

Los modelos experimentales *in vivo* en la amibiasis

Víctor Tsutsumi*

Resumen

La utilización de los modelos experimentales *in vivo* en la amibiasis, ha proporcionado información importante sobre los mecanismos involucrados en la relación huésped-parásito que determinan la producción de la enfermedad. En el laboratorio se han utilizado varios roedores para estudiar la amibiasis intestinal y la hepática. Para la primera, el modelo del "asa cecal lavada y cerrada" en el cobayo y el hámster ha sido útil para el análisis de las etapas tempranas del daño a la mucosa. También se ha logrado producir lesiones tempranas intestinales en el jerbo por inoculación intracecal de amibas en cultivo monoxénico. Para los modelos de amibiasis hepática, se han utilizado el hámster y el jerbo como animales susceptibles, y la rata y el cobayo como animales resistentes. El análisis morfológico de las lesiones hepáticas en los animales susceptibles mostró que las células inflamatorias del huésped participan en la producción del daño hepático. La resistencia a la producción de absceso hepático amibiano en ratas y cobayos se debe en parte a los leucocitos polimorfonucleares en la rata y los macrófagos en el cobayo. La completa caracterización y estandarización de los diversos modelos de amibiasis en roedores constituyen las bases para otros estudios biomédicos de importancia para el control de la enfermedad.

Palabras clave: *Entamoeba histolytica*, amibiasis, modelos animales, roedores.

Introducción

La amibiasis, como cualquier otra enfermedad causada por microorganismos, es el resultado de interacciones complejas entre los factores de patogenicidad del parásito y de resistencia del hospedero, cada uno gobernado por múltiples y variados mecanismos. En la amibiasis experimental, uno de los objetivos fundamentales es la obtención de conocimientos sobre estos mecanismos involucrados en el proceso que finalmente resulta en la manifestación de la enfermedad.

El estudio experimental de la amibiasis se inició simultáneamente con el descubrimiento de la *Entamoeba histolytica* por Lesh a finales del siglo XIX.¹ A partir del reconocimiento

Summary

In vivo experimental models for amebiasis have provided important information about the mechanisms of host-parasite interaction which determine the production of disease. In the laboratory, several species of rodents have been used to study the intestinal and hepatic amebiasis. For the former, the model of "washed-closed cecal loop" in guinea-pig and hamster has been useful to study the early invasive events. In gerbils we also produced early intestinal lesions by intracecal inoculation with monoxenically cultured amebas. Hamsters and gerbils have been used as susceptible animals for hepatic amebiasis, and rats and guinea-pigs as resistant animals. Morphological analysis of hepatic lesions of susceptible animals showed the role of host inflammatory cells in the process of liver damage. The resistance in the production of liver abscess in rats and guinea-pigs is due in part to the action of polymorphonuclear leukocytes in the rat and the macrophages in the guinea pigs. Complete characterization and standardization of the various models of amebiasis in rodents constitute the bases for other important biomedical studies aimed to the disease control.

Key words: *Entamoeba histolytica*, amebiasis, animal models, rodents.

de este protozooario como el agente causal de la disentería amibiana y del absceso hepático amibiano en el humano, se han realizado múltiples intentos para reproducir la enfermedad en animales de laboratorio. A pesar de todo, 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 íleon terminal, y el consecuente daño al intestino grueso y otros órganos, principalmente el hígado; de cualquier forma, los modelos *in vivo* de amibiasis actualmente en uso, han proporcionado información importante sobre aspectos biomédicos

Trabajo de ingreso, leído el 10 de noviembre de 1993.

*Académico numerario. Profesor Titular del Departamento de Patología Experimental, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

diversos, como la evaluación de la capacidad terapéutica de antiamibianos, la determinación del potencial invasor de aislados amibianos, el estudio de la patología, la patogénesis, la respuesta inmune del hospedero y pruebas de inmunoprofilaxis, entre otros.

Antes de la introducción del cultivo axénico de trofozoítos de *E. histolytica*, la única posibilidad de infectar animales era la inyección intracecal, intrarrectal o intrahepática directa de amibas mezcladas con abundantes y variadas bacterias, que con frecuencia llegaron a **enmascarar los resultados** por la adición de factores inespecíficos al sistema. El cultivo en condiciones axénicas de la *E. histolytica*² marca el inicio de una serie de importantes aportaciones a nivel de biología celular, molecular y genética de este protozooario parásito.

