

OBTENCION DE QUISTES DE *Entamoeba histolytica* A PARTIR DE CULTIVOS AXENICOS

Ricardo Castillo Gaytán
Olivia Gómez Mejía
J. Antonio Ramírez Almaraz*

RESUMEN

En este trabajo se toma al perro como un posible modelo animal para reproducir en él la enfermedad intestinal provocada por trofozoitos de *E. histolytica* a partir de cultivos axénicos. Debido que hasta el momento han fallado los intentos de enquistar este parásito, esta investigación busca cerrar el ciclo biológico del mencionado protozoario en el perro.

En este modelo se inoculan concentrados de trofozoitos en el ciego, colon ascendente y muy poco en el recto sigmoides mediante laparotomía media con anestesia general. Primero se les practica exámenes coproparasitológicos, se determina el tipo y grado de parasitosis presente y se les da tratamiento con los antiparasitarios específicos adecuados. Se realizaron ocho experimentos y en siete se logró la aparición de diarrea mucosanguinolenta con presencia de quistes en las heces, lo que refuerza la hipótesis del perro como modelo adecuado para el desarrollo de la enfermedad intestinal. Los síntomas de la enfermedad ceden en un lapso de 11 a 32 días posteriores a la inoculación y en uno de los animales no se presentaron síntomas de la enfermedad ni hubo presencia de quistes en las heces.

INTRODUCCIÓN

Las amibas pertenecen al grupo de los protozoarios, animales caracterizados por ser microorganismos unicelulares sin clorofila. Este grupo pertenece a la clase *sarcodina* (semejante a la carne) y al subgrupo *amoeba*, caracterizado por pre-

sentarseudópodos como órganos locomotores y para la captura de alimentos.¹

Llamamos amebiasis a la infección producida por *Entamoeba histolytica*; esta especie parásita del hombre puede vivir como comensal en el colon o invadir la pared intestinal produciendo alteraciones que si son lo suficientemente importantes, producen diarrea aguda y disentería amebiana. Los quistes representan la forma infectante de la amiba y los trofozoitos la forma invasora. Cuando los quistes son deglutidos con los alimentos o bebidas contaminados, reciben

* Departamento de Bioquímica, Laboratorio de Inmunología Comparada, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México y becario de COFAA y BDA.

la acción de los jugos digestivos que debilitan su pared, se rompen en el intestino delgado y dan lugar a trofozoítos metacíclicos que conservan el mismo número de núcleos que los quistes; después cada núcleo se divide en dos y resulta un segundo trofozoíto metacíclico con ocho núcleos que habita en la luz del colon. Cada núcleo se rodea de una porción de citoplasma y se forman ocho trofozoítos que crecen y se multiplican por división binaria. Los trofozoítos se sitúan en la luz del intestino sobre la superficie de las glándulas de Lieberkun o invaden la mucosa. Este periodo abarca entre 48 horas y cuatro meses.²

Con la ayuda de movimientos ameboideos y enzimas proteolíticas, las amibas penetran hasta la masa muscular de la mucosa. En unos trabajos se encontró que las amibas se introducen poco a poco al interior de las criptas glandulares, lesionan la mucosa, aparecen en la lámina propia y en el interior de vénulas y arteriolas de la submucosa. Se menciona que a los 20 minutos de la exposición las amibas empiezan a dirigirse hacia las glándulas colónicas, a los 50 minutos una gran cantidad de ellas se encuentran ya en su interior y a los 60 minutos las células glandulares en contacto con los trofozoítos empiezan a presentar lesiones como disminución en el número de microvellosidades, aclaramiento de su citoplasma y acortamiento de su longitud^{3,4,5} Esta situación facilita el paso del trofozoíto a la lámina propia —sitio de menor resistencia a su efecto citolítico— formando las características úlceras en fondo de botella. Como se mencionó, en ocasiones la amiba penetra a los pequeños vasos mesentéricos y es llevada hasta el hígado donde puede formar un absceso. Rara vez la amiba puede llegar a pulmones, cerebro y otros órganos que constituyen las localizaciones secundarias o extraintestinales de la enfermedad. En la luz del intestino los trofozoítos eliminan las vacuolas y demás inclusiones intracitoplásmicas, se inmovilizan y forman quistes que adquieren una cubierta, y originan los quistes inmaduros mononucleados, los que continúan su desarrollo hasta los típicos quistes tetranucleados que se eliminan con la materia fecal.²

