

Estudio histopatológico de las alteraciones hepáticas en hamsters inoculados con amibas sin y con protección. Informe preliminar.

RESUMEN

Se estudiaron 240 hamsters de 2 meses de edad y 70 g de peso promedio, agrupados en 6 lotes de 40 c/u.

Un lote de 40 hamsters, sin inmunización protectora, se subdividió en 5 grupos, a cada grupo se le inoculó respectivamente por vía intrahepática 500×10^3 trofozoítos de *E. histolytica* HM-531, *E. histolytica* AHA-1 *E. histolytica* HMI-IMSS *E. chattoni* PM 4 y PM5, provenientes de cultivos axénicos TYI-S-33.

A los otros cinco lotes de hamsters previamente, se les inoculó por vía intraperitoneal, 500×10^3 trofozoítos de amibas muertas por congelación de cada cepa, tres veces por semana durante cuatro semanas. El desafío hepático se llevó a cabo 8 días después de terminar la inmunización con trofozoítos vivos de cada una de las cepas y se les dejó 8 días de incubación.

El hígado de los hamsters no inmunizados y desafiados con amibas vivas, presentó grandes zonas de absceso. Histológicamente el absceso se encontró constituido por necrosis extensa rodeada de amibas, inflamación aguda y crónica, macrófagos, fibroblastos y linfocitos.

Las alteraciones hepáticas de los animales protegidos presentaron lesiones más atenuadas como: abscesos pequeños, inflamación granulomatosa crónica y granulomas inespecíficos.

Al microscopio electrónico se comprobaron las alteraciones histológicas, para valorar el grado de lesión del hepatocito el parámetro tomado fue el grado de alteración de la mitocondria. Concluimos que el hígado de los hamsters inmunizados presentó protección inmunológica.

Jiménez Cardoso Juan M *

Jiménez E. **

Bernal M J. **

Kumate Jesús ***

Introducción

La amibiasis es una enfermedad cosmopolita¹, su mayor incidencia se presenta en climas tropicales y subtropicales en forma endémica²; puede producir lesiones en el intestino grueso, así como tener capacidad invasora a otros órganos, manifestándose en la formación de absceso. La invasividad generalmente se encuentra acompañada por la aparición de anticuerpos específicos^{3 4}, los cuales comúnmente se utilizan para determinar la presencia o ausencia de amibas^{5 6 7}, pero no todas poseen la capacidad invasora a pesar que existan antígenos específicos comunes en las amibas invasoras y en las que no lo son.

Las alteraciones histológicas en el hígado de hamsters por inoculación de amibas, se han estudiado extensamente^{8 9 10 11 12},

la inmunidad protectora fue demostrada por Krupp¹³, Tanimoto¹⁴ y otros^{15 16 17}, los eventos histopatológicos que se producen no se han estudiado ampliamente, estos nos ayudarán a comprender en qué forma participa la capacidad protectora del huésped.

Nuestro trabajo tiene el objeto de describir las alteraciones histológicas, que se observaron en el hígado de hamsters, mediante los microscopios de luz y electrónicos; para investigar la inducción de inmunidad protectora indistintamente mediante la inoculación de tres cepas diferentes de *E. histolytica* y dos cepas de *E. chattoni*.

* Unidad de Microscopía Electrónica, Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F.

** Laboratorio de Inmunoparasitología Hospital Infantil de México, S.S.

*** División de Inmunoquímica, Unidad de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional del IMSS, México, D. F.

Material y método

Se utilizaron 240 hamsters machos dorados de Siria, que se pesaron y agruparon en 6 lotes de 40 c/u siguiendo la técnica de números aleatorios. Aproximadamente 500×10^3 amibas cultivadas en medio axénico TYI-S-33, de cada una de las cepas en estudio muertas por congelación, fueron inoculadas por vía intraperitoneal tres veces a la semana durante cuatro semanas (Tabla I).