Las primeras investigaciones de amibiasis experimental *in vivo* se realizaron en perros y gatos,^{3,4} y se obtuvieron conclusiones importantes respecto a la enfermedad; sin embargo, en la actualidad se utilizan poco, debido a una serie de factores, tales como la falta de uniformidad genética de los animales, dificultad en el manejo e insuficiente número de animales.

La disponibilidad actual de varias especies de roedores bien caracterizadas, en condiciones uniformes y susceptible aceptable a la *E. histolytica*, ha sustituido en gran parte el uso de perros y gatos en la experimentación amibiana. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, no existe una sola especie de roedor en la que se reproduzca o simule todo el ciclo completo de la enfermedad. En general, los animales susceptibles a la amibiasis intestinal son diferentes a los que se utilizan para el estudio de la amibiasis hepática. Así, gran parte del conocimiento sobre diferentes aspectos de la enfermedad proviene de la integración de datos obtenidos de modelos animales particulares con características especiales. Como se ha reportado, pueden existir diferencias importantes en susceptibilidad aun en una misma especie de roedor.^{7,8} Esto se observa más comúnmente en los estudios experimentales de amibiasis intestinal, en donde la flora microbiana está poco caracterizada y en general se considera que constituye un factor adverso a los parásitos. A pesar de la existencia de varias limitaciones en el uso de roedores en la amibiasis experimental, hay animales útiles y la selección del roedor dependerá del objetivo específico que se busque.

En el Departamento de Patología Experimental del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, se han realizado muy diversos estudios sobre la amibiasis a nivel experimental utilizando varias especies de roedores. Inicialmente, estuvieron encaminados a la caracterización morfológica del modelo intestinal y hepático de amibiasis, y se utilizaron animales tanto susceptibles como resistentes a la infección amibiana. Posteriormente, los modelos *in vivo* caracterizados han tenido múltiples aplicaciones dentro de diversos problemas biomédicos. En el presente trabajo se realizó una recopilación de varios de los

conceptos y aportaciones que se han obtenido con la utilización de estos modelos animales en el Departamento.

Modelos de amibiasis intestinal experimental

La obtención de un modelo de amibiasis intestinal en roedores ha sido más compleja que el modelo hepático. Los estudios previos en donde se describen modelos de amibiasis intestinal en roedores (ratas, ratones y cobayos) se refieren a la producción de lesiones intestinales con inóculos amibianos poco caracterizados y mezclados con otros protozoarios y abundantes bacterias, así como otros microorganismos. Esta falta de caracterización del inóculo, aunado con el poco conocimiento sobre el contenido cecal del propio roedor, son factores que influyen en la gran heterogeneidad y poca confiabilidad en los resultados. No existían en la literatura modelos de amibiasis intestinal en donde se produjeran lesiones o úlceras típicas con inóculos amibianos cultivados en condiciones axénicas o monoxénicas. En el laboratorio, Anaya-Velázquez y cols⁹ desarrollaron un modelo en roedores (hámsteres y cobayos) para la producción de lesiones intestinales amibianas típicas, con trofozoítos de *E. histolytica* cultivadas en condiciones axénicas y monoxénicas. Este modelo llamado "asa cecal lavada y cerrada" requiere de cierta manipulación quirúrgica del animal de experimentación y constituye un estudio relativamente agudo, ya que el animal no sobrevive más de 72 hrs. post-inoculación, debido a que el tránsito intestinal normal está detenido por la ligadura que se hace a nivel de la unión ileocecal. De cualquier forma, este modelo ha sido de gran utilidad para el conocimiento de las etapas tempranas de la interacción amiba-mucosa cecal y el inicio de las úlceras intestinales amibianas. En los estudios a nivel de microscopía óptica y electrónica de las etapas tempranas de la lesión intestinal se determinó que los leucocitos polimorfonucleares participan en la posible extensión de la lesión.¹⁰

Otro modelo estudiado en el laboratorio es el de la amibiasis intestinal en jerbos (*Meriones unguiculatus*). Este modelo había sido previamente reportado por Chadee y cols^{11,12} como susceptible de amibiasis intestinal, sin embargo, en sus estudios no se especifica claramente el tipo de inóculo que se empleó y el estudio morfológico que presentan no muestra daño o lesiones típicas en la mucosa intestinal de estos animales. En nuestro laboratorio se realizó un estudio con gran número de jerbos y se determinó que estos animales son efectivamente susceptibles a la producción de lesiones intestinales cuando se inoculan intracalmente con trofozoítos cultivados monoxénicamente.¹³ En el análisis morfológico secuencial que se realizó se determinó que estas lesiones amibianas, aunque típicas, fueron superficiales y temporales; así, se observó que a las 96 hrs. después de la inoculación intracecal ya no se detectan lesiones, sugiriendo que, en este animal, el daño de la mucosa cecal no es muy intenso, se

autolimita y se cura espontáneamente. Las bacterias (*Clostridium symbiosum*) presentes en los cultivos monoxénicos de *E. histolytica* no produjeron por sí solas ningún daño de la mucosa cecal, por lo que se pudo descartar en parte su posible papel en este modelo experimental.

