

66  
24.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**"DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA in vitro DE  
FÁRMACOS DE LA FAMILIA DE LOS 5-NITROIMIDAZOLES ANTE EL  
PROTOZOARIO Giardia duodenalis. CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA  
RESISTENCIA A DROGAS EN ESTE PARÁSITO".**

**TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGA  
P R E S E N T A  
LYDIA ROMERO MONTOYA**

**DIRECTORES DE TESIS: DRA. GUADALUPE ORTEGA PIERRES  
M.C. RAÚL ARGÜELLO GARCÍA  
ASESOR INTERNO: M.C. FERNANDO ALBA HURTADO**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO. 1997**

**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Expediente No.  
13444-11-101-101-101

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 20 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Determinación de la eficacia y actividad biológica in vitro de fármacos de la familia de los sulfonamídicos ante el bacteriostato Guajarda Diodonalis. Caracterización parcial de la resistencia a drogas en este parásito."

que presenta la pasante: Lydia Romero Tenorio,  
con número de cuenta: 909096-4 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Biológica

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Mex., a 5 de septiembre de 199 6

PRESIDENTE	M. en C. Luisa Martínez Aguilar.	<u>[Firma]</u>
VOCAL	C. F. R. Ma. Eugenia R. Posada Salazar.	<u>[Firma]</u>
SECRETARIO	M. en C. Fernando Alba Hurtado	<u>[Firma]</u>
PRIMER SUPLENTE	M. V. J. Juan Pablo Martínez Labat.	<u>[Firma]</u>
SEGUNDO SUPLENTE	M. en C. Andrés Romero Rojas	<u>[Firma]</u>

## **DEDICATORIAS**

**Dedico este trabajo de tesis con cariño inmenso y respeto a:**

**Mis padres Guadalupe y Enrique por su infinita paciencia, cariño, apoyo y confianza depositada en mí, además quiero que sepan que su sacrificio e intenso trabajo no han sido en valde, ya que por ustedes ahora soy lo que soy.**

**A mis hermanos Ivon, Enrique (coco) y Lupita († que descanse en paz y porque se encuentre en el paraíso) por los momentos buenos y malos, además de los sustos compartidos, esperando que alcancen sus metas en el futuro, y especialmente tú Quique espero que desarrolles al máximo esa gran capacidad y potencialidad que tienes.**

**Al Pbro. Felipe Vera por manifestar esa gran vitalidad y alegría que contagia a quienes en algún momento en tú vida estuvimos cerca de ti, con mucho cariño. Y a todos aquellos que eligen esa carrera (Jorge Luis de la Torre Barba) por el sacrificio que implica, mi mayor respeto y admiración.**

**A mis tíos Ofelia y Ramón por su apoyo incondicional proporcionado durante toda mi vida.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Dra. Guadalupe Ortega por haberme permitido realizar este trabajo de tesis en el Lab. 2 a su cargo, por su apoyo y las correcciones realizadas al presente trabajo.**

**A Raúl Argüello por las valiosas asesorías aportadas a lo largo de este trabajo, por el gran empeño con el que corrigió este trabajo de tesis y por su paciencia.**

**A Fernando Alba por su buena disposición para evaluar y corregir el presente trabajo.**

**Al honorable jurado por su disposición para la revisión del presente trabajo de tesis y sus valiosas sugerencias aportadas a ésta.**

**A los profesores de la FES-C que imparten sus conocimientos a los estudiantes de la carrera de Q.F.B., entre ellos Alberto Rojas, Teresa Ramírez, Andrea Becerril, Rodolfo Cruz, Rogelio Hernández, Enrique Angeles.**

**A la Química Matilde por permitirme conocer el trabajo del diagnóstico clínico en la Clínica No. 58 del INISS.**

**A mis compañeritos de Química : p. M. C. Ignacio (Nacho) y especialmente al p.M. C. Enrique (Quiquelín) por sus valiosas aportaciones realizadas al presente trabajo, además de su invaluable amistad y especialmente por ese gran apoyo incondicional proporcionado en todo momento.**

**A todos los integrantes del Lab. 2 de Genética y Biología Molecular.**

**Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio 2 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV - IPN) bajo la dirección de la Dra. Ma. Guadalupe Ortega Pierres Profesora Titular de tiempo completo y del M. C. Raúl Argüello García Auxiliar de Investigación del mismo centro, con la coasesoría del M. C. Fernando Alba Hurtado, Profesor Asociado "B" de tiempo completo de la Facultad de Estudios Superiores - Cuautitlán.**

## Índice de Contenido

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	IV
ABREVIATURAS.....	VII
RESUMEN.....	IX
<b>I. Introducción.....</b>	<b>1</b>
I.A. Generalidades de <i>G. duodenalis</i> .....	2
I.B. Giardiasis. Manifestaciones clínicas.....	7
I.C. Terapéutica de la giardiasis.....	14
I.D. Antecedentes.....	24
i. Generales.....	24
ii. Particulares.....	25
<b>II. Justificación.....</b>	<b>28</b>
<b>III. Objetivos</b>	
General.....	30
Particulares.....	30
<b>IV. Material y métodos</b>	
1. Parásitos.....	31
2. Cultivo axénico de <i>Giardia duodenalis</i> .....	31
3. Agentes quimioterapéuticos.....	32
4. Clonación.....	32
5. Pruebas de susceptibilidad a fármacos.....	34
5.1. Subcultivo en medio líquido.....	35
5.2. Subcultivo en agar semisólido.....	35
5.3. Tinción con colorantes fluorogénicos (FDA-PI).....	36
5.4. Incorporación de timidina tritiada [3H-TdR].....	36
5.5. Reducción de sales de tetrazolio [MTT].....	37
6. Determinación de DL <sub>50</sub> y MIC de fármacos representativos del grupo de los 5-Nitroimidazoles (dimetridazol, metronidazol, ornidazol, ronidazol, secnidazol, tinidazol).....	37
7. Evaluación transversal de la sensibilidad <i>in vitro</i> de cepas, aislados y clones de <i>G. duodenalis</i> expuestas a DL <sub>50</sub> de metronidazol y tinidazol.....	38
8. Análisis longitudinal de la sensibilidad de trofozoitos de <i>G. duodenalis</i> expuestos a Metronidazol y tinidazol.....	39
9. Obtención de líneas resistentes.....	39
9.1. Inducción por droga.....	40
9.2. Mutagénesis.....	40
9.3. Espontánea.....	40
10. Patrones cinéticos de incorporación de precursores moleculares involucrados en procesos celulares fundamentales en líneas celulares de <i>G.</i>	

<i>duodenalis</i> .....	41
11. Métodos estadísticos.....	41
<b>V. Resultados</b>	
1. Cultivo axénico de <i>Giardia duodenalis</i> .....	43
2. Clonación.....	43
3. Evaluación de ensayos que determinan la susceptibilidad a drogas en <i>G. duodenalis</i> .....	44
3.1. Subcultivo en medio líquido.....	45
3.2. Subcultivo en agar semisólido.....	45
3.3. Tinción con colorantes fluorogénicos [FDA-PI].....	49
3.4. Incorporación de timidina tritidiada [ <sup>3</sup> H-TdR].....	51
3.5. Reducción de sales de tetrazolio [MTT].....	53
4. Obtención de DL <sub>50</sub> y MIC de diversos fármacos del grupo de los 5-Ni.....	58
5. Análisis transversal de la sensibilidad de cepas de referencia, aislados mexicanos y clonas de <i>G. duodenalis</i> expuestos al metronidazol y tinidazol.....	60
6. Valoración longitudinal de la susceptibilidad a DL <sub>50</sub> de metronidazol y tinidazol en trofozoitos de cepas, aislados y clonas de <i>G. duodenalis</i> .....	67
7. Obtención de líneas resistentes de <i>G. duodenalis</i> por varios mecanismos (físicoquímico, fisiológico y espontáneo).....	73
7.1. Selección inducida por fármaco.....	73
7.2. Mutagénesis.....	73
7.3. Espontánea.....	74
8. Cinéticas de incorporación de precursores moleculares durante la replicación, transcripción y traducción en dos líneas de <i>G. duodenalis</i> con sensibilidad diferencial al metronidazol.....	75
<b>VI. Discusión</b> .....	81
<b>VII. Conclusiones</b> .....	107
<b>Anexos</b>	
Anexo I: Reactivos y soluciones complementarias.....	109
r. Medio TYI-S-33 suplementado con bilis.....	109
rr. Amortiguador de fosfatos salina (PBS) [Stock 10 X].....	110
rrr. Preparación de colorantes fluorogénicos [FDA-PI].....	110
tu. Preparación de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio [MTT].....	111
u. Solución para emisión de centelleo.....	111
ut. Preparación de ácido tricloroacético [CCl <sub>3</sub> COOH] al 10 % v/v.....	112

utr. Preparación de medio luria para prueba de esterilidad.....	112
Anexo II Técnicas complementarias.....	113
rrA. Criopreservación de trofozoitos de <i>G. duodenalis</i> en N <sub>2</sub> líquido.....	113
rrB. Descongelación de trofozoitos de <i>G. duodenalis</i> .....	113
<b>VIII. Referencias.....</b>	<b>115</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Tabla I</b>	Régimenes de tratamiento comúnmente usado para la giardiosis.....	15
<b>Tabla II</b>	Estructuras químicas y pesos moleculares de los fármacos utilizados en este trabajo.....	33
<b>Tabla III</b>	Resultados de clonación de trofozoitos de <i>G. duodenalis</i> por dilución limitante.....	44
<b>Tabla IV</b>	Efecto de diferentes tipos de agarosas sobre la formación de colonias (% CFE) en trofozoitos de <i>G. duodenalis</i> , empleando subcultivo en agar semisólido con concentración de agarosa 0.16 %.....	46
<b>Tabla V</b>	Efecto del metronidazol sobre la eficiencia de formación de colonias de trofozoitos de <i>G. duodenalis</i> en medio semisólido.....	47
<b>Tabla VI</b>	Actividad <i>in vitro</i> de seis derivados del 5-nitroimidazol contra trofozoitos de <i>G. duodenalis</i> (cepa WB).....	60
<b>Tabla VII</b>	Variabilidad en la sensibilidad <i>in vitro</i> de trofozoitos de <i>G. duodenalis</i> de clones obtenidas de distintos aislados y cepas expuestas a DL <sub>50</sub> de metronidazol y tinidazol.....	61
<b>Tabla VIII</b>	Historia de las líneas resistentes al metronidazol y tinidazol de las cepas WB y P-1 de <i>G. duodenalis</i> inducidas por selección en presencia de fármaco.....	74
<b>Figura 1</b>	Entidades morfológicas del parásito protozoario <i>Giardia duodenalis</i> ....	5
<b>Figura 2</b>	Esquema representativo del ciclo de vida del parásito <i>Giardia duodenalis</i> .....	6
<b>Figura 3</b>	Mecanismo de acción del metronidazol.....	17
<b>Figura 4</b>	Vía glucolítica general en <i>Giardia duodenalis</i> .....	18
<b>Figura 5</b>	Efecto de diferentes concentraciones de metronidazol sobre la formación de colonias de <i>G. duodenalis</i> cepas WB y P-1.....	48
<b>Figura 6</b>	Evaluación de la actividad del metronidazol en trofozoitos de <i>G. duodenalis</i> mediante la tinción con FDA-PI y la reducción del	50

	MTT.....	
<b>Figura 7</b>	Relación entre la incorporación de $^3\text{H-TdR}$ y el inóculo celular de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> (cepa WB) en cultivos <i>in vitro</i> del parásito.....	52
<b>Figura 8</b>	Determinación de la viabilidad en trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> cepa WB expuestos a metronidazol empleando varios métodos.....	54
<b>Figura 9</b>	Determinación de la viabilidad en trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> cepa P-1 expuestos a metronidazol empleando diferentes métodos.....	55
<b>Figura 10</b>	Comparación de los datos sobre viabilidad en trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> expuestos al metronidazol <i>in vitro</i> y evaluado por diferentes métodos.....	56
<b>Figura 11</b>	Efecto dependiente de la dosis de seis derivados del 5-Ni sobre la viabilidad de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> .....	59
<b>Figura 12</b>	Análisis transversal sobre la sensibilidad al metronidazol y tinidazol en trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> (cepas WB y P-1 y clonas de éstas).....	62
<b>Figura 13</b>	Análisis transversal sobre la sensibilidad al metronidazol y tinidazol en trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> de los aislados IMSS-2 e IMSS-3 con sus respectivas clonas.....	64
<b>Figura 14</b>	Análisis transversal sobre la sensibilidad al metronidazol y tinidazol en trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> de los aislados CIEA-10 y CIEA-52 con sus respectivas clonas.....	65
<b>Figura 15</b>	Análisis longitudinal de la sensibilidad <i>in vitro</i> de trofozoítos de la cepa WB y clonas de ésta expuestas a DL <sub>50</sub> de metronidazol y tinidazol.....	68
<b>Figura 16</b>	Análisis longitudinal sobre la sensibilidad <i>in vitro</i> de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> cepa P-1 y clonas de ésta expuestas a DL <sub>50</sub> de metronidazol y tinidazol.....	69
<b>Figura 17</b>	Análisis longitudinal de la sensibilidad <i>in vitro</i> de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> del aislado IMSS-2 y clonas de éste expuestos a DL <sub>50</sub> de metronidazol y tinidazol.....	70
<b>Figura 18</b>	Análisis longitudinal de la sensibilidad <i>in vitro</i> de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> del aislado IMSS-3 y clonas de éste expuestos a DL <sub>50</sub> de metronidazol y tinidazol.....	72

<b>Figura 19</b>	<b>Efecto del metronidazol sobre la síntesis del DNA en <i>Giardia duodenalis</i>.....</b>	<b>76</b>
<b>Figura 20</b>	<b>Efecto del metronidazol sobre la síntesis del RNA de <i>Giardia duodenalis</i>.....</b>	<b>78</b>
<b>Figura 21</b>	<b>Efecto del metronidazol sobre la síntesis de proteínas en <i>Giardia duodenalis</i>.....</b>	<b>80</b>

## ABREVIATURAS

% (p/v) ó (v/v)	Concentración peso a volumen ó volumen a volumen
° C	Grados centígrados
% CFE	Porcentaje de eficiencia de formación de colonias
CIEA	Centro de Investigación y Estudios Avanzados
DL <sub>10</sub>	Dosis letal 10
DL <sub>50</sub>	Dosis letal 50
DL <sub>90</sub>	Dosis letal 90
DMSO	Dimetilsulfóxido
EEO (-mr)	Electroendósmosis relativa
e <sup>-</sup>	Electrones
FDA	Diacetato de fluoresceína
g	Gramos
g'	Gravedades
hrs	Horas
<sup>3</sup> H-TdR	Timidina tritiada
<sup>3</sup> H-UdR	Uridina tritiada
i.e.	esto es, del latín <i>id est</i> .
λ	Longitud de onda
lb	Libras
μCi	Microcurie
μl	Microlitros
μM	Micromolar, concentración

mg	Miligramos
M	Molar, concentración
MIC	Concentración mínima inhibitoria
ml	Mililitros
mm	Milímetros
MTT	3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio
min	Minutos
nm	Nanómetros
N <sub>2</sub>	Nitrógeno líquido
5-Ni	5-Nitroimidazoles
p.e.	Por ejemplo
PBS	Amortiguador de fosfatos salina
P-1	Cepa Portland-1
pH	Potencial de hidrógeno
PI	Yoduro de propidium
PMS	Metasulfato de fenazina
r	Coefficiente de correlación
<sup>35</sup> S-Cisteína	Cisteína azufrada
TYI-S-33	Medio de cultivo conteniendo tripticasa (T), extracto de levadura (Y), hierro (I), y suero (S).
U.I.	Unidades internacionales
U.V.	Ultravioleta

## RESUMEN

La giardiasis es una infección intestinal cuyo agente causal es *Giardia duodenalis*. Este es un protozooario flagelado binucleado que parasita un amplio rango de vertebrados, produciendo en humanos cuadros clínicos que abarcan manifestaciones diarreicas hasta síndrome de malabsorción. La giardiasis, es un problema de salud pública, que conlleva a repercusiones de tipo económico en países en donde es endémica. Actualmente, el principal mecanismo de control incluye el uso de fármacos, entre los cuales están contemplados el metronidazol, tinidazol, furazolidona y quinacrina. Debido, a que se cuenta con un número limitado de agentes quimioterápicos se han empleado algunos de ellos. Esto último ha propiciado el que se estén generando casos refractarios al tratamiento de la giardiasis, por el desarrollo de resistencia a dichos agentes.

En el presente trabajo, inicialmente se decidió evaluar la sensibilidad de trofozoitos de *G. duodenalis* de las cepas de referencia WB y P-1 cultivados axénicamente hacia metronidazol, fármaco representativo de la familia de los 5-Ni, empleando dos métodos fisiológicos [subcultivo en medio líquido y subcultivo en medio semisólido] y comparar éstos con 3 métodos bioquímicos: reducción de sales de tetrazolio (MTT), tinción con colorantes fluorogénicos (FDA-PI) e incorporación de nucleótidos radioactivos ( $^3\text{H}$ -TdR). Los datos obtenidos se evaluaron estadísticamente y se obtuvieron valores de  $DL_{50}$  como parámetro de sensibilidad de cada método en base a la construcción de curvas dosis-respuesta.

Una vez seleccionado el método óptimo, se evaluó la eficacia farmacológica de seis derivados del grupo de los 5-Ni, determinándose para cada fármaco sus  $DL_{50}$  y MIC como parámetro estricto de potencia en ellos.

Posteriormente, se realizó un estudio transversal en donde se analizaron las dos cepas de referencia mencionadas y 4 aislados mexicanos [IMSS-2, IMSS-3, CIEA-10 y CIEA-52] con sus clonas respectivas, con la finalidad de evaluar su sensibilidad ante el metronidazol y tinidazol. Con base a los datos obtenidos en el estudio anterior, se seleccionaron algunas cepas, aislados mexicanos y clonas con distintos grados en su sensibilidad a las drogas utilizadas, con el objetivo de evaluarlos en un estudio longitudinal empleando cultivos continuos del parásito.

Asimismo nos pareció interesante analizar parcialmente el fenómeno de resistencia a drogas en *G. duodenalis*, para lo cual se compararon varios métodos de inducción anaeróbica de resistencia a fármacos *in vitro*, entre los que se incluyeron la resistencia innata o espontánea, la radiación con luz U V y la selección inducida por droga. Una vez obtenidas éstas se procedió a comparar sus procesos celulares fundamentales con una cepa silvestre (WB) además de analizar el efecto de dicho agente farmacológico en el parásito.

Los resultados mostraron que existen patrones dosis-respuesta característicos para cada fármaco y método utilizado. Los valores de DL<sub>50</sub> para el metronidazol fueron semejantes empleando los métodos de subcultivo en medio líquido, FDA-PI y <sup>3</sup>H-TdR. De manera interesante los métodos menos sensibles fueron el subcultivo en medio semisólido y la reducción del MTT. Asimismo, las cepas analizadas no mostraron diferencias significativas en la sensibilidad a este fármaco (P < 0.05). El método seleccionado fue el FDA-PI en términos de sensibilidad, costos, facilidad de realización y reproducibilidad. La actividad en orden decreciente de los 5-Ni fue: ornidazol > tinidazol > ronidazol > secnidazol > dimetridazol >> metronidazol. Los estudios transversales mostraron una heterogeneidad en la sensibilidad ante los fármacos utilizados, mientras que en los estudios longitudinales se observó un comportamiento diferencial en la susceptibilidad a los fármacos empleados, además de que no hay un mantenimiento de un fenotipo particular ya sea tolerante o sensible. En cuanto a la obtención de cultivos resistentes al metronidazol destacó la selección inducida por droga, debido a que es un proceso que permite conseguir elevar gradualmente la concentración de los fármacos empleados, descartándose definitivamente la resistencia innata o espontánea debido a la gran variabilidad que presentaron las cepas de referencia, aislados y clonas en el estudio longitudinal. Asimismo la radiación con luz U V, propicia la formación de dímeros en las pirimidinas lo cual no permite, aparentemente, que el parásito soporte concentraciones altas de fármaco.

