

302827

11  
24



**UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.**

**ESCUELA DE QUIMICA**

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

**INFLUENCIA DE HORMONAS SEXUALES EN AMIBIASIS  
HEPATICA EXPERIMENTAL**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**PATRICIA GARCIA URIBE**

MEXICO, D.F.

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.

A MIS PADRES:  
CATA LINA URIBE MARQUEZ  
ARMANDO GARCELA PRJEGO  
QUE ENES ME DIERON LA VIDA  
Y CON SU CARIÑO Y ESFUERZO  
LOGRARON UNO DE SUS OBJETIVOS,  
DEJANDOME LA MAGOJABLE  
HERENCIA DE MI PROFESION

GRACIAS

**INDICE**  
**CAPITULO 1**

**INTRODUCCION**

|                                      | <b>PAGINA</b> |
|--------------------------------------|---------------|
| 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 1             |
| 1.2 HIPOTESIS.....                   | 2             |
| 1.3 OBJETIVO.....                    | 2             |

**CAPITULO II**

**ANTECEDENTES**

|   |    |
|---|----|
| 2.1 GENERALIDADES.....                    | 3  |
| 2.1.1 DATOS HISTORICOS.....               | 6  |
| 2.1.2 MORFOLOGIA.....                     | 8  |
| 2.1.3 CICLO BIOLOGICO.....                | 9  |
| 2.1.4 FISIOPATOLOGIA DE LA AMIBIASIS..... | 10 |

**CAPITULO III**

**PARTE EXPERIMENTAL**

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| 3.1 DIAGRAMA GENERAL.....            | 13 |
| 3.1.1 DIAGRAMA ESPECIFICO.....       | 14 |
| 3.2 MATERIAL REACTIVOS Y EQUIPO..... | 15 |
| 3.2.1 MATERIAL BIOLOGICO.....        | 15 |
| 3.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO.....   | 17 |

|       |                  |    |
|-------|------------------|----|
| 3.2.3 | REACTIVOS.....   | 18 |
| 3.2.4 | EQUIPO.....      | 20 |
| 3.3   | METODOLOGIA..... | 21 |

## **CAPITULO IV**

### **RESULTADOS Y DISCUSION**

|     |                 |    |
|-----|-----------------|----|
| 4.1 | RESULTADOS..... | 23 |
| 4.2 | DISCUSION.....  | 33 |

## **CAPITULO V**

|  |                   |    |
|--|-------------------|----|
|  | CONCLUSIONES..... | 37 |
|  | BIBLIOGRAFIA..... | 38 |

# **CAPITULO 1**

## INTRODUCCION

### 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Existen diversidad de factores asociados a la patogénesis de la infección por Entamoeba histolytica. Entre ellos se consideran de gran importancia, los relacionados con el huésped como son la dieta deficiente en hierro y la composición de la flora bacteriana en el intestino. En lo que se refiere al parásito, influyen: las diferencias de cepa, la virulencia, el número de parásitos, etc<sup>(22)</sup>. En la edad pediátrica la amibiasis del hígado se presenta con igual incidencia en relación al sexo, es decir, por cada caso de niños hay uno de niñas<sup>(29)</sup>, sin embargo, se han encontrado diferencias de frecuencia de amibiasis hepática en el caso de la población adulta, en relación de 1:4 hasta 1:13 predominando en el sexo masculino<sup>(2,5,9,17,36)</sup>, siendo los casos muy raros en mujeres en edad reproductiva y cuando se presentan generalmente se debe a un factor que disminuye la capacidad de respuesta a las infecciones<sup>(11)</sup>.

Existen reportes de modelos de experimentación en animales que sugieren que niveles altos de estrógenos producen una menor severidad en el desarrollo de la amibiasis hepática, sin embargo no esta completamente establecido<sup>(6,11,12,33)</sup>. Dada la baja frecuencia observada en casos clínicos de adultos femeninos con amibiasis hepática nos sugiere que factores hormonales sexuales pudieran estar relacionados en el desarrollo de la amibiasis hepática. Por lo anterior, resulta interesante determinar si los niveles hormonales sexuales estan

implicados o no con el desarrollo y evolución de la amibiasis hepática, lo que permitiría además ayudar a esclarecer algunos de los mecanismos involucrados en la patogénesis por la infección de *E. histolytica* a nivel hepático.

### 1.2 HIPOTESIS

La presencia de niveles altos de hormonas sexuales masculinas favorecen la presencia de casos graves de amibiasis del tipo invasivo, amibiasis hepática en el modelo animal.

Dosis experimentalmente elevadas de Estrógenos, Progesterona y Testosterona por separado coadyuvan en el desarrollo de la amibiasis hepática.

### HIPOTESIS NULA

Dosis elevadas de hormonas sexuales no influyen en el desarrollo de la amibiasis hepática.

### 1.3 OBJETIVOS

1. Determinar si dosis elevadas de Estrógenos, Progesterona y Testosterona están implicados en el desarrollo de la amibiasis hepática experimental en el modelo murino (Gerbos).
2. Determinar si hay diferencia en el número de abscesos, con respecto a un grupo control, que no recibió la administración de hormonas sexuales.



## **CAPITULO II**

## ANTECEDENTES

### 2.1 GENERALIDADES

La amibiasis es una infección ocasionada por un protozooario parásito denominado *Entamoeba histolytica*<sup>(6,27)</sup>, que afecta aproximadamente al 10% de la población mundial<sup>(13)</sup>, con una incidencia mayor al 30% en regiones tropicales y subtropicales<sup>(20,21,25,27)</sup>. Por lo que se calcula que en México el 5.95% de sus habitantes, en promedio, es portador de anticuerpos con *E. histolytica*<sup>(15)</sup>. Pero la frecuencia varía entre 2.53% y 9.95% según su distribución geográfica<sup>(15,27)</sup>. Ocupa el cuarto lugar en frecuencia de las enfermedades transmisibles, con una tasa de casi el 1% y aumenta constantemente<sup>(27)</sup>, siendo fundamentalmente un problema de ingeniería sanitaria e higiene deficiente de las poblaciones afectadas, además de la susceptibilidad del huésped.

Todas las formas de amibiasis se incluyen en dos grupos: amibiasis intestinal y extraintestinal. En la primera se incluyen los casos de portadores asintomáticos y los de enfermedad crónica y aguda. La amibiasis intestinal aguda y la extraintestinal se consideran como amibiasis invasora. Esta última puede localizarse en cualquier órgano fuera del intestino, aunque el hígado es el más frecuentemente afectado hasta en el 90% de los casos<sup>(27,28)</sup>. La amibiasis invasora afecta mundialmente a alrededor de  $5 \times 10^7$  personas por año, aunque solo una pequeña fracción (menor del 1%) sufre de absceso hepático amibiano<sup>(1)</sup>. En la población pediátrica la frecuencia es similar en

ambos sexos, en contraste con el franco predominio en el sexo masculino que se observa en la población adulta<sup>(29)</sup>.

Otras localizaciones de amibiasis invasora son raras. La afección del sistema nervioso central puede originar absceso intracraneano que requiere tratamiento específico y drenaje adecuado<sup>(31)</sup>. La amibiasis causada por Naegleria fowleri productora de Meningoencefalitis amibiana primaria<sup>(19)</sup>. La amibiasis cutánea aunque rara, es de interés en los casos de participación genital y perianal<sup>(25)</sup>.