Tabla I
Inmunización intraperitoneal de hamsters dorados de Siria con amibas muertas por congelación

Lote	Número de animales	Cepa de amiba	Control no inmunizado Número de animales
I	40	<i>E. histolytica</i> Cepa HM 531	8
II	40	<i>E. histolytica</i> cepa HMI IMSS	8
III	40	<i>E. histolytica</i> cepa AHA-1	8
IV	40	<i>E. chattoni</i> cepa PM 4	8
V	40	<i>E. chattoni</i> cepa PM 5	8

Edad de los animales 2 meses
 Peso promedio de los animales 70g
 Inoculación (500×10^3) Trofozoitos de Amibas muertas por congelación por vía intraperitoneal tres veces a la semana, durante 4 semanas.
 Cada grupo con su control constituido por 8 animales a los que se les inocularon (500×10^3) amibas vivas por vía intrahepática.

A todos los animales inmunizados se les inoculó 500×10^3 trofozoitos vivos de su propia cepa, así como de las cepas restantes por vía intrahepática y se les dejó 8 días en incubación, cada lote con su grupocontrol (Tabla II)

Tabla II
Detalle de los hamsters inmunizados por inoculación intrahepática de trofozoitos vivos de las cepas en estudio

Lote I <i>E. histolytica</i> Cepa HM 531		Lote II <i>E. histolytica</i> Cepa HMI IMSS		Lote III <i>E. histolytica</i> Cepa AHA-1		Lote IV <i>E. chattoni</i> Cepa PM 4		Lote V <i>E. chattoni</i> Cepa PM 5		Control No Inmunizado	
Número de animales	Cepa ** en desafío con	Número de animales	Cepa ** en desafío con	Número de animales	Cepa ** en desafío con	Número de animales	Cepa ** en desafío con	Número de animales	Cepa ** en desafío con	Número de animales	Cepa
8	HM 531	8	HM 531	8	HM 531	8	HM 531	8	HM 531	8	HM 531
8	HMI IMSS	8	HMI IMSS	8	HMI IMSS	8	HMI IMSS	8	HMI IMSS	8	HMI IMSS
8	AHA-1	8	AHA-1	8	AHA-1	8	AHA-1	8	AHA-1	8	AHA-1
8	PM 4	8	PM 4	8	PM 4	8	PM 4	8	PM 4	8	PM 4
8	PM 5	8	PM 5	8	PM 5	8	PM 5	8	PM 5	8	PM 5

**VIVAS y VIVAS Trofozoitos vivos inoculados intrahepáticamente.

Después de anestesiarse a los animales con éter etílico, se les rasuró tórax y abdomen para realizar una incisión en la parte media. Directamente del corazón, se extrajeron de dos a tres ml de sangre y se colocaron en tubos de ensaye. Se extrajo el hígado y se examinaron los tres lóbulos para observar alteraciones como adherencias, necrosis, etcétera.

Los cortes del hígado, para ser observados al microscopio de luz, se fijaron en solución de formol al 10 por ciento del tejido hepático con alteraciones, se tomaron fragmentos pequeños de dos ml de espesor, se colocaron en solución fijadora de glutaraldehído al 2 por ciento por un lapso de 2 hs., después se pasaron a solución lavadora de fosfatos pH 7.2, sacarosa y cloruro de calcio.

Se postfijaron en tetraóxido de osmio a un pH de 7.4, se incluyeron en Epon 812 y se polimerizaron en una estufa a 70°C por un lapso de 2 a 4 días. El corte del tejido se realizó en un ultramicrotomo MT-2, se montó en rejillas de cobre y se contrastó con citrato de plomo y acetato de uranilo. El estudio al microscopio electrónico, se realizó en Zeiss M-10.

Resultados

Los hígados de los hamsters no protegidos y desafiados, presentaron en los lóbulos varios abscesos extensos, caracterizados por zonas de tejido necrótico, friable, amarillento, de límites poco precisos más acentuado cuando se inoculó con la *E. histolytica* HM-531.

Los hígados de hamsters inmunizados que desarrollaron absceso, éste fue pequeño de 0.3 a 1 cm. de diámetro mayor, y localizado en un lóbulo.

Histológicamente mediante el microscopio de luz en los abscesos hepáticos se encontró necrosis extensa, fibrina, trofozoitos en la porción periférica, rodeados por células inflamatorias de tipo agudo y crónico, macrófagos, fibroblastos, linfocitos y células plasmáticas (Figuras 1 y 2).

