Aportaciones al conocimiento de la amibiasis mediante estudios experimentales en hamsters

MIGUEL TANIMOTO-WEKI*

En 1971 se logró producir, por primera vez, en el Centro de Estudios sobre Amibiasis, dirigido por el Maestro Bernardo Sepúlveda, lesiones en hígado de hamsters mediante inoculación de *Entamoeba histolytica* de la cepa HK-9 NIH cultivada en medio anéxico. Tal estudio confirmó que aunque *Entamoeba histolytica* proceda de cultivos bacteriológicamente estériles es capaz de producir lesiones características en el hamster, a pesar de la creencia, general hasta entonces, de que el parásito necesitaba el concurso de bacterias asociadas para ejercer su efecto patógeno.[1,2]

La cepa utilizada en estos experimentos fue la HK9, de escasa virulencia por lo que se requirieron grandes cantidades de trofozoítos (12.5×10^6) para la producción de lesiones; éstas fueron pequeñas y de evolución lenta a diferencia de las lesiones secundarias a la inyección intrahepática de amibas con *Fusobacterium symbiosus*.

Estos estudios, confirmados posteriormente por Diamond y col. con cepas de amibas de distinta virulencia, demostraron que *Entamoeba histolytica* tiene poder patógeno propio.[3] Por otra parte, los resultados anteriores no invalidaron el hecho, bien conocido, de que la virulencia de la amiba puede ser exaltada considerablemente por la asociación de diversas bacterias.

Una vez comprobada la acción patógena que *Entamoeba histolytica* ejerce por sí misma, el siguiente avance consistió en la demostración, por Mattern y Keister, en 1977, de la mayor susceptibilidad del hamster recién nacido a la infección amibiana.[4]

A partir de tal conocimiento, los trabajos del Centro de Estudios sobre Amibiasis demostraron que varias cepas de amibas de origen mexicano, en especial las denominadas HM1, HM2 y HM3-IMSS, tienen patogenicidad variable en hamsters lactantes. Estos experimentos tuvieron como finalidad determinar el número de amibas necesarias para producir lesiones en dichos animales y efectuar estudios de inducción de inmunidad activa. Con tal fin se inocularon trofozoítos por medio de una aguja calibre 27, que se introdujo por debajo del borde costal, aproximadamente 3 mm dentro del parénquima hepático; cuando se empleó la cepa HM1 fue necesario inyectar 20,000 trofozoítos para producir lesiones en el hígado en 94.4 por ciento de los animales; con la cepa MH2 se requirió una cantidad diez veces mayor de trofozoítos para obtener lesiones en un porcentaje similar al del grupo anterior y con 200,000 amibas de la cepa HM3 se obtuvieron lesiones sólo en 21 por ciento de los hamsters inoculados. A partir de estas observaciones se ha utilizado, por numerosos investigadores de diversos centros y para diferentes propósitos el inóculo de 25,000 amibas como un número

* Presentado en sesión ordinaria de la Academia Nacional de Medicina, el 3 de agosto de 1988.
* Académico numerario.

convencional en el desarrollo de lesiones en el hamster lactante.[4]

Los hamsters fueron sacrificados una semana después de inoculados y se practicaron estudios macroscópico e histológico de las lesiones; en éstas se apreciaron dos alteraciones, fundamentalmente: necrosis y formación de granulomas. El grado de necrósis fue paralelo a la virulencia del parásito y en las amibas con virulencia atenuada hubo predominio de las lesiones granulomatosas, que evolucionaron espontáneamente a la curación. El hallazgo de granulomas de etiología amibiana fue descrito inicialmente en los estudios realizados en este centro y ha sido confirmado por otros investigadores.[5] En estos animales se hizo determinación de anticuerpos antiamibianos por contrainmunoelectroforesis, con resultados positivos en todos aquellos que presentaron lesiones amibianas.

Otra observación interesante derivada de las investigaciones de este centro fue el hecho de que los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* obtenidos de portadores asintomáticos y cultivados en condiciones axénicas o monoxénicas carecen de poder patógeno;[6] para este estudio se seleccionaron individuos sin lesiones intestinales ni anticuerpos antiamibianos a los que se les administró un laxante con objeto de colectar las amibas y éstas se inocularon directamente en el hígado del hámster. De los cultivos axénicos desarrollados por primera vez por Diamond en los Institutos Nacionales de Salud, de Estados Unidos, se obtuvo el antígeno amibiano que se han empleado en las investigaciones sobre inmunología de la amibiasis experimental, en la última década.[1,7]