ANTECEDENTES

La amebiasis como enfermedad se conoce des-

de hace más de 100 años. En la actualidad se considera a F. A. Losch de San Petesburgo como el verdadero descubridor del agente etiológico, ya que en 1875 descubrió en las heces de un campesino de 24 años con disentería unos microorganismos móviles que contenían eritrocitos dentro de sí. Al aplicar por vía oral y rectal las heces del paciente a cuatro perros, logró reproducir en uno de ellos la disentería con ulceraciones de la mucosa intestinal y los microorganismos en el exudado, a los que llamó *Amoeba coli*. No obstante, el autor no consideró a la amiba como agente etiológico sino como una ayuda mecánica que impedía la curación de las lesiones ocasionadas por otro agente causal. Se considera a Koch como el primero en afirmar que la amiba es el agente etiológico de la disentería tropical y que el absceso del hígado es una secuela de la disentería amebiana.⁶

Se sabe actualmente que el hombre es el único reservorio de la amiba y que la fuente de la infección en la amibiasis humana es el hombre; sin embargo, Kartulis también logró producir disentería experimental en gatos por inyección rectal de heces humanas con amibas. Councilman y Lafleur (1891) consideraron a la disentería como una entidad clínica caracterizada por lesiones definidas debidas a la amiba y propusieron el nombre de *Amoeba disenteriae*. Heuber, en 1903, hizo la descripción de los quistes de esta amiba y Schaudinn la de los trofozoítos; la diferenció de dos especies, la *histolytica* y la *coli*. Los trabajos definitivos sobre la patogenicidad de *E. histolytica* fueron realizados en 1913 por Musgrave y Clegg, y por Walker y Sellards, quienes suministraron quistes de *E. histolytica* y de *E. coli* a voluntarios sanos y obtuvieron la disentería sólo aquellos que ingirieron *E. histolytica*. En 1924 Boeck y Drbohlav lograron cultivar con éxito a *E. histolytica* en un medio artificial a base de huevo, que contenía la flora microbiana de las materias fecales. Este avance abrió las puertas a nuevos conocimientos, como la preparación de un antígeno para la fijación de complemento realizada por Craig en 1927.⁶ En 1928 Dobell describió el ciclo de vida de *E. histolytica* en cultivos de la cepa K.28c obtenida de un mono. En 1927 se logró la reproducción en el laboratorio de quistes de *E. invadens* por medio de metodología confiable y reproducible.⁷ El

principal problema para el estudio del enquistamiento de esta amiba es la ausencia de medios de cultivo óptimos para la producción de estas formas de resistencia en condiciones axénicas.^{7,8,9,10,11} La obtención por primera vez de un cultivo axénico se debe a Diamond, quien en 1961 logró un cultivo libre de bacterias.

Hasta la actualidad se han hecho innumerables estudios y experimentos *in vitro* e *in vivo* para tratar de conocer más sobre la virulencia, patogenicidad, ciclo de vida y otras características de la amiba.^{3,12} Se ha trabajado en distintos animales, como cobayos, hamsters,¹³ cerdos,¹⁴ monos¹⁵ y otros ejemplares. Pero en dichos animales sólo es posible desarrollar abscesos hepáticos, pues la amibiasis intestinal no se presenta en ellos.

JUSTIFICACIÓN

La distribución geográfica de la amibiasis intestinal es amplia y se considera una parasitosis cosmopolita, pues se encuentran casos en todo el mundo pero con prevalencias muy variables. La frecuencia de parasitosis intestinal en nuestro país es elevada; en 1988 la incidencia fue de 1,300 por cada 100,000 habitantes y la frecuencia de 1,250 por cada 100,000 habitantes.¹⁶ Por esto la parasitosis por *E. histolytica* representa uno de los principales problemas de salud pública en México y uno de los más difíciles de controlar debido a que se halla en relación directa con las precarias condiciones sanitarias en que vive gran proporción de la población del país, aunado, desde luego, a los hábitos higiénicos y dietéticos inadecuados que la hace más susceptible a la enfermedad.