Los factores tradicionalmente aducidos como responsables del paso de la E. histolytica hacia el hígado, tales como; la infección misma a que se encuentran expuestos ambos sexos; la igual insalubridad y casi el mismo grado de alcoholismo no explica la mayor frecuencia con que el hombre adulto es más afectado por el absceso hepático amibiano que la mujer a la misma edad; el mayor predominio del padecimiento en el sexo masculino se presenta sobre todo en edad reproductiva. En la observación clínica es notablemente mas frecuente la invasión amibiana en el hígado de los pacientes del sexo masculino que en los del femenino en razón de 1:4<sup>(17)</sup>, 1:5<sup>(2,5)</sup>, 2:9<sup>(14)</sup> y llegando incluso en un reporte hasta 1:13<sup>(36)</sup>. En base a las consideraciones anteriores, se ha formulado una teoría hormonal de carácter cíclico, en donde se menciona que serían las hormonas sexuales las responsables. Principalmente los estrógenos dentro del ciclo menstrual hay ascenso y descenso periódico de los mismos, lo que induciría protección periódica en las mujeres actuando sobre el sistema retículo endotelial, tan abundante en el hígado que por su actividad fagocitaria fuese

estimulada repetidamente por el ciclo de ascenso estrógeno, lo que protegería durante esos lapsos a las mujeres que se encuentran en capacidad de reproducción, lo que obviamente no acontece en los hombres. De ser así, la mujer estaría mas protegida durante los embarazos dado el alto nivel estrogénico que estimula la actividad fagocitaria del sistema retículo endotelial del hígado. Por consiguiente, durante las edades correspondientes a la menopausia (niveles bajos de estrógenos), también debería registrarse un mayor número de casos en las mujeres y probablemente el curso del absceso en ellas sería más grave. Así, también durante el puerperio, por el gran descenso estrogénico que lo caracteriza, sin embargo, en ninguno de estos casos ha sido demostrado<sup>(11)</sup>.

El mecanismo de acción de la progesterona en el incremento de la susceptibilidad en el modelo animal para desarrollar absceso hepático no es bien conocido. No hay reporte en la literatura de casos humanos y esta determinación hormonal. Sin embargo, la hidroxilación de la progesterona y conversión a deoxicortisona causa inmuno-supresión, como se ha notado después de la administración de corticoesteroides, la cuál a su vez puede provocar el desarrollo de absceso hepático. Además, la progesterona inhibe la acción leucocítica cruzada, lo cuál es uno de los importantes parámetros de la inmunidad mediada por células. En este sentido, títulos significativamente altos de anticuerpos anti-amiba se observaron en animales que desarrollaron absceso hepático, en comparación con el grupo control, el cuál mostró

únicamente ulceración cecal, sugiriéndose por eso, que la inmunidad humoral no se alteró<sup>(6,10)</sup>.

### 2.1.1 DATOS HISTORICOS

La infección por *E. histolytica* es una entidad nosológica que probablemente se presenta desde que se pobló la tierra; hay escritos chinos, hebreos y griegos que mencionan la descripción de disenterías, pero resulta difícil probar que corresponda a *E. histolytica*<sup>(26)</sup> un protozoo de la clase Rhizopoda y del género Entamoeba<sup>(3)</sup>.

Probablemente la primera referencia bibliográfica al respecto sea el caso publicado en 1824 por Brown, en Cuba, de un niño negro de un año de edad con un absceso hepático que se presentó después de un cuadro de disentería. Pero el primero en señalar la presencia de la amiba en el contenido intestinal del hombre fue Lambi, en 1859. En 1875 Lösh publicó un estudio clínico y patológico de un caso de disentería y la inoculación experimental en perros con amibas procedentes de este caso.

El primero en establecer la relación entre amiba, disentería, absceso hepático y absceso cerebral, fue Kartulus en sus estudios realizados en el periodo de 1885 a 1904 aunque los términos "disentería amibiana" y "absceso amibiano del hígado" fueron creados por Councilman y Lafleur en su estudio de 14 casos en 1891.

El nombre específico *Entamoeba histolytica* fue creado por Schaudinn en 1903 quién además estableció las diferencias entre *Entamoeba coli* y *Entamoeba histolytica*; en 1913 Warker y Sellards demostraron que el hombre adquiere la enfermedad mediante la ingestión de los quistes,

por estas fechas, 1912 Rogers precisa la acción anti*Amibiana* de la emetina.

Posteriormente se publicaron estudios que proporcionaron valiosa información sobre varios aspectos del padecimiento tanto terapéuticos como clínicos y epidemiológicos. Es de notar la controversia que existe entre algunas publicaciones de países desarrollados y las de países económicamente débiles. Así por ejemplo, desde 1898 Harris consideraba que la *Amibiasis* era rara en los niños. Musser en 1927 afirmaba que la *Amibiasis* era una enfermedad de los adultos que rara vez se contraía antes de los 10 años, y hasta la década de los 50 se aprecia que el número de casos publicados de *Amibiasis* en el niño era muy reducido; aún en 1975 en publicaciones norteamericanas altamente reconocidas, se afirma que en los niños prácticamente se desconoce la existencia del absceso hepático *Amibiano*.

En cambio, en México la casuística es muy elevada, Torroella en 1956 realizó una revisión de 26 casos de Absceso Hepático *Amibiano* (AHA), Gutiérrez y Sánchez Robledo en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional del I.M.S.S., informaron de 67 casos en 1970 y de 42 casos adicionales en el lapso de 1971-1972, Kumate y Aranda revisaron 346 casos de AHA observados en 1962 a 1973, en el Hospital Infantil de México.

En este siglo Boeck y Divohlav cultivaron in vitro a las *Amibas* y Diamond obtuvo el cultivo axénico (cultivo puro de trofozoítos) lo que permitió el avance del estudio bioquímico y fisiológico del parásito, así

como la preparación de antígeno puro para el diagnóstico inmunológico de esta parasitosis<sup>(32)</sup>.

### 2.1.2 MORFOLOGIA

***E. histolytica*** se presenta en la naturaleza en tres estadios morfológicos principales, el trofozoíto (forma móvil o vegetativa), el prequiste y el quiste (éstos dos últimos inmóviles).

**Trofozoíto** se observa en material fecal sus dimensiones fluctúan entre 10 y 60 micras de diámetro, con forma variable y movimiento característico, mediante la emisión de pseudópodos rápidos y explosivos, digitiformes, largos y anchos. En el citoplasma se observa marcada diferencia entre el ectoplasma que es hialino y transparente y el endoplasma que tiene gran cantidad de inclusiones, por lo que es granuloso con aspecto de vidrio molido, características que se acentúan más si usamos contraste de fases en el microscopio. El núcleo, es redondo vesiculoso, sin posición fija en el endoplasma, mide de 5 a 7 micras de diámetro, la cromatina nuclear en forma de pequeñas granulaciones de tamaño uniforme, un endosoma central constituido por cromatina nuclear.

En el endoplasma, además del núcleo hay organelos como retículo endoplásmico, ribosomas, polirribosomas, aparato de Golgi, pero no mitocondrias. El ectoplasma es hialino transparente.

El **prequiste** cuando las condiciones del medio ambiente del trofozoíto (intestino grueso) son poco favorables, empieza a inmovilizarse, elimina todo el material intracitoplasmático se redondea, se reviste de una membrana gruesa y refringente. Presenta un sólo núcleo, además,

puede presentar una masa de glucógeno en una vacuola y las barras cromatoidales.

El **quist**, (forma infectante) cuando en el interior del prequiste hay gran actividad, el núcleo se divide en dos y luego en cuatro, quedando al final del proceso de maduración, el quiste maduro que tiene cuatro núcleos pequeños con características morfológicas iguales a las del trofozoito, se recubre de la pared quística resistente y mide de 5 a 20 micras.

Durante la maduración del quiste, desaparece el glucógeno (se consume) y las barras cromatoidales se hacen poco visibles o desaparecen, en raras ocasiones *E. histolytica* tiene ocho núcleos que se tiñen con lugol durante la observación microscópica de materias fecales en los exámenes coproparasitoscópicos. Los trofozoitos no se enquistan cuando invaden tejidos, sólo cuando están en la luz intestinal. Viven en condiciones anaerobias en las criptas intestinales, favorecida por la presencia de bacterias. En la luz del intestino y en los tejidos, los trofozoitos se multiplican por división binaria simple nutriéndose de las secreciones mucosas mediante procesos anaeróbicos junto con bacterias entéricas, las que ya no necesitarán cuando invadan los tejidos lo cual hacen solamente como trofozoitos, seguramente porque ya en los tejidos encontrarán todos los precursores alimenticios y metabólicos.

