen de diferentes mecanismos de acción para causar lesión en los diferentes tratamientos además de la adhesión, como es la inserción de canales derivados del parásito en las células del hospedero (Lynch y col., 1982) o la liberación de sustancias tóxicas secretadas por la amiba (Lushbaugh y col., 1979, López-Revilla y Fernández 1980, Feingol y col., 1985). Comparando la respuesta que la cepa C57BL/6 desarrolló en este estudio con la reportada por otros autores, concluimos que es un modelo agudo resistente a la amibiasis intestinal, con bajos porcentajes de frecuencia de lesión que evolucionan a la curación, pero que tiene además posibilidades de desarrollar condiciones crónicas de enfermedad, esto tal vez asociado con la edad de los animales o con el uso de cepas amibianas crecidas en cultivos bacterianos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**CONCLUSIONES**

- La cepa C57BL/6 es un modelo agudo resistente a la amibiasis intestinal
- Las lesiones se confinan a nivel de la mucosa con infiltración moderada a intensa principalmente de neutrófilos
- El sexo no influye en el desarrollo de la infección
- En los ratones C57BL/6 la frecuencia de lesiones amibianas y el tiempo de evolución de éstas fueron menores que las observadas en otras cepas

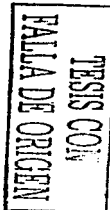
**PERSPECTIVAS**

- Comparar el desarrollo de lesiones amibianas intestinales en ratones C57BL/6 disminuidos de neutrófilos con respecto a ratones normales de la misma cepa
- Caracterizar el desarrollo de lesiones hepáticas amibianas en este modelo
- Estudiar el papel que desempeñan el NO, el TNF y el INF- $\gamma$  en el desarrollo de lesiones hepáticas e intestinales producidas por *E. histolytica* en ratones "knockout" para éstas moléculas, así como en ratones disminuidos de neutrófilos con parentesco genético en la cepa "knockout" C57BL/6

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**BIBLIOGRAFIA**

- Acosta G., Cote V., Isibasi A. y Kumate J. (1985). Anticuerpos anti-*Entamoeba histolytica* de clase IgA en el calostro de mujeres mexicanas. *Inmunología (Spain)* 4: 24
- Anaya-Velázquez F., Martínez-Palomo A., Tsutsumi V. y González-Robles A. (1985). Intestinal invasive amebiasis: an experimental model in rodents using axenic or monoxenic strains of *Entamoeba histolytica*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 34(4): 723
- Ansar-Ahmed S., Penhale J. y Talal N. (1985). Sex hormones, immune responses and autoimmune diseases. *American Journal of Pathology*, 121: 531
- Braga L., Ninomiya H. y McCoy J. (1992). Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Investigation*, 90: 1131
- Caballero-Salcedo A., Viveros-Rogel M., Salvatierra B., Tapia-Conyer R., Sepulveda-Amor, Gutierrez G. y Ortiz-Ortiz L. (1994). Seroepidemiology of amebiasis in México. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 50: 412
- Carrera G. y Faust E. (1949). Susceptibility of the guinea pig to *Entamoeba histolytica* of human origin. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29: 647
- Chadee K. y Meerovitch E. (1984a). The pathogenesis of experimental induced amebic liver abscess in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *American Journal of Pathology*, 117: 71
- Chadee K. y Meerovitch E. (1984b). The Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) as an experimental host for *Entamoeba histolytica*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 33: 47
- Chadee K. y Meerovitch E. (1985a). *Entamoeba histolytica*: early progressive pathology in the cecum of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 34: 283
- Chadee K. y Meerovitch E. (1985b). The pathology of experimentally induced cecal amebiasis in gerbils (*Meriones unguiculatus*). Liver changes and amebic liver abscess formation. *American Journal of Pathology*, 119: 485
- Das S., Das P. y Rai G. (1979). Revival of pathogenicity of axenically grown *Entamoeba histolytica* for the rat. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 57: 141
- Del Muro R., Acosta E., Merino E., Glender W. y Ortiz-Ortiz L. (1990). Diagnosis of intestinal amebiasis using salivary IgA antibody detection. *Journal of Infectious Diseases*, 162: 1360



Diamond L., Harlow D. y Cunninck, C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(4): 431

Espinosa-Cantellano M. y Martínez-Palomo A. (2000). Patogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(2): 318