La fuente de infección en la amibiasis humana es el hombre, y la única forma infectante por vía oral es el quiste; entonces, los mejores transmisores son las personas asintomáticas y los amibianos crónicos, que eliminan en sus materias fecales esta forma de la amiba. Este tipo de amibiasis es la más frecuente y por esta razón la diseminación es amplia en las zonas endémicas.

Se sabe bien que las amibas de la especie *E. histolytica* se enquistan; este proceso habitualmente se lleva a cabo en el colon humano y es posible reproducirlo en cultivos polixénicos,¹⁷ pero no en condiciones axénicas.¹⁸ Se ha inten-

tado enquistar a los trofozoítos de cultivos axénicos utilizando diferentes medios de cultivo, por ejemplo, PEHPS¹⁹ y TP51.²⁰ En estos medios la mayoría de las amibas alcanzan el estado de quiste inmaduro, y el enquistamiento se inicia al finalizar la fase logarítmica del crecimiento.⁵

La diferenciación de trofozoítos en quistes es uno de los aspectos menos conocidos de la biología de este parásito. Siendo el quiste la forma de resistencia que permite sobrevivir a las amibas en condiciones adversas fuera del tubo digestivo del hombre, es al mismo tiempo sorprendente y lamentable el poco interés que se ha dedicado a la investigación de este aspecto particular de la amibiasis. El aparente poco interés se deriva en parte de la incapacidad para producir la diferenciación de trofozoítos a quistes en cultivos axénicos.^{21,22}

En esta investigación y basándose en los antecedentes, fue escogido el perro como posible modelo animal para enquistar a los trofozoítos de cultivos axénicos y tratar de cerrar el ciclo vital de la amiba.

MATERIAL Y MÉTODO

Se trabajó con ocho perros adultos con peso entre 8 y 12 kg, los cuales se alimentaron con dieta hipercalórica-hipoproteínica para semejarla a la de la población más susceptible de contraer la infección. Se les realizó examen coproparasitológico (CPS) mediante el cual se determinó el tipo de parasitosis presente en el animal y se les dio tratamiento específico hasta obtener CPS negativo. Para helmintiasis se aplicó mebendazol dos tabletas de 100 mg al día en dosis única, y para amebiasis o infecciones por otros protozoarios, tabletas de metronidazol (400 mg) combinado con diiodohidroquinoleína (200 mg), tres cápsulas al día en dosis única; se les aisló durante un periodo de tres a siete días antes de inocular las amibas con el fin de evitar nuevas infecciones y eliminar totalmente el fármaco administrado. Después se procedió a inocular los trofozoítos por una de dos vías:

- a) Directo en el ciego y colon por medio de laparotomía efectuada bajo anestesia general.
- b) Inoculación de los trofozoítos en ciego por vía rectal con la ayuda de una sonda.

Tanto en el caso de intervención quirúrgica como en el sondeo, se les aplicó una ampolla de atropina para detener un poco el tránsito intestinal y dar tiempo a la implantación de las amibas en la mucosa del colon.

Los animales se aislaron nuevamente, se continuó con la alimentación antes mencionada y se practicaron diariamente CPS a partir de la primera defecación posterior a la intervención quirúrgica. Las amibas se concentraron por las técnicas de Ritchie y la de Faust, y al presentarse la diarrea se hizo además búsqueda de amiba en fresco y CPS directo para buscar al trofozoito en heces.

Los trofozoítos de amibas fueron donadas por el doctor Víctor Tsutsumi del laboratorio de Patología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN, aplicando de 8 a 12×10^6 amibas por perro. Para los dos últimos experimentos se obtuvieron amibas donadas por otro laboratorio del mismo Centro, pues las del primer laboratorio habían perdido patogenicidad según nos informó el mismo doctor Tsutsumi.