Por otro lado, el metronidazol afecta principalmente la tasa de síntesis del DNA la cual es decrementada notoriamente. Otro proceso afectado es la síntesis de RNA la cual también se encontró disminuida, y por su parte la síntesis proteínica sólo se afectó ligeramente.

## I. INTRODUCCIÓN :

El impacto de las enfermedades parasitarias en el campo de la salud pública es enorme. Se ha estimado que una tercera parte de la población mundial está infectada con parásitos y que el número anual de muertes debido a enfermedades parasitarias es del orden de varios millones (Warren, 1988). La relación existente entre el hospedero y el parásito es dinámica, en vista de que cada uno modifica las actividades y funciones del otro, lo cual trae como consecuencia problemas de salud humana y veterinaria que generalmente se refleja en la economía de los países.

Un parásito se define como un organismo que depende metabólicamente de un hospedero, y dependiendo de la localización en este último se catalogan como: endoparásitos (parásitos que se encuentran dentro del hospedero), y ectoparásitos (si se sitúan fuera del organismo). Generalmente existe cierta especificidad en una relación hospedero-parásito. Algunas veces, ésta es tal que el parásito se restringe a una sola especie del hospedero, en otras ocasiones ésta se amplía dando lugar a una zoonosis, que ha sido definida por la WHO como infecciones o enfermedades que se padecen por transmisión natural del agente causal entre animales vertebrados y humanos (Faubert, 1988).

Dentro de los parásitos se incluyen a los protozoarios, los cuales tienen una organización unicelular simple pudiéndose replicar directamente en circulación sanguínea, tracto intestinal o tejidos del hospedero vertebrado. La mayoría de los protozoarios parásitos permanecen, al menos durante una parte de su ciclo vital, dentro del hospedero (i.e. eritrocitos, fibroblastos, céls. musculares, macrófagos); y en varios aspectos son muy similares a otros agentes infecciosos tales como bacterias y virus, los cuales se replican en el hospedero en nichos extracelulares e intracelulares.

El desenlace de la relación hospedero-parásito está influido por la patogenicidad y virulencia que presente el parásito, por lo que el comprender las bases fisiológicas y

bioquímicas de las parasitosis o cualquier enfermedad infecciosa ha dado lugar a medidas terapéuticas y preventivas aplicables a comunidades endémicas. En el caso de la giardiosis, al igual que otras parasitosis, se ha notado la existencia de números crecientes de casos refractarios al tratamiento debido a la existencia de áreas endémicas como lo es México y otros países, además de las posibles reinfecciones de los pacientes, y en algunas ocasiones de la ineficacia de los fármacos en uso común, por lo que es importante desarrollar métodos de evaluación de agentes antiprotozoarios, el cual es el motivo de este trabajo

#### **I.A. GENERALIDADES DE *Giardia duodenalis* :**

Este protozooario fue descubierto por Leeuwenhoek (1681) en sus propias heces, pero la primera descripción identificable fue hecha por Lambl (1859) que le dio el nombre de *Cercomonas intestinalis*. Por la confusión surgida respecto al uso de los nombres *intestinalis* y *entérica* para esta especie, Stiles (1915) creó la denominación binomial *Giardia lamblia* en honor al profesor A. Giard de Paris y del Doctor F. Lambl, de Praga.

*Giardia* ha sido clasificada en el phylum Sarcostigophora y clase Zoomastigophorea junto con otros parásitos flagelados tales como: *Leishmania*, *Trichomonas*, *Trypanosoma*, y *Dientamoeba*, en el orden Diplomonadida, y tomando en cuenta la secuencia de su subunidad menor de RNAr, ha sido propuesto como el eucariote más primitivo (Sogin *et al.*, 1988) *Giardia* pertenece a un grupo filogenéticamente primitivo de protozoarios anaerobios, los cuales aparentemente provienen de ancestros arqueobacterianos que no presentan mitocondrias (Cavalier, 1987; Edlind y Chakraborty, 1987).

Se han descrito varias especies de *Giardia* considerando algunos criterios que ayudan a diferenciar a este parásito siendo: la especificidad del hospedero, las dimensiones del cuerpo y las variaciones en la estructura las cuales son: *G. agilis* que infecta a anfibios, *G. muris* que infecta a roedores, aves y reptiles, y *G. duodenalis* que infecta a

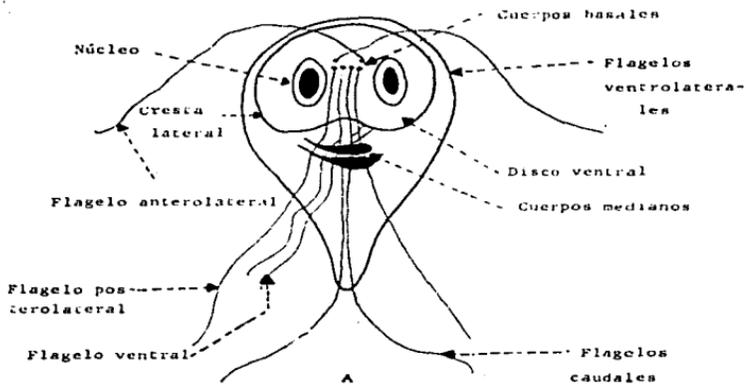
una variedad de mamíferos incluyendo humanos, así como aves y reptiles (Filice, 1952), al respecto es importante mencionar que se le llama *G. duodenalis* en lugar de *G. lamblia* por dos razones principales, siendo la primera el lugar en el que parasita a sus hospederos, esto es, en el duodeno; y la segunda porque no es adecuado que la especie lleve el nombre de un investigador. Recientemente se ha propuesto anexar dos especies: una de ellas se ha encontrado en aves de la especie *Meleospittacus undulatus*, nombrándosele *G. psittaci* (Erlandsen y Bemrick, 1987) También Erlandsen *et al* (1990 b) propusieron la especie *G. ardeae* presente en garzas (*Ardea herodias*) la cual había sido incluida en el grupo "*muris*" por Filice (1952).

*Giardia* presenta dos entidades morfológicas en su ciclo biológico. La fase vegetativa es el trofozoito, que es un organismo binucleado con forma de pera, mide de 10-15 µm de largo y de 6-10 µm de ancho, su superficie dorsal es convexa y la ventral cóncava, tiene un disco adherente anterior, cuenta con cuatro pares de flagelos dispuestos en posiciones anterior, lateral, posterior y caudal. El disco no es simétrico, tiene microtúbulos rígidos ordenados en espiral, con una muesca posterior que sirve para que al moverse, los flagelos expulsen el líquido del disco, facilitando la adherencia del parásito sobre las microvellosidades intestinales. Los flagelos se originan en los axonemas citoplásmicos constituidos por nueve hileras periféricas de microtúbulos pareados, que rodean a dos microtúbulos centrales y están revestidos por la unidad de membrana superficial. El movimiento vigoroso de los flagelos anteriores y caudales comprime el citoplasma del trofozoito, impulsando la circulación interna de los líquidos cuando los flagelos caudales se levantan, la succión ventral disminuye y el microorganismo puede desplazarse. Los flagelos anteriores y posterolaterales facilitan el desplazamiento del protozoario en el líquido duodenal. El cuerpo mediano, de morfología variable, es un agregado ovalado de microtúbulos curvos que se extienden hasta los axonemas caudales, reforzando su capacidad motriz (Carrada, 1984). En el citoplasma se encuentran presentes gránulos ribosomales y de glucógeno, pero no han sido identificados organelos propios de

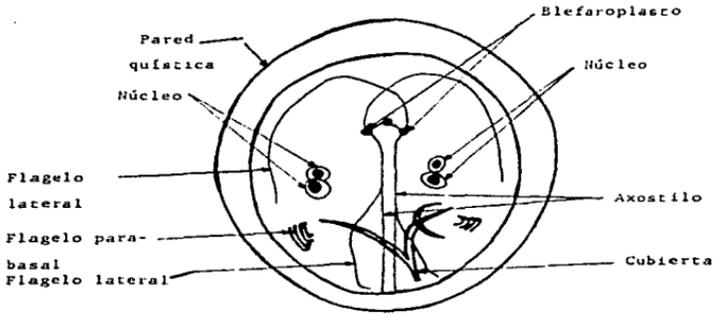
eucariontes como mitocondria, glicosomas, hidrogenosomas, peroxisomas y nucléolos (Adam, 1991., Thompson *et al*, 1993 b). (Figura 1-A).

La entidad infectante es el quiste, mide de 8-12  $\mu\text{m}$  de largo y de 7-10  $\mu\text{m}$  de ancho y está rodeado por una pared compuesta por proteínas y carbohidratos formando una malla cuyo espesor es de aproximadamente 0.3  $\mu\text{m}$  de espesor (Erlandsen *et al*, 1990 a). Dentro del quiste son visibles de 2 a 4 núcleos (dependiendo si la división nuclear ha sido completada), cuerpos basales, cuerpos medianos y elementos estructurales del flagelo y disco ventral (Figura 1-B). El quiste es relativamente resistente al pH gástrico y la desecación ambiental. Los quistes de *G. duodenalis* sobreviven bien a bajas temperaturas, reportándose que duran más de dos meses a 4°C y menos de 4 días a 37°C (Bingham *et al*, 1979; Knight, 1980). Asimismo éstos resisten concentraciones altas de desinfectantes químicos de uso rutinario, principalmente el cloruro o el dióxido de cloruro, por lo que actualmente se deben estudiar alternativas para la purificación de agua de consumo humano, ya que la desinfección por cloruros genera trihalometanos los cuales son potencialmente tóxicos (Karanis *et al*, 1991).

*G. duodenalis* tiene un ciclo de vida simple bifásico, consistiendo de una forma infectiva que es el quiste inactivo metabólicamente y el trofozoito que es la forma vegetativa. Después de la ingestión del quiste presente en agua y alimentos contaminados, el desenquistamiento es inducido al pasar éste por el medio ácido del estómago y la presencia de enzimas hidrolíticas pancreáticas. En general, de cada quiste emerge un trofozoito tetranucleado, el cual se divide por fisión binaria longitudinal en el tracto intestinal alto de humanos y la mayoría de los animales, y colonizan por medio de adhesión a la mucosa intestinal. El principal sitio de enquistamiento de los trofozoitos es el yeyuno, y este se lleva a cabo cuando las materias fecales líquidas se comienzan a deshidratar gradualmente en su tránsito hacia el colon, completándose el ciclo cuando los quistes son expulsados en las heces y son ingeridos por otro hospedero (Adam, 1991; Lindley, 1988) [Figura 2].

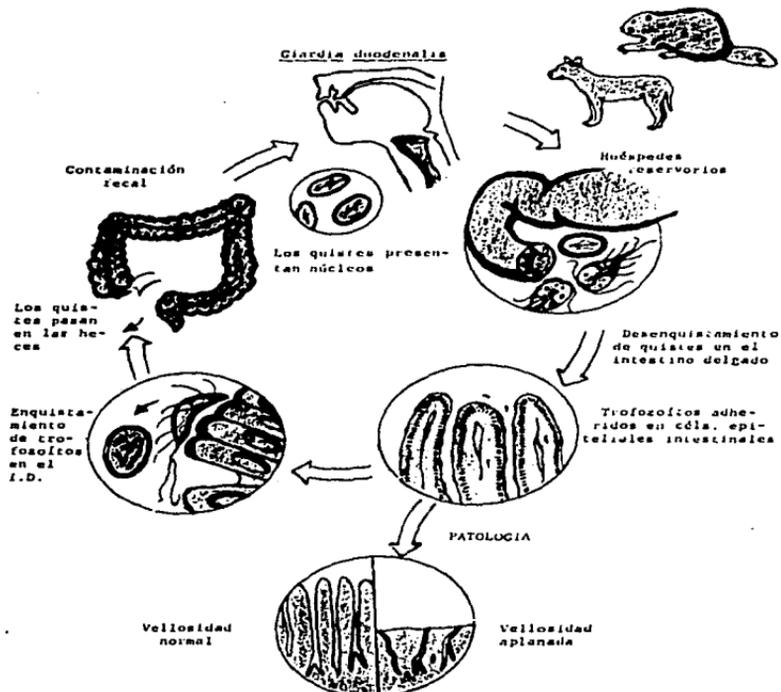


A



B

**FIGURA 1.** Entidades morfológicas del parásito protozoario *Giardia duodenalis*; A) Trofozoito, B) Quiste. Reproducido de Brown y Neva, Basic Clinical Parasitology, U.S.A., Appleton - Century - Crofts, 1983; y de Thompson *et al*, 1993.



**FIGURA 2.** Esquema representativo del ciclo de vida del parásito *Giardia duodenalis*. Reproducido de Katz, 1989.

En regiones de Estados Unidos se ha mostrado que hay una amplia variedad de especies de animales silvestres, particularmente el castor, que son portadores de quistes de *Giardia* y se ha sugerido que estos animales forman un reservorio importante para la diseminación de la giardiosis (Davies y Hibler, 1979). Estudios recientes realizados en animales domésticos, perros y ruminantes indican que hay otras fuentes potenciales y reservorios de *Giardia* cercanos al hombre (Buret *et al.*, 1990). Aunque se ha demostrado que la giardiosis es una zoonosis (Thompson *et al.*, 1988), también se han efectuado investigaciones que corroboran fuertemente esta idea, los cuales han concluido que hay una identidad fenotípica y genotípica entre aislados de humanos y animales (Faubert, 1988; De Jonckheere *et al.*, 1990).

Por su parte, Carosi *et al.* (1994) reportaron que tan sólo 10 quistes viables de *G. duodenalis* son suficientes para causar la infección en humanos, siendo ésta una de las razones principales de la alta pre-alecancia de la giardiosis en comparación con otras parasitosis intestinales.

## **I.B. GIARDIOSIS. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.**

Los síntomas de la giardiosis se presentan en gran medida por la colonización de la pared intestinal por el parásito y, como consecuencia de esto, se observa atrofia en las vellosidades intestinales. Las infecciones por *Giardia* suelen ser asintomáticas o asociadas a una variedad de síntomas prominentes como una diarrea prolongada, la cual se presenta en forma leve y produce heces semisólidas, o bien ser intensa y debilitante cuando las heces llegan a ser acuosas y voluminosas. Las infecciones crónicas se caracterizan por presentar esteatorrea que acompaña un síndrome de malabsorción con pérdida de peso substancial, debilidad general y la consecuente fatiga. El periodo prepatente de esta parasitosis es de 6 a 15 días, y el periodo de incubación frecuentemente oscila entre 7 y 21 días (Knight, 1980). El espectro de la respuesta clínica puede ser atribuido a la variación

en la virulencia de los aislados de *Giardia*, a factores del hospedero tales como la respuesta inmune o bien una combinación de los dos. Actualmente se tienen evidencias de que los aislados de *Giardia* obtenidos de humanos, idénticos morfológicamente, varían con respecto a sus antígenos de superficie (Smith *et al.*, 1982, Nash *et al.*, 1990 b), perfiles de isoenzimas (Andrews *et al.*, 1989), susceptibilidad a proteasas (Nash *et al.*, 1991), y se ha revelado genéticamente por análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y de impresión digital del DNA ó DNA fingerprinting (Upcroft *et al.*, 1990 a; Carnaby *et al.*, 1991). Un sistema inmune intacto es importante para erradicar la infección y para desarrollar una inmunidad protectora (Farthing, 1990). *Giardia* es esencialmente un parásito luminal y por lo tanto el estudio de los mecanismos inmunes se han enfocado a la producción de anticuerpos IgA secretorios. Recientemente hay estudios que sugieren que hay fallas para desarrollar una respuesta del tipo de IgA a un antígeno del parásito de 57 kDa, el cual es una proteína de choque térmico que está asociada con la infección persistente, a diferencia de una respuesta de IgG a este antígeno y la respuesta de IgA a otros polipéptidos de este parásito en infecciones de larga evolución. (Char *et al.*, 1991, 1992).

*Giardia* provoca alrededor de un 7 % de casos de diarrea aguda y del 11-45 % de casos de diarrea crónica, y menos del 50 % de pacientes sintomáticos presentan evidencias bioquímicas de malabsorción de carbohidratos, grasas y micronutrientes, aunque también suele ser responsable del desarrollo y crecimiento retardado en niños (Farthing *et al.*, 1986a; Sullivan *et al.*, 1991). El mayor impacto clínico de este parásito es en infantes y niños, durante los primeros 3 años de vida, en estados de desnutrición y en pacientes inmunocomprometidos.

La giardiosis presenta manifestaciones intestinales y extraintestinales, reportándose una variedad de mecanismos para explicar los procesos multifactoriales involucrados en la diarrea y malabsorción causada por *Giardia*, los cuales se enfocan a: a) la mucosa intestinal y b) al lumen intestinal (Katelaris y Farthing, 1992).

En los mecanismos de daño mucosal, se han encontrado anomalías estructurales y funcionales en el intestino delgado las cuales pueden ser detectadas en humanos y animales infectados experimentalmente, y parece probable que esto contribuya, al menos en parte, a la diarrea y malabsorción asociadas a esta infección. Entre los factores mucosales en la patogénesis se encuentran: a) la morfología, encontrándose mediante observaciones de microscopía de luz que en ocasiones la arquitectura de las vellosidades parece normal, pero hay cambios ultraestructurales tales como el acortamiento y engrosamiento de las microvellosidades (Takano y Yardley, 1965, Hoskins *et al.* 1967; Morecki y Parker, 1967), además de un incremento en la profundidad de las criptas, b) reducción en la actividad enzimática de lactasa, sucrasa, maltasa y trehalasa en la membrana de la microvellosidad (Duncombe *et al.* 1978, Hartong *et al.* 1979; Daniels y Belosevic 1995), reportándose asimismo que la reducción en las actividades de la disacaridasa son máximas cuando la diarrea y las anomalías morfológicas son más pronunciadas.