Feingold C., Bracha R., Wexler A. y Mirelman D. (1985). Isolation, purification and partial characterization of an enterotoxin from extracts of *E. histolytica* trophozoites. *Infection and Immunity*, 48: 211

García-Manzo N., Escandon-Romero C., Escobedo-De la Peña J., Hernández-Ramos J. y Fierro-Hernández Hilario. (1994). Amebiasis in the Epidemiologic Transition in México: Its Morbidity and Mortality Trends in the Mexican Institute of Social Security. *Archives of Medical Research*, 25(4): 393

Ghadirian E. y Meerovitch E. (1979). Pathogenicity of axenically cultivated *Entamoeba histolytica*, strain 200:NIH, in the hamster. *Journal of Parasitology*, 65(5): 768

Ghadirian E. y Kongshavn P. (1984). Genetic control of susceptibility of mice to infection with *E. histolytica*. *Parasite Immunology*, 6: 349

Ghadirian E. y Kongshavn P. (1985). The effect of splenectomy on resistance of mice to *Entamoeba histolytica* infection. *Parasite Immunology*, 7: 479

Ghosh K., Mancilla R. y Ortiz-Ortiz L. (1994). Intestinal amebiasis: histopathologic features in experimentally infected mice. *Archives of Medical Research*, 25(3): 297

Gold D. y Kagan G. (1978). Susceptibility of various strains of mice to *Entamoeba histolytica*. *Journal of Parasitology*, 64(5): 937

Gold D. y Norman L. (1979). Studies on the preservation and enhancement of the virulence of some strains of *Entamoeba histolytica* in axenic and monoxenic cultures. *Journal of Parasitology*, 65(6): 970

González-Montesinos F., Lee-Ramos A. y Aguirre-García J. (1971). Influencia del sexo y la edad en la amebiasis invasora del hígado. *Archivos de Investigación Médica* (Méx.), 2: 395

Grundy M., Cartwright-Taylor L., Lundin L., Thors C. y Huld G. (1983). Antibodies against *Entamoeba histolytica* in human milk and serum in Kenya. *Journal of Clinical Microbiology*, 17: 753

Hanson, L. y Wigzell, H. (1985). *Immunology*. Butterworth and Co. (eds). London

Houpt E., Glembocki D., Obrig T., Moskaluk C., Lockhart L., Wright R., Seaner R., Keepers T., Wilkins T. y Petri W. (2002). The Mouse Model of Amebic Colitis Reveals Mouse Strain Susceptibility to Infection and Exacerbation of Disease by CD4+ T cells'. *The Journal of Immunology*, 169: 4496

TRIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **Bibliografía**

---

- Ishaq M. y Padma M. (1980). Occurrence of hepatic amoebiasis in rats inoculated intracably with a virulent strain. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(Supl. 1): 140
- Jansson A., Gillin F., Kagardt U. y Hagblom P. (1994). Coding of hemolysins within the ribosomal RNA repeat on a plasmid in *Entamoeba histolytica*. *Science*, 263: 1440
- Jones W. R. (1946). The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica* with a method for evaluating the anti-amoebic properties of new compounds. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 40: 130
- Kaushik S., Ravindra N., Vinayak V. y Chakravarty R. (1977). Amebic Granuloma-An Experimental Study. *American Journal Gastroenterology*, 68(1): 64
- Kelsall B. y Ravdin J. (1993). Degradation of human IgA by *Entamoeba histolytica*. *Journal of Infectious Diseases*, 168: 1319
- Lancastre F., Bazin J., Le Fichoux Y., Mougeot G. y Gargouri M. (1968). Experimental amoebiasis. Finding of a pathogenic type of *Entamoeba histolytica* in immune-tolerant white mice. *Annals of Parasitology Human Comparative*, 43(6): 623
- Leeson T., Leeson C. y Paparo A. (1990). *Texto/Atlas de Histología*. Interamericana. McGraw Hill
- Leippe M., Andra J. y Muller-Eberhard H. (1994). Cytolytic and antibacterial activity of synthetic peptides derived from amoebapore, the pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America*, 91: 2602
- Lin J. y Chadee K. (1992). Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-Arginine. *Journal of Parasitology*, 148(12): 3999
- López-Revilla R. y Fernández S. (1980). Cytopathogenicity of *E. histolytica*: hemolytic activity of trophozoite homogenates. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29: 209
- Lushbaugh W., Kairalla A., Loadholt C. y Pittman F. (1978). Effect of hamster liver passage on the virulence of axenically cultivated *Entamoeba histolytica*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 27(2): 248
- Lushbaugh W., Kairalla A., Cantej J., Hofbauer A. y Pittman F. (1979). Isolation of a cytotoxin-enterotoxin from *E. histolytica*. *Journal of Infectious Diseases*, 139: 9
- Lynch E., Rosenberg I. y Gitler C. (1982). An ion-channel forming protein produced by *E. histolytica*. *EMBO J.*, 1: 801