Los resultados de los estudios histológicos del tejido hepático de los hamsters inmunizados, se encuentran resumidos en las tablas III al VII.

Las alteraciones histológicas de los animales protegidos, presentaron lesiones más atenuadas, predominó la inflamación granulomatosa crónica; una observación de interés fue encontrar granulomas constituidos por células plasmáticas, neutrofilos, células epiteloides, fibroblastos y linfocitos.

Descartamos las alteraciones producidas por la punción.

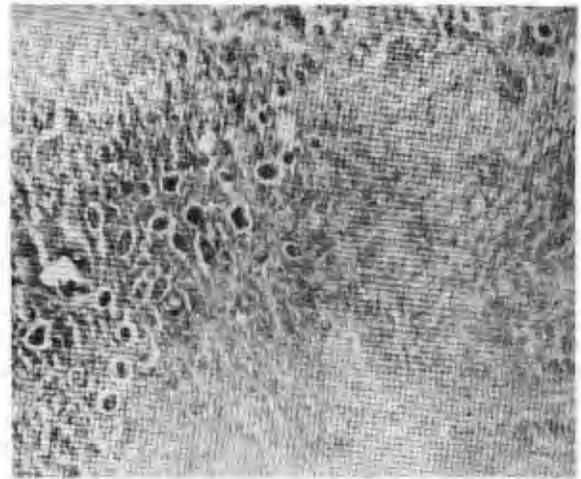
Al microscopio electrónico en los abscesos hepáticos se detectaron polimorfonucleares, eosinófilos, macrófagos, fibroblastos y numerosas porciones de trofozoítos en diferentes fases de lisis (Figura 3), entre las células inflamatorias se encontraron porciones de amibas, fibroblastos y fibras colágenas. (Figura 4).

Para valorar el grado de lesión del hepatocito, el parámetro que se usó fue el grado de alteraciones de las mitocondrias.

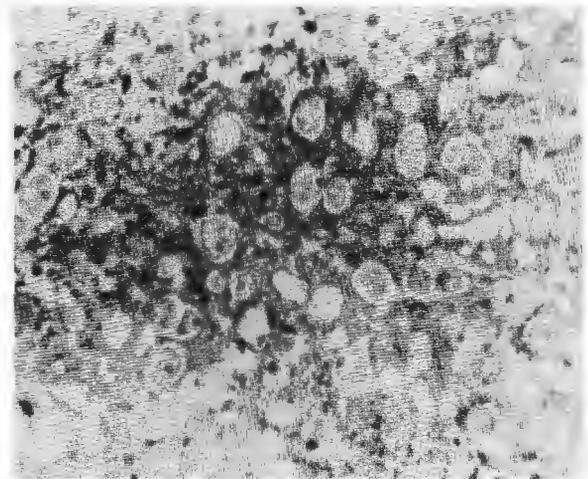
Comentario

En el estudio realizado por nosotros, en los animales no protegidos, las alteraciones más severas las encontramos en los hígados que fueron inoculados con la cepa HM-531, lo que indica su mayor virulencia en comparación con las otras cuatro cepas estudiadas; los hallazgos fueron similares a los descritos por Tanimoto¹² y Aguirre⁸, los cuales utilizaron otras cepas; Martínez Palomo¹⁰ enfatiza que en las inflamaciones granulomatosa, los macrófagos liberan hidrolasas que contribuyen al daño celular.

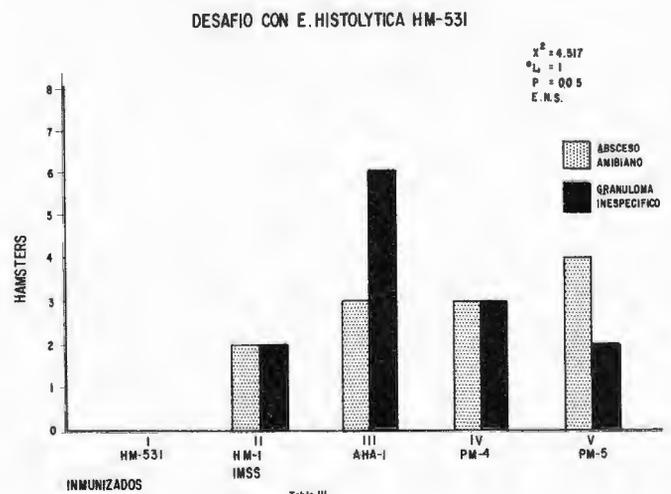
En los hígados de los hamsters protegidos, los abscesos que encontramos fueron pequeños y localizados a un solo lóbulo. Histológicamente observamos que en los abscesos amibianos predominó la inflamación granulomatosa crónica; un hallazgo de interés, fue el encontrar granulomas inespecíficos pequeños, inferimos que este evento se debe a un estado de protección inmunológica. Todos los hígados de los hamsters inmunizados y