Modelos de amibiasis hepática experimental

El primer modelo experimental de amibiasis hepática fue publicado por Reinertson y Thompson en 1951 utilizando hámsteres.¹⁴ Debido a que el cultivo amibiano que se usó se creció con bacterias, los hámsteres fueron inicialmente vacunados por vía intraperitoneal con una suspensión de bacterias, antes del reto con el aislado amibiano. Éste se aplicó ya sea por inyección directa al hígado o por la vena porta. Los autores muestran los grandes abscesos que se producen en estas condiciones. A partir de este reporte, se han realizado numerosos estudios utilizando el mismo modelo de amibiasis hepática en el hámster.¹⁵⁻¹⁷ Como parte del estudio de los mecanismos de patogenicidad en la amibiasis, hemos tenido un particular interés en estudiar las etapas tempranas del daño al tejido hepático por el parásito. En el laboratorio realizamos un análisis exhaustivo de los cambios celulares durante estas etapas después de la inoculación intraportal de amibas en cultivo axénico.¹⁸⁻¹⁹ Los resultados mostraron la producción de múltiples focos inflamatorios agudos alrededor de las amibas durante las etapas tempranas, la formación posterior de lesiones de tipo granulomatoso y la extensa necrosis tisular. La lisis de las células inflamatorias asociadas a las amibas sugirió que la destrucción del tejido hepático se debe, por lo menos en las etapas iniciales, a la acción de las potentes enzimas provenientes de la destrucción de las células inflamatorias del huésped, más que a un efecto directo de las amibas sobre los hepatocitos.

Con la finalidad de determinar si el mismo tipo de daño hepático (mediado por células inflamatorias) ocurre en otras especies de roedores, realizamos un estudio similar secuencial en jerbos. Este modelo de amibiasis hepática se había reportado como de evolución más crónica y con lesiones de menores dimensiones que las observadas en hámsteres.²⁰ En el análisis morfológico de las etapas tempranas de post-inoculación de amibas virulentas por vía intraportal se observaron focos inflamatorios alrededor de los trofozoitos similares a los descritos en los hámsteres. Sin embargo, también se detectaron trofozoitos vivos sin asociación con un proceso inflamatorio en áreas de daño al parénquima hepático.²¹ Este solo dato sugiere que en el jervo las amibas tienen también la capacidad de destruir hepatocitos sin la presencia de un proceso inflamatorio, tal como se ha sugerido en estudios histopatológicos de amibiasis hepática en el humano.²²

Existen dos especies de roedores que se utilizan poco por considerárseles como resistentes a la producción de abscesos

hepáticos amibianos, éstos son el cobayo y la rata. Igualmente, en el pasado no existía prácticamente ningún estudio encaminado a determinar la causa de esta resistencia natural a la amibiasis hepática de estos dos roedores. Los estudios que se realizaron en el laboratorio, utilizando cobayos, mostraron que probablemente parte de esta resistencia natural para la producción de abscesos hepáticos amibianos se debe a la acción de los macrófagos presentes en el infiltrado inflamatorio asociado a las amibas inoculadas.²³ Por otro lado, estudios morfológicos realizados en ratas Wistar, mostraron que después de la inoculación intraportal de amibas virulentas, éstas son rodeadas por un proceso inflamatorio agudo en las primeras horas de interacción, y posiblemente los leucocitos polimorfonucleares destruyen al parásito.²⁴ En estos modelos de resistencia a la amibiasis hepática es necesario el empleo de otras metodologías, principalmente inmunológicas, con el fin de dilucidar más claramente las causas de la resistencia del huésped, que constituirían las bases fundamentales de la defensa del organismo a la infección amibiana.