### 2.1.3 CICLO BIOLÓGICO

La transmisión es ano-mano-ano al ingerir los quistes de *E. histolytica* que son la forma infectante que pasan al estómago en donde la acción



del jugo gástrico empieza a actuar sobre ellos; luego pasan al intestino delgado en donde dejan salir un trofozoíto octanucleado, que rápidamente se divide y da lugar a ocho trofozoítos metaquísticos pequeños, los cuales son llevados con el contenido intestinal al ciego, en donde pueden seguir dos caminos; establecerse o ser arrastrados hasta el exterior junto con la materia fecal. Para que los trofozoítos se establezcan en el intestino grueso, tiene que juntarse una serie de factores, entre los cuales figuran el número de trofozoítos tránsito intestinal lento, bacterias entéricas apropiadas, dieta rica en azúcares, potencial de oxido-reducción bajo y otros más. Con los factores mencionados a favor de las amibas, se podran establecer en el epitelio intestinal, y permanecer ahí sin agredir la mucosa intestinal, ya que para que esto suceda entra en juego el factor de patogenicidad y empezar a atacar primero el moco intestinal y después producir lesiones intestinales que se traducen en manifestaciones clínicas de la amibiasis intestinal aguda y que pueden acarrear la muerte del individuo.

#### **2.1.4 FISIOPATOLOGIA DE LA AMIBIASIS**

La úlcera intestinal primaria se desarrolla generalmente en el intestino grueso, ciego, apéndice y colon ascendente; después de haber salvado la barrera del moco intestinal mediante la acción de la mucina y por los movimientos mecánicos muy activos, se observa necrosis lítica superficial, las amibas se multiplican, incrementan su número, se extienden por este epitelio intestinal hasta la base profunda de las glándulas, pasan a través del tejido intestinal hacia la muscularis

mucosa y al llegar a ésta, se detienen y acumulan debido a que se encuentra con tejido más resistente y compacto. Las úlceras están rodeadas de tejido sano y con aspecto típico de úlceras de botón de camisa. En estas lesiones úlcerosas el sitio de entrada es pequeño, cuello de botella fino y en la parte de la muscularis mucosa se ensanchan, pueden llegar a confluir con otras úlceras y entonces desprenderse fragmentos de mucosa arrastrando con el contenido intestinal los trofozoítos que tendrán oportunidad de establecerse en sitios más bajos del intestino y si al principio no había invasión bacteriana y prácticamente nula reacción tisular, al quedar abiertas en mucho mayor tamaño las úlceras, podrán ser invadidas por bacterias con infiltración extensa del borde de la lesión por neutrófilos y fibrocitos; lo que indica la invasión bacteriana. A partir de estos sitios, las lesiones pueden avanzar, atravesar la muscularis mucosa, llegar a la serosa perforarla y producir cuadro de peritonitis grave a la invasión de peritoneo por trofozoítos de amibas y bacterias del contenido intestinal. A través de vasos sanguíneos que son abundantes en la muscularis mucosa y linfáticos, los trofozoítos se diseminan hacia otros sitios produciendo amibiasis extraintestinal.

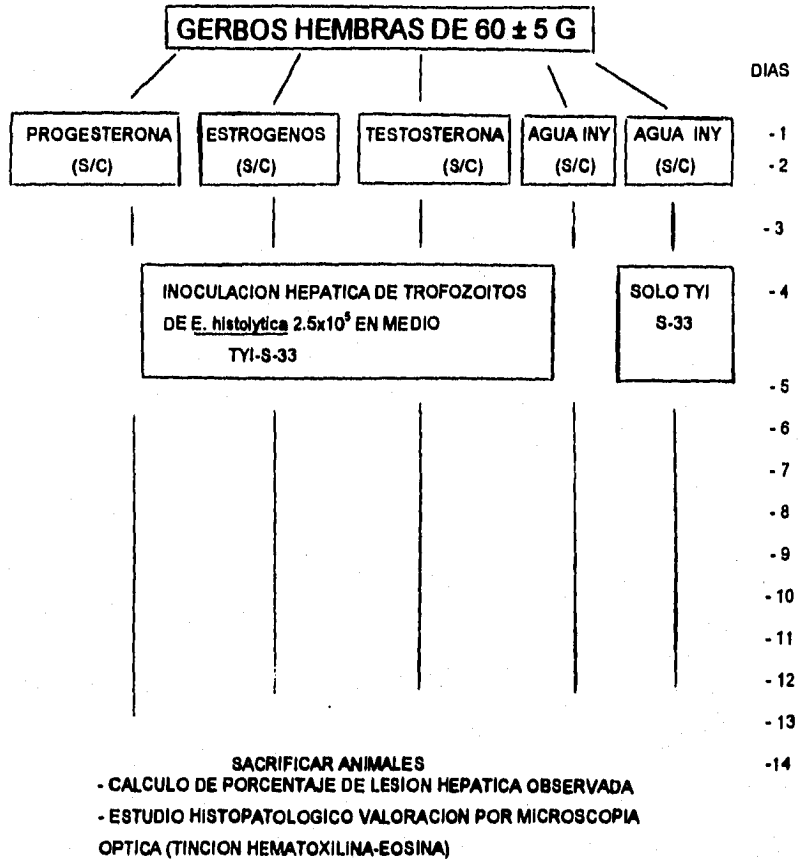
El sitio de preferencia de las amibas es el hígado y en particular el lóbulo derecho, también se deben conjuntar una serie de factores como es: tipo de cepa y número de amibas que lleguen al hígado a establecerse y a empezar a multiplicarse; también favorece el establecimiento de E. histolytica en el hígado las hormonas sexuales, ya que se ha visto que los abscesos hepáticos amibianos son mucho

más frecuentes en adultos del sexo masculino que en los del femenino en relación 4:1; no en prepúberes, en los que la frecuencia de absceso hepático amibiano es igual en niños que en niñas. En cambio, en las mujeres embarazadas, donde existen grandes niveles de gonodotrofina coriónica, se observa mayor frecuencia de amibiasis hepática. Experimentalmente si a animales de laboratorio se les administra colesterol y hormonas sexuales durante un tiempo prolongado previo a la inoculación de trofozoitos de *E. histolytica*, desarrollan abundantes y grandes abscesos hepáticos amibianos, mientras que los animales del grupo control, normal, casi no desarrollan lesiones. A partir del hígado y por vía hematógica se pueden diseminar a cualquier parte del organismo.<sup>(34)</sup>

## **CAPITULO III**

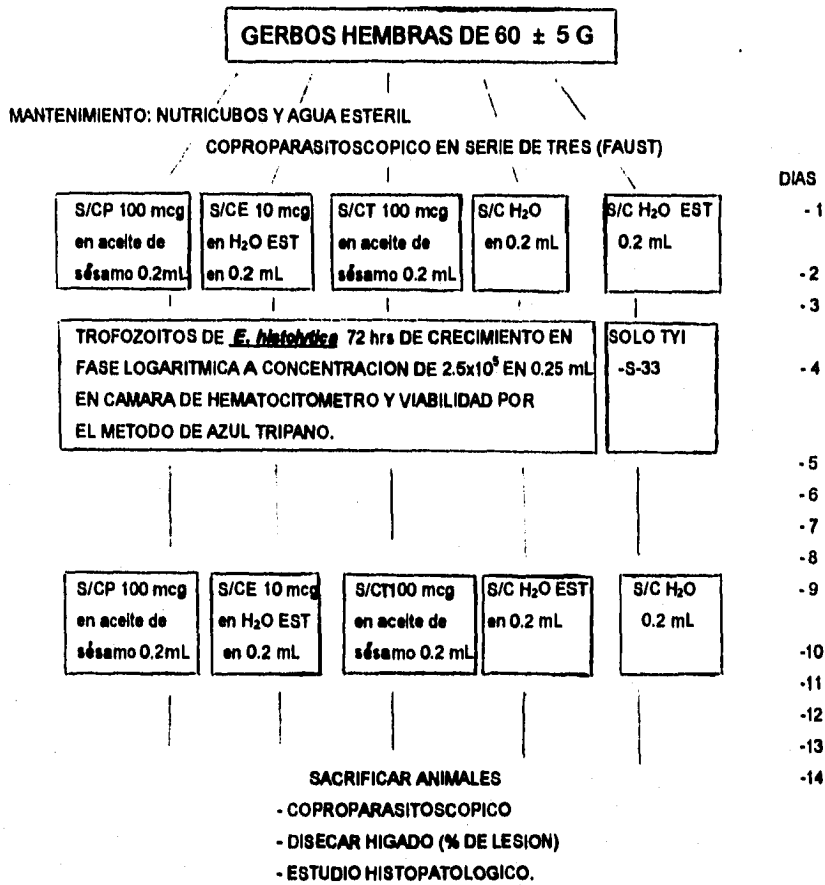
## PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 DIAGRAMA GENERAL