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Bibliografía

---

- MacMicking J., Xie Q. y Nathan C. (1997). Nitric Oxide and Macrophage Function. *Annual Review of Immunology*, 15: 323
- Martínez-Palomo A. (1989). Amibiasis. Ed. Panamericana
- Mattern F. y Keister D. (1977). Experimental amebiasis. II. Hepatic amebiasis in the newborn hamster. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 26: 401
- Mazanec M., Nedrud J., Kaetzel C. y Lamm M. (1993). A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immunology Today*, 14: 430
- Miller M. (1952). The experimental infection of *Macaca mulatta* with human strains of *Entamoeba histolytica*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1: 417
- Mirelman D. (1987). Ameba-Bacterium Relationship in Amebiasis. *Microbiological Reviews*, 51(2): 272
- Neal R. (1951). Some observations on the variation of virulence and response to chemotherapy of strains of *Entamoeba histolytica* in rats. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 44: 439
- Neal R. y Vincent P. (1956). Strain variation in *Entamoeba histolytica*. II. The effect of serial liver passage on the virulence. *Parasitology*, 46: 173
- Ortiz-Ortiz L., Mora N., Zambrano-Villa S., Carrero J., Sánchez-Zerpa M., Osuna A. y Rosales-Borjas D. (1998). Secretary immune response in patients with intestinal amoebiasis. *Parasite Immunology*, 20: 503
- Owen D. G. (1985). A mouse model for *Entamoeba histolytica* infection. *Laboratory Animals*, 19: 297
- Ghosh P., Mancilla R. y Ortiz-Ortiz L. (1994). Intestinal Amebiasis: Histopathologic Features in Experimentally Infected Mice. *Archives of Medical Research*, 25(3): 297
- Ramos-Martínez E., Martínez-Madrigal F., Velasco-Aviles F., Flores-Barroeta F. y Aguirre-García J. (1986). Amibiasis: estudio comparativo de dos grupos de 5000 necropsias del Hospital General "Dr. Bernardo Sepúlveda G." del Centro Médico Nacional. *Archives of Medical Research*, 17(Supl.1): 351
- Ravdin J. I. (1995). Amebiasis. *Clinical Infectious Diseases*., 20: 1453
- Rivero-Nava L., Aguirre-García J. y Calderón J. (1997). Production of amebic intestinal lesions in BALB/c mice. *Archives of Medical Research* 28:S220
- Salata R., Pearson R. y Ravdin J. (1985). Interaction of human leukocytes with *Entamoeba histolytica*: killing of virulent amebae by the activated macrophage. *Journal of Clinical Investigation*, 76: 491

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Bibliografía**

- Salata R., Martínez-Palomo A. y Murphy C. (1986). Patients treated for amebic liver abscess develop a cell mediated immune response effective in vitro against *Entamoeba histolytica*. *Journal of Immunology*, 136: 2633
- Salata R., Murray H., Rubin B. y Ravdin J. (1987). The role of gamma interferon in the generation of human macrophages and T lymphocytes cytotoxic for *Entamoeba histolytica*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37: 72
- Salata R., Martínez-Palomo A., Conales L. y Ravdin J. (1990). Immune sera suppresses the antigen specific proliferative response in T lymphocytes from patients cured of amebic liver abscess. *Infection and Immunity*, 58: 3941
- Seydel K., Li E., Swanson P. y Stanley S. (1997). Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis. *Infection and Immunity*, 65(5): 1631
- Seydel K. y Stanley S. (1998). *Entamoeba histolytica* induces host cell death in amebic liver abscess by a non fas-dependent, non-tumor necrosis factor alpha dependent pathway of apoptosis. *Infection and Immunity*, 66(6): 2980
- Seydel K., Smith S. y Stanley S. (2000). Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease. *Infection and Immunity*, 68(1): 400
- Sharma P., Krishna-Prasad B. y Dutta G. (1987). Coproantibodies in intestinal amoebiasis using axenic *Entamoeba histolytica* antigen. *Indian Journal of Medical Research*, 68: 423
- Shibayama-Salas M., Tsutsumi V. y Martínez-Palomo A. (1992). Early invasive Intestinal Amebiasis in Mongolian Gerbils. *Archives of Medical Research*, 23(2): 187
- Smith J., Chadee K. y Meerovitch E. (1985). Failure to establish experimental *Entamoeba histolytica* infection in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) naturally infected with *Entamoeba muris*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79: 875
- Snipes R. (1981). Anatomy of the Cecum of the Laboratory Mouse and Rat. *Anatomy and Embryology*, 162: 455
- Stanley S. L. (2001). Pathophysiology of amoebiasis. *Trends in Parasitology*, 17: 280
- Stern J., Graybill J. y Drutz D. (1984). Murine amebiasis: The role of the macrophage in host defense. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 33(3): 372
- Treviño-García N., Escandon-Romero C., Cabral-Soto J., Escobedo-De la Peña J., Olvera-Alvarez J. y Silva-Batalla A. (1997). Patterns of the morbidity and mortality of amebiasis and amebic liver abscess in México: An ecological analysis. *Archives of Medical Research*, 28: S290