Discusión

A pesar de los grandes adelantos en la biotecnología y la tendencia de la investigación actual de tratar de comprender a los complejos organismos vivos por medio del estudio de sus componentes más pequeños, tendencia conocida como "reduccionismo", y que ha dado un gran auge a la biología molecular, en un futuro no muy lejano el objetivo deberá ser no sólo lo que las células puedan hacer en condiciones muy controladas, en un tubo de cultivo (*in vitro*), sino cómo funcionan en un sistema de interacción compleja que constituyen finalmente los tejidos y los órganos del organismo. Así, los biólogos moleculares eventualmente tendrán que aplicar sus conocimientos de componentes aislados, al funcionamiento de las asociaciones heterogéneas características de los altos niveles de organización que forma un ser vivo.

El estudio con organismos completos o modelos de experimentación *in vivo* de muchas de las enfermedades que aquejan al hombre ha sido y seguirá siendo de gran utilidad. En el caso de la amibiasis, mucho del conocimiento sobre esta infección parasitaria se ha obtenido gracias al empleo de diversos modelos animales. El conocimiento claro de los modelos ya existentes y la búsqueda de otros posibles modelos de experimentación animal en la amibiasis son objetivos fundamentales en el trabajo de nuestro laboratorio.

A pesar de la ausencia, hasta el momento, de un modelo "ideal" de amibiasis *in vivo*, ya que no se reproduce todo el ciclo de la enfermedad en un solo animal, se han podido realizar muchos estudios tanto a nivel intestinal como hepático, sobre todo en el segundo. Es importante considerar igualmente que la utilidad de los modelos no está solamente relacionada con la susceptibilidad del animal a la infección, sino, como se ha revisado antes, los modelos de resistencia tienen también gran importancia, ya que la información sobre

los procesos o fenómenos de resistencia natural a la infección amibiana podrían ser útiles para establecer bases más racionales para estudios de inmunoprofilaxis en el futuro.

Específicamente sobre los modelos de susceptibilidad en amibiasis, y a pesar de los grandes esfuerzos que se han hecho, todavía no hay un modelo de amibiasis intestinal que esté perfectamente estandarizado y que sea completamente reproducible y que su evolución clínica e histopatológica sea similar al del humano. Los modelos intestinales que se han estudiado en nuestro laboratorio, son modelos agudos, en uno ("asa cecal lavada y cerrada") muere el animal a las 72 horas debido al cierre del tránsito intestinal, y en el otro (jérbos) las lesiones que se producen son temporales, ya que se curan espontáneamente a las 96 horas. De cualquier forma la información que se ha obtenido de ambos modelos referentes a las etapas tempranas de interacción amiba-mucosa intestinal ha sido de gran interés. Parte de esta información se ha utilizado igualmente para correlacionar con un modelo intestinal *in vitro* que se ha estudiado en colaboración con otro laboratorio.²⁵ El análisis morfológico fino que se ha hecho de las etapas tempranas de la infección hepática amibiana en varios modelos experimentales, tanto los considerados como susceptibles como los resistentes, nos ha proporcionado información importante referente a los componentes celulares del huésped que podrían estar participando tanto en la destrucción del tejido hepático o durante el rechazo de la infección parasitaria. Por otro lado, la completa caracterización y estandarización del modelo de amibiasis hepática en hámsteres y jérbos nos ha permitido utilizarlos en otros diversos proyectos de investigación relacionados con la histopatología,²⁶ inmunología²⁷ e inmunoterapia²⁸ de la amibiasis.

Referencias

- Lesh (Lösh) FD. Massive development of amebas in large intestine. (1885) (Traducción). Am J Trop Med Hyg 1975;24:383.
- Diamond LS. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. Science 1961;134:336.
- Swartzwelder JC. Experimental studies on *Entamoeba histolytica* in the dog. Am J Hyg 1939;29:89.
- Faust EC. Experimental amebiasis in dogs. Am J Trop Med Hyg 1932;12:37.
- Rees CW. Pathogenesis of intestinal amebiasis in kittens. Arch Pathol 1929;7:1.
- Cleveland LR, Sanders EP. The virulence of a pure line and several strains of *Entamoeba histolytica* for the liver of cats and the relation of bacteria, cultivation, and liver passage to virulence. Am J Hyg 1930;12:569.
- Martínez-Palomo A. Parasite factors of virulence. En: Martínez-Palomo A (ed). The Biology of *Entamoeba histolytica*. Chichester: Research Studies Press, 1982:95.
- Tsutsumi V. Pathology of experimental amebiasis. En: Ravdin JJ (ed). Amebiasis. Human Infection by *Entamoeba histolytica*. New York: John Wiley & Sons, 1988:147.
- Anaya-Velázquez F, Martínez-Palomo A, Tsutsumi V, González-Robles A. Intestinal invasive amebiasis: an experimental model in rodents using axenic or monoxenic strains of *Entamoeba histolytica*. Am J Trop Med Hyg 1985;34(4):723.