\* S/C = via subcutánea

## 3.1.1 DIAGRAMA ESPECIFICO



\*S/CP = via subcutánea Progesterona

\* S/CE = via subcutánea Estrógenos

\* S/CT = via subcutánea Testosterona

### 3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

#### A) Trofozoítos de *E. histolytica*.

Trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HMI: IMSS aislada en México de pacientes con disentería amibiana fueron mantenidos axénicamente en el medio TYI-S-33 de acuerdo a la formulación de Diamond et. al.<sup>(7)</sup>, procedente de la división de Inmunoquímica de la Unidad de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional IMSS.

El inóculo fue preparado en condiciones estériles de cultivos de amibas de 72 horas de crecimiento en fase logarítmica. Los trofozoítos se lavaron dos veces con medio de cultivo TYI-S-33 y se centrifugaron a 1,500 rpm con diámetro de rotor de 10.5 cm durante 5 minutos y se cuantificaron en una cámara de hematocitómetro ajustando la concentración a  $1 \times 10^5$  trofozoítos/mL en medio de cultivo<sup>(37)</sup>. Simultáneamente se determinó la viabilidad de los trofozoítos por el método de exclusión de azul de tripano<sup>(35)</sup>. Se considero útiles a las muestras que tuvieron 98% o más de viabilidad del parásito para el ensayo de inoculación. Cada animal recibió  $2.5 \times 10^5$  amibas en 0.25 mL de medio.

#### B) ANIMALES

Gerbo mongólico (*Meriones unguiculatus*), hembras adultas de 3 a 4 meses de edad con peso de  $60 \pm 5$  gr, mantenidas en cajas de plástico transparente (19x29x13 cm) con aserrín estéril, temperatura ( $21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ) e iluminación de (7:30 a 19:30 horas) controladas.

Fueron alimentados con nutricubos de purina y agua esterilizados a libre demanda<sup>(8)</sup>.

Previo a la inoculación de los animales, se les práctico un coproparasitoscópico en serie de 3 por la técnica de Faust<sup>(34)</sup>.



### **3.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO**

- Micropipetas Marca Gelbson de volumen ajustable de:
  - 10 a 20 uL
  - 50 a 200 uL
  - 100 a 1000 uL
- Probeta de 1000 mL de vidrio marca Pyrex
- Vaso de precipitado de 250 mL de vidrio marca Pyrex
- Gasas
- Guantes desechables
- Gradillas varias
- Jeringas de insulina marca Plastipak
- Tubos de centrifuga de polipropileno de 50 mL Marca Costar
- Anillos de plástico para sosten del bloque
- Cuchilla de Acero Leica
- Parafina para Laboratorio Marca Jung-Histowax
- Entellan Marca Merck
- Pipeta serológica graduada de vidrio de 10 y 5 mL
- Tubos de ensaye de laboratorio
- Porta objetos y cubre objetos.

### 3.2.3 REACTIVOS

#### A) DOSIS DE HORMONA

Se utilizaron presentaciones comerciales de:

Progesterona (Prolidon 500 mg); L: A-H16120 Lab.

Carnot, Méx.

Testosterona (Primoteston Depot 250 mg) L: 125 Lab.

Schering Mexicana, S.A. de C.V.

Estrógenos conjugados (Premarin 25 mg) L: 043 Lab.

Wyeth, México.

Para la inoculación de los animales de estudio se hicieron en condiciones estériles las diluciones correspondientes hasta ajustar la dosis de acuerdo al peso del animal y las diluciones de progesterona y testosterona se realizaron en aceite de sésamo<sup>(18,23,24)</sup>. En el caso de los estrógenos, la dilución fue preparada en agua inyectable esterilizada y libre de pirógenos.

#### B) MEDIO DE CULTIVO AXENICO DE *E. histolytica* (TYI-S-33)

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| PEPTONA DE BIOTRIPTICASA      | 2.6 g  |
| GLUCOSA                       | 1.0 g  |
| CLORURO DE SODIO              | 0.2 g  |
| FOSFATO DE POTASIO MONOBASICO | 0.06 g |
| FOSFATO DE POTASIO DIBASICO   | 0.1 g  |
| L-CISTEINA                    | 0.1 g  |
| ACIDO L-ASCORBICO             | 0.02 g |

|                        |                 |
|------------------------|-----------------|
| <b>CITRATO FERRICO</b> | <b>0.0022 g</b> |
| <b>AGUA DESTILADA</b>  | <b>87 mL</b>    |

Esterilizar a 15 libras por 15 minutos en autoclave, enfriar y agregar 15 mL de suero bovino descomplementado y añadir 3 mL de mezcla vitamínica NTCTC-107<sup>(7)</sup>.

**C) SOLUCION DE AZUL TRIPAN AL 0.3% <sup>(36)</sup>**

|                                 |               |
|---------------------------------|---------------|
| <b>AZUL DE TRIPANO</b>          | <b>0.3 g</b>  |
| <b>SOLUCION SALINA AL 0.85%</b> | <b>100 mL</b> |
| <b>pH</b>                       | <b>7.0</b>    |

**D).- ACEITE DE SESAMO<sup>(23)</sup>**

**E).- FORMOL AL 10%**

**F).- ALCOHOL AL 70%**

**G).- ETER ETILICO**

**H).- TINCION HEMATOXILINA-EOSINA<sup>(16)</sup>**

### **3.2.4 EQUIPO**

- Campana de extracción Marca Veco
- Microscopio óptico simple Zeiss
- Campana de Flujo laminar Marca Veco de no doble protección.
- Vortex Marca Labocraft
- Centrífuga refrigerada Marca Internacional con rotor
- Cámara de Hematocitómetro Propper Lumycite
- Microtomo Marca Leitz
- Centro de inclusión Marca Reichert-Jung
- Baño de flotación Marca Lipshau
- Histoquinel o procesador de tejidos Marca America Optical
- Carro de tinción
- Mechero de Bunsen
- Estufa
- Canastilla de ranura para laminilla
- Balanza Granataria

### **3.3 METODOLOGIA**

#### **A) COSECHA DE AMIBAS**

Las cajas con medio de cultivo TYI-S-33 y amibas de 72 hrs a 36°C se colocan por 5 min en un recipiente con hielo frape para despegar la monocapa; se agita suavemente la caja por un par de veces y después, son distribuidas con pipetas serológicas de 10 mL en tubos Costar de 50 mL dentro de la campana de flujo laminar y centrifugadas a 1500 rpm en una centrífuga refrigerada con temperatura de 4°C.

#### **B) DETERMINACION DE LA VIABILIDAD CELULAR POR EL METODO DE EXCLUSION DE AZUL DE TRIPAN.**

La cuantificación de la viabilidad, se realizó por la técnica de exclusión de azul de tripan de la siguiente manera: se deposita 0.1 mL de la suspensión celular en un tubo y se añade una solución de azul de tripan al 0.3% en un volumen de 0.1 ml (dilución 1:2) se homogeniza la preparación y se observa al microscopio óptico. Para determinar el porcentaje de viabilidad se cuenta el número de células teñidas (células muertas) y el número de células no teñidas vivas<sup>(35)</sup>.

#### **C) INDUCCION DE AMIBIASIS HEPATICA**

Se utilizaron 40 animales en este estudio. Fueron designados al azar en un total de cuatro grupos: cada grupo con 8 animales y corriendo a la par un control inoculado con medio de cultivo de Diamond<sup>(7)</sup>.