Se ha mostrado por microscopía electrónica que los trofozoitos de *Giardia*, al adherirse al epitelio, provocan ruptura y distorsión de las microvellosidades en el sitio donde el disco adhesivo ventral interactúa con la membrana de la microvellosidad (Erlandsen y Chase, 1974). *Giardia* produce, y posiblemente libera, sustancias citopáticas hacia el lumen intestinal (Samra *et al.* 1988), además de contener un número de tior proteinasas las cuales podrían adherirse a las glucoproteínas de la superficie y romper la integridad de la membrana de la microvellosidad (Hare *et al.* 1989, Parenti, 1989, North *et al.* 1990). También se ha mostrado que este flagelado expresa en su superficie una lectina que se une a residuos de manosa (Farthing *et al.* 1986b). Esta lectina sufre una ruptura mediada por tripsina de una molécula precursora citoplásmica (Lev *et al.* 1986), y esta proteólisis puede mediar la adhesión a los enterocitos (Inge *et al.* 1988), inflamación mucosal asociada con la activación de células T y liberación de citocinas (MacDonald y Spencer, 1988)

Por otro lado, entre los factores lumenales en la patogenésis de la diarrea se han reportado: a) el sobrecrecimiento bacteriano, que produce anomalías estructurales en el intestino delgado similares a las observadas en giardiosis clínica tienen un papel importante en el daño mucosal, notándose que la giardiosis sintomática se asocia con un incremento en el número de bacterias aeróbicas y anaeróbicas en el intestino delgado proximal (Tandon *et al.*, 1977), b) la incorporación de sales biliares por *Giardia*, la cual altera la expresión antigénica del parásito (Katelaris *et al.*, 1991) y c) inhibición de enzimas hidrolíticas, apreciándose concentraciones intraluminales reducidas de tripsina, quimiotripsina y lipasa en pacientes sintomáticos con giardiosis (Gupta y Mehta, 1973; Chawla *et al.*, 1975, Okada *et al.*, 1983)

En cuanto a la prevalencia de las infecciones por *G. duodenalis*, en estudios recientes realizados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez se encontró la siguiente distribución por edad de los niños con giardiosis: 21.4 % en lactantes, 41.7 % en preescolares, 27.9 % en escolares y 9 % en adolescentes (Bernal *et al.*, 1995). En países en vías de desarrollo, las tasas de incidencia oscilan entre un 8 y un 25 % como ocurre en regiones de Latinoamérica (Figueroa *et al.*, 1981), África (Hason y Patterson, 1987) y Asia (Hossain *et al.*, 1983). En 1960 se reportó una epidemia de giardiosis en Aspen, Colorado, debido a que los tubos de drenaje se cruzaron con los del agua purificada infectándose gran parte de la población. Después se confirmó la misma observación en 23 epidemias de origen hídrico en Estados Unidos de Norteamérica entre 1965 y 1980, con más de 7,000 personas afectadas debido a fallas en el sistema de filtración. Este problema es frecuente en México y otros países latinoamericanos, donde es común el consumo de aguas contaminadas de ríos, norias, pozos, canales de riego, manantiales naturales y cenotes. Esto último se ha manifestado en casos de enfermedad contraída por turistas norteamericanos o procedentes de regiones como Leningrado, URSS, considerada una región de riesgo elevado ( Brodsky *et al.*, 1974).

Por otro lado White *et al* (1972) y Bradley (1977) dividieron las enfermedades infecciosas transmitidas por agentes presentes en el agua en categorías, las cuales reflejan sus medios de transmisión, siendo estas: i) infecciones propagadas a través del suministro del agua (a través de agua), ii) infecciones difundidas por la falta de agua para la higiene personal (lavado de agua), iii) infecciones transmitidas a través de un hospedero invertebrado acuático (basadas en agua), y iv) infecciones propagadas por insectos que dependen del agua (vectores relacionados con el agua). Feachem (1977) observó que había un traslapamiento entre infecciones propiciadas por el suministro del agua y la falta de este líquido para una higiene adecuada por lo que las situó dentro de las enfermedades feco-orales, las cuales podían constituir un grupo separado. La clasificación Bradley-Feachem fue: i) enfermedades feco-orales (a través de agua y lavado de agua), ii) enfermedades estrictamente por lavado de agua (infecciones de piel y ojos), iii) vectores que viven con agua. Tomando en cuenta dicha clasificación, entre los principales factores de riesgo para la transmisión de la giardiasis se encuentra la transmisión a través de agua la cual ocurre cuando se consume agua contaminada por quistes de *Giardia*. Existen dos causas por las cuales puede surgir este problema como son: la fuente de agua y el método de tratamiento usado para la purificación de ésta. Por otro lado, la transmisión a través de alimentos contaminados ocurre porque los quistes de *Giardia* sobreviven en la mayoría de los alimentos que no necesitan ser cocinados antes de consumirse, propiciados por la inadecuada limpieza de verduras y frutas, y la transmisión de persona a persona debida a la transferencia de quistes en heces de un individuo infectado a otra persona. Aquí se incluyen factores como la densidad poblacional, las condiciones higiénicas, la proporción de individuos susceptibles en una población (Harley, 1988), la cantidad de niños en las guarderías (Keystone *et al*, 1978) y hombres homosexuales promiscuos (Schmerin *et al*, 1978).

En Estados Unidos las fuentes y modos de transmisión de la giardiasis, de acuerdo al Center for Disease Control and Prevention (CDC) estiman que el 90 % de infecciones

por *Giardia* son adquiridas por beber agua no filtrada o por el contacto con la población en edad pediátrica, el 10 % restante la adquiere por beber agua de superficie no tratada, viajes internacionales o a través de prácticas sexuales (Kappus y Juranek, 1988).

La proporción de casos para la transmisión de persona a persona, y a través de alimentos y agua varía de acuerdo a la región geográfica. En estudios epidemiológicos estacionales se ha encontrado un pico en enero en el noreste de España (García *et al*, 1989), aunque la estacionalidad de la giardiasis en Wisconsin es similar a la que ha sido reportada en Vermont (Birkhead y Vogt, 1989), Colorado (Wright *et al*, 1977), Minnesota (Ayala y Hermida, 1987), Arkansas (Pasley *et al*, 1989), Oklahoma, México (Hermida *et al*, 1990), y el Reino Unido, notándose los picos entre los meses de julio y octubre. Se reporta que esta incidencia estacional puede ser mediada por la contaminación de agua de superficie durante el verano. La transmisión de persona a persona resulta también por el hacinamiento poblacional.

Las medidas preventivas, por su parte, incluyen campañas de educación a la población para concientizar del riesgo que implica el beber agua de superficie no tratada, así como realizar una construcción adecuada de los pozos, promover su mantenimiento, la reparación o el recambio de pozos poco profundos, y monitorear los sitios de natación públicos para minimizar la exposición a parásitos. Así mismo se incluyen el tratamiento de las personas con infecciones identificadas, el mejoramiento en la purificación del agua y el control de sanidad que se debe acompañar con programas de educación pública dirigidos a su uso e investigaciones en el desarrollo de una vacuna efectiva.

En relación con los métodos diagnósticos que se emplean hasta ahora se han enfocado a detectar etapas específicas del ciclo de vida de *G. duodenalis* (quistes y trofozoitos en distintas muestras), y las técnicas más usadas son:

1) Métodos tradicionales como son el examen microscópico (coproparasitológico) muestras de heces el cual detecta quistes. Sin embargo, dado que los quistes se eliminan intermitentemente, esta técnica resulta ser inadecuada en una proporción alta de casos (30-

50 %) (Kamath y Murugasu, 1974). Así mismo influyen en ésto otros factores tales como la administración de antibióticos, antiácidos, y productos de caolin que inhiben la excreción de quistes (Wolfe, 1984). Otros métodos, como la aspiración duodenal y la biopsia, identifican principalmente trofozoitos (Gordts *et al.*, 1985). Un método adicional consiste en la obtención de líquido y/o moco duodenal a través de un hilo en una capsula y que, al ser extraído unas horas después, es exprimido y se hace un frotis de la muestra para la observación directa en el microscopio de luz (Entero-test ó Cap. Beal).

2) Técnicas inmunológicas que emplean reactivos biológicos para la detección de anticuerpos específicos contra *G. duodenalis* en suero y secreciones. Entre las pruebas serológicas más empleadas se encuentran la inmunodifusión (Vinayac *et al.*, 1978, Jokipii y Jokipii, 1982), hemaglutinación indirecta (Ganguly y Mahajan, 1981), inmunofluorescencia indirecta y la inmunofluorescencia directa en la cual se han detectado anticuerpos específicos hacia *Giardia* en saliva (Osipova *et al.*, 1984) y ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) en las cuales también se han empleado muestras como la leche materna (Miotti *et al.*, 1986). Por otro lado la detección de IgG anti*giardia* específica en muestras sanguíneas conservadas en papel filtro presenta una sensibilidad del 91 % y especificidad del 95 % (Al-Tukhi *et al.*, 1993). Dicho ensayo también se emplea en la detección de antígenos del trofozoito y/o quiste en heces. Otra técnica usada es la contraelectroforesis (CIE) la cual detecta antígenos de quiste en heces en la cual se usa comercialmente el ELISA (Janoff *et al.*, 1989).

3) Técnicas moleculares, que son métodos basados en sondas de DNA y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para secuencias específicas del DNA. La segunda prueba se ha empleado para detectar y diferenciar quistes viables y no-viables de *Giardia*, además de caracterizarse por ser una técnica específica y sensible dado que puede detectar hasta un solo quiste, lo cual la hace una herramienta muy útil para la detección ambiental del parásito (Abbaszadegan *et al.*, 1991). Así mismo se ha empleado dicha técnica para diferenciar cepas patógenas de *Giardia* (Mahbubani *et al.*, 1992). También se ha empleado

la impresión digital de DNA con la sonda de DNA del fago M13 la cual es capaz de mostrar diferencias genéticas entre cepas de *Giardia* (Archibald *et al.*, 1991). Por otro lado, la electroforesis de enzimas (zimodensos) se usa para examinar la variación genética entre aislados de *G. duodenalis* de diferentes áreas geográficas y además proporciona información sobre la estructura genética, ploidía y taxonomía y compara aislados de diferentes especies de hospederos con el fin de demostrar si en realidad la transmisión es mediada por una zoonosis (Meloni *et al.*, 1995). El RAPD (DNA polimórfico amplificado al azar) es otra técnica que detecta la variación genética entre aislados de *Giardia* (Morgan *et al.*, 1993 a).

### I.C. TERAPÉUTICA DE LA GIARDIOSIS

La piedra angular del tratamiento en la mayoría de las parasitosis intestinales es el empleo de agentes antiprotozoarios efectivos. El tratamiento antiparasitario debe ser apropiado para cada infección y a la dosis correcta, vigilando los posibles efectos tóxicos. La elección de la vía de administración se debe basar en la farmacodinamia del agente quimioterapéutico y la toxicidad. La elección del agente antiparasitario para un paciente y una parasitosis debe mantener un equilibrio entre la efectividad y el riesgo de la toxicidad.

Haciendo una breve reseña histórica, antiguamente se usaban para el tratamiento de la giardiosis sustancias muy tóxicas como  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ , y  $\text{Bi}^{3+}$  y posteriormente se utilizó la mepacrina, un agente tradicionalmente antimalárico (Mendelson, 1980). Actualmente, los fármacos más utilizados en esta parasitosis son los siguientes (ver tabla I):

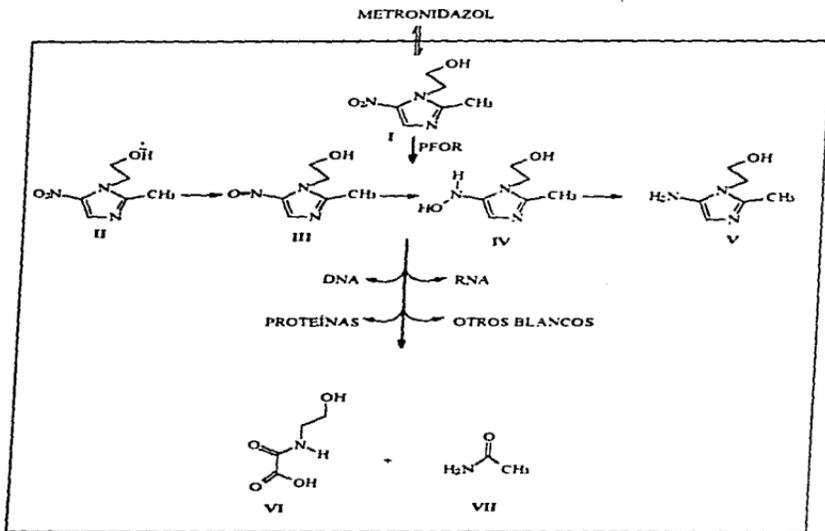
**Metronidazol** (2-metil-5-nitroimidazol-1-etanol). Este fármaco ha sido ampliamente usado en infecciones provocadas por bacterias y protozoarios anaeróbicos. El mecanismo de acción de este 5-nitroimidazol en el parásito *G. duodenalis* es

**TABLA I. REGÍMENES DE TRATAMIENTO COMÚNMENTE USADO PARA LA GIARDIOSIS.**

AGENTES	DOSIS	DURACIÓN	EFICACIA	REFERENCIA
Albendazol	Dosis única 600 mg u	1 a 3 días	62-75 %	Hall y Nahar, 1993
	800 mg 400 mg 400	5 días	81 %	Hall y Nahar, 1993
	mg diariamente		95 %	Hall y Nahar, 1993
Furazolidona	8mg/kg/día (3 ó 4 veces diariamente)	10 días	80 %	Davidson, 1984
Metronidazol	15 mg/kg/día (3 veces diariamente)	5 días	90 %	Davidson, 1984
Ornidazol	1.5 g dosis únicas		90 %	Jokipii y Jokipii, 1982
Paramomicina	30 mg/kg/día (3 ó 4 veces diariamente)	10 días	55-73 %	Wolfe, 1984
Quinacrina	6 mg/kg/día (3 veces diariamente) 300 mg por día máximo	5 días	90 %	Davidson, 1984
Secnidazol	Niños 30 mg/kg	1 día	70 %	Chacón <i>et al.</i> , 1991
Tinidazol	50 mg/kg, 2 g máximo. Dosis única		95 %	Jokipii y Jokipii, 1979 Speelman, 1985

completamente bioquímico, involucrando principalmente a la enzima ferredoxina oxidoreductasa conocida también como piruvato sintasa (PFOR), la cual promueve la reducción del grupo nitro para formar varios intermediarios tóxicos, como el radical anión, el nitroso, la hidroxilamina y el amino. Estos posiblemente se pegan al DNA para formar un complejo que no puede funcionar como iniciador para las DNA y RNA polimerasas inhibiendo la síntesis de DNA u otras moléculas, y se generan finalmente dos metabolitos conocidos como acetamida y ácido-N-(2-hidroxietil) oxámico [Figura 3] (Ings *et al.*, 1974). Es importante mencionar que la enzima PFOR interviene en la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) [Figura 4], la cual se encarga de catalizar la descarboxilación del piruvato para generar acetato y CO<sub>2</sub> a partir de D-glucosa (Lindmark, 1980; Lindmark y Miller, 1988). La PFOR tiene una masa molecular de 240 kDa, es una proteína dimérica que utiliza una proteína Fe-S (ferredoxina) como un aceptor de electrones y tiene un potencial de media onda muy negativo (Thompson *et al.*, 1993 b).

En cuanto a la farmacocinética del metronidazol en humanos, se ha reportado que se metaboliza en el hígado por la oxidación de la cadena lateral y la formación del glucurónido correspondiente. Los principales metabolitos oxidativos son: 1-(2-hidroxietil)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol, (el metabolito "hidroxi") que tiene actividad antibacteriana y es detectado en plasma y orina, y el ácido 1-(2-hidroxietil-2-hidroximetil-5-Nitroimidazol (el metabolito "hidroxi") que tiene actividad antibacteriana y es detectado en plasma y orina, y el ácido-2-metil-5-nitroimidazol-1- acético (el metabolito "ácido"), el cual no tiene actividad antibacteriana, y frecuentemente no se detecta en plasma pero es excretado en orina. Así pequeñas cantidades de metabolitos reducidos, como acetamida y ácido N-(2-hidroxietil) oxámico se han detectado en orina y son formados por la flora intestinal (Koch *et al.*, 1979 a). El metronidazol aparece en la mayoría de los tejidos del cuerpo y fluidos de secreción incluyendo bilis, leche materna, fluido cerebroespinal, saliva, fluido seminal y secreciones vaginales, alcanzando concentraciones similares a las del plasma. También atraviesa la placenta y rápidamente entra a circulación fetal.



**FIGURA 3. Mecanismo de acción del metronidazol (I), involucrando la reducción del grupo 5- nitro a través de la enzima PFOR, generando intermediarios reactivos como: radical anión (II), nitroso (III), hidroxilamina (IV) y amino (V), éstos probablemente se pegan al DNA, RNA, proteínas u otros blancos promoviendo la muerte celular, para finalmente generar ác.-N-(2-hidroxietil)oxámico (VI) y acetamida (VII). Reproducido de Goldman *et al*, 1986 y Borcham *et al*, 1988.**

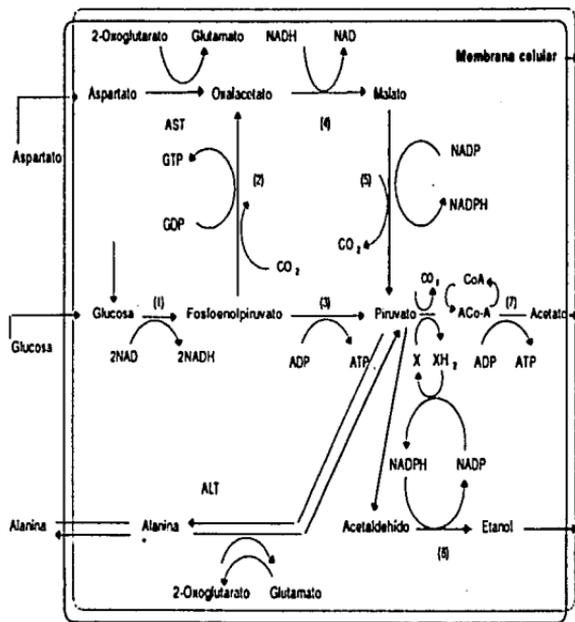


FIGURA 4. Vía glucolítica general en *G. domesticus*, mostrando los puntos de entrada del aspartato y alanina (1) Enzimas de la vía Embden-Meyerhof. (2) aspartoglutarato transaminasa (AST), (3) piruvato quinasa (ADP), (4) malato deshidrogenasa (NAD), (5) malato deshidrogenasa (NADP), (6) piruvato ferredoxina-oxidoreductasa (sintetasa, piruvato cianasa), (7) acetil-CoA sintetasa (ADP), (8) alcohol deshidrogenasa (NADP), (9) NADPH oxidoreductasa, AST aspartato-2-oxoglutarato amino transferasa, ALT, alanina-2-oxoglutarato amino transferasa. Reproducido de Thompson et al, 1993

Los efectos adversos del metronidazol generalmente están relacionados con la dosis, y los más comunes son: molestias gastrointestinales, especialmente náusea y desagradable sabor metálico, se acompaña algunas veces por dolor de cabeza, anorexia y vómito. El régimen de tratamiento requiere de 5 a 7 días, y ha presentado una efectividad del 80-90 %. Algunos estudios han mostrado que es mutagénico en bacterias (Rosenkranz y Speck, 1975 ; Lindmark y Muller, 1976) y carcinogénico en varias especies de roedores (Legator *et al*, 1975; Rustia y ShubiK, 1979). Con lo que respecta a sus reacciones adversas, cuando es administrado junto con alcohol provoca una reacción parecida al disulfiram. La cimetidina eleva las concentraciones séricas de metronidazol incrementando el riesgo de efectos neurológicos. Este fármaco no está aprobado por la Food and Drug Administration en los Estados Unidos para el tratamiento de la giardiosis, aunque es ampliamente usado por los médicos para este propósito en éste y otros países en vías de desarrollo. Sin embargo suelen presentarse fallas en el tratamiento con derivados del 5-nitroimidazol (Mendelson, 1980), siendo algunas causas la inconformidad del paciente con el régimen de fármacos prescritos, la posible reinfección del paciente, los cambios en la farmacocinética del fármaco, el posible escape de organismos a sitios privilegiados donde los fármacos anti giardia no son capaces de llegar, las deficiencias en el sistema inmune del paciente, la inactivación del fármaco por infecciones bacterianas concomitantes (Edwards *et al*, 1979), la heterogeneidad en la respuesta de poblaciones de *Giardia* a fármacos antiprotozoarios (Majewska *et al*, 1991), así como la existencia de cepas resistentes al fármaco (Boreham *et al*, 1988 b). Como se mencionó, en el mecanismo de acción del metronidazol, este es reducido dentro de las células a intermediarios reactivos con la formación de radicales libres, los cuales son responsables de la actividad del fármaco al causar ruptura a las cadenas del DNA y a los enlaces cruzados en estas mismas. La resistencia a fármacos puede resultar por una disminución en la incorporación de metronidazol por las líneas resistentes, o bien por la acumulación de metronidazol libre dentro de las células resultando de las fallas en la formación de intermediarios reactivos

por la oxidoreductasa PFOR, y por fallas de los intermediarios reactivos del metronidazol para actuar con el DNA (Boreham *et al*, 1988 a) Asimismo, se ha asociado la tolerancia al metronidazol con cambios en el DNA a nivel cromosomal y niveles de DNA repetitivos (Upcroft *et al*, 1989, 1990 b)

**Tinidazol** (1-[2-(etilsulfonil)etil]-2-metil-5-nitroimidazol) Su mecanismo de acción al igual que otros derivados del 5-Nitroimidazol, implica la reducción del grupo nitro generando dos metabolitos llamados 2-hidroxi metiltinidazol y etil 2-(5-hidroxi-2-metil-4-nitro-1-imidazolil)-etil-sulfona, los cuales se unen a macromoléculas o el DNA, siendo esto letal para la célula (Edwards *et al*, 1973) La eficacia del tinidazol en dosis únicas de 2 g ha sido del 89-100 % (Farid *et al*, 1974, Petterson, 1975, Schenone *et al*, 1975; Salih y Abdalla, 1977, Danzig y Hatchuel, 1977) En cuanto a su metabolismo y excreción, el etil 2- ( 5- hidroxi-2- metil- 4- nitro-1- imidazolil)- etil- sulfona es un producto de la biotransformación hepática del tinidazol que involucra la hidroxilación y la reducción del grupo nitro. El 2-hidroxi metiltinidazol es un metabolito menor. El fármaco no cargado y el metabolito urinario mayoritario se presentan principalmente en heces, aunque también se han encontrado en bilis, leche materna, fluido cerebroespinal, saliva y en una variedad de tejidos del cuerpo, así como en la placenta. Sus reacciones adversas incluyen ligeros efectos sobre el aparato gastrointestinal, como náusea y vomito poco frecuente y se puede presentar leucopenia transitoria. Este fármaco está contraindicado en pacientes con discrasias sanguíneas presentes o con antecedentes de las mismas, también durante el primer trimestre del embarazo y en etapa de lactancia (Rosentein y Del Campo, 1979).