- Martínez-Palomo A, Tsutsumi V, Anaya-Velázquez F, González-Robles A. Ultrastructure of experimental intestinal invasive amebiasis. Am J Trop Med Hyg 1989;41(3):273.
- Chadee K, Meerovitch E. *Entamoeba histolytica*: early progressive pathology in the cecum of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). Am J Trop Med Hyg 1985;34(2):284.
- Chadee K, Meerovitch E. The pathology of experimentally induced cecal amebiasis in gerbils (*Meriones unguiculatus*). Am J Pathol 1985;119(3):485.
- Shibayama-Salas M, Tsutsumi V, Martínez-Palomo A. Early invasive intestinal amebiasis in mongolian gerbils. Arch Med Res 1992;23(2):187.
- Reinertson JW, Thompson PE. Experimental amebic hepatitis in hamsters. Proc Soc Exp Biol Med 1951;76:518.
- Treviño-García Manzo N, De la Torre M, Ruiz de Chávez I, Hernández-López H, Escobedo A. Morfología de *Entamoeba histolytica* en el absceso hepático del hámster. Arch Invest Med (Méx) 1970;1(Suppl):61.
- Tanimoto M, Sepúlveda B, Vázquez-Saavedra JA, Landa L. Lesiones producidas en el hígado del hámster por inoculación de *Entamoeba histolytica* cultivada en medio axénico. Arch Invest Med (Méx) 1971;2(Suppl 1):2275.
- Aguirre-García J, Calderón P, Tanimoto M. Examen histopatológico de las lesiones hepáticas en hámsteres inoculados con cultivo axénico de *Entamoeba histolytica*. Arch Invest Med (Méx) 1972;3(Suppl 2):341.
- Tsutsumi V, Mena-López R, Anaya-Velázquez F, Martínez-Palomo A. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. Am J Pathol 1984;117:81.
- Tsutsumi V, Martínez-Palomo A. Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. Am J Pathol 1988;130:112.
- Diamond LS, Phillips BP, Bartgis IL. The clawed jird (*Meriones unguiculatus*) as an experimental animal for the study of hepatic amebiasis. Arch Invest Med (Méx) 1974;5(Suppl 2):465.
- Shibayama-Salas M, Tsutsumi V, Campos-Rodríguez R, Martínez-Palomo A. Morphological characterization of experimental amebic liver lesions in gerbils. Arch Med Res 1992;23(2):203.
- Pérez-Tamayo R, Brand H. Amebiasis. En: Marcial-Rojas RA. (Ed) Pathology of Protozoal and Helminthic Diseases. Huntington: Krieger RE Publishing Co. 1973:145.
- Canales-Treviño ML, Tsutsumi V, Martínez-Palomo A. Papel de los macrófagos y los linfocitos T: Resistencia del cobayo en la infección hepática amibiana. Arch Invest Med (Méx) 1990;21(Suppl):81.
- Tsutsumi V, Ramírez-Rosales A, Martínez-Palomo A. Amibiasis hepática experimental: inflamación aguda en la rata. Arch Invest Med (Méx) 1990;21(Suppl):233.
- Navarro-García F, López-Revilla R, Tsutsumi V, Reyes JL. Model of intestinal amebiasis: structural and functional lesions to the rabbit colon mucosa by *Entamoeba histolytica* lysates. Arch Med Res 1992;23(2):197.
- Martínez-Gigena MP, Shibayama-Salas M, Tsutsumi V, Martínez-Palomo A. Histological changes during healing of experimental amebic liver abscess treated with metronidazole. Arch Med Res 1992;23(2):209.
- Tsutsumi V, Shibayama-Salas M, Campos-Rodríguez R, Pacheco-Yépez J, Martínez-Palomo A. Active immunization in hamsters with live *Entamoeba histolytica* trophozoites of low virulence. Arch Med Res 1992;23(2):161.
- Tsutsumi V, Canales-Treviño L, Martínez-Palomo A. Inmunoprofilaxis de la amibiasis. En: Escobar Gutiérrez A, Valdespino Gómez JL, Sepúlveda Amor J. (Eds). Vacunas, Ciencia y Salud. México: Sec Salud. 1992:521.