1.- A un grupo de los animales se les administraron 100 mcg/kg peso de progesterona en un volumen de 0.2 mL durante 14 días por vía subcutánea y en el cuarto día dentro del esquema de la administración

de progesterona se inocula por punción hepática percutánea directa amibas preparadas de acuerdo a la concentración antes descrita.

2.- En otro grupo diferente se siguió el mismo esquema de inoculación anterior pero se administraron 10 mcg/kg de peso de estrógenos, por la misma vía volumen y condiciones.

3.- Otro grupo fue inoculado con 100 mcg/kg de peso de testosterona por la misma vía, volumen y condiciones.

4.- Un grupo control que se le administró agua estéril libre de pirógenos en un volumen de 0.2 mL vía subcutánea a cada animal y en el cuarto día trofozoítos de *E. histolytica* en medio TYI-S-33 por la misma vía, volumen y condiciones.

5.- Y por último, al grupo control que se le administró agua estéril libre de pirógenos en un volumen de 0.2 mL vía subcutánea a cada animal y medio TYI-S-33 por la misma vía y condiciones.

#### **D) DETERMINACION DEL POR CIENTO DE LESION.**

Después de 14 días de inoculados, se sacrificarón, se disecaron por planos, se extrajo el hígado de cada animal, pesándolo inmediatamente en una balanza granataria realizando la determinación del por ciento de lesión de acuerdo a la siguiente fórmula(30)

Pt de Hígado ——— 100%

peso del absceso ——— X

donde:

Pt del Hígado: peso total del hígado

X: por ciento de lesión hepática

## **CAPITULO IV**

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 RESULTADOS

TABLA 1. POR CIENTO DE LESION HEPATICA

|     | PROGESTERONA | ESTROGENOS | TESTOSTERONA | CONTROL |
|-----|--------------|------------|--------------|---------|
| 1.  | 58.18        | 50.0       | 66.66        | 40.0    |
| 2.  | 57.14        | 48.0       | 57.14        | 33.00   |
| 3.  | 46.66        | 55.55      | 63.93        | 57.00   |
| 4.  | 58.33        | 57.89      | 51.92        | 50.00   |
| 5.  | 49.09        | 56.45      | 61.53        | 46.00   |
| 6.  | 47.61        | 40.0       | 66.66        | 44.00   |
| 7.  | 45.45        | 37.83      | 46.87        | 56.7    |
| 8.  | 44.0         | 48.48      | 50.0         | 61.42   |
| X   | 406.46       | 394.2      | 464.71       | 388.12  |
| -   |              |            |              |         |
| X   | 50.80        | 49.27      | 58.08        | 48.51   |
| STD | 6.05         | 7.41       | 7.77         | 9.61    |

Tabla 1. Muestra el por ciento de lesión hepática obtenida en relación a las diferentes hormonas y el control, así como el promedio y desviación estandard de nuestro experimento.



## ADMINISTRACION DE DIFERENTES HORMONAS SEXUALES

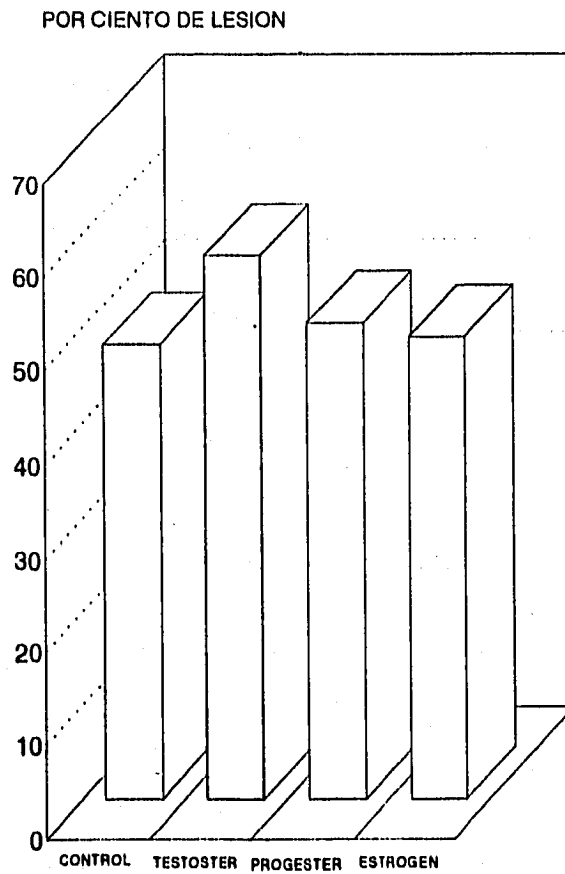


Fig.1 Efecto de la administración de diferentes hormonas sobre el por ciento de lesión hepática

**TABLA 2. PESO PROMEDIO EN GRAMOS DE ANIMALES INOCULADOS CON PROGESTERONA.**

| Días | 1     | 3     | 5     | 7     | 9     | 11   | 13    |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
|      | 56    | 56.5  | 54.5  | 57    | 58.5  | 59.5 | 59    |
|      | 55.   | 56.5  | 54    | 56    | 56    | 57.5 | 56    |
|      | 55    | 56    | 54.5  | 56.5  | 56.5  | 59   | 59.5  |
|      | 55.5  | 56    | 55    | 57.5  | 58.5  | 60   | 61    |
|      | 57    | 58    | 55    | 58.5  | 59    | 60   | 60    |
|      | 55    | 55    | 54    | 55    | 55.5  | 54   | 54    |
|      | 55    | 55    | 55    | 56    | 58    | 58.5 | 57.5  |
|      | 58    | 58    | 57.5  | 59    | 58.5  | 59.5 | 59    |
| X    | 446.5 | 451   | 439.5 | 455.5 | 460.5 | 468  | 466   |
| -    |       |       |       |       |       |      |       |
| X    | 55.81 | 56.37 | 54.93 | 56.93 | 57.62 | 58.5 | 58.25 |
| STD  | 1.13  | 1.15  | 1.11  | 1.34  | 1.43  | 2.0  | 2.29  |

Tabla 2. Resultado observado del peso promedio de los animales inoculados con progesterona 100 µg/kg de peso en seguimiento hasta el día 13º. post-inoculación experimental de  $2.5 \times 10^5$  trofozoitos de *E. histolytica* de la cepa HMI-IMSS

## PESO PROMEDIO DE LOS ANIMALES CON AMIBIASIS HEPATICA

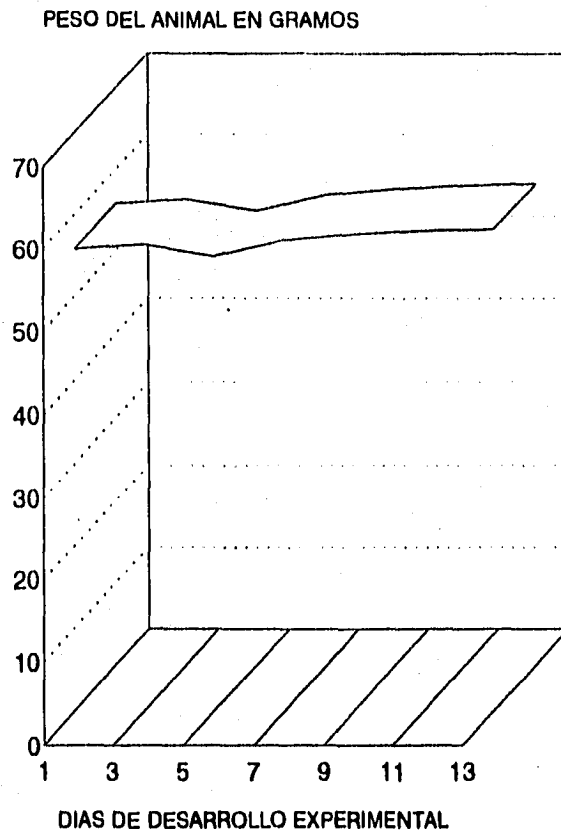


Fig.2 Polígono de frecuencia que muestra el resultado del peso promedio de los animales inoculados con progesterona  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$  peso