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **Bibliografía**

---

Tsutsumi V., Mena-López R., Anaya-Velázquez F. y Martínez-Palomo A. (1984). Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *American Journal of Pathology*, 117: 81

Tsutsumi V. y Martínez-Palomo A. (1988). Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis: An ultrastructural study. *American Journal of Pathology*, 130(1): 112

Tsutsumi V., Anaya-Velázquez F. y Martínez-Palomo A. (1990). Amibiasis intestinal experimental: Invasión y extensión de la lesión amibiana. *Archivos de Investigación Médica*, 21(Supl. 1): 47

Velázquez C., Shibayama-Salas M., Aguirre-García J., Tsutsumi V., Calderón J. (1998). Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. *Parasite Immunology*, 20: 255

Walderich B., Weber A. y Knobloch J. (1997). Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from german travelers and residents of endemic areas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 57(1): 70

Walsh J.A. (1988). Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. In: Ravdin J.I., ed. Amebiasis: human infection by *Entamoeba histolytica*. New York: Churchill Livingstone, 93

Weikel C., Murphy C., Orozco M. y Ravdin, J. (1988). Phorbol esters specifically enhance the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*, 56: 1485

Weinke T., Friedrich-Janicke B., Hopp P. y Janitschke K. (1990). Prevalence and clinical importance of *Entamoeba histolytica* in two high-risk groups: travelers returning from the tropics and male homosexuals. *Journal of Infectious Diseases*, 161: 1029

TESIS CON  
FALLA DE GRICEN

ANEXO

Características de la cepa C57BL/6

El C57BL/6 es ampliamente usado como antecedente genético de ratones mutantes y transgénicos y es popular en investigaciones con aplicación en oncología, inmunología y toxicología. Las hembras son longevas y buenas criadoras. Tienen baja susceptibilidad a tumores y pocas caracterizaciones desfavorables. Son utilizadas para producir los híbridos B6C3F1 y B6D2F1.

Color de pelo: Negro

Locí del color de pelo: a, B, C, D.

Otros Locí: Car-2<sup>a</sup>, Ce-2<sup>a</sup>, Cs-1<sup>a</sup>, Es-1<sup>a</sup>, Es-3<sup>a</sup>, Es-10<sup>a</sup>, Gpd-1<sup>a</sup>, Gpi-1<sup>b</sup>, Gus<sup>b</sup>, Hba<sup>a</sup>, Hbb<sup>a</sup>, Hc<sup>1</sup>, Idh-1<sup>a</sup>, Lv<sup>b</sup>, Lyb-2<sup>b</sup>, Ly-1<sup>b</sup>, Ly-2<sup>b</sup>, Ly-3<sup>b</sup>, Mod-1<sup>b</sup>, Mup-1<sup>b</sup>, Pep-3<sup>a</sup>, Pgm-1<sup>a</sup>, Trf<sup>b</sup>, Thy-1<sup>b</sup>, Tla<sup>a</sup>, H-2D<sup>b</sup>, H-2K<sup>b</sup>.