**Quinaquina** (N4-(6-cloro-2-metoxi-9-acridinil)-N1,N1-dietil-1,4-pentanendiamina dihidrocloruro). Es un compuesto antimalárico que actúa inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos. El tratamiento involucra un periodo de 5 a 10 días (Davidson, 1984) y es considerado por varios investigadores como el agente de selección, con una efectividad del

90 %. Sus efectos colaterales son: psicosis tóxica y hemólisis en pacientes deficientes en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

**Furazolidona** (3-[(5-nitro-2-furanil) metileno]-amino]-2-oxazolidinona). Es un derivado del nitrofurano con actividad antiprotozoaria y antibacteriana. Actúa dañando el DNA directamente o por vía radicales de oxígeno (Thompson *et al.*, 1993 b). Los nitrofuranos pueden ser reducidos por enzimas citosólicas tales como NADH y NADPH oxidasa, así como también por la PFOR (Moreno *et al.*, 1984). Se ha observado que en *Giardia* la sensibilidad a este tipo de fármacos está correlacionada con un aumento en la actividad enzimática de peroxidasa y reductasa dependiente del tiol, siendo esta una posible explicación del mecanismo de resistencia, lo cual en parte puede indicar que un adecuado funcionamiento del ciclo tiol genera el fenotipo de resistencia (Smith *et al.*, 1988). Los efectos adversos más comunes de la administración de furazolidona involucran el tracto gastrointestinal e incluyen náusea y vómito, es hepatotóxica, produciendo anemia hemolítica en pacientes con deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La Food and Drug Administration de los E U (1991) la reportó como carcinogénica y mutagénica, y no se comercializa para uso humano en Australia (Townson *et al.*, 1992).

**Paromomicina** (O-2-amino-2-deoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-[O-2,6-diamino-2,6-dideoxi- $\beta$ -L-idopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-ribofuranosil-(1 $\rightarrow$ 5)]-2-deoxi-D-estreptamina). Pertenecce al grupo de los aminoglicósidos, presentando actividad antibacteriana, antihelmíntica y antiprotozoaria. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis proteica, al unirse al RNAr (tipo 16 S) la subunidad ribosomal menor (Adam, 1991). Estudios realizados por Boreham *et al.* (1986) con ratones neonatales revelaron que este fármaco es de 4 a 5 veces más activo que el metronidazol y la quinacrina, y dado que es poco absorbida en el intestino se reduce el riesgo de toxicidad sistémica, lo cual permite que sea recomendado durante el embarazo (Davidson, 1984). Recientemente se ha reportado que el par de bases específica C-1409/G-1491 del RNAr está implicado en la susceptibilidad de *Giardia* a dicho fármaco, mientras que todos los procariontes tienen

este par de bases, se encuentra ausente en la mayoría de eucariontes (incluyendo mamíferos) y varios protozoarios (Edlind, 1989).

De manera general, actualmente se están presentando casos refractarios en esta parasitosis debido al uso indiscriminado y periódico de fármacos prescritos rutinariamente tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Por tal motivo, es necesario hacer una evaluación de otros fármacos además de la síntesis de agentes quimioterápicos alternativos. En este sentido, actualmente se ha propuesto el uso de agentes como pentamidinas y bis-bencimidazoles (Bell *et al.*, 1991, 1993).

La investigación de agentes anti $Giardia$  alternativos ha hecho necesaria la evaluación de los bencimidazoles como agentes antiprotozoarios. Entre ellos se encuentran el albendazol, mebendazol, fenbendazol y nocardazol, cuyo mecanismo de acción propuesto es la unión a tubulina (proteína dimerica compuesta de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de aproximadamente 50 kDa cada una) y giardinas (que sólo son encontradas en el disco ventral de  $Giardia$ ), viéndose en estudios *in vitro* que el tratamiento con estos fármacos deteriora la adhesión de los trofozoitos a substratos biológicos (cél. epiteliales) o inertes (vidrio, plástico) y ocasiona cambios dramáticos en la morfología del parásito (Meloni *et al.*, 1990; Chávez *et al.*, 1992). El albendazol, mebendazol y oxfendazol producen embriotoxicidad y teratogénesis en animales de laboratorio, además no deben administrarse a mujeres embarazadas (Botero, 1986). Recientemente ha sido incorporado al Cuadro Básico de Medicamentos del Sector Salud de México el albendazol como antihelmíntico de amplio espectro para uso en medicina veterinaria y humana, y según el perfil metabólico del organismo humano existen nueve metabolitos, encontrándose en mayor proporción el sulfóxido y la sulfona de albendazol (Fuentes *et al.*, 1992).

Existen una serie de fármacos anti $Giardia$  cuyo estudio se encuentra en fase experimental. Por ejemplo, el fármaco antidepresor clorimipramina inhibe el crecimiento de  $Giardia$  *in vitro*, posiblemente a través de su capacidad para inhibir la ATPasa asociada con la membrana (Weinbach *et al.*, 1985). El D-propranolol, al ser un fármaco estabilizante

de la membrana inhibe tanto la motilidad como el crecimiento de *Giardia in vitro* y hay un reporte clínico de un caso en que al presentarse una falla al tratamiento con metronidazol se le administró posteriormente DL-propanolol, asociándosele con una rápida erradicación del parásito (Popovic, 1990) Por otro lado Crouch *et al* (1986), han evaluado la sensibilidad *in vitro* de *G. duodenalis* ante varios agentes quimioterapéuticos que no han sido usados previamente en el tratamiento de la giardiosis, entre los cuales se encuentran la mefloquina, doxiciclina, y rifampina, observando una fuerte actividad de éstos contra el protozooario, por lo que se ha propuesto su evaluación clínica como potenciales fármacos de tratamiento alternativo. Actualmente se ha evaluado *in vivo* la eficacia del zinc de bacitracina encontrándose que es efectivo en el tratamiento de la giardiosis, lo cual es debido a que el zinc forma un complejo con la bacitracina que incrementa la estabilidad de la molécula asegurando su actividad farmacológica, de esta forma resulta ser un candidato alternativo para el tratamiento de dicha infección (Andrews *et al*, 1995).

## I.D. ANTECEDENTES

### I. Generales

La resistencia a fármacos ha emergido como un obstáculo en el tratamiento y control de enfermedades de origen parasitario. Además, existe escasa información disponible relacionada con mecanismos moleculares y bioquímicos que contribuyan al conocimiento sobre la resistencia a fármacos en cepas y aislados mexicanos de *G. duodenalis*, por lo que en este trabajo se pretende evaluar parcialmente células tolerantes al efecto de los agentes quimioterapéuticos del tipo de los 5-Nitroimidazoles.

La resistencia a fármacos ha sido definida como un incremento en la capacidad de parásitos individuales dentro de una cepa para tolerar dosis de un compuesto el cual podría ser letal para la mayoría de los parásitos en una población normal de la misma especie. Una disminución en la sensibilidad podría ser causada por cambios genéticos o no genéticos en la célula blanco. Si un cambio en la sensibilidad no involucra un cambio en el DNA cromosomal o extracromosomal, entonces es el resultado de una adaptación fenotípica. Esto ocurre en cultivos después de una larga exposición al fármaco bajo condiciones favorables para la célula o el organismo. La resistencia fenotípica no es estable y generalmente se pierde cuando las células después de haberse cultivado un largo tiempo en presencia de fármaco se transfieren a un medio libre de agente quimioterápico (Kelly y Hall, 1979).

Lacey (1990) define la resistencia a fármacos en algún organismo como un cambio en la farmacodinamia del fármaco (absorción, distribución, metabolismo, excreción y sitio de acción), y por lo tanto concluye que la resistencia no necesariamente se presenta en el sitio de acción del mismo. Estudios basados en la genética molecular de la resistencia a fármacos en malaria por *P. falciparum* han propuesto que este fenómeno es propiciado por dos formas: 1) Resistencia a fármacos antifolato como lo es la pirimetamina y cicloguanil, la cual se debe a mutaciones puntuales en el sitio activo de la enzima

dihidrofolato reductasa (DHFR) (Wellems, 1991), y 2) resistencia a la cloroquina, la cual es mediada por la proteína llamada Pgp (P-glicoproteína), para la cual se han encontrado dos genes *mdr* (*pfmdr1* y *pfmdr2*) que codifican para homólogos de Pgp identificados en este parásito. Uno de estos (*pfmdr1*) tiene varios alelos que han sido relacionados con el fenotipo de resistencia a la cloroquina (Cowman, 1991).

Tomando en cuenta esta información, y dado que actualmente se están presentando casos refractarios al tratamiento de la giardiosis se puede pensar que este problema es debido a dos razones: uno, la ineffectividad de los agentes quimioterápicos utilizados, o bien a la presencia de parásitos resistentes en un hospedero. Por lo consiguiente, en el presente trabajo se pretende evaluar de una forma parcial este fenotipo en líneas que sean inducidas experimentalmente *in vitro* a presentar resistencia al metronidazol, fármaco representante de la familia de los 5-Ni, el cual se eligió porque en México es de los fármacos más prescritos y la presencia de casos refractarios a este fármaco es un problema que va en aumento.

#### 11. Particulares.

La resistencia a fármacos y el número limitado de agentes quimioterápicos disponibles para el tratamiento de infecciones debidas a protozoarios y bacterias anaerobias conduce a serios problemas de salud humana y veterinaria. El metronidazol es el fármaco de uso más común para la quimioterapia de la giardiosis, además de caracterizarse por su uso indiscriminado en ciertas áreas endémicas a esta parasitosis, ya que es prescrita para otros agentes infecciosos, tales como *Balantidium*, *Gardnerella*, *Eutamoeba histolytica*, *Bacteroides*, *Fusiformis*, *Leishmania mexicana*, *Trichomonas vaginalis*. Es así importante enfocarnos a estudios bioquímicos que nos determinen las bases de la resistencia a fármacos con este agente farmacológico en *G. duodenalis*.

La resistencia al metronidazol ha sido reportada en cepas de *B. fragilis* y *Clostridium pasteurianum*, la cual es propiciada por niveles disminuidos de la enzima piruvato ferredoxina oxidorreductasa (PFOR) cuya función es donar los electrones a la ferredoxina y en el segundo microorganismo por la hidrogenasa bidireccional (hidrogenasa I) la cual se encarga de reducir el grupo nitro en este fármaco (Britz y Wilkinson, 1979;; Church *et al*, 1988). La resistencia al metronidazol ha sido estudiada con detalle en *Trichomonas*, en donde se ha descrito la resistencia anaeróbica (generada sólo en el laboratorio, Cerkasovova *et al*, 1984), y la resistencia aeróbica (la cual se presenta naturalmente en casos refractarios al tratamiento, Muller *et al* 1988). Estudios *in vitro* realizados en *T. vaginalis* y *Trichomonas foetus* han correlacionado la resistencia con una disminución en la actividad de las enzimas PFOR (Cerkasovová *et al*, 1984; Kabickova *et al*, 1986).

Estudios recientes realizados por Upcroft *et al*, (1992) sugieren que las líneas que presentan el fenotipo de resistencia a fármacos en *G. duodenalis* tienen rearrreglos cromosomales. En el caso del aislado BRIS/83/HEPU/106-2ID10 (línea resistente a 10 dosis letales al metronidazol) se presenta la delección de un gen llamado G6/1 en el cromosoma 4, esta delección involucra una porción de un cromosoma parcialmente duplicado en la cepa BRIS/83/HEPU/106. Al comparar ambas cepas, no encontraron diferencias en el tamaño del cromosoma, pero observaron que la pérdida de G6/1 en el primer aislado está involucrada con una delección de un segmento pequeño del cromosoma mencionado anteriormente que no pudo ser detectada por electroforesis en gel por inversión de campos (FIGE) debido a que es muy pequeño o bien un segmento grande con recambios de DNA que no abarcaron G6/1. Además se analizaron otras cepas como la BAH 12 que se caracteriza por un crecimiento lento, no presentándose G6/1, por lo cual asocian a este gen o proteína con el crecimiento y división anormal del parásito, y mediante ensayos de inmunofluorescencia lo encontraron en el núcleo de los trofozoitos.

Otro mecanismo de resistencia al metronidazol involucra directamente el

mecanismo de acción del fármaco bajo estudio, en la que interviene principalmente el sistema del transporte de electrones, mediado a través de la enzima PFOR. Esta puede tener una baja actividad enzimática y se conduce así a una producción reducida de radicales tóxicos que son los responsables del efecto farmacológico, o bien por encontrarse alterados los niveles redox u otras características de dicha enzima, siendo posible también una producción baja de intermediarios reactivos y una gran cantidad de metronidazol libre. Lo anterior ocasiona un bajo o nulo efecto citotóxico (Boreham *et al.*, 1988 b). Sin embargo, otras posibilidades como la presencia de mutaciones puntuales en la PFOR o bien la presencia de la PgP (P-glicoproteína), la cual esta involucrada con la resistencia a fármacos en células mamíferas; no han sido aún explorados en *G. duodenalis*.

En general, hasta el momento se desconoce el mecanismo exacto por el cual surgen los casos refractarios a la quimioterapia en pacientes con giardiosis clínica, por lo cual resulta interesante estudiar algunos aspectos involucrados con este fenotipo.

## II. JUSTIFICACIÓN:

La giardiosis es una parasitosis muy frecuente en México y otros países tanto en vías de desarrollo como desarrollados soliendo ser endémica, que afecta principalmente a niños que por la situación antes expuesta son frecuentemente re infectados además de las condiciones precarias de higiene presente en esta población, cuya forma de control principalmente involucra el uso de agentes quimioterapicos entre los cuales se destaca el uso extensivo del metronidazol, fármaco que presenta un amplio espectro, esto es, tiene un efecto farmacológico contra bacterias y protozoarios anaeróbicos

Dado que actualmente se están presentando casos refractarios en esta parasitosis y debido a la existencia de poblaciones de *Giardia duodenalis* resistentes a fármacos, es importante tener información relacionada con los mecanismos moleculares que puedan estar alterados en líneas resistentes que conducen generalmente a fallas en el tratamiento con la finalidad de desarrollar estrategias metodológicas que controlen esta infección.

Por otro lado, se requiere hacer una evaluación de métodos tanto bioquímicos como fisiológicos útiles en la evaluación de la susceptibilidad a fármacos en dicho parásito porque en la actualidad no hay un consenso en estos ensayos, de los cuales se han reportado el crecimiento clonal en medio semisólido (Gillin y Diamond, 1980), el subcultivo en medio líquido (Hill *et al.*, 1986), la incorporación de nucleótidos radioactivos (Boreham *et al.* 1984; Inge y Farthing, 1987), la captación de colorantes fluorogénicos [FDA-PI] (Schupp y Erlandsen, 1987) y la reducción de sales de tetrazolio (Mosmann, 1983), entre los cuales se han observado diferentes valores de  $DL_{50}$ . En la fase experimental de este trabajo se seleccionará el más adecuado en términos de sensibilidad, facilidad de realización y reproducibilidad para que pueda tener aplicabilidad a nivel clínico. Esto permitirá diseñar estrategias de quimioterapia alternativa para casos de giardiosis refractarios a uno o más fármacos, los cuales pueden consistir en el uso de productos de combinación, de lenta liberación o de acción prolongada que tengan un

efecto directo en el parásito, baja toxicidad, sin efectos colaterales y de fácil administración en esta parasitosis.

Otro aspecto interesante es que los ensayos antes mencionados pueden ser una herramienta útil en el área de la Investigación y Farmacología, ya que permite hacer una evaluación integral de la actividad de nuevos fármacos que pueden presentar mecanismos de acción similares o diferentes a los ya empleados en el tratamiento de la giardiosis.

### III. OBJETIVOS

Con la finalidad de entender el fenómeno de susceptibilidad del parásito *Giardia duodenalis* al exponerse a fármacos usados rutinariamente en el tratamiento de dicha parasitosis, se han planteado los siguientes objetivos

#### OBJETIVO GENERAL :

- Analizar el efecto y actividad *in vitro* de fármacos de la familia de los 5-Nitroimidazoles hacia trofozoitos de *Giardia duodenalis*, (asi como la respuesta de sensibilidad de distintos aislados y clonas de este parásito a los fármacos mencionados)

#### OBJETIVOS PARTICULARES :

- 1 • Seleccionar un método óptimo para evaluar la sensibilidad de trofozoitos de *G. duodenalis* a fármacos del tipo de los 5-Nitroimidazoles *in vitro*.
- 2 • Determinar la sensibilidad *in vitro* de distintos aislados y clonas de *G. duodenalis* a fármacos de la familia de los 5-Nitroimidazoles.
- 3 • Seleccionar líneas celulares de *G. duodenalis* con sensibilidad diferencial a los fármacos empleados.
- 4 • Implementar diferentes técnicas de mutagénesis celular (físicoquímicas, fisiológicas, espontáneo) para inducir resistencia en trofozoitos de *G. duodenalis* a fármacos.
- 5 • Obtener patrones cinéticos de incorporación de precursores moleculares involucrados en procesos celulares fundamentales (replicación, transcripción y traducción) en líneas celulares de *G. duodenalis* con distinta sensibilidad a fármacos.

#### IV. MATERIAL Y METODOS

**1. Parásitos :** Las cepas de *G. duodenalis* utilizadas en estos experimentos fueron la Portland-1 (PO American Type Culture Collection No. 30888) obtenida por los Drs. G. Visvesvara y G. Healy (Center for Disease Control, Atlanta, GA). Esta cepa fue aislada de una paciente sintomática de 36 años de edad en Portland, Oregon (Meyer, 1976). La cepa WB fue aislada por la Dra. F. Gillin en el NIH a partir de fluido duodenal de un paciente de sexo masculino de 27 años de edad con giardiasis sintomática con una duración de 2.5 años, la cual adquirió en Afganistán. El tratamiento con metronidazol falló en este paciente, el cual recibió cuatro terapias de metronidazol y 3 regimenes de quinacrina (Smith *et al*, 1982). Las cepas WB y P-1 fueron proporcionadas por el Dr. E. Weinbach del National Institutes of Health en Bethesda, Md. (E.U.A.). Los aislados mexicanos utilizados fueron: IMSS-2 (obtenido de paciente crónico sintomático), IMSS-3 (obtenido de paciente crónico asintomático), 52 (obtenido de paciente asintomático en el CIEA), y 10 (obtenido de paciente sintomático en el CIEA) los cuales fueron aislados originalmente por Cedillo *et al* (1991).