TABLA 3. PESO PROMEDIO EN GRAMOS DE ANIMALES  
INOCULADOS CON ESTROGENOS.

| DIAS | 1     | 3    | 5     | 7     | 9     | 11    | 13   |
|------|-------|------|-------|-------|-------|-------|------|
|      | 55    | 56   | 55    | 58    | 59    | 58    | 59   |
|      | 55.5  | 56   | 53    | 53.5  | 54    | 55    | 55   |
|      | 58    | 59   | 60    | 63    | 64    | 65.5  | 65.5 |
|      | 55    | 56   | 55    | 55    | 56    | 57    | 55.5 |
|      | 55    | 56   | 56    | 58.5  | 61.5  | 63    | 61   |
|      | 56    | 56   | 57    | 56    | 57    | 57    | 56   |
|      | 56    | 57   | 55    | 57    | 57    | 58    | 57   |
|      | 56    | 56   | 54    | 54    | 55    | 55    | 55   |
| X    | 446.5 | 452  | 445   | 455   | 463.5 | 468.5 | 464  |
| -    |       |      |       |       |       |       |      |
| X    | 55.81 | 56.5 | 55.62 | 56.87 | 57.93 | 58.5  | 58   |
| STD  | 0.99  | 1.06 | 2.13  | 3.05  | 3.38  | 3.75  | 3.69 |

Tabla 3. Resultado observado del peso promedio de los animales inoculados con estrógenos 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso en seguimiento hasta el día 13<sup>o</sup>. post-inoculación experimental de  $2.5 \times 10^5$  trofozoitos de *E. histolytica* de la cepa HMI-IMSS

## PESO PROMEDIO DE LOS ANIMALES CON AMIBIASIS HEPATICA

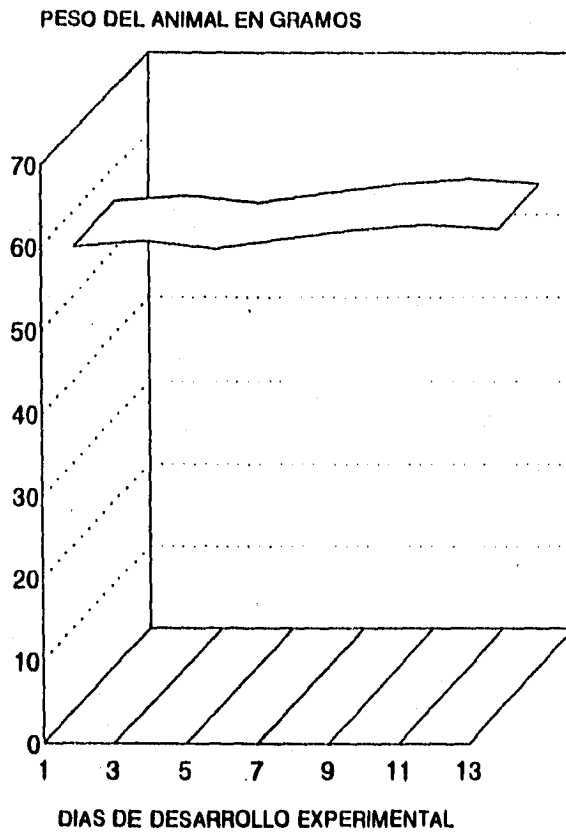


Fig.3 Polígono de frecuencia que muestra el resultado del peso promedio de los animales inoculados con estrógenos  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  peso

**TABLA 4. PESO PROMEDIO EN GRAMOS DE ANIMALES  
INOCULADOS CON TESTOSTERONA.**

| DÍAS | 1     | 3     | 5     | 7     | 9    | 11    | 13   |
|------|-------|-------|-------|-------|------|-------|------|
|      | 57    | 58    | 57    | 59    | 60   | 62    | 60   |
|      | 55.5  | 55    | 57    | 58    | 58.5 | 58.5  | 60   |
|      | 55.5  | 56    | 55    | 56.5  | 58   | 58.5  | 59.5 |
|      | 55    | 56    | 54.5  | 55    | 56   | 58    | 62   |
|      | 60    | 61    | 60    | 62    | 63   | 65    | 66   |
|      | 55    | 55    | 53.5  | 55    | 57   | 58    | 59   |
|      | 55    | 55    | 55    | 57    | 57.5 | 58    | 59   |
|      | 57    | 57    | 55    | 55    | 58   | 60    | 58.5 |
| X    | 450   | 453   | 447   | 457.5 | 468  | 478   | 484  |
| -    |       |       |       |       |      |       |      |
| X    | 56.25 | 56.62 | 55.87 | 57.18 | 58.5 | 59.75 | 60.5 |
| STD  | 1.73  | 2.06  | 2.04  | 2.44  | 2.15 | 2.53  | 2.46 |

**Tabla 4. Resultado observado del peso promedio de los animales inoculados con testosterona 100 µg/kg de peso en seguimiento hasta el día 13º. post-inoculación experimental de  $2.5 \times 10^5$  trofozoitos de E. histolytica de la cepa HMI-MSS**

PESO PROMEDIO DE LOS ANIMALES CON AMBIASIS HEPATICA

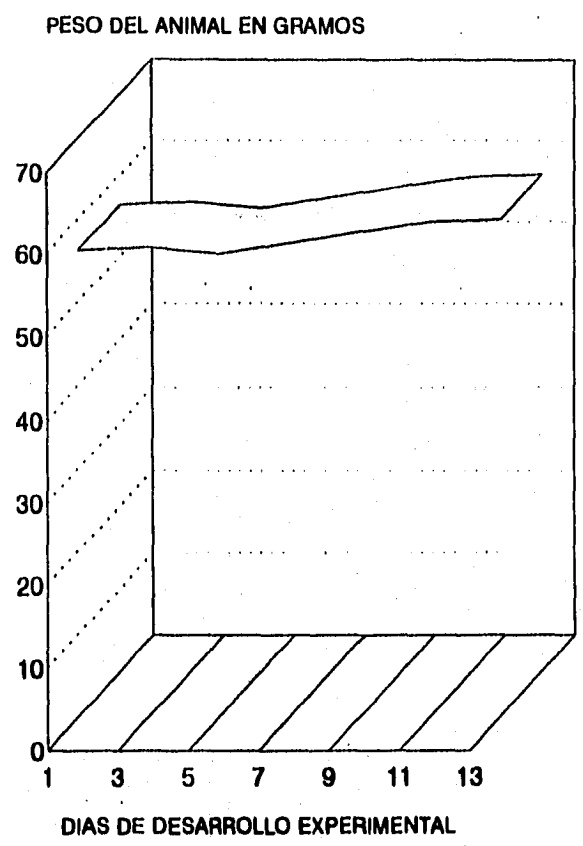


Fig.4 Poligono de frecuencia que muestra el resultado del peso promedio de los animales inoculados con testosterona 100 µg/kg peso

**TABLA 5. PESO PROMEDIO EN GRAMOS DE ANIMALES  
INOCULADOS CON AGUA ESTERIL LIBRE DE PIROGENOS.**

| DIAS | 1     | 3    | 5     | 7    | 9     | 11    | 13    |
|------|-------|------|-------|------|-------|-------|-------|
|      | 59.5  | 55.5 | 60    | 60   | 62    | 63.5  | 62    |
|      | 63    | 59.5 | 61.5  | 63   | 64    | 64    | 65    |
|      | 62    | 58.5 | 60.5  | 61   | 61.5  | 60    | 59    |
|      | 63    | 61.5 | 64    | 65   | 64    | 64    | 65    |
|      | 56    | 55   | 58    | 61   | 62    | 63.5  | 62    |
|      | 61    | 60   | 62    | 63   | 65    | 66    | 67    |
|      | 56    | 55   | 55    | 56   | 57    | 55.5  | 56    |
|      | 58    | 55   | 58.5  | 59   | 60    | 60    | 61    |
| X    | 478.5 | 460  | 479.5 | 488  | 495.5 | 496.5 | 497   |
| X    | 59.81 | 57.5 | 59.93 | 61   | 61.93 | 62.06 | 62.12 |
| STD  | 2.9   | 2.67 | 2.77  | 2.77 | 2.56  | 3.35  | 3.56  |

Tabla 5. Resultado observado del peso promedio de los animales inoculados con agua inyectable estéril libre de pirógenos en un volumen de 0.2 mL en seguimiento día 13°. post-inoculación experimental de  $2.5 \times 10^5$  trofozoitos de *E. histolytica* de la cepa HMI-MSS.