Se observa necrosis rodeada de numerosos trofozoítos. Figura 1. PA-Schiff. X 160.



Tejido necrótico con numerosos trofozoítos de *E. histolytica*. Hematoxilina-eosina. X 240.



retados con la misma cepa generaron un efecto protector del 100% ya que no se produjo absceso hepatico ambiano.

En orden de mayor a menor protección de

DESAFIO CON E. CHATTONI PM 4

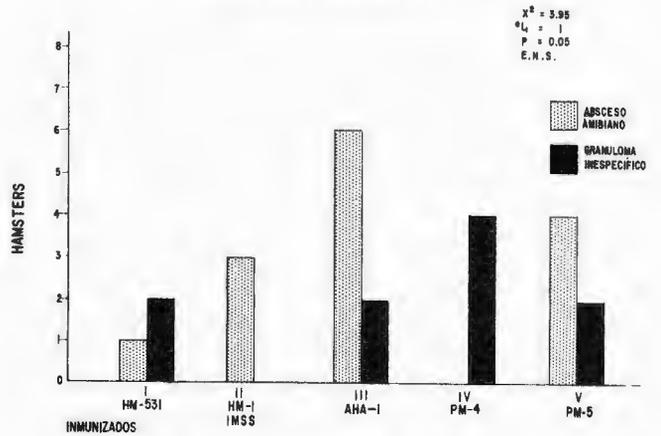


Tabla VI

DESAFIO CON E. CHATTONI PM 5

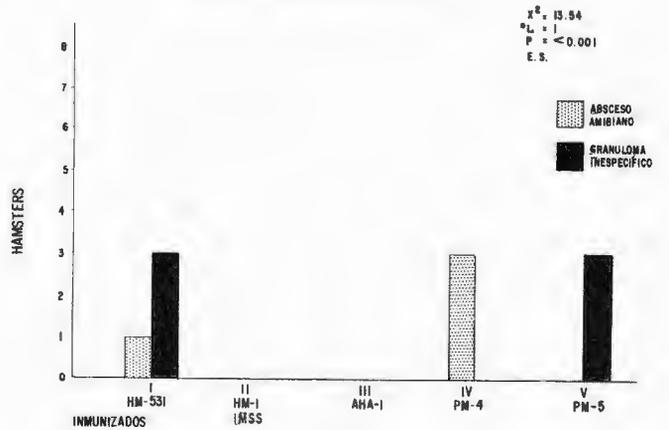


Tabla VII

DESAFIO CON E. HISTOLYTICA HMI-IMSS

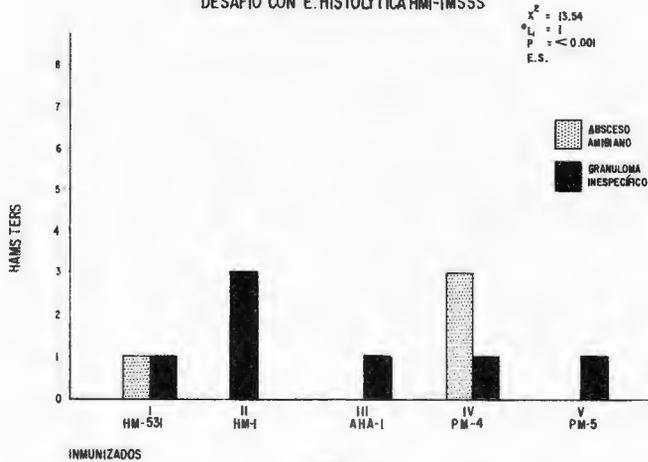


Tabla IV

los hígados de los hamsters inmunizados y desafiados con las diferentes cepas fueron: los hígados de los hamsters inmunizados con la cepa *E. histolytica* AHA-1, permitió 3 abscesos, la HMI-IMSS, 4 abscesos, la *E. chattoni* PM 4, cuatro abscesos; estas tres cepas tuvieron la capacidad de generar un efecto protector contra el reto intrahepático de las cinco