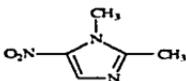
**2. Cultivo axénico de *Giardia duodenalis* :** Los trofozoitos de las cepas, clonas y aislados mencionados anteriormente fueron cultivados axénicamente (subcultivándose tres veces semanalmente) en tubos de plástico de fondo cónico de 15 ml a 37°C [incubadora Precisión modelo 4EG], hasta fase logarítmica en medio TYI-S-33 (desarrollado por Diamond *et al*, 1978 y modificado por Keister, 1983), suplementado con suero bovino al 10 % con 1 ml de los antibióticos estreptomina (50,000 U.I./L) - penicilina (50 mg/L). Los trofozoitos se cosecharon por enfriamiento de los tubos de cultivo en un baño agua-hielo durante 90 minutos, invirtiéndose varias veces y resuspendiéndose en el mismo medio. Para los ensayos en que se requirió un número de trofozoitos mayor, se efectuó la

propagación de la cepa o aislado deseado en botellas de plástico de 60 ml a partir de un tubo stock de parásitos, realizando de éste inicialmente un conteo en hemocitómetro (Reichert Sci. Instruments) para efectuar cálculos tomando como referencia que por cada ml se alcanza una densidad máxima aproximada  $2 \times 10^6$  de trofozoitos y el tiempo de duración promedio del ciclo de replicación ( $\approx$  8 horas).

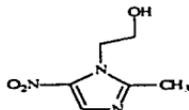
**3. Agentes quimioterapéuticos :** Los agentes químicos que se emplearon fueron el metronidazol (2-metil-5-nitroimidazol-1-etanol), tinidazol (1-[2-(etilsulfonil) etil]-2-metil-5-nitroimidazol), ornidazol ( $\alpha$ -(clorometil)-2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-etanol), secnidazol ( $\alpha$ ,2-dimetil-5-nitro-1H-imidazol-1-etanol), dimetridazol (1,2-dimetil-5-nitro-1H-imidazol), y ronidazol (1-metil-5-nitro-1H-imidazol) El secnidazol fue gentilmente donado por la Dra. Juan de los laboratorios Rhone-Poulenc-Rorer, y los fármacos restantes fueron adquiridos de Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A. Los fármacos fueron disueltos en agua destilada estéril a una concentración de 1 mg/ml, se pasaron a través de filtros millipore (tamaño de poro 0.22  $\mu$ m; Millipore S.A.) Posteriormente se almacenaron en alícuotas pequeñas a temperatura ambiente y, para el caso del metronidazol, dimetridazol y ronidazol, éstos se almacenaron refrigerados a 4°C. Las estructuras químicas de los fármacos utilizados se muestran en la tabla II.

**4. Clonación :** La obtención de clonas se realizó empleando la técnica reportada por Baum *et al* (1988) basada en diluciones limitantes, para lo cual se cultivaron los trofozoitos hasta fase logarítmica y se enfriaron los recipientes de cultivo en un baño agua-hielo por aproximadamente 30 minutos. Se hizo un recuento celular en un hemocitómetro de Neubauer (Reichert Sci. Instruments), haciéndose diluciones progresivas hasta obtener 12.5 trofozoitos/ml. Estos fueron inoculados en razón de 0.5 células/vial en 25 viales de borosilicato con tapa de rosca de 4.5 ml incubándose a 37°C [incubadora Precisión modelo 4EG] durante una semana. Posteriormente se revisó el crecimiento celular en

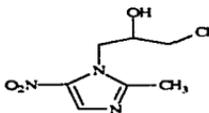
**TABLA II. ESTRUCTURAS QUÍMICAS Y PESOS MOLECULARES DE LOS FÁRMACOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO.**



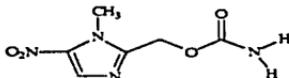
**DIMETRIDAZOL**  
P.M. = 141.13



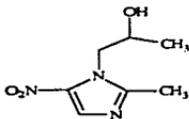
**METRONIDAZOL**  
P.M. = 171.16



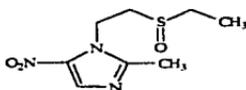
**ORNIDAZOL**  
P.M. = 219.62



**RONIDAZOL**  
P.M. = 200.16



**SECNIDAZOL**  
P.M. = 185.18



**TINIDAZOL**  
P.M. = 247.26

microscopio óptico con sistema invertido (Olympus) (en colaboración con la Biól. Maricela Cruz Soto) La forma en la que se evaluó la clonación, esto es, el hecho de que ciertamente un vial positivo representara una clona verdadera se calculó dividiendo el número de viales positivos (con crecimiento celular) entre el número de viales esperados de acuerdo al inóculo y al número total de viales inoculados (Hernández, 1992)

**5. Pruebas de susceptibilidad a fármacos :** Con la finalidad de establecer un método que evaluara eficazmente la susceptibilidad de los trofozoitos de *G. duodenalis* cultivados axénicamente ante el metronidazol, el cual se utilizó inicialmente como fármaco de referencia, se emplearon las cepas WB y P-1 construyendo curvas dosis-respuesta para cada método utilizado, determinándose la DL<sub>50</sub> la cual se consideró como parámetro de sensibilidad. Los métodos utilizados fueron: Subcultivo en medio líquido, Subcultivo en agar semisólido, Tinción con colorantes fluorogénicos [FDA-PI], Incorporación de timidina tritiada [3H-TdR] y, Reducción de sales de tetrazolio [MTT].

La preparación de los trofozoitos de *G. duodenalis* utilizados en todas las pruebas mencionadas anteriormente fue la siguiente: en botellas de plástico de 60 ml se colocaron 5 ml de medio de cultivo completo TYI-S-33 y se adicionó el fármaco en un intervalo de concentraciones finales de  $2.92 \times 10^{-5}$   $\mu$ M hasta 350.46  $\mu$ M, después se adicionaron aproximadamente 125,000 trofozoitos de *G. duodenalis*, se ajustó el volumen total a 60 ml con medio de cultivo y las células se incubaron por un espacio de 24 horas a 37°C. Se enfriaron las botellas en un baño agua-hielo y su contenido se transfirió a tubos de plástico de fondo cónico de 50 ml para posteriormente lavarse los trofozoitos tres veces con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) [Anexo I] mediante centrifugaciones a 840 x g' en centrífuga con sistema de refrigeración acoplado [Beckman modelo TJ-6/TJ-R] por un tiempo de 10 minutos para cada lavado. Los experimentos fueron realizados por triplicado el mismo día, evaluándose la viabilidad celular por varios métodos que se describen enseguida :

**5.1 Subcultivo en medio líquido :** En este método se inocularon 100,000 trofozoitos/ml de *Giardia* expuestos a fármaco en viales de vidrio de borosilicato de 4.5 ml colocándoles medio fresco completo TYI-S-33 e incubando éstos a 37°C durante 48 horas . Pasado ese tiempo, se enfriaron las células en un baño agua-hielo durante 1 hora y se efectuó el recuento celular en cámara de Neubauer, realizándose simultáneamente una curva de calibración colocando en el eje de las ordenadas el número de trofozoitos inoculado inicialmente que abarcaban un rango desde 5,000 hasta 200,000 trofozoitos, y en el eje de las abscisas el número de lo trofozoitos obtenidos después de 48 horas, considerando el logaritmo base diez como escala en los ejes graficados. Para obtener el número inicial de parásitos inoculados en cada vial al tiempo cero, se le sustrajo el número final de trofozoitos obtenidos después de 48 horas. El número inicial de parásitos viables se extrapoló de la curva de calibración usando el número total corregido a las 48 horas. Finalmente el porcentaje de mortalidad se calculo mediante la fórmula: **% de mortalidad = 100 x n**, donde **n = I-** (número de trofozoitos obtenido a partir de la curva de calibración dividido entre el número de trofozoitos inoculados inicialmente) (Hill *et al*, 1986).

**5.2. Subcultivo en agar semisólido :** En tubos de ensayo de borosilicato de 16x125 mm se colocaron 15 ml de medio de cultivo TYI-S-33 y se incubaron éstos a 42°C [incubadora Precision] por un espacio de 2 horas. Los tubos de medio de cultivo con agarosa fundida se prepararon empleando una solución stock concentrada al 2 % p/v de agarosa (tipo I, ultrapura, Bio Rad, tipo III, Sea Kem) en medio TYI-S-33, la cual se esterilizó a 121°C, 15 lb de presión durante 15 minutos (en autoclave) y se conservó en estufa a 42°C hasta su uso. A los tubos que contenían 15 ml de medio de cultivo calentado a 42°C se les adicionaron volúmenes apropiados de agarosa al 2 % para obtener las siguientes concentraciones : 0.13, 0.16, 0.18, 0.22, 0.25 y 0.30 % p/v y se les agregaron las suspensiones celulares diluidas, las cuales contenían 200 o 500 trofozoitos. La mezcla se agitó inmediatamente invirtiéndose varias veces y los tubos se colocaron en un baño

agua-hielo para solidificar la agarosa. Posteriormente los tubos se incubaron por un periodo de 7 días a 37°C, hasta que las colonias llegaron a ser visibles. Se procedió a realizar el recuento de éstas con la ayuda de un aparato cuentacolonia (New Brunswick Scientific), determinándose el porcentaje de eficiencia de formación de colonias (% CFE), el cual se define como el número de colonias crecidas dividido entre el número de células inoculadas multiplicado por 100 (Gillin y Diamond, 1978)

**5.3. Tinción con colorantes fluorogénicos (FDA-PI) :** En este ensayo a las células cosechadas y lavadas con PBS se les adicionaron 50 µl de una solución de diacetato de fluoresceína [FDA] (40 mg/ml en PBS 1X) y 50 µl de una solución de yoduro de propidium [PI] (30 mg/ml en PBS), agitándose y dejándose reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente, frenándose la reacción al meter los tubos en hielo. Los recuentos de células se hicieron en un microscopio óptico con sistema de epifluorescencia (Zeiss) con λ de excitación de 499 nm para el FDA y de 520-610 nm para el PI. En cuanto a la interpretación de esta prueba, los trofozoitos teñidos color verde, amarillos o no teñidos, pero presentando movimiento flagelar, se consideraron viables [FDA positivos], mientras que los que adquirieron una coloración rojiza fueron trofozoitos no viables [PI positivos], haciendo el recuento de 300 células por cada muestra para obtener el porcentaje de viabilidad.

**5.4. Incorporación de timidina tritiada (<sup>3</sup>H-TdR) :** Se inocularon 1x10<sup>6</sup> trofozoitos de *G. duodenalis* expuestos a fármaco en viales de vidrio de borosilicato de 4.5 ml con tapa de rosca, adicionándoles medio TYI-S-33 fresco hasta obtener un volumen de aforo de 4.4 ml, y se incubaron por 2 horas a 37°C. Después se agregaron a cada vial 12.5 µCi/ml (56.3 µl) de timidina tritiada con una actividad específica de 4.33 TBq/mmol (Amersham Int. PLC), incubándose cuatro horas más. La incorporación se frenó metiendo los viales en un baño agua-hielo, posteriormente los trofozoitos cosechados fueron lavados dos veces en PBS utilizando centrifugaciones a 840 x g' centrífuga [Beckman modelo TJ-6/TJ-R] durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se retiró con pipetas de transferencia

desechable, en el segundo lavado se eliminó el sobrenadante hasta dejar 1 ml, resuspendiendo perfectamente la pastilla y transfiriendo ésta a una solución para emisión de centelleo [anexo I] para realizar las lecturas en un contador de centelleo de líquidos (Beckman modelo 6000). Los valores de incorporación de  $^3\text{H}$ -TdR se cuantificaron y consideraron a las concentraciones del fármaco se realizó un análisis de regresión lineal para obtener el valor de  $\text{DL}_{50}$ .

**5.5. Reducción de sales de tetrazolio [MTT] :** En este caso se hicieron algunas modificaciones al método reportado por Mosmann (1983). A los trofozoitos cosechados se les agregaron 50  $\mu\text{l}$  de metasulfato de fenazina [PMS] (5 mg/ml de PBS 1X) y una solución de MTT (0.05 % p/v en PBS 1X) hasta obtener un volumen de aforo de 1.3 ml. Se agitó suavemente cada tubo eppendorf<sup>®</sup> en un agitador de contacto (Vortex Genie 2) y se dejaron éstos a 37°C durante 45 minutos. Las lecturas se hicieron en un microscopio óptico, tomando como criterio de viabilidad celular a trofozoitos que presentaron gránulos color púrpura en su citoplasma, lo cual indica la precipitación de formazán, mientras que los trofozoitos no viables no presentaron dicha granulación.

**6. Determinación de  $\text{DL}_{50}$  y MIC de fármacos representativos del grupo de los 5-Nitroimidazoles (dimetridazol, metronidazol, ornidazol, ronidazol, secnidazol, tinidazol) :** Estos estudios se realizaron empleando la cepa de referencia WB, construyendo curvas dosis-respuesta de fármacos derivados del grupo de los 5-Nitroimidazoles mencionados anteriormente. Como criterios para evaluar la susceptibilidad de *G. duodenalis* hacia estos fármacos, se eligieron la  $\text{DL}_{50}$  y MIC, de tal manera que al obtener las gráficas de tipo sigmoideo se procedió a realizar un análisis de regresión lineal con la finalidad de obtener dichos valores. Se prepararon varias diluciones de los fármacos en agua destilada estéril hasta obtener un intervalo de concentraciones amplio con la finalidad de cubrir extremos de la gráfica donde estuviera involucrada una viabilidad del 100 % y una mortalidad del 100 %. El procedimiento consistió en cultivar

los trofozoitos hasta fase logaritmica de crecimiento, esto es, con un 100 % de confluencia, después se cosecharon las células por enfriamiento y se contaron en hemocitómetro. A los viales de borosilicato de 4.5 se agregaron las cantidades de fármaco respectivas, y se adicionaron  $2 \times 10^5$  trofozoitos/ml, aforando con medio de cultivo TYI-S-33. Los tubos se incubaron por un periodo de 24 horas a 37°C, después se enfriaron para cosechar las células por centrifugación, eliminando el sobrenadante y estimando la viabilidad utilizando el método de tinción con colorantes fluorogénicos descrita en 5.3.

**7. Evaluación transversal de la sensibilidad *in vitro* de cepas, aislados y clones de *G. duodenalis* expuestas a DL<sub>50</sub> de metronidazol y tinidazol :** En este estudio, se hicieron cosechas cada 96 horas de las cepas o aislados mexicanos con sus clones respectivas, para lo cual los trofozoitos se cultivaron hasta fase logaritmica de crecimiento y posteriormente se enfriaron los recipientes de cultivo en un baño agua-hielo durante 90 minutos. En seguida se efectuó el recuento celular en cámara hemocimétrica de Neubauer con el objeto de inocular  $2 \times 10^5$  trofozoitos/ml de *Giardia* en viales de borosilicato con tapa de rosca de 4.5 ml. Se agregó la DL<sub>50</sub> del metronidazol ó tinidazol según el caso, adicionándoles medio TYI-S-33 e incubándolos a 37 °C durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se revisó cada vial en microscopio invertido para evaluar el porcentaje de confluencia, después se metieron en un baño agua-hielo durante 90 minutos. En seguida, los trofozoitos se lavaron dos veces transfiriendo el contenido a tubos de plástico de fondo cónico de 15 ml los cuales contenian PBS frio, y se centrifugaron a 840 x g' a 4°C durante 10 minutos. En el último lavado se eliminó todo el sobrenadante y a la pastilla se le agregaron 50 µl de una solución de FDA [40 µg/ml] y 50 µl de PI [30g/ml], se agitó cada tubo y se dejaron reposando a temperatura ambiente durante 5 min, para finalmente frenar la tinción al meter los tubos en un baño agua-hielo. La determinación del porcentaje de viabilidad se realizó haciendo la cuantificación de 300 células en microscopio de epifluorescencia tomando en cuenta, para la interpretación de dicha

prueba, que los trofozoitos teñidos color verde, amarillos o sin tinción eran viables [FDA positivos], mientras que los que adquirieron una coloración rojiza fueron trofozoitos no viables [PI positivos].

**8. Análisis longitudinal de la sensibilidad de trofozoitos de *G. duodenalis* expuestos a metronidazol y tinidazol :** En esta fase se evaluó la susceptibilidad del parásito al exponerse al metronidazol y tinidazol, fármacos representativos del grupo de los 5-Nitroimidazoles, mediante un estudio longitudinal en trofozoitos cultivados en forma continua durante 32 días. Se realizaron cosechas celulares cada 72 y 96 horas, a partir de cepas y aislados que junto con algunas clonas, se seleccionaron del estudio transversal en base a su tolerancia ó sensibilidad al exponerse a una  $DL_{50}$  de los fármacos probados. Los trofozoitos se cultivaron hasta fase logarítmica de crecimiento a 37°C, posteriormente se colocaron en un baño agua-hielo durante 90 minutos, y para cosechar las células se centrifugaron a 840 x g' durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y las pastillas celulares se juntaron en un tubo de plástico de fondo cónico de 15 ml, para finalmente adicionar medio completo TYI-S-33 hasta tener un volumen total de 10 ml colocando dicho tubo en un baño agua-hielo. Posteriormente se realizó un recuento en un hemocitómetro de Neubauer para ajustar la concentración de trofozoitos requerida. Se inocularon entonces  $2.2 \times 10^5$  trofozoitos/ml en viales de berosilicato de 4.5 ml con tapa de rosca, se les colocó el volumen adecuado de los fármacos mencionados que representaba la dosis letal 50 y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, se evaluó la confluencia que presentaba cada tubo mediante observaciones en microscopio invertido, para después cosechar las células por enfriamiento, y finalmente cuantificar el porcentaje de viabilidad con el método de tinción de colorantes fluorogénicos [FDA-PI], interpretando dicha prueba como se mencionó en el apartado 5.3.

**9. Obtención de líneas resistentes :**

**9.1 Inducción por droga :** A trofozoitos de las cepas de referencia WB y P-1 en fase logarítmica de crecimiento se les cultivó en presencia de concentraciones ascendentes de los fármacos metronidazol o tinidazol, tomando en cuenta las curvas dosis-respuestas obtenidas con estos agentes quimioterápicos en el inciso 8 para las cepas respectivas, siendo expuestos inicialmente a la  $DL_{10}$ . Al irse adaptando los trofozoitos, se les fue incrementando la dosis, siempre y cuando estos llegaran a tener una confluencia del 100 % varias veces. En ese momento se aumentó la concentración, y con el objetivo de tener una reserva de trofozoitos viables con diferentes grados de tolerancia al agente citotóxico expuesto se les conservó por criopreservación en  $N_2$  líquido (Anexo II)

**9.2 Mutagénesis :** A trofozoitos de las cepas WB y P-1 en fase logarítmica de crecimiento se les eliminó el medio TYI-S-33 para adicionarles PBS de pH=7.2 estéril, posteriormente se revisaron los tubos en microscopio invertido y se incubaron en exposición a radiación de luz U.V. (lámpara Blank Ray, UVL 22, 115 volts, 60 ciclos, 0.17 amps) durante 3 horas a 37°C. Los tubos se colocaron en un baño agua-hielo durante aproximadamente 30 minutos para ser centrifugados a  $840 \times g'$  durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante con pipetas pasteur y se adicionó medio completo TYI-S-33, metiéndose a incubar a 37°C para después de 30 minutos de incubación evaluar algunos daños cualitativamente después de realizar este tratamiento, como la morfología de los trofozoitos y la velocidad de replicación del parásito, siendo éstos cambios bastante evidentes después de compararse con una cepa control (no sometida a dicho tratamiento). Después de 48 horas de incubación se volvieron a revisar en microscopio invertido para estimar otra vez los parámetros antes mencionados. Con el fin de mantener trofozoitos mutados viables se les sometió a la técnica de criopreservación en  $N_2$  líquido mencionada en el Anexo II.

**9.3. Espontánea :** Al realizar el estudio longitudinal se pudieron observar algunas cepas de referencia, aislados mexicanos y clonas que sin necesidad de inducir con ningún agente lograron mantener un comportamiento de tolerancia por sí solas, es decir, naturalmente.

**10. Patrones cinéticos de incorporación de precursores moleculares involucrados en procesos celulares fundamentales en líneas celulares de *G. duodenalis* :** Durante la realización del presente trabajo los experimentos se hicieron por duplicado en un mismo día, en las cinéticas se utilizaron concentraciones de  $^3\text{H-TdR}$ ,  $^3\text{H-UdR}$  y  $^{35}\text{S-Cisteína}$  de 0.55, 0.55, y 0.44 mCi/ml respectivamente. Las cepas utilizadas fueron WB y WB resistente obtenida a partir del inciso 9.1. en donde a cada una de las cepas al tiempo de 2 horas se les colocó el volumen de fármaco que representaba la MIC del metronidazol conseguida a partir del apartado 5. La metodología para los tres ensayos fue la misma, adicionando la concentración de nucleótido radioactivo en viales de 4.5 ml de borosilicato conteniendo  $2.2 \times 10^5$  trofozoitos/ml a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , y se dejaron en presencia de éstos durante un periodo de 2 hasta 24 horas a la temperatura antes mencionada. Después las células se colectaron empleando un cosechador de células (Millipore Corporation Bedford M.A.S.S.) a través del cual se hizo pasar PBS y ác. tricloroacético al 10% fríos. Las muestras en papel de nitrocelulosa se pusieron a secar a temperatura ambiente y se colocaron en viales de 20 ml que contenían 5 ml de solución de centelleo (Anexo I). La cantidad de marca incorporada por el organismo se determinó por lecturas realizadas en un contador de centelleo de líquidos (Beckman 6000) obtenidas en cuentas por minuto [c.p.m.] versus el tiempo de incubación con dicho nucleótido.

**11. Métodos estadísticos:** En el presente trabajo se emplearon análisis de regresión lineal para la determinación de  $\text{DL}_{50}$  como parámetro de sensibilidad en cada método. En los casos en que se requirió la comparación estadística de los diferentes métodos de viabilidad se realizó un análisis de variancia (Andeva), y la prueba DVS de Tukey (DVS : diferencia verdaderamente significativa). Con respecto al análisis de los estudios longitudinales se efectuó un diseño en bloques, en tanto que en la incorporación de precursores moleculares se aplicó la prueba de hipótesis: diferencia entre las medias de dos

poblaciones, en donde las inferencias estadísticas tienen por lo menos un 95 % de confiabilidad (Daniel, 1995).

## V. RESULTADOS

**1. Cultivo axénico de *G. duodenalis* :** Las cepas de referencia P-1, WB, y los aislados mexicanos IMSS-2, IMSS-3, CIEA-10 y CIEA-52 fueron cultivados axénicamente en medio TYI-S-33 tal como se describió en material y métodos, no detectándose diferencias relevantes en cuanto a la velocidad de replicación, lo cual fue evaluado mediante observaciones de campo en microscopio óptico invertido, determinado esto por el porcentaje de confluencia que presentó cada tubo. Generalmente la fase logarítmica de crecimiento fue el momento elegido para cosechar los parásitos, presentándose ésta aproximadamente cada 72 horas, lo cual estuvo en función del inóculo inicial de trofozoitos siendo de 3,906 trofozoitos/ml utilizados

Por otro lado, cabe mencionar que a las células en cultivo continuo, se les realizó prueba de esterilidad en medio luria (Anexo II) con frecuencia, ya que la presencia de algún tipo de contaminación hubiese alterado los resultados de la evaluación de la susceptibilidad a fármacos en este parásito.

**2. Clonación :** Con la finalidad de poder obtener poblaciones celulares genéticamente homogéneas, se realizó la clonación empleando la técnica reportada por Baum *et al* (1988) basada en diluciones limitantes, tal como se describió en el apartado 4.0 de material y métodos. Se definió una clona como un grupo de células las cuales son la progenia de una célula inicial. En dichos ensayos se obtuvieron los datos contenidos en la Tabla III.

Uno de los parámetros que permitió evaluar si realmente una clona se derivó de una célula fue mediante la obtención del % CFE cuyo valor máximo es del 100 %. Así en los datos anteriores se observó que la cepa WB rebasó el límite superior probablemente al haber una distribución celular mayor al esperado teóricamente (12.5 trofozoitos), también el aislado IMSS-2 presentó el menor porcentaje de CFE pero aún se considera un número adecuado para poder ser considerada como clona.

Por otro lado, también se observaron diferencias relevantes en el número de clonas obtenidas y en la velocidad de replicación entre clonas después de haber sido realizada la clonación. Es probable que las diferencias detectadas en el número de clonas obtenidas son propiciadas por la misma metodología de la clonación, ya que el hecho de colocar una célula en cada dos viales es un evento probabilístico.

**TABLA III. RESULTADOS DE CLONACIÓN DE TROFOZOITOS DE *Giardia duodenalis* POR DILUCIÓN LIMITANTE**

CEPA O AISLADO	NÚMERO DE CLONAS OBTENIDAS	% CFE
WB	14	107.69
P-1	9	69.23
IMSS-2	7	53.84
IMSS-3	8	61.53
CIEA-10	11	84.61
CIEA-52	11	84.61

**3. Evaluación de ensayos que determinan la susceptibilidad a fármacos en *Giardia duodenalis* :** En la actualidad no se tiene un consenso sobre las metodologías que ayudan a evaluar la sensibilidad a fármacos en trofozoitos de *Giardia*, por lo que en esta parte del estudio se evaluaron una serie de metodologías que permitieron determinar el porcentaje de viabilidad en las cepas de referencia (WB y P-1), con la finalidad de seleccionar aquella que fuera óptima en términos de costos, confiabilidad, facilidad, reproducibilidad y sensibilidad. Así se elaboraron curvas dosis-respuesta para cada método, tomándose como parámetro de sensibilidad el valor de DL<sub>50</sub> correspondiente. Dichos ensayos se

clasificaron como *bioquímicos* [tinción con colorantes fluorogénicos (FDA-PI), reducción de sales de tetrazolio (MTT), e incorporación de timidina tritiada ( $^3\text{H-TdR}$ )] y *fisiológicos* [subcultivo en medio líquido y subcultivo en agar semisólido].

**3.1. Subcultivo en medio líquido :** Este ensayo evalúa la capacidad de las células para poder replicarse después de haber sido expuestas a un agente potencialmente citotóxico, y se siguió la metodología descrita en material y métodos. Se obtuvieron las curvas dosis-respuesta presentadas en las figuras 8 y 9, obteniéndose valores de  $\text{DL}_{50}$  de 176.1 y 113.2  $\mu\text{M}$  de metronidazol para las cepas WB y P-1 respectivamente. En la figura 10 se puede apreciar que resultó ser el método más sensible, debido a que se determinaron  $\text{DL}_{50}$  más bajas comparándolas con los demás ensayos de viabilidad probados. Cabe mencionar que su principal desventaja es el tiempo requerido para la obtención de los resultados (48 horas) después de haber expuesto los organismos al agente antiparasitario.

**3.2. Subcultivo en agar semisólido :** En este ensayo, después de haberse incubado las células con metronidazol durante 24 horas, se colocaron en tubos de 15 ml con agarosa semisólida, con la finalidad de que las células individuales fueran capaces de replicarse y formar una colonia en esta matriz. Para la determinación de la concentración óptima de agarosa, se emplearon medios semisólidos que abarcaban un rango de concentraciones desde 0.13 hasta 0.3 % (p/v) empleando en la estandarización a la cepa WB. Así se observó que el crecimiento clonal dependió de la concentración de agarosa empleada, esto es, en concentraciones bajas como 0.13 %, las colonias eran incontables y difusas, mientras que en concentraciones altas se presentaban pocas colonias y muy pequeñas. Así, la concentración óptima fue la de 0.16 % ya que las colonias se encontraban bien definidas y de tamaño constante, y éstas fueron apreciables a simple vista después de 7-8 días de incubación a 37°C. Por otro lado, también se probaron diferentes inóculos de células por tubo (200 y 500) observándose que el número de colonias era proporcional al número de células inoculadas. En este caso, se decidió utilizar el inóculo de 500 trofozoitos

considerando que el tratamiento con fármaco disminuiría notablemente la eficiencia de formación de colonias (%CFE).

Otro aspecto en esta fase del trabajo consistió en evaluar diferentes agarosas con distinta pureza tales como Ultrapura [BRL, EEO (-mr)=0 15, grado electroforesis de punto de fusión bajo], tipo I [Sigma, Baja EEO=0 09-0 13], agarosa [Bio Rad, EEO (-mr)=0 13 +/- 0.02], tipo III [Sigma, Alta EEO=0 23-0 26] y agarosa [Sea Kem, EEO media, EEO(-mr)= 0.16-0.19], utilizándose una concentración de medio semisólido constante de 0.16% p/v la cual, como se mencionó anteriormente, fue la más apropiada. Se empleó como parámetro de evaluación el % CFE para cada agarosa empleada, y se obtuvieron los datos que aparecen en la Tabla IV.

**TABLA IV. EFECTO DE DIFERENTES TIPOS DE AGAROSAS SOBRE LA FORMACIÓN DE COLONIAS (% CFE) EN TROFOZOÍTOS DE *Giardia duodenalis*, EMPLEANDO SUBCULTIVO EN AGAR SEMISÓLIDO CON CONCENTRACIÓN DE AGAROSA 0.16 %.**

TIPO DE AGAROSA	% C F E
Ultrapura (BRL)	5.80
Tipo I (Sigma)	19.33
Tipo III (Sigma)	16.86
Agarosa (Sea Kem)	20.13
Agarosa (Bio Rad)	26.60

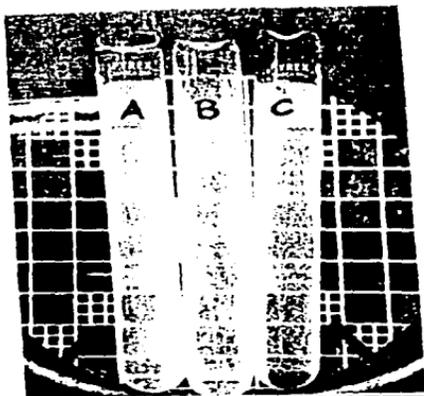
Como se puede observar, el % CFE de la cepa WB varió drásticamente con el uso de agarosas de diferente calidad. La agarosa ultrapura dio el menor % CFE, observándose colonias muy pequeñas, compactas y algunas con aspecto micótico. Al emplear agarosa Sea Kem se obtuvieron colonias medianas, definidas, mientras que con agarosa Bio Rad

las colonias fueron de tamaño irregular, difusas y grumosas, aunque ambas presentaban un alto % CFE. Se decidió no utilizar éstas posteriormente debido a la heterogeneidad en la morfología de las colonias, e incluso la agarosa tipo I presentó colonias de tamaño irregular y grumosas. Por el contrario, la agarosa tipo III fue seleccionada porque generó colonias bien definidas y de tamaño constante (datos no mostrados). Tomados en su conjunto, estos datos sugieren que la agarosa más adecuada fue la tipo III debido a las características que presentaron las colonias obtenidas al emplearla en el medio semisólido. Una vez establecidas las condiciones óptimas para esta metodología, se procedió a evaluar el efecto del metronidazol sobre el parásito *G. duodenalis*. En la figura 5 se analizó el efecto de este fármaco en las cepas de referencia. Se observó así un efecto significativo del fármaco sobre la viabilidad celular al disminuir notablemente el número de colonias formadas, según se puede apreciar en la Tabla V.

**TABLA V. EFECTO DEL METRONIDAZOL SOBRE LA EFICIENCIA DE FORMACIÓN DE COLONIAS DE TROFOZOÍTOS DE *Giardia duodenalis* EN MEDIO SEMISÓLIDO.**

CONCENTRACIÓN DE METRONIDAZOL ( $\mu\text{M}$ )	CFE %	
	CEPAS	
	WB	P-1
Control	2.26	1.40
$2.92 \times 10^{-5}$	9.87	3.00
$2.92 \times 10^{-4}$	0.40	5.00
14.60	4.80	0.20
58.41	3.80	0.20
350.46	0.20	0.00

PANEL 1



PANEL 2

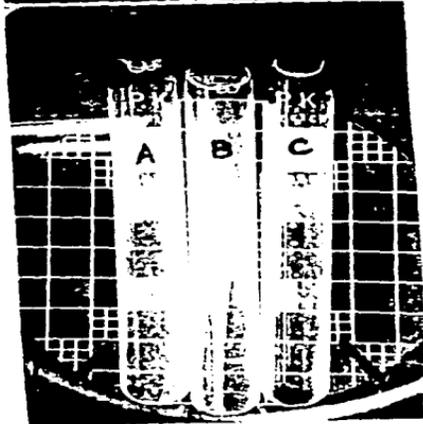
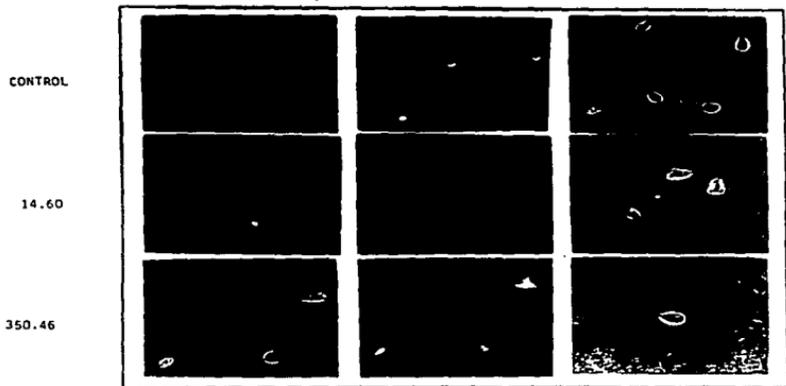


FIGURA 5. Observación visual del efecto de diferentes concentraciones de metronidazol sobre la formación de colonias de *Giardia duodenalis* cepas WB y P-1. 500 trofozoitos se incubaron en medio de agarosa 0.16 % (Tipo III, Sigma) a 37°C durante 7 días, posteriormente se determino el % CFE de acuerdo a lo descrito en material y métodos. Panel 1: Cepa WB. A) 350.46  $\mu$ M, B) 2.92x10E<sup>-7</sup>  $\mu$ M, C) control sin fármaco. Panel 2: Cepa P-1. A) 350.46 $\mu$ M, B) 14.60  $\mu$ M, C) control sin fármaco.

Los resultados del % CFE de las cepas de referencia no permitieron hacer la construcción de una curva dosis-respuesta que tuviera una tendencia sigmoidea clásica para poder calcular los valores de DL<sub>50</sub> en forma confiable, ya que al realizar el análisis de regresión y correlación se obtuvieron valores para *r* de 0.21 y 0.23 en las cepas WB y P-1, respectivamente. Al ser valores bajos, estos datos nos indican que la ecuación no se ajusta a una línea recta y que por lo consiguiente no es posible obtener valores de DL<sub>50</sub> confiables para dichas cepas, las cuales serían de -3851.98  $\mu$ M y -6827.21  $\mu$ M de metronidazol para las cepas WB y P-1, respectivamente.

Asimismo, los resultados obtenidos no presentaron la tendencia esperada, dado que a bajas concentraciones de fármaco debió haber un elevado % CFE mientras que a dosis elevadas debió presentarse un efecto serio en la viabilidad, visualizándose por una disminución drástica en el % CFE y ello no pudo apreciarse en los datos mostrados en la Tabla V, pudiendo notarse que son valores excesivos si se comparan con los demás ensayos de viabilidad probados. Por estas causas, además de la falta de reproducibilidad en cada experimento realizado aunado con una baja sensibilidad se decidió descartar dicho ensayo.

**3.3. Tinción con colorantes fluorogénicos [FDA-PI] :** Con la finalidad de obtener el porcentaje de viabilidad sobre recuentos celulares directos, éstos se realizaron empleando microscopio de epifluorescencia después de haber expuesto los trofozoitos a metronidazol. Los parásitos viables de *G. duodenalis* incubados con el substrato fluorogénico FDA presentaron una fluorescencia verde-amarilla debido a la actividad enzimática de las esterasas las cuales hidrolizaron el FDA generando la fluoresceína dentro del parásito nombrándoles a dichas células FDA-positivas. Por su parte, las células dañadas o muertas adquirieron un color rojizo al incorporar el PI, llamándolas PI-positivas. Los patrones de tinción de los trofozoitos con FDA-PI se puede observar en la figura 6. Algunas veces se observaron trofozoitos que no se teñían con FDA ni con PI, sin embargo, en las observaciones microscópicas de campo claro los parásitos tenían morfología y motilidad flagelar normal, por lo que se consideraron viables. Los valores de



MICROSCOPIA CON SISTEMA  
OPTICO DE CONTRASTE DE  
FASES

FDA - PI

MTT

FIGURA 6. Evaluación de la actividad del metronidazol en trofozoitos de *Giardia duodenalis* mediante la tinción con FDA-PI y la reducción del MTT. 2 x 10<sup>6</sup> trofozoitos/ml de *Giardia* cepa WB se incubaron en vales que contenían dosis de metronidazol de 14.60 µM, 350.46 µM y uno sin fármaco (control). El monitoreo de la viabilidad se hizo mediante las técnicas mencionadas en la parte inferior de la gráfica.

DL<sub>50</sub> obtenidos a partir de las figuras 8 y 9 fueron de 226 y 226.2  $\mu$ M para las cepas WB y P-1 respectivamente. En la figura 10 se aprecia que no hay una diferencia en los valores obtenidos entre las dos cepas. Una posible explicación al hecho de que algunos trofozoitos no presentaban tinción puede deberse a que la concentración de FDA se debía incrementar para que las células presentaran fluorocromasia o bien a que la actividad enzimática de las esterasas no era adecuada para poder hidrolizar el FDA y formar la fluoresceína.

**3.4. Incorporación de timidina tritiada [<sup>3</sup>H-TdR] :** En el presente trabajo se hicieron adaptaciones a los métodos reportados por Borcham *et al* (1984) y Farthing (1987), en donde la optimización de esta técnica requirió inicialmente estandarizar el número de trofozoitos y el tiempo de incubación con el nucleótido radioactivo en ausencia de fármaco. Para ello, se probaron distintos inóculos celulares abarcando desde  $5.5 \times 10^4$ ,  $4.4 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  trofozoitos/ml adicionándoles <sup>3</sup>H-TdR (12.51  $\mu$ Ci/ml) y realizando las cosechas a un intervalo desde 2 hasta 8 horas, para posteriormente realizar lecturas en un contador de centelleo de líquidos.