## PESO PROMEDIO DE LOS ANIMALES CON AMIBIASIS HEPATICA

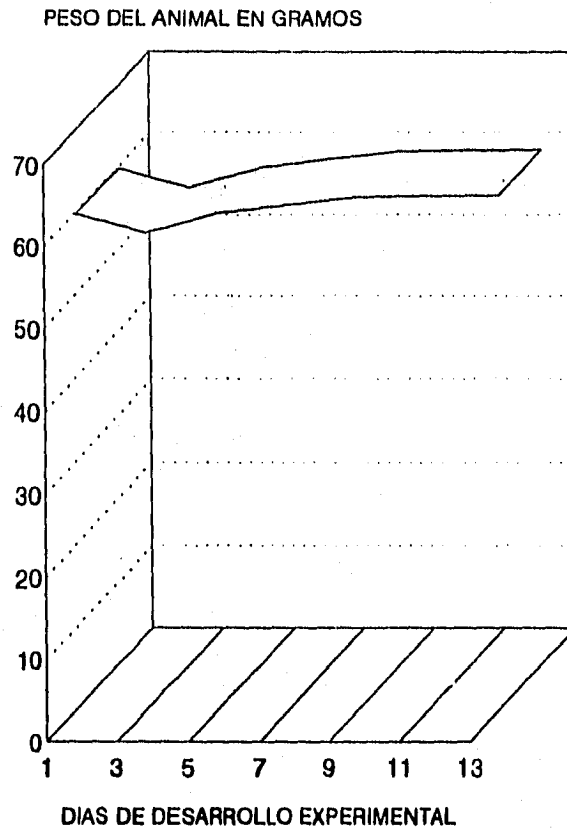


Fig.5 Polígono de frecuencia que muestra el resultado del peso promedio de los animales inoculados con agua esteril libre de pirógenos en un volumen de 0.2 mL

## 4.2 DISCUSION

La observación más importante encontrada en este estudio es la relación entre la presencia de la testosterona y el mayor por ciento de lesión hepática con respecto a el grupo control y a otras hormonas como estrógenos y progesterona. Al respecto Biagi y Cols<sup>(4)</sup> no observaron desarrollo de amibiasis hepática en los animales a los que se les administró testosterona, pero si la formación de 19 abscesos en el bazo y de algunas adherencias en el diafragma, peritoneo y/o pared abdominal que probablemente se deba a la vía de inoculación de las amibas, realizada vía vena meséptica mediante laparoscopia, lo que también pudo originar las adherencias. Estos datos son contrarios a la observación de que la amibiasis hepática es mas frecuente en el hombre que en la mujer<sup>(2,5,9,11,17,36)</sup>.

En el caso de la progesterona y el grupo control hay estudios descritos en donde la vía de inoculación es intestinal (normal) y nosotros utilizamos la percutánea directa al hígado. La diferencia del por ciento de lesión es poca entre nuestros grupos de estudio, sin embargo es importante mencionar que el mecanismo de acción de la progesterona incrementa la susceptibilidad de los animales a desarrollar amibiasis hepática. No esta totalmente aclarado, pero como la hidroxilación de la progesterona lleva a la conversión a deoxicortisona, quizá esta cause inmunosupresión, que es un efecto bien conocido de la administración de corticoesteroides, lo cuál favorece el paso de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* hacia el hígado. En estudios de NJ Gil y Cols<sup>(10)</sup> se inyectaron animales con progesterona vía intramuscular

diariamente durante 8 días antes y después de inocular con *E. histolytica*, se observó que a los tres días sólo el 60% tenía AHA y a los siete, once y quince días el 100% lo presentaron; de acuerdo a lo anterior la administración de progesterona tendría un importante efecto inmunosupresor que favorece el desarrollo de AHA.

En nuestro estudio, entre el grupo al cual se aplicaron estrógenos y el grupo control no hay diferencias significativas del por ciento de lesión hepática. En contraste, los estudios antes descritos por González MA., Tanimoto UM y Cols<sup>(12,33)</sup> reportan un menor por ciento de formación de amibiasis hepática cuando se usan estrógenos y mayor formación de amibiasis hepática en el grupo control, inoculando los trofozoítos por vía intraperitoneal lo cual pudo dar tiempo a que los estrógenos pudieran conferir una cierta protección contra la amibiasis. También debido al tiempo de administración de la hormona que fue 8 días diariamente antes de inocular los trofozoítos de *E. histolytica*.

En la técnica de inoculación percutánea directa al hígado con trofozoítos de *E. histolytica* se utilizó un anestésico inhalado (éter) para evitar el uso de anestésico intravenoso que generalmente se metaboliza en el hígado alterando su funcionamiento, llevando en la mayoría de los casos a un deterioro del estado general del animal que además, con el uso de hormonas pudiera retardar su recuperación y modificar los resultados de estos estudios. Además no se realizó cirugía abdominal para no alterar barreras anatómicas de importancia.

En relación a la cantidad del inóculo se realizó un ensayo con diferentes dosis de trofozoítos de *E. histolytica* desde 1.0, 1.5, 2.0, 2.5,

3.0, 3.5, 4.0, 4.5 y  $5.0 \times 10^5/0.2$  mL determinándose, lesiones a partir de los 7 días y hasta los 15 días después de la inoculación donde se observaron muertes. El por ciento mayor de lesión fue encontrado a los 10 días después de la inoculación, por lo anterior se decidió utilizar la media, es decir,  $2.5 \times 10^5/0.2$  mL por un periodo de 10 días de desarrollo, evitando así la muerte de algunos animales. Sin embargo, al revisar la bibliografía encontramos que Tsusumi, V. y Cols<sup>(37)</sup> utilizaron el mismo inóculo únicamente que a diferencia de nuestro estudio ellos practicaron una cirugía, considerando lo anterior nosotros validamos nuestro modelo experimental de infección.

Los resultados del peso diario de los animales no cambiaron de acuerdo a la bibliografía anteriormente citada<sup>(23)</sup> se observó un ascenso lento, solamente un día después de inoculación de los trofozoítos de E. histolytica un pequeño descenso, que quizá se deba al stress y manipulación a la que fueron sometidos los animales.

Para asegurarnos de que la amibiasis hepática es producto de los trofozoítos de E. histolytica, se utilizaron dos controles: el primer control involucra solamente un grupo que se inóculo con medio de cultivo TYI-S-33 en las mismas condiciones y cantidades anteriormente descritas y en lugar de las hormonas se administró agua inyectable estéril libre de pirógenos en la misma cantidad y vía. Para evitar cualquier variable estos animales no debieron presentar ningún tipo lesión; asegurando que el resultado fuera solo producto del proceso experimental. El otro grupo control fué desarrollado a la par, en donde se le administró agua inyectable estéril libre de pirógenos en un volumen de 0.2 mL vía

subcutánea a cada animal y trofozoitos de *E. histolytica* por la misma vía y condiciones. Cabe destacar que éste control fue utilizado por varios autores<sup>(4,10,12,18,33)</sup> anteriormente con resultados similares.