RESULTADOS

Con excepción del último perro, todos los demás presentaron cuadros de diarrea, en ocasiones claramente mucosanguinolenta, de inicio entre el noveno y el vigesimocuarto día. Tanto los perros infectados mediante laparotomía, como los dos infectados mediante sonda, presentaron la primera evacuación entre el tercer y octavo día postinfección. La duración de la diarrea fue de tres a 17 días, luego curó espontáneamente entre el onceavo y el trigésimosegundo día, sin importar la fecha de inicio. La cantidad máxima de quistes por campo fue de 20. Estos resultados se cotejaron con los obtenidos por el laboratorio de análisis clínicos de la Escuela, a los que se les enviaron las muestras de heces de los perros sin mencionar la procedencia, como estudio ciego. Ahí se corroboró que se trataba de quistes de *E. histolytica*.

Uno de los perros presentó heces melénicas. Se tomaron sus heces y se dieron oralmente al último perro tratado (precisamente el que no presentó cuadro diarreico y tampoco signos de infección). Este perro presentó a los nueve días un

cuadro de diarrea mucosanguinolenta que cedió espontáneamente cinco días después.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El cuadro clínico presente en los perros inyectados con trofozoítos de *E. histolytica* semeja estrechamente la enfermedad presente en humanos con amebiasis intestinal. Esta aseveración se refuerza por la presencia de quistes de amiba en sus heces, cuyos hallazgos fueron efectuados por nuestro laboratorio y corroborados por otro independiente. Ya que los animales fueron desparasitados antes de inocularlos, es difícil pensar que se trata sólo de una exacerbación de cepas de amibas presentes previamente en el colon de los perros. La transmisión de la infección de un perro a otro por los quistes presentes en sus heces, hace pensar que efectivamente pudimos cerrar en el perro el ciclo de la infección por amiba.

Por lo anterior, se piensa que el perro es un buen modelo para el estudio de la amebiasis intestinal, y puede servir para estudiar las medidas terapéuticas de esta enfermedad.

SUMMARY

In this work, dog was used as a possible animal model to reproduce intestinal disease provoked by trophozoites of *E. histolytica* from axenic cultures. Up to date, the attempts to obtain cysts of the parasite have failed, and the present work aims to close the biological cycle of the protozoan in an animal model. First, coproparasitoscopic assays were performed, actual parasitosis was determined and specific treatment given. Concentrated trophozoites were inoculated in cecum, colon and less in rectum by means of laparotomy under general anesthesia. Eight experiments were done and blood-mucous diarrhea developed in seven of them, with presence of cysts in feces which reinforces the hypotheses of the dog as a model for the study of amebiasis intestinal disease. Symptoms clear in 11 to 32 days and in one dog they did not appear, nor the presence of amoeba cysts in feces. In this dog, the clinical picture could be obtained by giving feces of one of the infected dogs mixed with food. It is concluded that the dog is

good model for the study of human intestinal disease due to *E. histolytica*.