Los resultados de la figura 7 mostraron que hay una tendencia directamente proporcional entre el transcurso del tiempo de incubación y el aumento en la incorporación de <sup>3</sup>H-TdR hacia el material genético (DNA) de *Giardia*, resultando ser el inóculo óptimo  $1 \times 10^6$  trofozoitos, ya que conforme transcurría el tiempo se incrementaba linealmente la incorporación durante las 8 hrs probadas. Incluso, en el análisis estadístico se encontró un coeficiente de correlación de 0.96, en tanto que el análisis de regresión lineal mostró que a partir de 1.2 hrs se tuvo una incorporación del 50 % del nucleótido radioactivo, descartándose los inóculos de  $4.4 \times 10^5$  trofozoitos/ml ( $r=0.68$ ) y  $5.5 \times 10^4$  trofozoitos/ml ( $r=0.76$ ) por una falta de linealidad, además de que en este último inóculo celular la adición del fármaco dañaría seriamente los trofozoitos, dando como consecuencia lecturas bajas de incorporación del nucleótido radioactivo. Por otro lado se decidió seleccionar como tiempo de incubación óptimo para nuestros propósitos el de 2

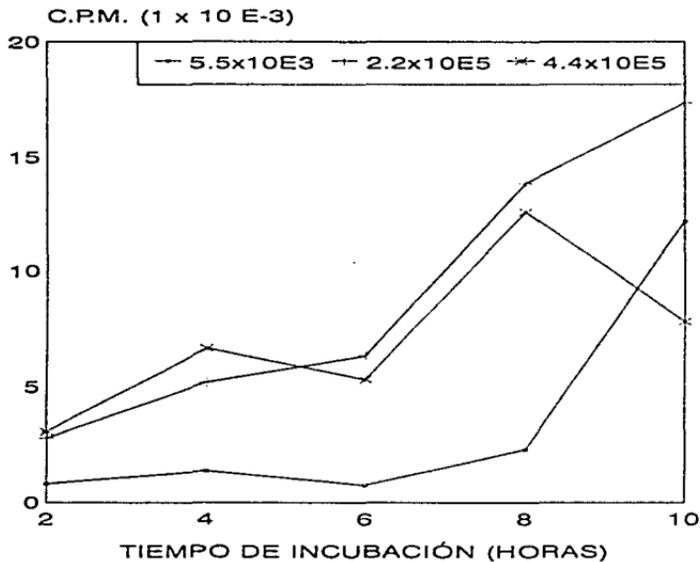


FIGURA 7. Relación entre la incorporación de  $^3\text{H-TdR}$  y el inóculo celular de trofozoitos de *Giardia duodenalis* (cepa WB) en cultivos *in vitro* del parásito. Se inocularon  $5.5 \times 10^3$ ,  $2.2 \times 10^5$  y  $4.4 \times 10^5$  trofozoitos/ml de *Giardia* en viales que contenían medio TYI-S-33 y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 hrs, posteriormente se adicionaron  $12.51 \mu\text{Ci/ml}$  del nucleótido, enseguida se cosecharon los parásitos a las 2, 4, 6, 8 y 10 hrs después de iniciados los cultivos, efectuando las lecturas en un contador de centelleo de líquidos (Modelo Beckman 6000). Los puntos en dicha gráfica representan el promedio de experimentos realizados por duplicados en un mismo día.

hrs, el cual fue el mínimo necesario para detectar incorporación significativa del nucleótido, esto con base en el análisis estadístico mencionado (Cruz, 1996).

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas para realizar estos experimentos, se expusieron los trofozoitos a metronidazol y se incubaron con el nucleótido radiactivo para posteriormente medir la incorporación de éste al núcleo de las células mediante lecturas en un contador de centelleo de líquidos. A partir de las figuras 8 y 9 se obtuvieron los valores de  $DL_{50}$  después de haber realizado un análisis de regresión lineal para las cepas WB y P-1, siendo éstos de 221.5 y 217.4  $\mu M$  respectivamente. Como se puede apreciar en la figura 10 y también por el análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad de las dos cepas de *G. duodenalis* al exponerse a metronidazol. Este ensayo es rápido, siendo sus ventajas el ser un método parcialmente automatizado que permite el manejo de muchas muestras, pero es costoso porque requiere de nucleótidos radioactivos y equipo especial (contador de centelleo de líquidos).

**3.5. Reducción de sales de tetrazolio [MTT] :** En este trabajo se hicieron modificaciones al método reportado por Mosmann (1983), en donde el ensayo tradicional implica lisar las células para liberar el formazán insoluble en agua y solubilizarlo en alcohol-ácido (isopropanol-HCl) para posteriormente efectuar lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro. En este caso, se decidió no lisar las células y se efectuó el recuento de los trofozoitos que ya tenían precipitado el formazán en el interior de su citoplasma, lo cual era indicativo de viabilidad, mientras que las células que no presentaban dicha granulación indicaban que éstas no eran viables. Lo anterior se representa en las fotomicrografías de la figura 6. Al realizar la graficación de las curvas dosis-respuesta y aplicar el método de mínimos cuadrados, cuya ecuación general está dada por la expresión  $y = a + bx$ , en la cepa WB fue establecida en la forma  $y = 76.5127 - 0.4433x$ , en donde se obtuvo un coeficiente de correlación  $r = -0.92$

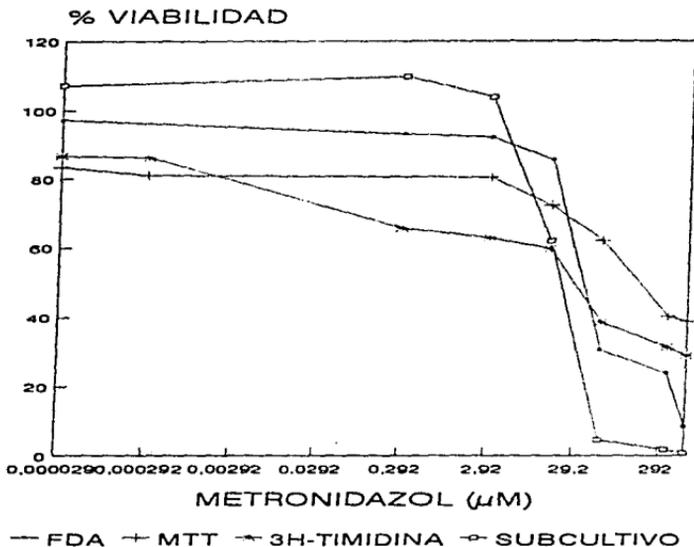
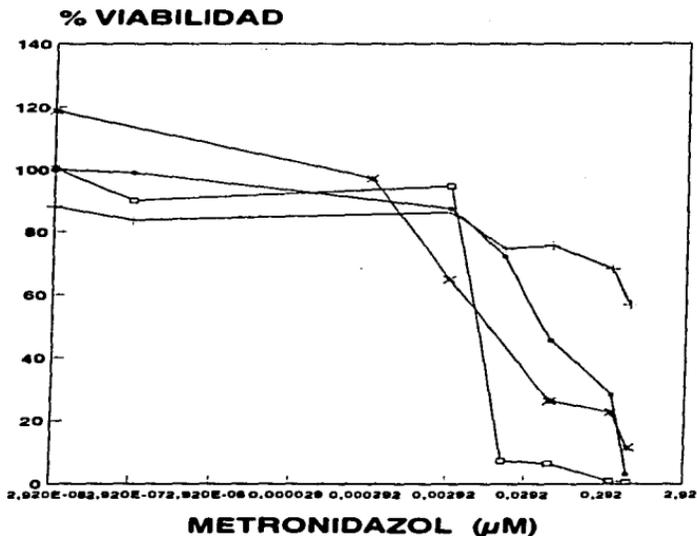


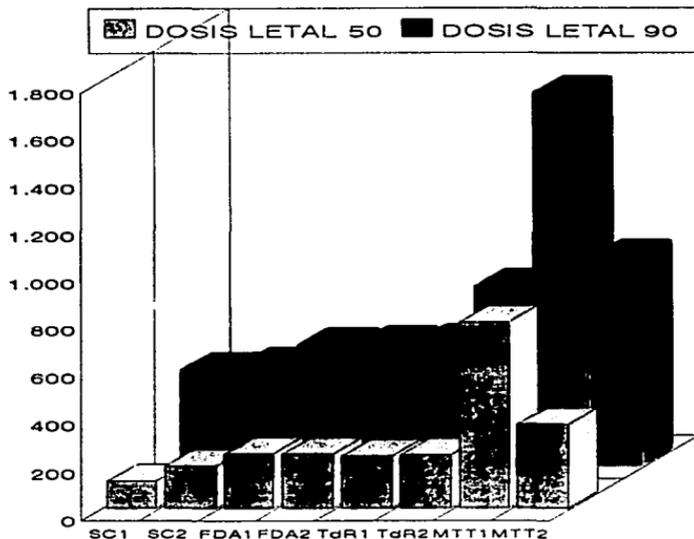
FIGURA 8. Determinación de la viabilidad en trofozoitos de *Giardia duodenalis* cepa WB expuestos a metronidazol empleando varios métodos. Se inocularon  $2.2 \times 10^5$  trofozoitos/ml y se les adicionaron diferentes concentraciones de metronidazol, posteriormente se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas. La cuantificación de la viabilidad se realizó utilizando las técnicas indicadas en la parte inferior de la gráfica de acuerdo a lo descrito en material y métodos. En dicha gráfica cada punto representa el promedio de experimentaciones realizadas por triplicado. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los métodos de FDA-PI, 3H-Timidina y subcultivo con una  $P < 0.05$ .



— FDA — MTT — 3H-TIMIDINA — SUBCULTIVO

FIGURA 9. Determinación de la viabilidad en trofozoítos de *Giardia duodenalis* cepa P-1 expuestos a metronidazol empleando diferentes métodos. Se inocularon  $2.2 \times 10^5$  trofozoítos/ml y se les adicionaron diferentes concentraciones de metronidazol, posteriormente se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas. El monitoreo de la viabilidad se hizo empleando las técnicas indicadas en la parte inferior de la gráfica y de acuerdo a lo descrito en material y métodos. Los puntos en dicha gráfica representan el promedio de experimentos realizados por triplicado en un mismo día. No se presentaron diferencias significativas entre los métodos de FDA-PI, 3H-timidina y subcultivo con  $P < 0.05$

## DOSIS LETAL ( $\mu\text{M}$ )



## METODO

FIGURA 10. Comparación de los datos sobre viabilidad en trofozoitos de *Giardia duodenalis* expuestos al metronidazol *in vitro* y evaluado por diferentes métodos. A partir de los datos presentados en las Figuras 8 y 9, se determinaron los valores de DL50 y DL90 para cada uno de los métodos empleados, en donde SC1 = subcultivo en medio líquido cepa P-1, SC2 = subcultivo en medio líquido cepa WB, de manera global el número 1 indica que se utilizó la cepa P-1, en tanto que el número 2 indica la cepa WB, FDA = tinción con colorantes fluorogénicos, TdR = incorporación de timidina tritiada, MTT = reducción de sales de tetrazolio.

De las figuras 8 y 9 se obtuvieron como valores de  $DL_{50}$  para la cepa WB 349  $3 \mu M$  y para la cepa P-1 de  $780.1 \mu M$ , y al cotejar estos resultados con los obtenidos en las otras pruebas de viabilidad utilizados se comprobó que fue el ensayo menos sensible, y se descartó al igual que el subcultivo en medio semisólido. Esto obedeció a que se obtuvieron valores muy elevados de  $DL_{50}$ , apreciándose diferencias verdaderamente significativas en los valores obtenidos en las dos cepas analizadas, lo cual no sucedió con las otras metodologías, por lo que se sugiere que dicho método analítico no es confiable para la determinación de la viabilidad celular. Sin embargo, cabe mencionar que a pesar de ser inadecuada, esta técnica tiene ciertas ventajas como son la facilidad de realización, que permite el manejo rápido de las muestras y que es un ensayo cualitativo que visualmente indica en donde se encuentra un 100 % de viabilidad ó un 100 % de mortalidad celular.

De manera general, estos datos sugieren que el método óptimo para evaluar la viabilidad fue el subcultivo en medio líquido, siendo ensayos alternativos la incorporación de timidina tritiada y la tinción de colorantes fluorogénicos ( $P < 0.05$ ) en las dos cepas analizadas (Figuras 8 y 9), caracterizándose estos ensayos por ser altamente reproducibles y sensibles, sugiriendo que el mecanismo de acción citotóxico de este fármaco es inicialmente bioquímico y tiene efectos inmediatos a nivel fisiológico. De manera particular, las curvas del ensayo de MTT presentó decrementos de viabilidad más graduales, por lo que su sensibilidad fue menor. La finalidad de comparar los diferentes métodos de viabilidad fue para determinar cual de ellos nos permitía obtener valores de  $DL_{50}$  confiables bajo nuestras condiciones experimentales.

Para el desarrollo de las siguientes estrategias metodológicas, se seleccionó el ensayo de tinción con colorantes fluorogénicos (FDA-PI) por razones prácticas siendo la más representativa el corto tiempo de procesamiento en cada muestra, descartándose al subcultivo en medio líquido y la incorporación de timidina tritiada ( $^3H$ -TdR) por las limitantes antes mencionadas.

**4. Obtención de DL<sub>50</sub> y MIC de diversos fármacos del grupo de los 5-Ni :** Durante la realización del presente estudio, se decidió hacer una evaluación comparativa de la eficacia farmacológica de los diversos agentes antiprotozoarios utilizados en este trabajo, específicamente del grupo de los 5-Ni, tomándose como parámetro de confrontación las DL<sub>50</sub> y MIC, empleando como modelo al parásito *G. duodenalis*.

Así,  $2.2 \times 10^5$  trofozoitos de *Giardia* se expusieron a diferentes fármacos: dimetridazol, metronidazol, ornidazol, ronidazol, secnidazol y tinidazol, en un intervalo de concentraciones amplio durante 24 horas, para enseguida realizar la cuantificación de viabilidad en cada caso, y posteriormente obtener los valores de los parámetros mencionados anteriormente.

Los resultados obtenidos (Figura 11) muestran las diferentes curvas dosis-respuesta para los fármacos utilizados, las cuales presentaron una tendencia sigmoidea clásica y éstas presentaron distintas pendientes, lo cual en parte indica las diferencias en la eficacia de los fármacos probados en este trabajo. A partir de las tangentes del ángulo de inclinación de las curvas, se realizó un análisis de regresión lineal y se obtuvieron los datos presentados en la Tabla VI, y que son los valores de DL<sub>50</sub> y MIC para los fármacos utilizados. De acuerdo con éstos, existió una mayor actividad citotóxica del ornidazol la cual fue equiparable con el tinidazol, siendo de efectividad intermedia el ronidazol, secnidazol y dimetridazol, en tanto que el menos efectivo fue el metronidazol bajo estas condiciones. De los agentes antiparasitarios comúnmente empleados para el tratamiento de la giardiasis, esto es, el metronidazol y el tinidazol, el primero fue el menos efectivo bajo las condiciones empleadas, y el segundo se caracterizó por ser uno de los 5-Ni más activos. Debido a esto último se eligieron éstos para realizar estudios posteriores con el fin de discernir si estos resultados se debieron a la presencia de distintas poblaciones del parásito o bien a un efecto propio del fármaco. Por otro lado, al determinar el índice citotóxico (MIC/DL<sub>50</sub>) en los seis derivados del 5-Ni utilizados en el presente trabajo, se observó un

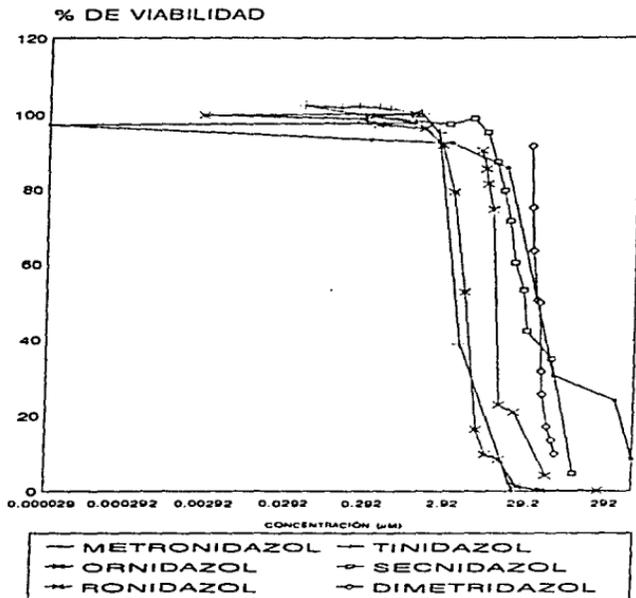


FIGURA 11. Efecto dependiente de la dosis de seis derivados del 5-NI sobre la viabilidad de trofozoitos de *Giardia duodenalis*.  $2.2 \times 10^5$  trofozoitos/ml de la cepa WB se cultivaron en presencia de diversas concentraciones de cada uno de los 5-NI incubándose a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 hrs. El efecto citotóxico se evaluó mediante la técnica de tinción con FDA-PI. En la gráfica los puntos del metronidazol, tinidazol, ornidazol y secnidazol representan cuantificaciones de aproximadamente 300 células en tres experimentos realizados en días distintos mientras que para el ronidazol y dimetridazol los valores corresponden al recuento de aproximadamente 300 células durante un día.

rango bastante estrecho en dichos valores abarcando un intervalo desde 1.60 hasta 2.56 (Tabla VI).

**TABLA VI. ACTIVIDAD *in vitro* DE SEIS DERIVADOS DEL 5-NITROIMIDAZOL CONTRA TROFOZOITOS DE *Giardia duodenalis* (CEPA WB).**

COMPUESTO	DL <sub>50</sub> (μM)	MIC (μM)	MIC / DL <sub>50</sub>
Ornidazol	5.18	9.10	1.75
Tinidazol	8.65	19.30	2.23
Ronidazol	13.13	21.58	1.64
Secnidazol	24.46	43.41	1.77
Dimetridazol	38.27	61.58	1.60
Metronidazol	226.00	579.31	2.56

Esto último probablemente debido a la similitud de las estructuras base, sugiriendo que éste no se relaciona con la efectividad posológica de los fármacos como sería el caso de la relación DL<sub>50</sub> / MIC, aunque ésta sí puede funcionar como un parámetro útil para determinar la potencia parasiticida de los fármacos.

**5. Análisis transversal de la sensibilidad de cepas de referencia, aislados mexicanos y clones de *Giardia duodenalis* expuestos al metronidazol y tinidazol :** Un objetivo del presente estudio fue comparar la sensibilidad de cepas de referencia y aislados mexicanos de humanos y clones obtenidos a partir de ellos ante fármacos del tipo 5-nitroimidazol, para lo cual los trofozoitos se incubaron con una DL<sub>50</sub> del metronidazol o tinidazol determinada en ensayos previos durante 24 horas. Posteriormente se evaluó el efecto

citotóxico en los trofozoitos al determinar el porcentaje de viabilidad empleando la técnica de tinción con colorantes fluorogénicos.

De esta manera, en la figura 12 se puede observar que en la cepa de referencia WB y sus respectivas clonas presentaron una tolerancia generalmente alta al metronidazol no descartándose un comportamiento heterogéneo en éstas, esto es, sensibles y tolerantes. Con el tinidazol ocurrió lo contrario debido probablemente al origen de dicha cepa, la cual fue obtenida a partir de un paciente con un cuadro perfectamente establecido de giardiasis que fue tratado inicialmente con metronidazol y éste fue inefectivo. Por otra parte, la cepa P-1 tuvo un comportamiento más homogéneo con el tinidazol mostrándose tolerante a éste, en tanto que con el metronidazol se obtuvo una respuesta más heterogénea en su sensibilidad. En la tabla VII se aprecia el rango del porcentaje de viabilidad obtenidos en estas líneas.