DESAFIO CON E. HISTOLYTICA AHA 1

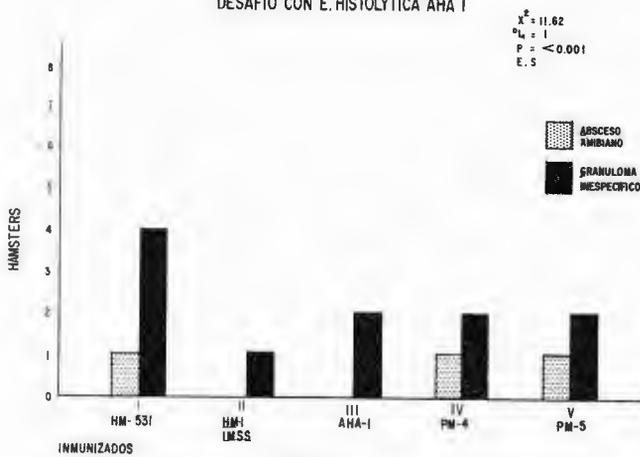
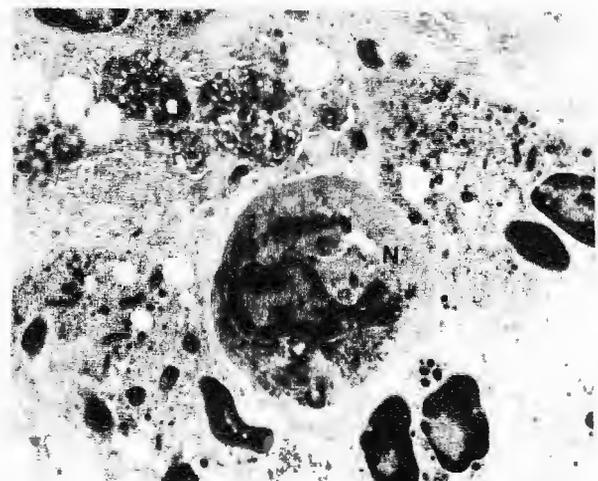


Tabla V

diferentes cepas para formar abscesos ambianos, lo cual se explica por las semejanzas

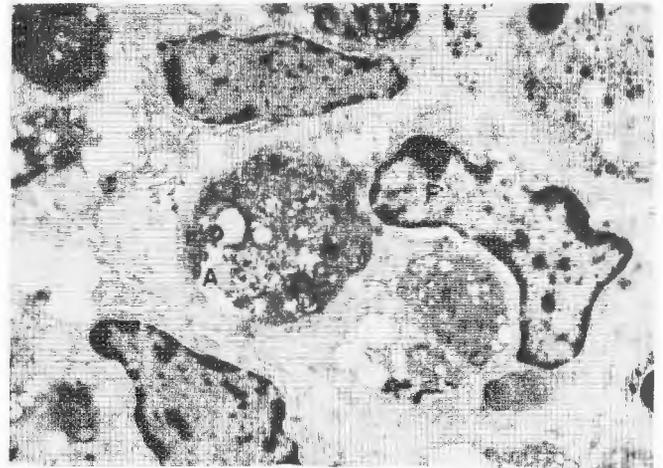


Micrografía electrónica de porciones de trofozoitos (A) y tres fibroblastos (F). X 160. Figura 3

antigénicas entre estas cepas.

En cambio, en los hamsters inmunizados con las cepas *E. histolytica* HM-531 y la *E. chattoni* PM 4 al ser retadas permitieron el mayor número de abscesos, se explica por tener diferencias antigénicas. Nuestro estudio fué estadísticamente significativo.