BIBLIOGRAFIA

1. Burdon-Williams: *Microbiología*. 6a. reimpre-
sión. México, D.F. 1982, pp. 237-238.
2. Botero, M.D.: *Parasitosis humanas*. 2a. ed. Edit.
CIIB. 4a. reimprección. Medellín, Colombia.
1987, pp. 24-27.
3. Treviño-García, Manzo; N. Cruz de la Vin, E.
y Tanimoto Weki, M.: "Estudio ultramicroscó-
pico de la invasión de la mucosa del colon por *E.*
histolytica". *Arch. Invest. Méd.* (Méx.), 71,
1977.
4. _____: "Estudio ultramicroscópico de la
invasión de la mucosa del colon por *E. histolytica*
en cultivo axénico". *Arch. Invest. Méd.* (Méx.),
9, supl-1: 275, 1978.
5. Treviño García, M. y Cruz de la Vin, E.: "Estu-
dio secuencial de la invasión de la mucosa del co-
lon por *E. histolytica*". *Arch. Invest. Méd.*
(Méx.), 11, supl-1: 199, 1980.
6. *Op. cit.* (10), pp. 21-22.
7. Diamond, Louis S.: "Axenic cultivation of *E. his-*
tolytica: Progress and problems". *Arch. Invest.*
Méd. (Méx.). 11, supl-1 47, 1980.
8. Diamond, L.S.; Harlow, D. R. y Cunnich, C.C.:
"A new medium for the axenic cultivation of *E.*
histolytica and other *Entamoebas*". *Tr. Roy. Soc.*
Trop. Med. and Hyg., 72: 431, 1978.
9. Jackson, G.L. y Stoll, N. R.: "Axenic culture of
Entamoeba species". *Am. J. Trop. Med. and*
Hyg., 13: 520, 1964.
10. Merovitch, E.: "*Entamoeba, Giardia* and *Tricho-*
monas". En: *Methods of cultivating parasites in*
vitro. Taylor, A. Er. and Backaer. J.R. (eds)
Academyc Press, London, 19, 1978.
11. De la Torre, M.; De la Hoz, R. y Fillory, L.:
"Cultivos de cepas mexicanas de *E. histolytica*
HM2, IMSS; HM3, IMSS". *Arch. Invest. Méd.*
(Méx.). 5, Supl-2: 279, 1974.
12. Orozco, O.M.; Martínez, P.A. y Guerrero, G.:
"Virulencia y propiedades de superficie de va-
rias cepas axénicas de *E. histolytica*". *Arch. In-*
vest. Méd. (Méx.). 11, Supl-1: 153, 1980.
13. Tanimoto Weki, M.: "Aportaciones al conoci-
miento de la amibiasis mediante estudios experi-
mentales en hamsters". *Gaceta Médica de*
México. vol. 125, no. 1-2. enero-febrero, 1989.
14. Diamond, L.; Tanimoto, M. y Martínez, A.:
"Production of cecal lesions in newborn Ginea
pigs with axenically cultivated *E. histolytica*".
Arch. Invest. Méd. (Méx.). Supl-1: 223, 1978.
15. Martínez, R.R.; González, P.M.; De la Torre,
M. y Sepulveda, B.: "Inducción de la inmunidad
antiamibiásica en primates subhumanos con anti-
geno lisosomal de *E. histolytica*. VI, Inoculación
intrahepática de *E. histolytica* virulenta en mo-
nos". *Arch. Invest. Méd.* (Méx.). 11. Supl-1:
267, 1980.
16. González, S.N.: "Infectología clínica pediátrica".
5a. ed. Editorial Trillas. México, 1993, pp. 705.
17. Kudo, R.R.: "Amoebida Ehrenberg". *Protozo-*
ology. 5a. ed. Springfield. Charles C. Thomas
publisher. 1966: 518.
18. Martínez Palomo, A.: "Biochemistry". *The Bio-*
logy of E. Histolytica. New York, John Wiley &
Sons. 1982: 56.
19. Said Fernández, S.; Vargas-Villarreal, J.; Cas-
tro Garza, J.; Mata Cardenas, B.D.; Navarro-
Marmolejo, L.; Lozano Garza, G. y Martínez Ro-
dríguez, H.: "PEHPS medium: An alternative for
axenic cultivation of *E. histolytica* and *E. inva-*
dens". *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*,
1988, 82: 249.
20. Arroyo-Begovich, A.: "Tinción de quistes de *E.*
histolytica, *E. invadens* y *Entamoeba coli* con
aglutininas de germen de trigo marcados con par-
tículas de oro coloidal". *Arch. Invest. Méd.*
(Méx.). 1980. 11, Supl-1; 25.
21. Martínez, Palomo A.: "*The Biology of E. his-*
tolytica". New York Research Studies Press. Wi-
ley & Sons LTD. 1982: 161.
22. _____: *Amibiasis*. México. Edit. Médica Pa-
namericana, D.F., 1982: 206.
23. Said Fernández, S.: "Producción masiva de qui-
stes de *E. histolytica* en condiciones axénicas". *Ga-*
ceta Médica de México. vol. 126. no. 4,
julio-agosto, 1990.