## **CAPITULO V**

## **CONCLUSIONES**

**En este estudio se evaluó la influencia de las hormonas sexuales en un modelo experimental en el que se indujo amibiasis hepática.**

**Se demostró que al aplicar las hormonas, se induce un mayor por ciento de lesión hepática en gerbos.**

**La testosterona produce mayor lesión a diferencia de los animales a los que se les administró estrógenos y progesterona.**

**Este resultado va a la par con las hipótesis propuesta de que el hombre es mas susceptible a la amibiasis hepática ya que en este estudio se observa que sí hay un nivel alto de testosterona habrá un por ciento de lesión hepática mayor, demostrada en cifras estrictamente significativas.**

**Con respecto a la explicación de este resultado en la literatura existe poca información que indique el mecanismo que pudiera estar desarrollando la testosterona en la inducción de la amibiasis hepática.**

**Con los dos grupos control, se permitió valorar las condiciones óptimas del experimento, es decir, asegurar que los resultados se deben exclusivamente a las maniobras realizadas.**

**Al contar la formación del número de abscesos en cada uno de los grupos, es decir, los que integran las diferentes hormonas y el control que desarrollo amibiasis hepática, no se observó diferencia alguna.**

**BIBLIOGRAFIA**

- 1.- Arellano, J, Granados, J, Pérez, E, Feley C, Krestschmer, RR, HLA antigens and complotypes in amebic abscess of the liver in mexican mestizos. Arch Invest Med México 1990; **21** (Supl 1):11-14.
2. Arellano J, Granados P, Frenk M, López-Osuna I, Santos y RR, Kretschmer. Increased Frecuency of HLA-DR3 In Mexican Mestizo Pediatric Patients with amebic Liver Abscess (ALA) Archives of medical Research. 1992; **23** (2): 269-270.
- 3.- Bandt H, Pérez TR, AMIBIASIS. La prensa Médica Mexicana Edición 1970, 13.
- 4.- Biagi FT, Robledo E, Servin H, y Marvan G. Influence of some steroids in the experimental production of amebic hepatic abscess. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1963; **12** (3): 318-20
5. Boonyapisit S, Chinapak O. and Plenguanit O. Amoebic liver abscess thailand, clinical analysis of 418 casos. J Med Assoc Thai. 1993; **76** (5): 243-246.
6. Caballero AS, Viveros MR, Salvatierra B, Tapia RC, Sepulveda JA, Gutiérrez G, Ortiz LO, Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1994; **50** (4): 412-419.
7. Diamond LS. Techniques of axenic cultivation of *E. histolytica* Like amebae. J. Parasitol 1968; **54**: 1047.



ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

39

8. Fenske M. Production of steroids by in vitro superfusion from adrenals of the Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*): effect of acute stress. Comp. Biochem Physiol. 1983; **74 A**: (4) 971-76.
9. Georges JA, Gervez F, and Fobuzshi FA. Extra intestinal Amebiasis. Radiology 1992; **182**: 181-183.
10. Gil NJ, Ganguly KN, Mahajan CR, Bhusnurmath RS, and Dilawari BJ. Progesterone-induced amebic liver abscess in guinea pig a new model. Transactions of the royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1983; **77** (1): 53-58.
11. González MF, Lee AR, y Aguirre GJ. Influencia del sexo y la edad en la amibiasis invasora del hígado. Archivos de Investigación Médica. 1971; **2** (Supl): 395-400.
12. González MF, Tanimoto UM, Vázquez SJA, Calderón LP, Aguirre GJ. Efectos de los estrógenos en hamsters con amibiasis en el hígado. Arch. Inv. Med. 1972; **3** Supl 2: 335-40.
13. González RA, Haque R, Rehman T, Aguirre A, Hall A, Guhl F, Warhuist Do, y Miles M. Diagnosis of amebic dysentery by detection of *Entamoeba histolytica* fecal antigen by an Invasive Strain-Specific, Monoclonal Antibody-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Journal of clinical Microbiology 1994; **32** (4) 964-970

- 14.- Greenstein AJ, Barth J, Dicker A, Bottone EJ, Aufses AH Jr. Amebic liver Abscess: a study of 11 cases compared with a series of 38 patients with pyogenic liver abscess. Am. J. Gastroenterol. Jun 1985; **80** (6) 472-8.
- 15.- Gutiérrez,G, Ladlow, A, Espinoza, G, Herrera, S., Muñoz,O Rattoni, N, Sepulveda, B. Encuesta serológica nacional. Salud Pública de México.1992; **34** (2):242-254.
- 16.- Ham AW,. TRATADO DE HISTOLOGIA. Nva De. Interamericana, S.A. de C.V. 8a Edición 16-8. México, D.F. 1986.
17. Higuera RF, Lagunes RA, Romero ZJL, Sánchez CJ, y Cruz VA. Absceso hepático amibiano. Estudio retrospectivo clínico - epidemiológico. Rev. Med. Hosp. Gral. de Méx. S.S. 1986; **49** (1): 25-31.
18. Información Profesional Especializada S.A., de C.V. VADECUM FARMACEUTICO. Rezza Editores. S.A de C.V. 2a Edición 1993; 1233-1234, 1244-1245, y 1266.
19. Lares FV, Jockheere F, Mora H. Rech AI, Ferreira EG, Fernández QG, Ruíz CM, Visvesvara G. Five cases of primary Amebic-Meningoencephalitis in Mexicali, México: study of the isolates. Journal of clinical Microbiology. 1993; **31** (3): 685-88.
- 20.- Maltz, G,M.D., Knaver,M, M.D. Amebic liver abscess: a 15 years experience. Am. J. Gastroenterol 1991; **86** (6): 704-709.
- 21.- Merten, D, Kirks, D. Amebis liver abscess in children.The role of diagnostic imaging. A.J.Radiology .1984; **143**: 1325-29

22. Pehrson PO, Amoebiasis in a non-endemic country. Scand J Infect. Disc. 1983; **15**: 207-214.
23. Raible HL, and Gorzalka BB. Food Intake, Body Weight and Lordosis in Male and Female Mongolian Gerbils: effects of Ovarian Steroids. Physiology and Behavior 1985; **35**: 767-74.
24. Raible HL, and Gorzalka BB. Receptivity on Mongolian gerbils dose and temporal parameters of ovarian hormone administration Laboratory Animals 1986; **20**: 109-13.
25. Reed SL. Amebiasis An update. Clinic. Infect. Disc. 1992; **14**: 385- 393.
26. Romero Zamora JL, Newton SO, Amibiasis En: **INFECTOLOGIA**. Higuera RF, Hidalgo LH, Sánchez CJ, Lagunas RA, Romero ZJL. Ed. Prado México. 1995; 462-478.
- 27.- Said, FS. Virulence factors of Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med.México.1990; **21** (3): 253-262.
- 28.- Seng-Kee C, Chi-Sin C, I-Shyen S, Hsien-Hong L, Shue-Shian C. Cheng-Tang C, Chung-Huang K, Jye-You C, y King Wash C. The prognostic Factors of severe amebic liver abcess: a retrospective study of 125 cases. Am J Trop. Med Hyg. 1992; **46** (4): 398-402.
29. Searle de México, S.A. de C.V. AMIBIASIS 2a Reunión de Expertos registro en tramite México, 1994.

30. Shibayama SM, Tsutsumi VR., Campos R, y Martínez AP. Morphological Characterization of experimental amebic. Liver Lesions in Gerbils. Arch Invest. Med. (Méx) 1992; 23: (2): 203-7.
- 31.- Sigler, LM, Mier, JD, Melgoza, CO., Blanco RB, y Medina, EG. Amibiasis Tratamiento Quirúrgico en 1989. Rev. Gastroenterol Méx. 1989; 54 (3):185-189.
32. Soria-Puente EM. AMIBIASIS INTESTINAL Y EXTRAINTestinal EN NIÑOS. Estudio retrospectivo de 105 casos postmortem del HIM. México, D.F. 1976; 4-6.
33. Tanimoto UM, Vázquez SJA, Calderón LP, Aguirre GJ, y González MF. Nuevos experimentos acerca del efecto de los estrógenos en hamsters con amibiasis del hígado. Arch. de Investigación Médica. 1973; 4 Supl. 1: 165-68.
- 34.- Tay L, Velasco G. PARASITOLOGIA MEDICA. De Méndez Cervantes. 5a edición. México 1991; 49-59.
- 35.- Tennat JR. Evaluation of trypan blue technique for determination of cell viability transplation. 1964; 2: 685.
- 36.- Tony JC, Martin TK. Profile of amebic liver Abscess. Arch Med. Res. 1992; 23 (2): 249-250.
- 37.- Tsutsumi VR, Mera LR, Anaya FV, y Martínez AP. Cellular bases of experimental Amebic Liver Abscess formation. Am J Pathol 1984; 117: 81-91.