Origen: Little en 1921 cruzó una hembra 57 con un macho 52. Esta cruce dio lugar a dos cepas, la C57L y la C57BR. La hembra 58 cruzada con el mismo macho dio lugar a la cepa C58. La C57BL es probablemente la cepa más ampliamente utilizada de entre todas las cepas homocigotas. En contraste a otras 36 cepas homocigotas estándar, esta lleva un cromosoma Y de origen *Mus musculus* Asiático, y un elemento LINE-1 derivado de *Mus spretus*, el cuál sugiere que en un porcentaje mayor a 6.5 el genoma podría tener este origen. Una prueba designada B6-38 para la región pseudoautosomal del cromosoma X y Y tiene un patrón característico Pst I del tamaño de fragmento que esta únicamente presente en las cepas de la familia C57BL.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Gráfica de crecimiento



Fig.8 Gráfica de crecimiento de la cepa C57BL/6

### Anatomía comparada del ciego del humano y del ratón

El ciego en el ser humano es un pequeño saco cerrado por un extremo, que se encuentra colgado de la unión ileocecal pero fijo a la pared abdominal posterior en el cuadrante inferior derecho del abdomen. Con estructura idéntica a la del colon, posee un epitelio superficial formado por células cilíndricas altas con vellosidades y pliegues escasos. Las criptas intestinales son largas, agrupadas de manera compacta y con abundantes células caliciformes. El ciego en el humano conserva funciones vestigiales de digestión debido a las bacterias existentes, de absorción de líquidos y de secreción de moco (Leeson y col., 1990).

En el ratón, al ciego se le ha dejado de considerar como un órgano vestigial debido a sus características. El ciego del ratón es excesivamente grande en comparación al del humano,

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

se encuentra en el lado izquierdo del abdomen, curvado a si mismo llenando el espacio entre el estómago y los lóbulos hepáticos. Se caracteriza por falta de especialización, sin embargo, su forma relativamente pequeña en comparación al largo del ciego de los herbívoros y decididamente larga en comparación al tamaño de los carnívoros lo colocan en una posición entre herbívoros y carnívoros estrictos que se refleja en sus hábitos alimenticios capaces de metabolizar celulosa y almidones. Tiene una capacidad de absorción que reduce de un 10-20% el escape de la digestión ocurrido en el intestino delgado y con una fermentación microbiana constante y controlada debida a la compartimentalización situada fuera del flujo directo de la digestión, además de utilizar la coprofagia como otra estrategia para procesar el alimento (Snipes, 1981).

#### **Mecanismos de defensa del huésped contra infecciones**

La propiedad de microorganismos y parásitos de producir enfermedad en un huésped se denomina patogenicidad. La virulencia se denomina como el grado de patogenicidad. El que un microorganismo logre o no producir enfermedad depende, por un lado, de su virulencia, y por otro, de la eficiencia del huésped para defenderse contra ese agente infeccioso. Si este sensible balance entre microorganismo y huésped se rompe, la situación puede cambiar rápidamente, dando ventaja al huésped o al microorganismo. Por un lado, las condiciones del medio pueden cambiar de manera agresiva para el parásito y producirle la muerte, y por otro, los mecanismos de defensa del huésped pueden disminuir y dar como resultado el establecimiento de la infección. Los mecanismos de defensa no son igualmente efectivos en todo el organismo así, un microorganismo puede o no causar infección en ciertas partes del organismo. El que una infección aparezca o no, depende en cada caso de

TPSIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Anexo

---

la relación entre el microorganismo y los mecanismos de defensa del huésped. La capacidad de defensa del huésped contra los ataques infecciosos, se desarrolla muy temprano en la filogenia del organismo. Las grandes especies cuentan con tejidos complejos y especializados de defensa. Estos mecanismos de defensa se componen de diversos factores no específicos y de procesos inmunes específicos mediados vía anticuerpos humorales y linfocitos T (Hanson y Wigzell, 1985).

Durante el primer contacto con el agente infeccioso aparece una defensa congénita no adquirida contra la infección, comúnmente llamada resistencia natural, la cual es resultado de varios factores cooperativos no bien definidos aún, como son los factores genéticos, mecánicos y químicos, edad, balance hormonal y estado nutricional, respuesta inflamatoria, fagocitosis y producción de lactoferrina e interferon. Después de esto, la inmunidad específica o adquirida se desarrolla y aparece mediada principalmente por las células linfoides, más que por los anticuerpos humorales, los cuales varían su capacidad protectora de acuerdo al tipo de infección (Hanson y Wigzell, 1985).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN