

165



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ACTIVIDAD FARMACOLOGICA DEL PRAZICUANTEL EN EL ABSCESO HEPATICO DESARROLLADO EN HAMSTER DORADO Mesocricetus auratus POR Entamoeba histolytica.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
SANDRA LORENA PALACIOS BALBUENA



DIRECTORA DE TESIS DBA. ENÉDINA JIMENEZ CARDOSO





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

" Actividad farmacológica del Prazicuantel en el absceso hepático
desarrollado en hamster dorado Mesocricetus auratus por
Entamoeba histolytica".

realizado por Sandra Lorena Palacios Balbuena.

con número de cuenta 8925582-5 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Enedina Jiménez Cardozo.

Propietario

Dra. María Antonieta Aladro Lubel.

Propietario

Dra. María Esther Martínez Murillo.

Suplente

M en C María del Pilar Crisóstomo Vázquez.

Suplente

Dr. Guillermo Salgado Maldonado.

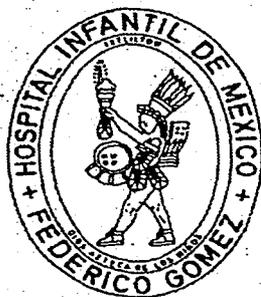
Consejo Departamental de Biología

Dr. Patricia Ramos Morales.

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.



DEPARTAMENTO DE
DE BIOLOGIA



**Este trabajo fué realizado en el Laboratorio de Investigación en
Parasitología del Hospital Infantil de México, "Federico Gómez",**

bajo la dirección de la Dra. Enequina Jimenez Cardoso

DEDICATORIA

A mi papá y a mi mamá por todo su amor, confianza y su apoyo incondicional en todo momento gracias.

A mis hermanos Cris, Rosy, Claudia, Toño y Fredy por todo su cariño, apoyo.

A mis sobrinos Nadiah, Oliver, Mayra^t y Suni por el amor y alegría.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Enedina Jiménez Cardoso por ser directora y sinodal de esta tesis, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo y participar con su equipo de investigación.

A la M en C. María del Pilar Crisóstomo Vázquez, por fungir como sinodal y la revisión minuciosa de la tesis, por compartir conmigo su conocimiento y amistad.

A la Dra. María Esther Martínez Murillo por su participación como sinodal y por la revisión del escrito, sus sugerencias permitieron mejorar el trabajo.

A la Dra. María Antonieta Aladro Lubel por ser sinodal y revisora del escrito, sus comentarios contribuyeron a mejorarlo

A el Dr. Guillermo Salgado Maldonado por ser sinodal y por la revisión del escrito.

A Lety, Caro, Vis, Yadi, por su amistad, consejos y apoyo en todo momento.

A todos el personal del laboratorio de Investigación en Parasitología del Hospital Infantil de México.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias Erika R, Irais V, PaolaT, Ricardo J, Humberto S, por todos esos momentos gratos.

INDICE

	Pág.
1. Resumen.....	5
2. Introducción.....	6
2.1 Historia.....	6
2.2 Epidemiología.....	7
2.3 Morfología.....	10
2.4 Ciclo de vida.....	12
2.5 Patología.....	14
2.6 Diagnóstico.....	15
2.7 Tratamiento	17
3. Objetivos.....	20
4. Metodología.....	21
4.1 Material biológico.....	21
4.2 Desarrollo de absceso hepático amebiano.....	22
5. Resultados.....	25
6. Discusión.....	35
7. Conclusiones.....	39
8. Bibliografía.....	40
9. Anéxo.....	49

1.- RESUMEN

La amebiasis es una enfermedad causada por *Entamoeba histolytica*, aproximadamente el 20% de la población mexicana está infectada una parte presenta síntomas imputables a la penetración del parásito en el hígado, ocasionando el absceso hepático. Generalmente su tratamiento es farmacológico y en algunas circunstancias el padecimiento es severo, siendo necesario recurrir a procedimientos quirúrgicos. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto amebicida del prazicuantel en la evolución del absceso hepático amebiano en hámster, inducido por diferentes aislados de *E. histolytica* obtenidos de las heces de pacientes con patología digestiva. Se obtuvieron ocho aislados de *E. histolytica* cultivados en medio de Robinson. Cada uno de los cultivos se cosecho por centrifugación a 700 xg durante 10 minutos. Las bacterias presentes en el botón de trofozoitos se separaron utilizando gradientes discontinuos de percoll. Posteriormente se preparó una suspensión de 1×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 parásitos/0.2 ml de PBS. Se formaron 24 grupos de hámster de 22 días de nacidos, cada grupo se integro de 5 animales. Tres grupos fueron inoculados con las tres suspensiones una por grupo para determinar la cantidad de trofozoitos a inocular.

Obtenida la cantidad ideal 1×10^5 trofozoitos de *E. histolytica* se inoculo a 16 grupos dos grupos por cada aislado después de ocho días se sacrificaron un grupo por cada aislado, esto para determinar el porcentaje de AHA, a los otros ocho grupos después de producir el AHA se les administro 20 mg/kg de peso de prazicuantel durante cinco días, los cinco grupos restantes se utilizaron para los siguientes controles: grupo 1 control de fármaco prazicuantel 20mg/kg de peso, grupo 2 con AHA control de metronidazol 20mg/kg de peso, grupo 3 inoculación del medio "BR", grupo 4 inoculación de cepa HM1:IMSS, y grupo cinco sin fármaco ni amebas.

Los resultados mostraron que todos los aislados causaron lesiones amebianas con diferentes niveles de patogenicidad, a diferencia de los control negativo en donde no hubo desarrollo de absceso hepático amebiano (AHA) y en el control positivo que desarrolló AHA al 100%. La concentración de prazicuantel de 20 mg/kg fue insuficiente para eliminar completamente la infección en todos los casos.

2. INTRODUCCIÓN

• 2.1 Historia

La amebiasis ha existido probablemente desde que la especie humana se diferenció de sus predecesores inmediatos en el curso de la evolución. Se encontró referencia escrita relacionada con los síntomas clásicos de la disentería, con probabilidad amebiana, en documentos muy antiguos. Así se mencionaron casos de diarrea mucosanguinolenta en el documento sánscrito conocido como "Brigusa-mhita", escrito 3000 años antes de nuestra era (Vaiday y Ray., 1982).

En los trabajos de Hipócrates, recopilados en el siglo V, A. C se mencionan con frecuencia la disentería, la manifestación más común de la amebiasis invasora (Adams, 1939).

En 1875 el investigador Losch, en San Peterburgo, publicó la primera prueba experimental de su papel patógeno de la ameba; fue el primero en describir la forma del trofozoito de *Entamoeba histolytica* y la patología asociada con la infección en un paciente (Bruckener, 1992).

Councilman y Lafleur en 1891, describieron la clínica, patología y las evidencias en la asociación de *Entamoeba histolytica* con disentería y abscesos (Councilman y Lafleur, 1891).

Quincker y Roos en 1893 describen la forma de quiste y Schaudinn en 1903 le da el nombre de *Entamoeba histolytica* y describe las diferencias con *Entamoeba coli* (Bloomfiel, 1957; Ravdin y Guerrant ., 1982).

Boeck y Drbohlav en 1924, desarrollaron un medio de cultivo en el que las amebas parásitas podrían crecer fácilmente, sin embargo este método requería cultivar amebas en presencia de bacterias (Boeck y Drbohlav, 1925). Diamond en 1961, elaboró un medio de cultivo que permitió el cultivo del parásito sin necesidad de otro microorganismo (Diamond, 1968).

Entamoeba histolytica es la única de las seis amibas parásitas del género *Entamoeba* que se conoce que infecta al ser humano y le produce daño (Clark y Diamond, 1991; García y Bruckner, 1988; Diamond, 1986).

● 2.2 Epidemiología

La infección por *Entamoeba histolytica* es de distribución universal, la mayor incidencia ocurre en las comunidades pobres y con mal saneamiento ambiental. La mayoría de los individuos infectados son portadores asintomáticos de *E. histolytica* no patógena, ya que no produce ningún signo o síntoma; sin embargo, como patógena es la causante de la amebiasis invasora, cuya prevalencia varía de un país a otro (Sepúlveda y Martínez-Palomo, 1984).

E. histolytica coloniza el intestino en el humano y eventualmente puede invadir otros órganos, la infección al rebasar la pared intestinal, por vía portal, llega al hígado en donde se manifiesta como absceso hepático amebiano (Adams y Macleod., 1977; Shibayama *et al.*, 1998).

Desde hace tiempo se sabe que muchas personas aparentemente infectadas por *E. histolytica* nunca desarrollaron síntomas y se liberaron espontáneamente de la infección. Muchos investigadores interpretaron este hecho como indicativo de un parásito con diferentes niveles de virulencia (Martínez-Palomo y Castellano, 1994). *E. histolytica* comprende dos formas diferentes de amebas morfológicamente idénticos pero con diferente estructura genética *E. histolytica* patógena (Schaudin) y la no patógena (Diamond y Graham, 1993). La frecuencia de absceso hepático amebiano es una medida confiable de patogenicidad, debido a que estas lesiones pueden identificarse con relativa facilidad en el paciente cuando se punciona al absceso y se observa la ameba bajo el microscopio o a través de estudios post-mortem. En las áreas endémicas, el absceso hepático ocurre en aproximadamente el 2% de los pacientes adultos (Sepúlveda, 1982).

En la actualidad es una de las 15 patologías más importantes del mundo porque genera un poco más de 500 millones de casos anuales. Se expresa como enfermedad en el 10% (50 millones) y es causa de 100, 000 muertes por año (Treviño-García *et al.*, 1997)

En nuestro país, la presencia del AHA continúa siendo una preocupación ya que su incidencia al inicio de los años noventa, más concretamente en 1992 fue de 3,074 casos a nivel nacional sin embargo en 1993 disminuyó el número a 2,992. En 1994 siguió el descenso de los casos y se reportaron 1,250. En 1996 se incrementó el número a 3,120 para el año 1998 el número fue de 1,435 siendo Chiapas, Jalisco, Michoacán, Nuevo León y Oaxaca, las entidades con más casos reportados. En 1999 el número disminuyó a 933 siendo Chiapas y Veracruz las entidades en las que se reportaron más y por último en el 2000 el número se incrementa a 6380 en donde se observó un aumento de casos con absceso hepático amebiano en las localidades de Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Sinaloa y Veracruz. Tabla 1. (Escandón *et al.*, 1996; Suárez-Ortiz, 1999; Dirección de epidemiología, 2000)

Tabla 1. Casos de Absceso hepático amebiano (A06.4)

	Año 1992	Año 1993	Año 1994	Año 1996	Año 1998	Año 1999	Año 2000
ENTIDAD	Casos	Casos	Casos	Casos	Casos	Casos	Casos
Agascalientes	310	162	11	52	21	5	51
Baja California	38	44	4,00	19,00	11	12	49
Baja California Sur	45	38	12	31	5	1	27
Campeche	6	10	2	8	13	7	69
Coahuila	63	40	15	16	17	20	56
Colima	58	42	35	37	8	22	55
Chiapas	50	65	63	123	96	114	334
Chihuahua	75	112	6	10	68	10	172
Distrito Federal	77	139	1	80	23	7	113
Durango	28	42	88	55	21	20	66
Guanajuato	163	140	45	115	34	22	272
Guerrero	170	67	31	376	42	43	526
Hidalgo	29	40	34	118	26	56	124
Jalisco	1	13	3	108	102	45	725
Edo. De México	294	325	89	278	43	45	229
Michoacán	165	130	45	111	128	22	274
Morelos	65	146	36	74	18	7	48
Nayarit	129	74	66	62	18	7	125
Nuevo León	165	181	49	152	100	29	174
Oaxaca	56	50	77	114	197	25	872
Puebla	183	125	64	194	68	67	429
Querétaro	216	99	20	147	27	21	60
Quintana Roo	26	45	19	36	3	4	5
San Luis Potosí	90	87	31	47	21	41	174
Sinaloa	129	227	38	126	37	65	358
Sonora	61	82	34	76	29	42	120
Tabasco	0	62	56	88	42	12	16
Tamaulipas	57	109	16	142	69	30	112
Tlaxcala	71	49	27	29	8	2	18
Veracruz	134	132	157	231	86	95	503
Yucatán	14	24	16	11	8	26	109
Zacatecas	106	91	60	54	46	9	95
Total	3074	2292	1250	3120	1435	933	6380

FUENTE: Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica/dirección general de epidemiología/SSA 2000

• 2.3 Morfología

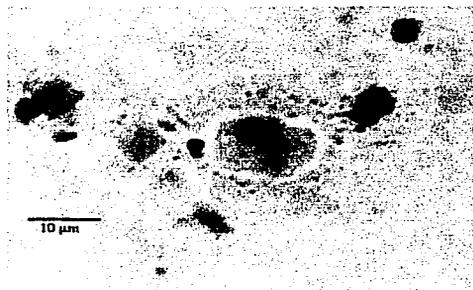
Entamoeba histolytica es al parecer, uno de los organismos eucariontes más primitivos. La actividad dinámica de los trofozoítos o formas móviles, están basadas en una disposición citoplásmica sencilla, que carece de los siguientes componentes: citoesqueleto estructurado y microtúbulos citoplásmicos (no existen prácticamente microfilamentos de actina); un sistema de membranas equivalentes a cuerpos de Golgi y al retículo endoplásmico de los eucariontes superiores mitocondrias y un sistema de lisosomas primarios y secundarios semejantes al que se encuentra en otros eucariontes (Carrero y Ladetle, 1996., Mc Laughlin y Aley, 1985).

E. histolytica puede presentarse como trofozoíto y como quiste (fig 1). Los trofozoítos varían en tamaño de 12 - 60µm de diámetro (Huber *et al.*, 1989) viven en la luz o en la pared del colon, se alimentan de bacterias y de eritrocitos, se multiplican con rapidez en el ambiente anaerobio del intestino, y en ocasiones atacan el tejido epitelial produciendo lesiones ulcerativas, invade al hígado y otros órganos causando un daño extensivo, presentan un solo núcleo esférico, un pequeño cariosoma central o nucléolo, gránulos finos y regulares distribuidos regularmente alrededor de la membrana nuclear una membrana citoplásmica con dos capas, citoplasma con numerosas vacuolas, gránulos de glucógeno, estructuras semejantes a cuerpos de Golgi y un escaso desarrollo de retículo endoplásmico. Posee una gran variedad de enzimas que interviene en el metabolismo de proteínas y ácidos nucleicos (Reed 1992., Eubank y Reeves 1982).

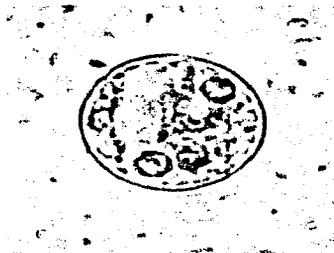
En el estadio de prequiste, el trofozoito aproximadamente es del mismo tamaño que el quiste, ocasionalmente el citoplasma es claro, contiene glucógeno los cuerpos cromatoides son uninucleados y presentan cariosomas (Lake y Stayter 1970., Protor y Gregory 1973).

El quiste se desarrolla a partir del prequiste y el núcleo se divide para formar el quiste maduro tetranucleado, su tamaño es de 8.5 a 19µm de diámetro,

son esféricos, la membrana nuclear es uniforme con cromatina periférica, el cariosoma es pequeño y usualmente se localiza en el centro de los núcleos. La formación del metaquiste se presenta durante el proceso de desenquistamiento, en donde la ameba emerge de la pared quística a través de un pequeño poro (Chavéz *et al.*, 1978).



a)



b)

Figura 1. *Entamoeba histolytica* a) trofozoíto teñidos con la técnica tricrómica de Gomori b) quiste teñido con lugol.

Clasificación taxonomica según Levine *et al.*, 1980 es la siguiente:

Reino:	Protista	(Haeckel, 1866)
Subreino:	Protozoa	(Goldtuss, 1818, Von Siebold, 1846)
Phylum:	Sarcomastigophora	(Honigberg y Balamuth, 1963)
Subphylum:	Sarcodina	(Schmarda, 1871)
Superclase:	Rhizopodea	(Von Siebold, 1845)
Clase	Lobosea	(Carpenter, 1861)
Subclase:	Gymnamoebia	(Haeckel, 1862)
Orden:	Amoebida	(Kent, 1880)
Suborden:	Tubulina	(Bovee y Jahn, 1966)
Familia:	Entamoebidae	(Diesing, 1848)
Género:	<i>Entamoeba</i>	(Cassigrandi y Barbagallo, 1895)
Especie.	<i>E. histolytica</i>	(Shaudinn, 1903)

• 2. 4 Ciclo de vida

El parásito es transmitido de un individuo a otro mediante el quiste tetranucleado (Zaman, 1979). Las principales fuentes de infección son: el enfermo crónico, el convalesciente y el portador asintomático, que excretan una gran cantidad de quistes en sus heces. La vía de entrada del parásito al organismo es por la boca a través de algún vehículo contaminado como los alimentos, el agua. Una vez ingerido, el quiste maduro pasa a través del estómago hasta llegar al intestino delgado donde se transforma en un metaquiste multinucleado (8 núcleos) que se dividirá hasta originar ocho trofozoítos metaquisticos, junto con la materia fecal son transportados hasta el colon y el ciego donde proliferan. Algunos trofozoítos se transforman en quistes otros pueden ser virulentos, causando lesiones a los tejidos intestinales o no virulentos sin causar daño a los tejidos del huésped y vivir como comensales. Cuando los quistes alcanzan su madurez, son arrojados al exterior junto con la materia fecal, y al ser ingeridos por otro huésped susceptible, inicien nuevamente el ciclo o al quedar depositados en las manos y

uñas del portador, que se reinfecará cuando los quistes pasen a la boca (Walsh, 1988; Crevenna, 1977) (Fig 2).

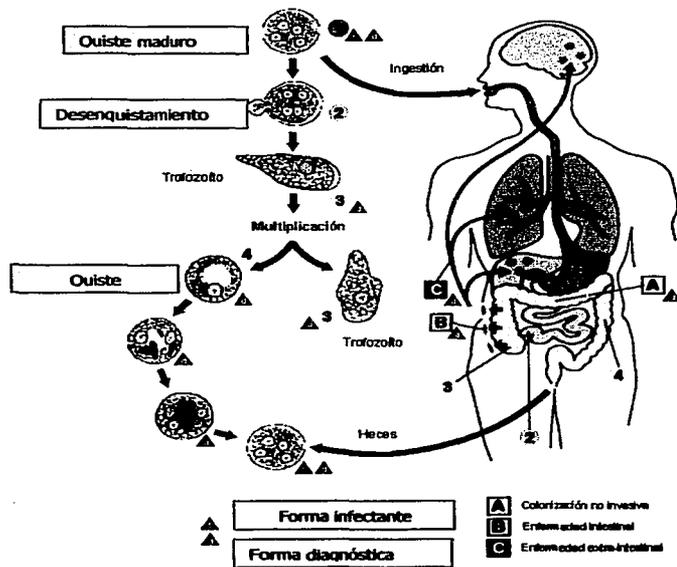


Figura 2. Ciclo biológico de *Entamoeba histolytica* (Amebiasis., 1999)

● 2.5 Patología

El trofozoíto ejerce su acción patógena sobre el tejido por medio de la adhesión a la célula blanco, la liberación de toxinas y proteasas, la fagocitosis y la digestión de la célula ingerida (Nort *et al.*,1990)

Para evitar que el trofozoíto sea expulsado del intestino con las heces, es necesario que se adhiera al epitelio intestinal de tal forma que el movimiento peristáltico no lo desprenda y lo arrastre hacia el exterior. Si el trofozoíto resiste la fuerza del flujo intestinal esta en posibilidad de dividirse y colonizar el intestino, para después invadir la mucosa y en algunos casos penetrar el epitelio. En el proceso de adhesión existen moléculas de superficie de la ameba que juegan un papel fundamental y éstas se conocen con el nombre de adhesinas (Mattem *et al.* ,1982).

El absceso hepático es sin duda la complicación extraintestinal más frecuente de la ameba. Además, las amebas encuentran más fácil producir metástasis en otros órganos a partir del hígado que del intestino (Sepúlveda *et al.*, 1954). En adultos, la amebiasis hepática es mucho más frecuente en hombres que en mujeres, mientras que en niños prepúberes no hay diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de la enfermedad según el sexo (Dirección de epidemiología, 2000). Macroscópicamente, un absceso hepático amebiano es un área bien delimitada donde el parénquima del hígado está completamente reemplazado por material necrótico de color amarillento y consistencia cremosa, generalmente rodeado por un anillo de tejido hepático congestivo. El material necrótico puede ser sólido, blanco o semilíquido; frecuentemente es espeso y algo mucoide. La parte líquida del área necrótica por lo común se encuentra en el centro del absceso, mientras que la parte más sólida se adhiere a la superficie interna de la cavidad. Los abscesos pequeños tienden a ser más densos que los más grandes, pero hay muchas excepciones. El tamaño del absceso es muy variable, desde lesiones puntiformes hasta masas enormes de material necrótico que puede sustituir hasta cerca del 90% del órgano normal. Los abscesos se

localizan con preferencia en el lóbulo derecho del órgano y con mayor frecuencia son únicos que múltiples (Brandt y Pérez-Tamayo, 1970; Adams y MacLeod, 1977; Aikat *et al.*, 1979) (Fig 3).



Figura 3. Aspecto macroscópico de absceso hepático amibiano.
(Martínez-Palomo, 1989)

● 2.6 Diagnóstico

El diagnóstico de la amebiasis invasora se basa en: signos y síntomas, la identificación de trofozoitos móviles de *E. histolytica* conteniendo eritrocitos fagocitados. Los trofozoitos se pueden identificar por examen microscópico de

evacuaciones recientes o mejor aún, en el moco sanguinolento. Hay mayor oportunidad de identificar estas formas amebianas en la cubierta amarilla de las ulceraciones de la mucosa, que se obtiene durante la rectosigmoidoscopia. En esta se pueden identificar a un ameboma localizado en la porción final del colon. Cuando la masa se localiza en otra región, puede identificarse por colonosopia o mediante un estudio radiológico con enema de bario.

Existen numerosas pruebas inmunológicas que se han utilizado para identificar anticuerpos antiamebianos (Tanimoto *et al.*, 1989) que aparecen en sangre aproximadamente siete días después del inicio de los síntomas y se encuentran con mayor frecuencia en las formas graves de amebiasis invasora. De los diferentes métodos en los que se emplean antígeno amebiano proveniente de cultivo axénicos de *E. histolytica* para detección de anticuerpos séricos, la contrainmunolectroforesis (CIE) y la hemaglutinación indirecta (HAI) (Sepúlveda y Martínez-Palomo, 1982) por lo común son las más sensibles y específicas. Los estudios de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en amebiasis experimental y en humanos han mostrado resultados comparables a los obtenidos con HAI y CIE.

En relación a la diferente patogenicidad de aislados mediante electroforesis de isoenzimas, se diferencia a dos grupos de *E. histolytica*, las patógenas y las no patógenas dependiendo de la migración electroforética de las enzimas glucosafosfato isomerasa (GFI), enzima málica (EM), fosfoglucomutasa (FGM), exokinasa (KH), llamadas zimodemos (Sargeant, 1987; Sathar *et al.*, 1990, Acosta *et al.*, 1995).

El desarrollo del medio de cultivo axénico (reproducción de *E. histolytica* sin la presencia de otro organismo), permitió la realización de diversas técnicas inmunológicas (Walderich, 1997).

Las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permite efectuar la hibridación de enzimas por inmunoanálisis al utilizar anticuerpos monoclonales. Este método de laboratorio permite diferenciar las dos formas de *Entamoeba histolytica* patógena (Schaudin) y la no patógena, protozoarios morfológicamente

idénticos pero con diferente estructura genética. La identificación del DNA en *E. histolytica* por PCR, sólo se ha podido realizar en lisado hepático y heces en esta última muestra se logra extraer DNA extracromosomal con tiozonato de guanidina, tanto de trofozoítos como de quistes. La utilización de PCR, no solo se concreta al diagnóstico de amebiasis, sino que puede utilizarse como herramienta para estudios epidemiológicos (Tachibana *et al.*, 1991).

Los estudios radiológicos y principalmente la radiografía simple de abdomen, son de gran valor en el diagnóstico y manejo de los pacientes con amebiasis intestinal y hepática (Tanimoto *et al.*, 1989).

El centelleograma es de ayuda en el diagnóstico de amebiasis hepática permitiendo establecer el tamaño, localización y número de las lesiones, las cuales se ven como defectos de concentración que corresponden a zonas donde existe menor radioactividad por la ausencia del tejido hepático capaz de captar el radioisótopo (J Radiol, 1996).

La tomografía axial computada (TAC) o resonancia magnética, actualmente el ultrasonido es el método diagnóstico de entrada y por tanto de elección para la demostración de los abscesos.

En relación a la TAC, es un estudio que permite visualizar zonas hipodensas en una proporción similar al ultrasonido. Su mayor utilidad, es cuando los abscesos son menores de 2 cm y cuando existen dudas respecto al tipo de lesión observada durante el ultrasonido (Stoopen y Kimura; 1996).

• 2.7 Tratamiento

Los agentes amebicidas con los que se cuenta en la actualidad pueden ser clasificados en aquellos que actúan extraintestinalmente y los que lo hacen exclusivamente en la luz del intestino.

El hidrocloreuro de eretina, la dehidroemetina y el fosfato de cloroquina, sólo actúan como amebicidas tisulares (Hart y Nauton, 1964), mientras que el metronidazol y sus derivados tienen efecto tanto extraluminal como intraluminal

(Jonhson;1993). Los dos amebicidas tisulares más importantes son el metronidazol y la emetina (Kean, 1976)

Entre las sustancias que actúan específicamente en la luz intestinal se encuentran las 8-hidroxiquinolinas (Oakley, 1975) y los arsenicales, como el glicobiarsol. El furoato de diloxamida es considerado por algunos autores como la droga de elección para el tratamiento de los portadores asintomáticos. La amebiasis invasora responde al tratamiento farmacológico en más del 90% de los casos, cuando se emplean las drogas y las dosis adecuadas. (Griffin, 1973; Henn y Collins, 1973; Koutsaimanis *et al.*,1979).

En 1972 se descubrió el praziquantel que es un derivado de la pirazinoisoquinolina. (Pearson y Guerrant, 1983; Andrew *et al.*, 1983; King *et al.*, 1989). Es clínicamente eficaz contra un amplio espectro de infecciones por céstodos, tremátodos, en animales y humanos (Harnett, 1988).

El fármaco ejerce dos acciones principales inmediatas en los organismos susceptibles; en su mínima concentración efectiva provoca un incremento de la actividad muscular, seguido de contracción muscular y parálisis espástica. (Bercker, 1980), se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal. La biodisponibilidad oral es un 80% de la dosis administrada, sufre amplio metabolismo y los metabolitos se excretan por vía urinaria en cuatro días tras la administración, el 90% se excretan en 24 horas, la vida media plasmática de eliminación es de 1.5 horas (Lima, 1990).

En concentraciones mayores pero aun dentro de los márgenes terapéuticos, el praziquantel causa vacuolización y una vesiculación del tegumento de los parásitos susceptibles. Si es suficientemente marcado este efecto, ocasiona la liberación de los contenidos del parásito, en la actividad de los mecanismos de defensa y la destrucción de los parásitos (Shaw y Erasmmsus, 1983).

Existen reportes aislados sobre el uso del praziquantel en el manejo de ciertas infecciones causadas por protozoarios. La actividad contra protozoarios fue reportada inicialmente como un hallazgo en el estudio epidemiológico, en el que se estudiaba el efecto del praziquantel en la esquistosomiasis (Flisser *et al.*, 1995).

Los protozoarios son difíciles de erradicar por diferentes causas, entre ellas la relación huésped-parásito (Jendoczko *et al.*, 1993; Herbert *et al.*, 1994) y los pocos fármacos disponibles. La toxicidad de los tratamientos disponibles hasta la fecha o la resistencia a estos tratamientos contribuyen a la prevalencia de esta forma de parasitosis (Smith *et al.*, 1988; Upcroft y Upcrt, 1990). Tal es el caso de los 5-nitromidazoles representados por el metronidazol, que posee eficacia en el tratamiento de la amebiasis intestinal y extraintestinal. Sin embargo, estudios clínicos y experimentales indican la presencia de casos en donde no fueron eficaces estos fármacos (Anon, 1993; Campbell, 1986). De ahí la necesidad de incrementar la búsqueda de agentes eficaces en el manejo de la amebiasis extraintestinal. Por ello el interés de utilizar el prazicuantel en la eliminación del absceso hepático desarrollado por *Entamoeba histolytica*.

3.- OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto amebicida del prazicuantel a 20 mg/kg de peso, en la evolución del absceso hepático amebiano en hámsters, inducido por diferentes aislados de *Entamoeba histolytica* obtenidos de las heces de pacientes con patología digestiva.

• OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el número de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* y la diferente capacidad invasora para producir abscesos hepáticos amebianos de los diferentes aislados, provenientes de muestra fecal de individuos sintomáticos.
- Determinar si la dosis de 20mg/kg de peso de prazicuantel elimina el absceso hepático amebiano producido en hámster, con los diferentes aislados de *E. histolytica*.

4.- METODOLOGÍA

4.1 Material Biológico

Se utilizó la materia fecal de 8 pacientes, con diferente edad (18-50 años) y sexo. Todos ellos presentaron patología digestiva como diarrea, dolor abdominal y algunos moco con sangre en sus heces. Se demostró la presencia de quistes *Entamoeba histolytica* por la técnica de Faust. Posteriormente los parásitos fueron cultivados en forma monoxénica por el método de Robinson (Diamond, 1968). Aproximadamente 5 mg de materia fecal fue colocada en un frasco de cultivo que contenía agar salino en forma inclinada, 5 mg de almidón ; 200µl de eritromicina al 0.1%; 3.0 ml de medio "BR" (ver anéxo), se incubó durante 24 horas a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se eliminó el sobrenadante y se adicionó al mismo frasco, 5 mg de almidón, 200 µl de eritromicina al 0.1%, 100 µl de peptona al 20%, y 3.0 ml de medio "BRS" mezclado 1:1 con ácido fólico y se incubó nuevamente por 24 horas a 37° C.

Con una pipeta Pasteur se tomó una gota de sedimento para inocular nuevamente un frasco de cultivo que previamente contenía, los reactivos antes mencionados y se incubó durante 48 horas a 37°C. Posteriormente se tomó con una pipeta Pasteur una gota del sedimento y se colocó en un porta objetos el cual contenía previamente una gota de lugol al 2%, se cubrió con un cubreobjetos y se observó al microscopio con los objetivos 10X y 40X.

4.2 Desarrollo de abscesos hepático amibianos en hámster.

Las amibas cultivadas monoxénicamente de 96 h, se cosecharon y se centrifugaron a 700xg durante 10 minutos. Se lavaron con 5 ml de solución salina y se centrifugaron durante 5 minutos a 700xg; se decantó el sobrenadante y el botón obtenido con los trofozoítos de cada aislado se les separó de las bacterias mediante gradientes discontinuos de percoll, a partir del 100%, ajustada a una osmolaridad de 230 mosmol/kg de agua. Al sedimento de células se le agregó 1ml de percoll al 100%, se homogenizó, posteriormente se agregó 1 ml de percoll al 80%, seguido de 1 ml de percoll al 60%, 2 ml de percoll al 50% y por último 1 ml de percoll al 30 %, se centrifugó a 700xg durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Con una pipeta Pasteur se obtuvieron las amibas de la interfase y se colocaron en otro tubo de vidrio, se lavaron con solución salina y se procedió a contarlas en la cámara de Newbauer.

En forma aleatoria utilizando el programa Epistat se formaron 24 grupos de hámster con 5 integrantes machos (*Mesocricetus auratus*) con un peso aproximado de 50 g y 22 días de edad. tres grupo de los 24 se inocularon con diferentes cantidades de amebas al primer grupo se les inoculó 1×10^6 trofozoítos, al segundo 1×10^5 y al tercero 1×10^4 esto para determinar cual era la cantidad ideal para producir absceso hepático amebiano.

Obtenida la cantidad ideal de trofozoítos de *E. histolytica* para formar absceso hepático amebiano Se procedio a inocular a 16 grupos dos grupos por cada aislado, se les inoculo intrahepáticamente 1×10^5 trofozoítos en un volumen 0.2 ml de PBS, conjuntamente a la inoculación de los trofozoítos también se les inyectó intraperitonealmente 8 mg/0.2 ml de gentamicina, para evitar infección bacteriana. Después de un período de ocho días, un grupo de cada aislado inoculado fue anestesiado con éter para sacrificarlos y determinar la presencia de abscesos hepáticos amebianos. Con los otros ocho grupos restantes después de desarrollar el absceso hepático amebiano se les administró

prazicuantel 20 mg/kg de peso vía oral durante cinco días y posteriormente se les sacrificó. Los últimos cinco grupos fueron utilizados como controles. El primero para evaluar la toxicidad del prazicuantel en animales sin inocular, en el segundo se determinó el efecto del metronidazol de 20 mg/kg de peso en los hámsters con absceso hepático amebiano, el tercero para comprobar el efecto de la carga bacteriana del medio "BR", el cuarto para comparar el desarrollo del absceso hepático con *E. histolytica* cultivada axénicamente y el quinto fue el grupo testigo negativo al cual no se le administro ni fármaco, ni amibas (Fig.4)

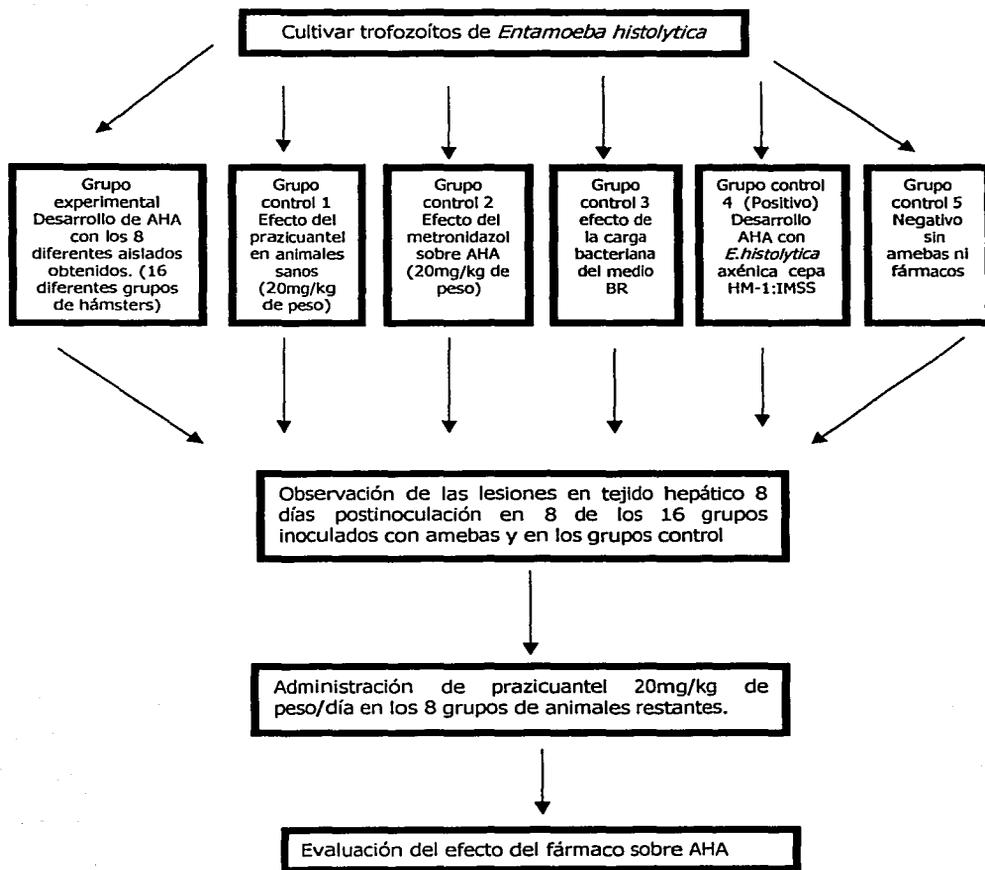
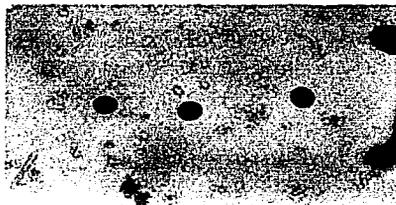


Figura 4. Metodología.

Se obtuvieron trofozoítos de los ocho aislados y se tiñeron con lugol para su observación (Fig 5).



a)



b)

Figura 5. Se muestran trofozoítos que al momento de adicionar el colorante Lugol 2% adoptaron la forma redonda en la parte interna y alrededor de estos trofozoítos se observan granulos de almidón a) vistos con el objetivo 10X. b) vistos con el objetivo 40X.

En la Tabla 2 se presenta la presencia de absceso hepático amebiano en los hámsters, en ella observamos que el 80% de los animales inoculados con los aislados HIM-1, HIM-2 y HIM- 4 desarrollaron absceso hepático amebiano. En los aislados el HIM-3, HIM-8 fue del 60% , con los aislados HIM-5, HIM-6, HIM-7 el desarrollo del absceso hepático amebiano fue entre el 20% y 40%. En esa misma tabla se observa el porcentaje de animales que murieron después de tres días de haberles inoculado las amebas; suponemos que la presencia de partículas como el almidón contenidas en los cultivos facilitaron una obstrucción biliar que provocó la muerte. Esto fue frecuente en aquellos aislados que tuvieron una capacidad patogénica menor tal es el caso de los aislados HIM-5 y HIM-7 puesto que en el 20% de ellos no desarrollaron abscesos hepático amebiano en los animales.

En relación a los controles se observa que los animales inoculados con medio de cultivo "BR", y fármaco sin previa inoculación de amebas ningún animal murió ni desarrollo absceso hepático amebiano al igual que en el control negativo. En cuanto al control positivo se pudo observar que todos los animales inoculados con amebas de cultivo axénico HM-1:IMSS desarrollaron abscesos hepáticos amebianos.

Se hizo notar que las amebas de los aislados HIM-1, HIM-2 y HIM-4 desarrollaron el absceso hepático amebiano de mayor tamaño abarcando más del 50 % del hígado (Fig 6) y por lo contrario los aislados HIM-5, HIM-6 y HIM-7 desarrollaron abscesos mas pequeños en forma puntual (Fig 7) El absceso hepático amebiano que abarco entre el 20% y 30% del tejido hepático se presenta en la (Fig 8).

La representación gráfica del porcentaje de animales que desarrollaron o no el absceso hepático amebiano al ser inoculados con diferentes aislados de *Entamoeba histolytica* se presenta en la figura 9.

En la tabla 3 observamos el número de hámsters que presentaron abscesos hepáticos amebianos después de recibir tratamiento con 20 mg/kg de peso de praziquantel. En ella se observa que el absceso hepático amebiano fue

resuelto entre el 50% y 100 % cuando se inoculo a los animales con los aislados HIM-1, HIM-3, HIM-6, HIM-8.

Por lo contrario los animales inoculados con los aislados HIM-2, HIM-4, que se evaluaron con una capacidad patogénica alta del 80% (Fig 9) para el desarrollo del absceso hepático amebiano; con la administración de prazicuantel se observa que no lo resolvieron entre un 75% y 100% (tabla 3). Los aislados HIM-5 y HIM-6 con poca capacidad de desarrollo de absceso hepático amebiano entre 20% y 40% (Fig 9) después del tratamiento tampoco lo resolvieron en un 100%.

En la figura 10, se observa el número de animales que redujo su absceso hepático después de recibir tratamiento con prazicuantel de 20 mg/kg de peso, durante cinco días, tal fue el caso del aislado HIM-6 donde se observa que el mismo número de animales que desarrollo absceso hepático fue el mismo número de animales que elimino el absceso después del tratamiento.

TABLA 2. PORCENTAJE DE ABSCESO HEPÁTICO AMEBIANO DESARROLLADO EN HAMSTERS INOCULADOS CON LOS AISLADOS DE *Entamoeba histolytica* PROVENIENTES DE LAS HECE DE 8 PACIENTES SINTOMÁTICOS

Aislado	Con AHA	SIN AHA	
		vivos	mueertos
HIM - 1 n=5	4/5 (80%)	0	1/5 (20%)
HIM- 2 n=5	4/5 (80%)	0	1/5 (20%)
HIM - 3 n=5	3/5 (60%)	1/5 (20%)	1/5 (20%)
HIM - 4 n=5	4/5 (80%)	0	1/5 (20%)
HIM - 5 n=5	2/5 (40%)	1/5 (20%)	2/5 (40%)
HIM - 6 n=5	2/5 (40%)	0	3/5 (60%)
HIM - 7 n=5	1/5 (20%)	1/5 (20%)	3/5 (60%)
HIM - 8 n=5	3/5 (60%)	1/5 (20%)	1/5 (20%)

AHA Absceso hepático amebiano

HIM Hospital Infantil de México

n. Tamaño de la muestra



Figura 6. Todos los aislados causaron lesiones amebianas, sin embargo en cada grupo de animales se observaron diferentes niveles de lesiones producidas por *Entamoeba histolytica*

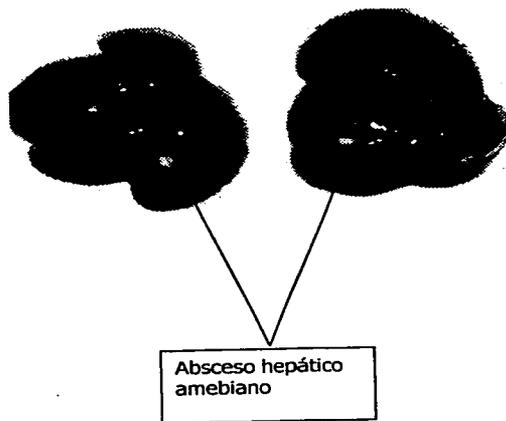


Figura 7. Lesiones pequeñas únicas y circunscritas de color amarillo y localizadas en uno o más lóbulos del hígado se observaron en los aislados HIM-5, HIM-6, HIM-7.

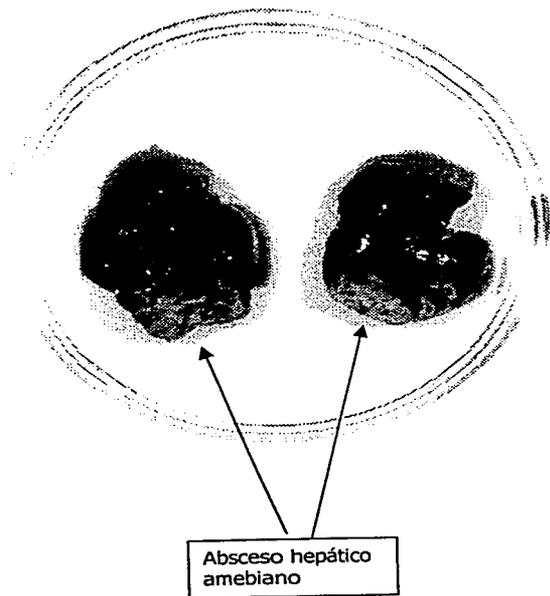
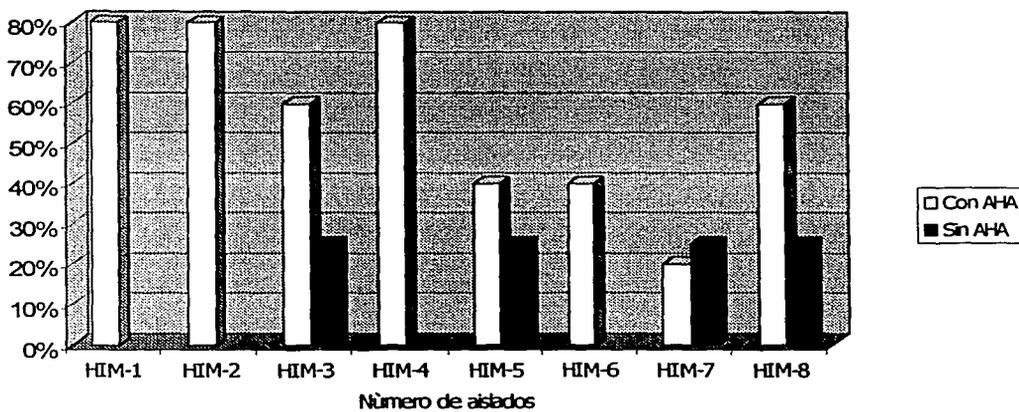


Figura 8. Las lesiones producidas por trofozoítos de *Entamoeba histolytica* con menos de la mitad de lesión en un lóbulo del hígado de los animales.



AHA absceso hepático amebiano
 HIM Hospital Infantil de México

Figura 9 . Porcentaje de animales que desarrollaron abscesos hepáticos amebianos con los diferentes aislados de *Entamoeba histolytica*

TABLA 3. PORCENTAJE DE ABSCESOS HEPÁTICOS OBTENIDOS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON PRAZICUANTEL (20 mg/Kg DE PESO) DOSIS DIARIA POR 5 DÍAS

Aislado	AHA		Muertos
	Sin	Con	
HIM-1 n=5	2/4 50%	1/4 25%	1/4 25%
HIM-2 n=5	1/4 25%	3/4 75%	0/4 0%
HIM-3 n=5	2/3 66%	1/3 33%	0/3 0%
HIM-4 n=5	0/4 0%	4/4 100%	0/4 0%
HIM-5 n=5	0/2 0%	2/2 100%	0/2 0%
HIM-6 n=5	2/2 100%	0/2 0%	0/2 0%
HIM-7 n=5	0/1 0%	1/1 100%	0/1 0%
HIM-8 n=5	2/3 66%	1/3 33%	0/3 0%

*AHA(Absceso hepático amebiano)

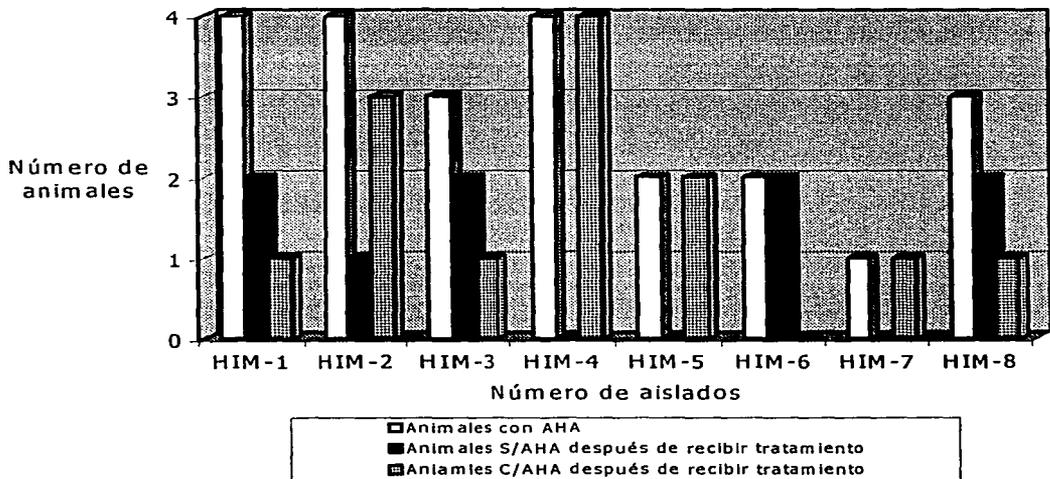


Figura 10. Número de animales que resolvió el absceso hepático amebiano después de recibir tratamiento de prazicuantel (20mg/kg de peso durante 5 días)

6.- DISCUSION.

En este trabajo se evaluó la actividad farmacológica del prazicuantel en el absceso hepático desarrollado por *Entamoeba histolytica*. Existe poca información sobre la actividad del prazicuantel contra protozoarios patógenos del hombre. Sin embargo, destacan los resultados observados con su uso en malaria (Al-Waili, 1998) y las observaciones que reportan actividad contra *Giardia intestinalis* en perros (Barr *et al.*, 1998), si bien es cierto el prazicuantel es conocido como un medicamento de actividad selectiva en céstodos (Flisser *et al.*, 1995). Recientemente se demostró la actividad farmacológica en protozoarios, y considerando las continuas resistencias de *Entamoeba histolytica* (Nequiz *et al.*, 2000) a los fármacos como el metronidazol y /o quimioterapias (Seifert, 2000) se justifica el presente estudio.

Por tal motivo, se quiso comprobar si el prazicuantel puede actuar a nivel extraintestinal en la diferente capacidad patogénica de *Entamoeba histolytica*, aislada de pacientes con patología digestiva semejante, considerando al absceso hepático amebiano desarrollado.

Para ello el primer paso y uno de nuestros objetivos fue determinar la cantidad de trofozoítos y la capacidad invasora de *E. histolytica* para producir absceso hepático amebiano.

Matter *et al.*, 1977, desarrollaron abscesos hepáticos amebianos empleando diferentes cantidades de trofozoítos desde 20 hasta 2×10^6 trofozoítos obteniendo abscesos en diferente porcentajes, de acuerdo al número inoculado de trofozoítos. Basándonos en este estudio se decidió inocular 1×10^5 trofozoítos de *E. histolytica* a los hámster ya que esta cantidad logró producir absceso hepático en todos los aislados obtenidos, cabe mencionar que los abscesos obtenidos fueron de diferente tamaño, esto dependía de cada aislado.

Suponemos que el tamaño de la lesión correspondió a que tan patógena podría ser *E. histolytica* de cada aislado. Este hecho coincide con estudios experimentales, donde se relaciona la patología desarrollada en el paciente y la variabilidad en la lesión hepática, no manifestada en la morfología del parásito (Sharma *et al.*, 1997; Sharma y Acharya, 1991).

En relación al hospedero a pesar de que el estudio se realizó en forma homogénea (hámster) no todos los animales inoculados con el mismo aislado desarrollaron absceso hepático amebiano al mismo nivel de patogenicidad (volumen de la lesión) y coincide con los resultados obtenidos en otros experimentos (Costa *et al.*, 2000).

De ello podemos inferir que en la capacidad para producir daño biológico participan diferentes factores; unos relacionados con el hospedero y otros con el del parásito per sé. En relación al primero en este estudio utilizamos al hámster por ser el animal idóneo para desarrollar experimentalmente el absceso hepático amebiano; sin embargo, no todos presentaron lesión probablemente por desarrollar inmunidad natural. (Shibayama *et al.*, 2000) Con el propósito de evitar este sesgo, los animales fueron agrupados en forma aleatoria de manera que los grupos estuviesen en las mismas condiciones.

A pesar de ello no podemos atribuir la ausencia de absceso hepático amebiano en forma absoluta con la falta de patogenicidad de la ameba.

Los abscesos hepáticos amebianos obtenidos presentaban un área donde el parénquima del hígado está reemplazado por material necrótico de color amarillento y consistencia cremosa, la parte líquida del área necrótica se encontró en el centro del absceso, los abscesos pequeños eran más densos que los más grandes con algunas excepciones. El tamaño del absceso fue muy variable, desde lesiones puntiformes hasta masas enormes de material necrótico que podían sustituir hasta cerca del 90% del órgano normal. Las observaciones

concordieron con las hechas por Huard y Meyer-May, 1936; Brandt y Pérez-Tamayo, 1970; Adams y MacLeod, 1977; Aikat *et al.*, 1979.

Se comprobó que el prazicuantel (control uno) que por sí sólo no le provoca ningún daño al hígado del hámster, ya que al realizar laparatomía se observó el hígado sano, al igual que en el control dos metronidazol fármaco de elección elimino el absceso hepático amebiano, el control tres medio "BR" el cual contenía carga bacteriana de *Escherichia coli*, se comprobó que esta bacteria fue incapaz de producir absceso hepático por si sola en el hígado de los hamster, cabe señal que las bacterias de *Escherichia coli* ayudan a los trofozoítos a ser más agresivos en este caso a producir un mayor daño en el hígado (Jung *et al.*.,1998) el control cuatro hubo un desarrollo del 100% de absceso hepático amebiano con la cepa HM-1:IMSS y en el control cinco los animales continuaron sanos.

Otro objetivo fue ver si la dosis de 20mg/kg de peso de prazicuantel elimina el absceso hepático, este producto se ha caracterizado como un fármaco de elección para el tratamiento del helmintos (Pearson y Guerrand,, 1983). No se conoce el mecanismo mediante el cual el prazicuantel ejerce su efecto contra los trofozoítos de *E. histolytica*.

En los helmintos sensibles, el prazicuantel aumenta la permeabilidad de la membrana al calcio, lo cual induce contracciones seguidas de parálisis espástica de los helmintos provocando que el parásito se libere de los sitios de fijación a la mucosa intestinal del huésped (Lima, 1990). Si se considera que *E. histolytica*; se adhiere a la mucosa intestinal , es posible que esta adherencia se modifique por un fenómeno similar.

Como se pudo observar en los resultados obtenidos la actividad farmacológica del prazicuantel no en todos los aislados se correlacionó con la capacidad patogénica de *Entamoeba histolytica*, pues el absceso hepático amebiano no se resolvió de igual forma al administrar prazicuantel. Esto se

observó con los aislados que desarrollaron el 80% de absceso hepático amebiano y en otros con igual porcentaje de patogenicidad no lo hicieron (sin actividad farmacológica).

Lo que interpretamos como una resistencia a la actividad farmacológica del prazicuantel lo que hace patente la diversidad de los aislados estudiados

Si consideramos que los aislados con capacidad patogénica del 60% al 80% de absceso hepático amebiano después del tratamiento con el fármaco, el absceso hepático amebiano pudo resolverse en diferentes niveles de 25% al 100% (aislados HIM-1, HIM-2, HIM-3, HIM-6 y HIM-8) esto representa que el 62.5 % de los aislados de *Entamoeba histolytica* fueron sensibles en diferente proporción al fármaco.

Finalmente podemos decir que la patología de *Entamoeba histolytica* depende de diferentes factores de virulencia, la deficiencia de uno de ellos, podría ser suficiente para modificar el nivel de patogenicidad lo cual explica la diferente capacidad para desarrollar absceso hepático amebiano además de las características del hospedero.

La actividad farmacológica del prazicuantel se hizo evidente al emplear una sola concentración con diferente respuesta de resolución.

No obstante, de acuerdo al porcentaje resuelto del absceso hepático amebiano podríamos decir que la dosis empleada de 20mg/kg de peso de prazicuantel fue insuficiente para la eliminación del absceso hepático amebiano tal vez al incrementar la concentración del fármaco se incremente la actividad farmacológica y se pueda llegar a encontrar la dosis adecuada para la eliminación del absceso hepático.

7. - CONCLUSIONES

- Fue importante conocer la diferente patogenicidad de los diferentes aislados utilizados, ya que sirvió para determinar si el prazicuantel tiene la capacidad de eliminar diferentes tipos de aislados de *Entamoeba histolytica*.
- Una posible explicación a la diferente capacidad patogénica de *Entamoeba histolytica* podría ser, la constitución genética responsable de los diferentes niveles de patogenicidad.
- En este estudio se demostró que a nivel hepático no es suficiente la dosis de 20 mg/kg de peso de prazicuantel, posiblemente se metaboliza rápido y no se alcance la dosis necesaria y el tiempo necesario para que el fármaco actúe en el órgano.
- De acuerdo al porcentaje resuelto de absceso hepático amibiano podríamos inferir que, tal vez incrementando la dosis de prazicuantel, se pueda llegar a la cantidad ideal para la eliminación del absceso hepático producido por *Entamoeba histolytica*.

B. - BIBLIOGRAFÍA

- Acosta G, Cote V, Isibasi A, Kumate J. Anticuerpos antiamebias en calostro de mujeres de México. *Inmunología* 1995; 4: 27
- Adams E B, Macleod I N. Invasive amebiasis II amebic liver abscess and its complications. *Medicine (Baltimore)* 1977; 56: 325-334.
- Adams F. The Genuine works of Hipocrates. Williams y Wilkins, Baltimore. 1939, 8107 pp.
- Aikat B K, Bhusnurmath S R, Pal A K, Chhuttani P N, Datta D V. The pathology and pathogenesis of fatal hepatic amoebiasis-a study based on 79 autopsy cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979; 73: 188-192.
- Andrew P, Thomas H, Pohlke R, Seubert J. Praziquantel. *Med Res Rev* 1983; 3: 174-200
- Bercker B. Light and electron microscopic studies on the effect of praziquantel on *schistosoma mansoni* *Dicrocoelium dendriticum* and *Fasciola hepatica* (trematoda) in vitro. *Z. Parasitenkunde* 1980; 63: 113-128.
- Bloomfiel A L. A bibliography of internal medicine: amebic dysentery. *J Chronic Dis* 1957; 5: 235-252.
- Boeck W C, Drbohlav J. The cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Am J Hyg* 1925; 5: 371-407.

- Brandt H, Pérez-Tamayo R. Pathology of human amebiasis. *Human Pathol* 1970; 1: 351-385.
- Bruckner D. Amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5(4): 356-369.
- Carrero J, Ladette J. Molecular Biology of *Entamoeba histolytica*: A Review. *Arch Med Res* 1996; 27 (3): 403-412.
- Clark C, Diamond L. The laredo strain and other "*Entamoeba histolytica* - like amoebae are *Entamoeba moshkovskii*. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 46: 11-18.
- Computed tomographic test in the diagnosis and treatment of amebic liver abscesses. *J Radiol* 1996; 77 (1):23.
- Costa A, Viana J, Assis D, Rocha O, Silva E. Comparison of xenic and monoxenic *Entamoeba dispar* cultures using hepatic inoculation in hamster. *Arch Med Res* 2000; 31: 247-248
- Councilman W T, Lafleur H.. Amoebic dysentery. *Johns Hopkins Hosp Res* 1891; 2: 395-548.
- Crevenna P Epidemiología de la amibiasis. *Salud Publica* 1977; 19 (3): 411-420.
- Chavéz B, Martínez-Palomo A, Torres M. Estructura ultramicroscópica de la pared del quiste de *Entamoeba invadens*, *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba coli*. *Arch Invest Med* 1978; 9 (supl.1): 113-116.

- Diamond L, Graham C. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. J Euk Microbiol 1993; (40) 3: 340-345
- Diamond L. *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903: from axenic to axenic cultivation. J Protozool 1986; 33:1-5.
- Diamond L S. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*, Schaudinn 1903 and *Entamoeba histolytica*-like amebae. J Parasitol 1968; 54: 1047-1056.
- Dirección general de epidemiología/ SSA. 2000.
- Escandón RC, Treviño G M, Escobedo de P J. La amibiasis y el absceso hepático un problema de salud de actualidad. Rev Gastro Mex 1996; 61 (4): 378-386.
- Eubank W B. Reeves analog -inhibitors for the pyrophosphate- dependent phosphofructokinase of *Entamoeba histolytica* and their effect on culture growth. J Parasitol 1982; 68: 599-602.
- Flisser A, Sarti E, Sarti R, Schantz P, Valencia S. Effect of praziquantel on protozoan parasites. The Lancet 1995; 345: 316-317.
- Garcia L, Bruckner D. 1988. Diagnostic medical parasitology. Elsevier Science. Publishing Co. Inc. New York.
- Griffin F M. Failure of metronidazole to cure hepatic amebic abscess. N Engl J Med 1973; 288: 1397

- Harnett W. The anthelmintic action of praziquantel. *Parasitology Today* 1988; 4: 144-146
- Hart C W, Naunton R F. The ototoxicity of chloroquine phosphate. *Arch Otolaryngol* 1964; 80:407- 412.
- Heen R M Collin D B. Amebic abscess of the liver. treatment failure with metronidazole *J A M A* 1973; 224: 1394-1395.
- Huard H, Stemberger H, Scheiner O, Kollaritsh H, Wiedermann G. *Entamoeba histolytica* I Mechanismos der zytotoxischen action. *Tropmed parasitol* 1983; 34: 248-252.
- Huber M B, Koller C, Gitler D, Mirelman M, Revel S, Rozenblatt, Garfinkee L. *Entamoeba histolytica* ribosomal RNA gene are carried on polidromic circular DNA molecules. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 32: 285-296.
- Jiménez C E, Crisóstomo V P, Santillán M R. Actividad del praziquantel sobre trofozoítos de *Giardia intestinalis*. *Rev Mex Cient* 1998; (29) 2: 14-16.
- Jonhson P J. Metronidazole and drug resistance. *Parasit Today* 1993; 9 (5): 183-186.
- Jung M K, Hyun C J, Kyung-il I, Chung Y K. Synergy between *Entamoeba histolytica* and *Escherichia coli* in the induction of cytokine gene expression in human colon epithelial cells. *Parasitology* 1998; 84: 509-512.
- Kean B H. The treatment of amebiasis. A recurrent agony. *J A M A* 1976; 235: 501.

- King Ch H, Adel A F, Mahmoud M D. Drugs fine years. Later praziquantel. *Annals of Internal Medicine* 1989; 110 (4): 290-4
- Koutsaimanis K G, Timms P W, Rée G H. Failure of metronidazole in a patient with hepatic amebic abscess. *Am J Trop Med Hyg* 1979; 28:768-769.
- Lake J A, Stayter H S. Three dimensional structure of the chrommotoid body of *Entamoeba invadens*. *Nature* 1970; 227: 1032-37.
- Levine N D, Corliss J O, Cox F E G, Deruox G, Grain, Honigberg B M Leedale G F, Loeblich A R, Lom J, Lynn D O, Merinfeld E G, Page E C, Poljansky G, Sprage V, Vaura J, Wallace F G. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool* 1980; 27(1): 37-58.
- Lima S. Effects of culture and praziquantel of membrane fluidity parametrs of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 1990; 109: 57-65
- Martínez- Palomo, Castellano M. Amoebiasis. New understanding and New Goais. *Parasitol Today* 1994; 14 (1): 67-69
- Mattern C F T, Keister D B, Caspar N P. *Entamoeba histolytica* "toxin":ffetuin neutralizable and lectin-like. *Am J Trop Med Hyg* 1982; 29: 26-30
- Mattern C F T, Keister D B. Experimental amebiasis: II hepatic amebiasis in the newborn hamster. *J Trop Med Hug* 1977; (26) 3: 402-410.
- MC Laughlin J, Aley S. The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba*. *J. Protozool* 1985; 32: 221-229

- Nequiz M, Polo A, Santos Preciado J, Vega Robledo G. Antiamebic activity of the metronidazole-Zinc association Arch Med Res 2000; 31: 19-20
- North M J, Mottram J C, Coombs G H. Cysteine proteinases of parasitic protozoa. Parasitology Today 1990; (6) 8: 270-74.
- Oakley G P. The Neurotoxicity of the halogenated hydroxyquinolines. J A M A ; 225: 395-97.
- Pearson R D, Guerrant R L, Praziquantel: a major advance in anthelmintic therapy. Ann Inter Med 1983; 99: 195-198.
- Protor E M, Gregory M A. Ultrastructure of cysts of *Entamoeba histolytica*. Int J Parasitol 1973; 3: 455-456.
- Ravdin J I, Guerrant R L. A review of parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis. Rev Inf Dis 1982; 4 (6): 1185-1207.
- Reed S. Amebiasis : an update. Clin Infect Dis 1992; 14 :1185.
- Robinson G L. The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. Transactions of royal society of tropical medicine and hygiene 1968; (62) 2: 285-294.
- Salas M. anatomía patológica de la amibiasis en los niños. Gac Med Mex 1958; 88: 373-383.
- Sargeant P G. The reliability of *Entamoeba histolytica* zimodemos in clinical diagnosis. Parasitol Today 1987; 3: 40-42.

- Sathar M A, Breden- Kamp B L, Gathiran V E, Simjee A E. Detection of *Entamoeba histolytica*, in immunoglobulins assay. J Clin Microbiol 1990; 28 (2): 332-5
- Seifert K, Duchene M, Wernsdarfer W, Kollaritsch H, Scheiner O, Wiedermann G, Eibi H. A new approach for chemotherapy against *Entamoeba histolytica*. Arch Med Res; 2000 31: 56-57.
- Sepúlveda B. Amebiasis: host-pathogen biology. Rev Infec Dis 1982; 4: 836-842.
- Sepúlveda B, Jínich H, Bassols F, Muñoz R K. La amibiasis del hígado. Su diagnóstico pronóstico y tratamiento Rev Invest Clin 1954; 6:165-187.
- Sepúlveda B, Martínez-Palomo A. Amebiasis 1984. In: K. S. Warren and A. A. F. Mahmoud (Eds) Tropical and Geographical Medicine, McGraw-Hill, New York, pp.305-318.
- Sepúlveda B, Martínez-Palomo A. (1992) Immunology of amebiasis by *Entamoeba histolytica*. In: S. Cohen and K. S. Warren (Eds.) Immunology of parasitic infections, Blackwell, Oxford, pp170-191.
- Shama S, Verma N. Variants of amebic liver abscess. Arch Med Res 1997;28:272-73.
- Sharma M P, Acharya S K. Chincial profile of multiple liver abscess. J assoc phy India 1991; 38: 837.

- Shaw J R, Erasmms D A. *Schistosoma mansoni*: the effects of subcurate dose of praziquantel on the ultrastructure of worms in vitro. *Z Parasiten Kude* 1983; 69: 73-90
- Shibayama M, Campos-Rodríguez R, Ramírez C, Pacheco-Yépez J, Tsutsumi V. Studies on the Natural Immunity in hamsters using the intraperitoneal model of amebic liver abscess. *Arch Med Res*; 2000 31:78-80.
- Shibayama M, Campos R, Ramírez R, Flores L, Espinosa M, Martinez A, Tsutsumi V, *Entamoeba histolytica*: Liver invasion and abscess production by intraperitoneal inoculation of trophozoites in hamster *Mesocricetus auratus*. *Exp Parasit* 1998; 88:20-27.
- Stoopen R M, Kimura K A. Tecnología de los 80's. ultrasonido, tomografía computada y resonancia magnética:¿han contribuido a mejorar el diagnóstico del absceso hepático?. *Rev Gastroenterol Mex* 1989; 54:167-75.
- Simon M, Shookhoff H B, Tener H, Weingarten B, Parker J G. Paromomycin in the treatment of intestinal amebiasis; a short course of therapy. *Am J* 1967; 48: 504-11.
- Suárez-Ortíz C. 1999. Epidemiología de las complicaciones extraintestinales de la amebiasis. *Amebiasis cuarta reunión de expertos. México D, F*: 7-15 pp.
- Tachibana H, Ihara S, Kobayashi S, Kaneda Y, Takeuchi T, Watanabe Y. Differences in Genomic DNA Sequences between pathogenic and non

pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* identifies by polymerase chain reaction. J Of clinic. Microbiol 1991; 29 (10):2234-39.

- Tanimoto W M, Singler M I, Treviño G N, Gallardo A E, Pérez R J. Amebiasis ¿ha variado su expresión clínica? Rev Gastroenterol 1989; 54: 163-6.
- Treviño-García M, Escandon-Romero C, Cabral-Soto J, Escobedo-De la Peña, Olvera-Alvarez J, Silva- Batalla A. Patterns of the morbidity and motality of amebiasis and amebic liver abscess in México: an ecological analysis. Arch Med Res 1997; 28: 209-2.
- Vaiday A B, Ray D K. Amebiasis: the tropical scourge. Science Today(India) 1982; 21-26
- Walderich B. Develoment of monoclonal anti bodies directed against cysts of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Arch of Med Res 1997; 28: 147.
- Walsh J. 1988. Transmission of *Entamoeba histolytica* infection, Amebiasis: human infection by *Entamoeba histolytica*. J Ravdin Ed. Joh Wiley & Sons. USA 106-119 pp.
- Zaman, V. Atlas of Medical Parasitology. 1979. ADIS Australia 285 p.

9.- ANEXO

- AGAR SALINO

Agar bacteriológico (agar 1.5%, NaCl 0.7%)

Se pesa 15 g de agar, 2g de NaCl, se disuelve en 1000 ml de agua destilada, se hierve hasta que la solución quede clara.

Nota: tener precaución en la preparación, la ebullición produce mucha espuma. Se reparte en frascos pequeños con aproximadamente 3 ml de agar cada uno, se esteriliza durante 15 minutos, y se colocan los frascos inclinados aproximadamente a un ángulo de 45°, se deja solidificar y se almacenan a 4°C.

- MEDIO R

NaCl	5.0 g
Ácido cítrico monohidratado	2.0 g
Fosfato de potasio monobásico	0.5 g
Sulfato de amoníaco	1.0 g
Sulfato de magnesio heptahídrico	0.05 g

Disolver en 100 ml de agua destilada y adicionar 4.0 ml de ácido láctico, posteriormente se agrega 7.5 ml de NaOH al 40% y se ajusta a pH 8.5 se adiciona 2.5 ml de azul de bromotimol y se afora a 1000 ml, se reparte en frascos de 500 ml cada uno y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- **MEDIO BR**

En un frasco de 100 ml de medio R se le inocula 5 gotas de bacteria *Escherichia coli* en peptona al 2%, se incuba 48 horas a 37°C. Posteriormente se almacena a 4°C.

- **MEDIO BRS**

Se inactiva suero bovino en baño María a 56°C, posteriormente se hace una mezcla 1:1 de suero bovino inactivado y medio (BR) según la cantidad que se desee preparar.

- **FTÁLICO 10X**

Se pesa 51g de ftalato de potasio y se disuelve en 25 ml de NaOH 40% , se ajusta el pH 6.2 y se adiciona 500 ml de H₂O destilada, se esteriliza y se almacena a 4°C. Para la solución de trabajo se prepara una dilución 1:10.

- **PEPTONA DE CARNE 20%**

Pesar 20g de peptona y disolver en 100 ml de agua destilada y colocar en frascos iguales de aproximadamente 10 ml cada uno, esterilizar a 121°C durante 15 min.

- **LUGOL**

Se pesa, 2g de Yodo, 4g de KI, se disuelve en 100 ml de agua destilada.

- **AZUL DE BROMOTIMOL**

Pesar 0.04g de azul de bromotimol y aforar a 100 ml de agua destilada esterilizar.

- **ERITROMICINA AL 1%**

Solución madre: se pesa 1.0g de eritromicina y se disuelve en 20 ml de alcohol al 70%, posteriormente se afora a 100 ml agua destilada, la solución de trabajo se prepara 1:20, se almacena en frascos de 3 ml aproximadamente.

- **MEDIO TYI- S33 (Cultivo axénico)**

Pesar 3.0 gr. de peptona biotriptasa, 1.0g de Dextrosa de Sodio, 0.06g de fosfato de potasio monobásico, 0.1g de fosfato de potasio dibásico, 0.1g de L-Cisteína, 0.02g de ácido ascórbico, 0.002g de citrato de amonio térrico. Se disuelve en 80 ml de agua bidestilada, se ajusta a un pH entre 6.8 a 6.9, se esteriliza durante 15 min, a 121°C .

- **COMPLEMENTO POR UNIDAD**

Se disuelven 80 ml de medio TYI-S33, con 15ml de SBI (Suero bovino inactivado) y 5ml de vitaminas (microlab)