Uno de los primeros estudios de nuestro grupo sobre inmunidad en la amibiasis, publicado en 1970, comprobó la extrema rareza de las reinfecciones por *Entamoeba histolytica* en pacientes curados de absceso hepático amibiano; en un total de 1021 de estos pacientes, sólo se registraron tres casos de reinfección amibiana, lo que corresponde a 0.20 por ciento. Sobre la base de estos resultados, formulamos la hipótesis de que la amibiasis invasora, al menos en sus formas graves, dejaba como secuela un estado de inmunidad adquirida de larga duración. En consecuencia, pensamos que era teóricamente posible inducir, de manera experimental, la inmunización contra la infección por *Entamoeba histolytica.* [8]

En experimentos que se llevaron a cabo a partir de 1971; en el Centro de Estudios sobre Amibiasis, demostramos que la inyección de antígeno total liofilizado, obtenido de cultivos axénicos de *Entamoeba histolytica,* o bien la inyección de cultivos "vivos" de la propia amiba confería en los hamsters inmunidad protectora contra la infección. Tal protección varió de 62 a 87 por ciento según los diferentes métodos empleados; así, la inyección de antígeno mezclado con adyuvante de Freud proporcionó el mayor porcentaje de protección.[9] Todos los animales inmunizados tuvieron reacciones serológicas positivas hacia la amibiasis. Por otro lado, los hamsters curados de absceso hepático amibiano quedaron protegidos contra la reinfección subsecuente en la mayoría de los casos[8,9]

La inyección de suero humano inmune en los mismos animales también les confirió protección contra la inoculación intrahepática de amibas virulentas.[10]

Los estudios experimentales sobre inmunidad celular los llevamos a cabo mediante la inoculación de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* en hamsters sometidos a la acción de drogas inmunosupresoras.[11] La mayoría de los animales que recibieron cortisona y azatioprina, presentaron abscesos hepáticos al innocularles cantidades menores de amibas que las que recibieron los hamsters normales en los que no se desarrollaron lesiones. En otras palabras, los animales tratados con substancias inmunosupresoras son más susceptibles al efecto patógeno de *Entamoeba histolytica.*

Es preciso reconocer que todavía hay muchas lagunas en los conocimientos sobre la inmunidad celular en la amibiasis, aunque suponemos que ésta debe tener un papel importante como mecanismo de defensa contra la infección. De cualquier manera, vale la pena señalar que en la fase inicial de la enfermedad, la respuesta inmunológica a la infección amibiana parece ser únicamente de naturaleza humoral a base de la producción de anticuerpos; y que la inmunidad celular aparece, como regla, en la fase tardía del padecimiento.

Con estos antecedentes, en 1977 dimos a conocer los experimentos que demostraron la inducción de inmunidad protectora antiamibiana en el hamster lactante con la administración de antígenos contenidos en ciertas fracciones subcelulares de *Entamoeba histolytica.* Dos de ellos, aislados mediante ultracentrifugación y denominados fracción ribosómica y lisosómica exhibieron, *in vitro* e *in vivo* potencia antigénica superior a la del antígeno total de *Entamoeba histolytica.*[12]

Estos antígenos se ensayaron también con especies animales superiores principalmente en primates, en cinco monos verdes y tres monos arañas, sin que hubiese reacción local o general atribuíble al antígeno.

En 1985 diseñamos una investigación para determinar la capacidad inmunogénica protectora de antígeno soluble deslipidizado en hamsters inoculados con *E. histolytica* intrahepáticamente. Los resultados preliminares de este experimento indican que el antígeno deslipidizado obtenido de cultivos axénicos de *E. histolytica* provoca reacción inmunológica protectora en los hamsters, contra la infección amibiana.[13]

REFERENCIAS

1. DIAMOND, L.S.: *Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica.* Schaundinn, 1903 and E. histolytica like amebae. J. Oarasit. *54:* 1047.
2. TANIMOTO, M, SEPULVEDA B, VAZQUEZ J.A. y LANDA, L.: *Lesiones producidas en el hígado del hamster por inoculación de Entamoeba his-*