Concluimos que el hamster inmunizado desarrolló menos abscesos hepáticos amibianos, debido a las similitudes antigénicas entre las cepas estudiadas, fué protegido inmunológicamente para desarrollar absceso en comparación con los hígados de los hamsters no protegidos.



En la micrografía electrónica se observa un neutrófilo (N), porciones de otros polimorfonucleares y de trofozoitos (A). X 4000.

Figura 4.

Referencias

1. Hoare, C A: **Parasitological review. The commensal phase of *Entamoeba histolytica*.** Exp Parasit. 1952;1:411
2. Sepúlveda, B: **La amibiasis invasora por *Entamoeba histolytica*.** Gaceta Médica de México. 1970;100:101.
3. Nilsson, Lars-Ake, Petchclai, B y Elwing H: **Application of thin layer immunoassay (TIA) for demonstration of antibodies against *Entamoeba histolytica*.** Amer J Med Hyg, 1980;29:524.
4. Osisanya, J O S, Warhust, DC: **Specific antiamebic immunoglobulins and the cellulose acetate precipitin, test in *Entamoeba histolytica* infection.** Trans Royal Society Trop Med Hyg, 1980;74:415.
5. Sepúlveda, B; Aubenal, M; Landa, L y col: **Avances en la técnica de contrainmunolectroforesis para el estudio serológico de la amibiasis.** Arch Invest Med 2 (Supl.2), 1972;363
6. Culbertson, CG; Harper, K: **Surface coagglutination with formalized strained protein a staphylococci in the immunologic study of three pathogenic amebae.** Am J Trop, 1980;28:416.
7. Koffler, D; Carr, TI; Angello, V y cols: **Antibodies to polynucleotide in human sera. Antigenic specificity and relation to disease.** J Exp Med, 1971;134:294.
8. Aguirre-García, J; Calderón, P; Tanimoto-Weki, M: **Examen histopatológico de las lesiones hepáticas en hamsters inoculados con cultivo axénico de *Entamoeba histolytica*.** Arch Invest Med (Supl. 2), 1972;3:341.
9. Aguirre-García, J; Calderón Lara, JA; Tanimoto-Weki, M: **Estudio histopatológico de las lesiones hepáticas en hamsters inoculados con distintas cepas de *E. histolytica* desarrollada en condiciones axénicas.** Arch Invest Med (Méx), (Supl. 1), 1973;4:109.
10. Martínez-Palomo, A: **Inducción de inmunidad protectora antiamebiana con "nuevos" antígenos en el hamster lactante. d. histopatología.** Arch Invest Med (Supl. 1), 1978;9:321.
11. Martínez-Palomo, A; Tanimoto, M; Tena, E: **Evolución de las lesiones producidas en hamsters por inoculación de *Entamoeba histolytica*.** Arch Invest Med, (Méx.), 1980;11:169.
12. Tanimoto, M; Sepúlveda, B; Vázquez Saavedra, J; Landa, L: **Lesiones producidas en el hígado del hamster por inoculación de *E. histolytica* cultivada en medio axénico.** Arch Invest Med (Méx.), (Supl.1), 1971;2:275.
13. Krupp, I: **Protective immunity to amebic infection demonstrated in guinea Pig.** Amer J Trop Med Hyg 1973;23:502
14. Tanimoto, M: **Inducción de inmunidad protectora antiamebiana con nuevos antígenos en el hamster lactante.** Arch Invest Med (Méx), (Supl.1), 1978;9:315.
15. Massod, A; Sohail, A: **Immunogenicity of *Entamoeba histolytica* antigen fractions.** Trans Royal Society. Trop Med Hyg, 1974;68:300.
16. Myjak, Przemyslaw: **Comparative studies of the antigenic properties of indigenous and imported strains of indigenous and imported strains of *Entamoeba histolytica*.** Bulletin of the Institute of Marine Medicine in Gdansk., 1970;29:304.
17. Ríos, D; Capin, R; Ortiz-Ortiz, L: **Reacción inmunitaria de hamsters infectados o inmunizados con *Entamoeba histolytica*.** Arch Invest Med (Méx), (Supl.1), 1978;9:303.