tolytica cultivada en medio axénico. Arch Invest Med (Méx) 1971; Supl. 1971; *1:* 275.
3. DIAMOND, L., TANIMOTO, M, y MARTINEZ, A.: *Production of cecal lesions en newborn Guinea pigs with axenically cultivated* Entamoeba histolytica. Arch Invest Med (Méx) 1978; Supl 1, 223.
4. AGUIRRE, J., CALDERON, P., VAZQUEZ, J.A. y TANIMOTO, M.: *Estudios histopatológicos de las lesiones hepáticas en hamsters inoculados con distintas cepas de* E. histolytica *desarrollada en condiciones axénicas.* Arch Invest Med 1973; (Supl 1) s 109.
5. AGUIRRE, J., CALDERON, P. Y TANIMOTO, M.: *Examen histopatológico de las lesiones hepáticas en hamsters inoculados con cultivo axénico de* E. histolytica. Arch Invest Med 1972; (Supl 2) 341.
6. TANIMOTO, M., VAZQUEZ, J.A., CALDERON, P. y AGUIRRE, J.: *Resultados de la inoculación al hamster de trofozoítos obtenidos de portadores asintomáticos de* E. histolytica. Arch Invest Med 1973; (Supl 1) s 105.
7. TANIMOTO, M., VAZQUEZ, J.A., CALDERON, P. y AGUIRRE, J.: *Inmunidad consecutiva a la inyección de antígeno amibiano axénico* en el hamster. Arch Invest Med. 1973 (Supl 1) s 147.
8. VAZQUEZ, J.A., TANIMOTO, M., OLIVERA, J.L., CARACHEO, F. y CORTES, A.: *Inmunidad consecutiva a infección amibiana curada en el hamster.* Arch Invest Med 1973; (Supl 1) s 155.
9. SEPULVEDA, B., TANIMOTO, M., GUERRERO, A., SOLIS, G.: *Inmunidad en hamsters consecutiva a "vacunación" con cultivos monoxénicos y8 axénicos de* E. histolytica. Arch Invest Med. 1973; (Supl 1) s 159.
10. SEPULVEDA, B., TANIMOTO, M., CALDERON, P., y DE LA HAZ, R.: *Inducción de inmunidad pasiva antiamibiana en el hamster por la inyección de suero inmune.* Arch Invest Med 1974; 5: (Supl 2) 451.
11. TANIMOTO, M., CALDERON, P., DE LA HOZ, R. y AGUIRRE, J.: *Inoculación de trofozoítos de* E. histolytica *en hamsters bajo la acción de drogas inmunosupresoras.* Arch Invest Med 1974; 5: (Supl 2) 441.
12. SEPULVEDA, B., ARROYO, A., TANIMOTO, M., MARTINEZ, A. y ORTIZ-ORTIZ, L.: *Simposio: Inducción de inmunidad protectora antiamibiana con "nuevos" antígenos en el hamster lactante.* Arch Invest Med 1978; 9 (Supl 1) 309.
13. TANIMOTO, M., AGUIRRE-GARCIA, J., SANCHEZ, Ma. EUGENIA y SEPULVEDA, B+: *Inducción de inmunidad protectora antiamibiana en el hamster por medio de antígeno soluble deslipidizado.* Arch Invest Med 1986; 17 (Supl): *233..*

Fig. 1. Inoculación intrahepática, percutánea, de trofozoítos de *E. histolytica*.

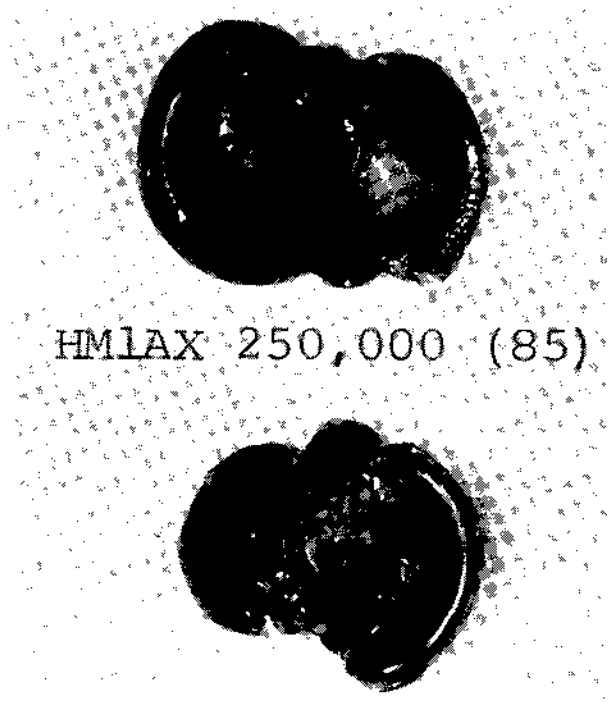

Fig. 2. Lesiones amibianas extensas ó múltiples en cara inferior del hígado.

COMENTARIO OFICIAL

GONZALO GUTIERREZ-TRUJILLO*

Las aportaciones al conocimiento de *E. histolytica* y de la enfermedad que en el hombre produce, se han incrementado en forma acelerada en los últimos veinte años. Ello se debe a un renovado interés por el estudio de esta enfermedad, identificada hace más de cien años, motivado por el desarrollo de nuevas técnicas para su estudio, a partir del cultivo axénico del parásito, libre de otros microorganismos, logrado por Diamond en 1968. Uno de los polos de desarrollo del conocimiento de esta parasitosis, más importantes en el mundo entero, ha sido el Centro de Estudios sobre Amibiasis, fundado en México por Bernardo Sepúlveda en 1971 y uno de los personales claves en este Centro, ha sido Miguel Tanimoto.

En su trabajo de ingreso a la Académica Nacional de Medicina nos presenta un resumen de sus "Aportaciones al conocimiento de la amibiasis mediante estudios experimentales en hamsters". Los temas abordados son de extraordinario interés y de muy diversa índole y por lo tanto, muy amplios los comentarios, que sobre ellos, se podrían elaborar. Ante la imposibilidad de hacerlo, por mis limitaciones personales y por el espacio destinado a este comentario, me referiré exclusivamente a las relacionadas con las siguientes áreas:

- Mecanismos de patogenicidad.
- Diferenciación de cepas patógenas y no patógenas.
- Inmunidad adquirida.
- Inmunidad inducida.

Durante muchos años prevaleció la idea de que *E. histolytica* sólo era capaz de ejercer su poder patógeno cuando se asociaba con bacterias. Sin bien existían datos en sentido contrario, como la esterilidad de las lesiones hepáticas amibianas, ello no convencía, y no fue sino hasta que en 1971 Tanimoto logró producir lesiones hepáticas en el hamster, utilizando cultivos axénicos de *E. histolytica*, que dicho concepto fue desechado, sobre todo, cuando otros investigadores corroboraron sus hallazgos.

Durante muchos años se ha discutido si *E. histolytica* es una sola especie siempre patógena, si son dos especies morfológicamente idénticas, una patógena y otra no patógena, o si se trata de un conjunto de cepas con muy diferente virulencia. En la actualidad prevalece el concepto de que hay cepas patógenas y cepas no patógenas y dentro de las primeras, cepas con diferente virulencia. Una literatura muy abundante se ha producido en relación a ello, pero sin lugar a dudas, los trabajos de Tanimoto son fundamentales al respecto. En opinión de Pérez-Tamayo, una autoridad en la materia, la producción de abscesos hepáticos en el hamster, constituye uno de los criterios más confiables para distinguir cepas patógenas y no patógenas, así como para verificar los resultados obtenidos con otros marcadores de patogenicidad. Tales como la aglutinación con concanavalina, la adherencia y la fagocitosis con células epiteliales y eritrocitos, e inclusive la determinación de zimodemos, tan en boga en la actualidad.

La inmunidad adquirida es otra área que ha generado grandes polémicas en el campo de la amibiasis. Se conocen ya muchos aspectos de la respuesta inmune humoral y celular pero aún no sabemos con precisión si ello confiere protección y en qué grado, al sujeto que sufre una enfermedad amibiana. Tanimoto ha demostrado que los hamsters curados de una lesión hepática experimental, quedan protegidos contra retos subsecuentes, en una proporción elevada de casos y que la inyección de suero humano de convalecientes de absceso hepático amibiano, también les confiere cierto grado de protección. pero estos resultados no se pueden extrapolar a la enfermedad humana no experimental. Así por ejemplo, sabemos que la amibiasis intestinal no parece conferir una inmunidad importante, pero que la amibiasis hepática muy rara vez se sufre por segunda vez, aunque ésto, en opinión de algunos autores, no indica necesariamente inmunidad, pues la probabilidad de sufrir absceso hepático es relativamente baja en toda la población.

De cualquier forma, existen suficientes bases inmunológicas como para intentar el desarrollo de una vacuna contra este padecimiento, que tantos daños causa en nuestro país. En este sentido, Sepúlveda y Tanimoto fueron pioneros en el mundo entero, cuando en 1971, lograron inducir inmunidad protectora en hamsters, mediante la inyección de antígeno total liofilizado. A partir de entonces, diversos antígenos han sido probados en diferentes modelos experimentales, por los autores mencionados y por otros investigadores. De los experimentos realizados se puede concluir que diversos inmunógenos son capaces de inducir, en diferentes modelos experimentales, pero especialmente en el hamster lactante, inmunidad protectora contra la inoculación intrahepática de trofozoitos de *E. histolytica* cultivados en forma axénica, y que no se observaron fenómenos colaterales indeseables, atribuibles a la inyección del inmunógeno. Todo lo anterior justifica cabalmente que se continúen los trabajos que permitan el desarrollo de una vacuna para ser probada en seres humanos.

Las investigaciones realizadas por Miguel Tanimoto en relación con la amibiasis experimental lo han convertido en una figura destacada de la medicina mexicana e inclusive internacional. Pero además, ha ejercido en forma ejemplar la medicina clínica, en el campo de la gastroenterología.

En nombre de la Académica Nacional de Medicina, le doy la más calurosa bienvenida a esta Corporación y le expreso mi profundo reconocimiento al hombre de ciencia, al maestro y al clínico.

*Académico titular. Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias. Instituto Mexicano del Seguro Social.