**TABLA VII. VARIABILIDAD EN LA SENSIBILIDAD *in vitro* DE TROFOZOITOS DE *Giardia duodenalis* DE CLONAS OBTENIDAS DE DISTINTOS AISLADOS Y CEPAS EXPUESTAS A DL<sub>50</sub> DE METRONIDAZOL Y TINIDAZOL.**

AISLADO DEL QUE SE OBTUVIERON LAS CLONAS	RANGO DEL PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LAS CLONAS	
	METRONIDAZOL (DL <sub>50</sub> = 226µm)	TINIDAZOL (DL <sub>50</sub> = 8.65 µM)
WB	2.82-100 %	2.41-39.43 %
P-1	25.08-99.50 %	42.57-100 %
IMSS-2	43.62-99.68 %	24.59-99.06 %
IMSS-3	3.56-100 %	6.16-99.43 %
CIEA-10	97.35-100 %	91.53-100 %
CIEA-52	1.52-98.39 %	0.00-72.74 %

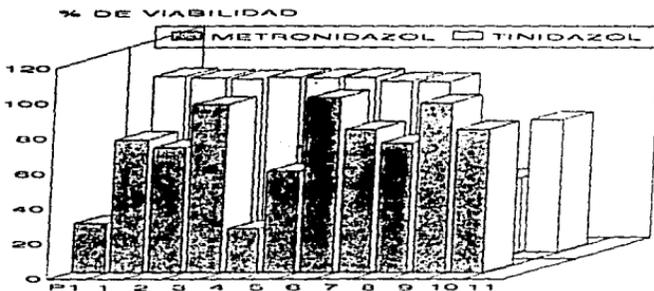


FIGURA 12. Análisis transversal sobre la sensibilidad al metronidazol y tinidazol en trofozoitos de *Giardia duodenalis* (cepas WB y P-1, y clones de éstas).  $2.2 \times 10^5$  trofozoitos/ml de *Giardia* se cultivaron con DL50 de metronidazol ( $220 \mu\text{M}$ ) y tinidazol ( $8.85 \mu\text{M}$ ) incubándose a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 hrs. Posteriormente la determinación del efecto citotóxico se realizó empleando la técnica de tinción con colorantes fluorogénicos (FDA-PI). En el eje de las ordenadas se indican por números la clona de las cepas utilizadas.

Por su parte, en los aislados mexicanos IMSS-2 e IMSS-3 también se presentó el mismo fenómeno que en las cepas antes mencionadas, e incluso en el segundo aislado el porcentaje de viabilidad ante ambos fármacos probados fue muy heterogéneo (Tabla VII, Figura 13). Para los aislados mexicanos CIEA-10 y CIEA-52 se destaca el comportamiento del primero, dado que sus clones presentaron una tolerancia muy alta para los fármacos empleados (Figura 14), mientras que las clones del aislado CIEA-52 tuvieron una sensibilidad completamente diferencial, esto es, algunas fueron muy sensibles, otras presentaron sensibilidad intermedia y las restantes fueron tolerantes.

Al presentarse una gran variabilidad en el comportamiento de sensibilidad ante estos fármacos del grupo de los 5-Ni (Figs. 12 a 14) se decidió establecer una clasificación que permitiera catalogar a las células con base en su respuesta diferencial manifestada a los fármacos probados, esto es, sensibilidad o tolerancia, siendo

0-40 % de viabilidad : Sensibles ( S )

40-70 % de viabilidad : Sensibilidad intermedia ( SI )

> 70 % de viabilidad : Tolerantes ( T )

Este criterio se aplicó para seleccionar aislados y clones para un estudio longitudinal posterior en el cual se representaron los diferentes patrones de sensibilidad. De esta forma, los cultivos seleccionados fueron los que se presentan a continuación.

Así, estos datos sugirieron que las clones derivadas de cepas de referencia y aislados mexicanos estuvieron compuestas de diferentes poblaciones de parásitos de *Giardia duodenalis*, caracterizadas por las diferencias significativas en su sensibilidad al metronidazol y al tinidazol *in vitro*. Por consiguiente, se decidió realizar este tipo de valoración en forma longitudinal en cultivos continuos del parásito.

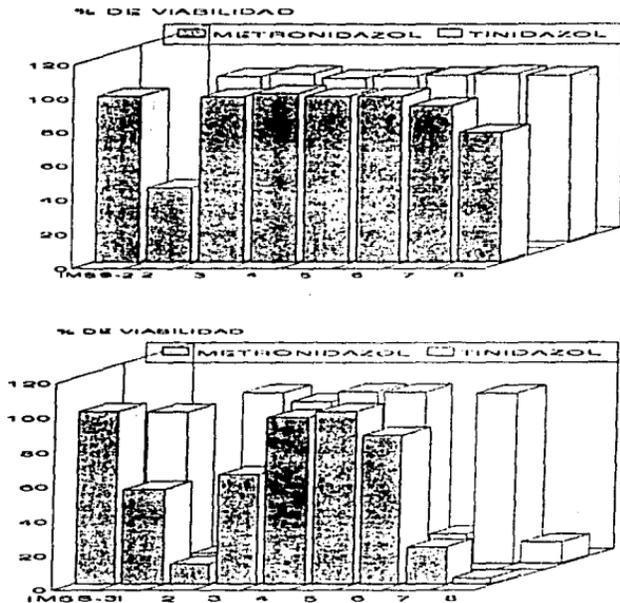


FIGURA 13. Análisis transversal sobre la sensibilidad al metronidazol y tinidazol en trofozoitos de *Giardia duodenalis* de los aislados IMSS-2 e IMSS-3 con sus respectivas clones.  $2.2 \times 10^5$  trofozoitos/ml de *Giardia* se incubaron con DL50 de metronidazol y tinidazol incubándose a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 hrs. En seguida se realizó la cuantificación de la viabilidad mediante el ensayo de tinción con colorantes fluorogénicos (FDA-PI). En el eje de las ordenadas el número indica la clona del aislado utilizado.

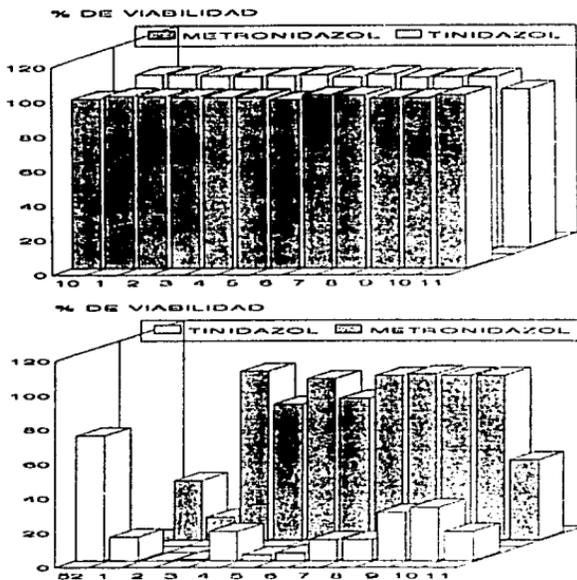


FIGURA 14. Análisis transversal sobre la sensibilidad al metronidazol y tinidazol en trofozoitos de *Giardia duodenalis* de los aislados CIEA-10 y CIEA-52 con sus respectivas clones.  $2.2 \times 10^5$  trofozoitos/ml de *Giardia* se incubaron en presencia de DL50 de metronidazol y tinidazol durante 24 hrs a  $37^\circ\text{C}$ . Para determinar la sensibilidad ante los fármacos de la familia de los 5-Ni en trofozoitos de dichos aislados se siguió el protocolo de tinción con colorantes fluorogénicos (FDA-PI). En el eje de las ordenadas los números indican las clones de los aislados utilizados.

CEPAS, AISLADOS Y CLONAS	SENSIBILIDAD (%)	
	METRONIDAZOL	TINIDAZOL
WB-1	2.82 (S)	39.43 (S)
WB-2	74.06 (T)	24.33 (S)
WB-12	99.69 (T)	25.51 (S)
P-1	28.17 (S)	25.51 (S)
P1-6	99.50 (T)	100 (T)
P1-8	73.94 (T)	63.46 (SI)
P1-9	96.75 (T)	42.57 (SI)
IMSS-2	98.07 (T)	24.59 (S)
I2-2	43.62 (SI)	97.66 (T)
I2-7	92.30 (T)	99.01 (T)
IMSS-3	100 (T)	87.82 (T)
I3-5	100 (T)	99.16 (T)
I3-7	21.58 (S)	98.48 (T)
I3-8	3.56 (S)	12.5 (S)

Así, estos datos sugirieron que las clonas derivadas de cepas de referencia y aislados mexicanos estuvieron compuestas de diferentes poblaciones de parásitos de *Giardia duodenalis*, caracterizadas por las diferencias significativas en su sensibilidad al metronidazol y al tinidazol *in vitro*. Por consiguiente, se decidió realizar este tipo de valoración en forma longitudinal en cultivos continuos del parásito.

6. Valoración longitudinal de la susceptibilidad a DL<sub>50</sub> de metronidazol y tinidazol en trofozoítos de cepas, aislados y clonas de *Giardia duodenalis* : Una vez seleccionados los aislados y clonas mencionadas en el apartado anterior, se decidió analizar la sensibilidad de éstos ante el metronidazol y tinidazol durante un periodo de tiempo determinado, al ser mantenidos en cultivo continuo. Para ello se realizaron cosechas y resiembras de los organismos en periodos definidos (cada 96 horas) hasta que se cumplieron 35 días. El monitoreo del porcentaje de viabilidad se hizo mediante la técnica de tinción con colorantes fluorogénicos (FDA-PI) después de exponerse los parásitos a DL<sub>50</sub> de fármacos representativos del grupo de los 5-Ni.

En general la viabilidad varió drásticamente en todas las líneas celulares de *G. duodenalis* (Figuras 15-18), siendo los patrones de variación más representativos los del aislado WB y la clona WB-12, debido a que presentaron descensos y ascensos graduales de sensibilidad ante los fármacos probados, presentándose algunas veces cambios repentinos como el mostrado por WB-1 (Figura 15). En el caso de la cepa de referencia P-1 se observaron caídas repentinas en la sensibilidad al metronidazol en los cultivos P-1 y P-1(8), mientras que la P-1(6) mostró incrementos graduales presentando una tendencia a mantenerse tolerante. Con el tinidazol se observó que la cepa P-1 y la clona P-1(9) mostraron ascensos y descensos graduales en el porcentaje de viabilidad, siendo notorio que la clona P-1(6) presentó durante 20 días un comportamiento con ascensos y descensos graduales y posteriormente manifestó cambios repentinos al aumentar su tolerancia por dicho fármaco (Figura 16). Con lo que respecta al aislado IMSS-2, cuando fue expuesto al metronidazol se observó que la clona I-2(2) presentó un fenotipo tolerante al mantenerse así durante aproximadamente 24 días, en tanto que la clona I-2(7) presentó ascensos graduales con una tendencia a tolerar dicho fármaco. Con el tinidazol existió un comportamiento en general con ascensos y descensos graduales en la sensibilidad, sin presentar esta clona una estabilidad tolerante ni sensible ante el metronidazol (Figura 17). Conforme a lo obtenido con el aislado IMSS-3, se observó que cuando se exponían ante el metronidazol clonas

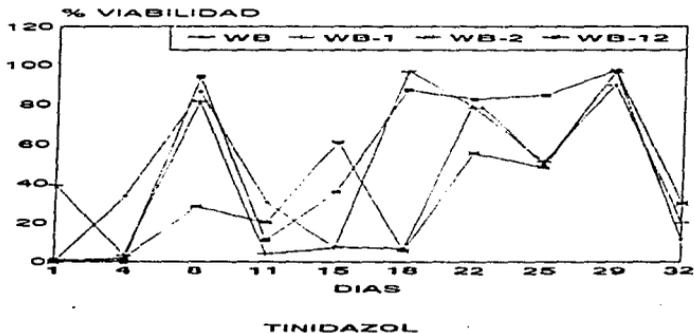
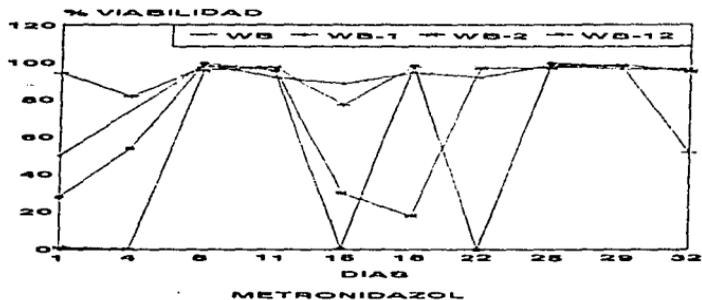


FIGURA 15. Análisis longitudinal de la sensibilidad *in vitro* de trofozoítos de la cepa WB y clones de ésta expuestas a DL50 de metronidazol y tinidazol.  $2.2 \times 10^5$  trofozoítos de *Giardia* se inocularon en viales conteniendo medio TYI-S-33 y metronidazol ( $226 \mu\text{M}$ ) ó tinidazol ( $8.65 \mu\text{M}$ ) y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas. El monitoreo de la viabilidad a drogas se realizó en cada cosecha mediante la técnica de tinción con FDA-PI. En la gráfica los puntos representan la cuantificación de aproximadamente 300 células.

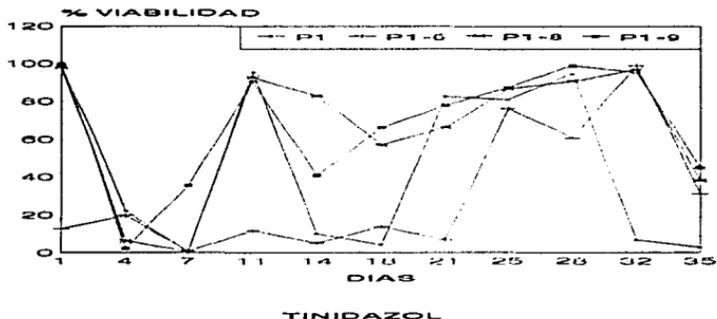
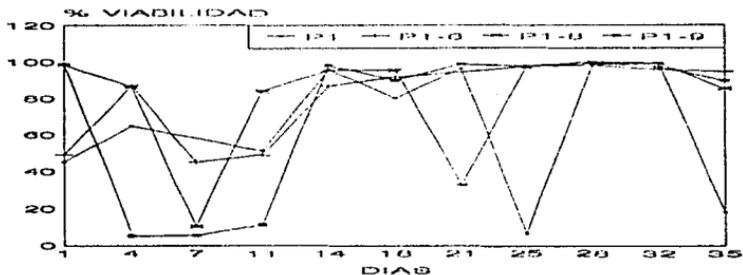
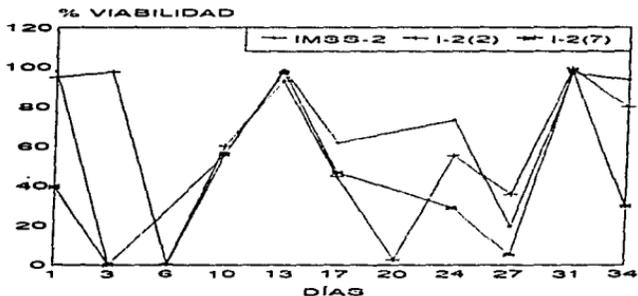
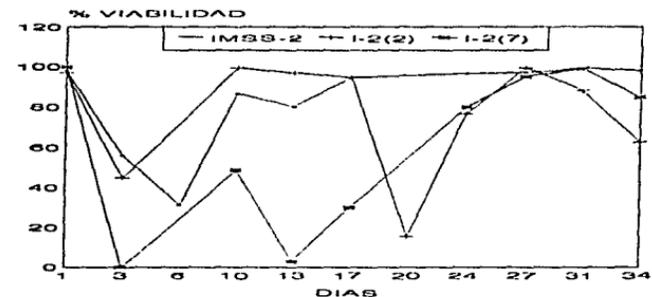


FIGURA 16. Análisis longitudinal sobre la sensibilidad in vitro hacia trofozoitos de *Giardia duodenalis* cepa P-1 y clones de ésta expuestas a DL50 de metronidazol y tinidazol.  $2.2 \times 10^5$  trofozoitos/ml de *Giardia* se inocularon en viales conteniendo medio TYI-S-33 y la DL50 de metronidazol y tinidazol incubándose a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas. La evaluación de la sensibilidad a dichos agentes farmacológicos se realizó en las condiciones especificadas en material y métodos. En la gráfica los puntos representan la cuantificación de aproximadamente 300 células. De acuerdo al estadístico aplicado no hubieron diferencias significativas  $P < 0.05$

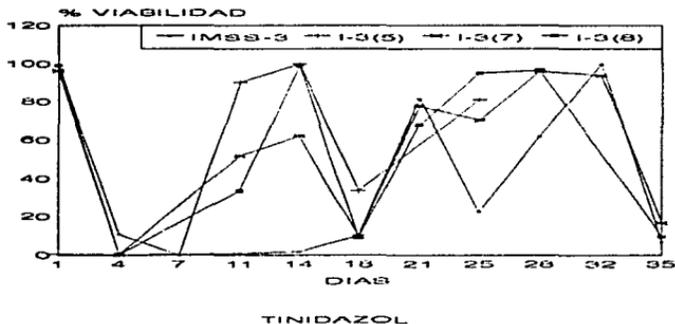
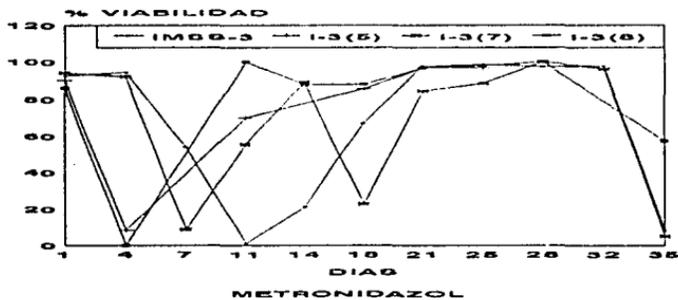


**FIGURA 17.** Análisis longitudinal de la sensibilidad *in vitro* de trofozoitos de *Giardia duodenalis* del aislado IMSS-2 y clones de éste expuestos a DL50 de metronidazol y tinidazol.  $2.2 \times 10^5$  trofozoitos/ml de *Giardia* se inocularon en viales conteniendo medio TYI-S-33 y metronidazol ( $226 \mu\text{M}$ ) ó tinidazol ( $8.65 \mu\text{M}$ ) y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas. El monitoreo de la viabilidad a drogas se realizó en cada cosecha mediante la técnica de tinción con FDA-PI. En la gráfica los puntos representan la cuantificación de aproximadamente 300 células. No se presentaron diferencias significativas  $P < 0.05$

como I-3(3) se manifestaron ascensos graduales con una tendencia a mantenerse estable con un fenotipo tolerante. En el caso de la clona I-3(7) hubieron variaciones periódicas en la sensibilidad a este fármaco, sin tener la capacidad de mantener una estabilidad en cuanto a sensibilidad o tolerancia se refiere. Cuando se expuso al tinidazol, la clona I-3(3) presentó un comportamiento estable sensible a dicho fármaco durante aproximadamente 10 días, presentando posteriormente ascensos y descensos graduales de viabilidad. Las demás clonas utilizadas mostraron una variación periódica en la sensibilidad a dicho agente antiparasitario sin mantener una estabilidad de comportamiento ya sea tolerante o sensible (Figura 18).

De forma general, todos los aislados presentaron una gran variabilidad a los dos agentes parasitarios probados con cambios graduales en la sensibilidad, en donde la gran mayoría de clonas no mantenían un comportamiento estable para manifestar un fenotipo ya sea tolerante o sensible. Solamente en casos específicos se observaron cultivos que tenían la capacidad de mantener temporalmente dichas características [p.e. WB, P-1(8), IMSS-2(2), IMSS-3(3)] al ser expuestos al metronidazol, mostrando una tendencia a mantenerse tolerantes. Por su parte, las clonas P-1(6) e IMSS-3(3) expuestas ante tinidazol tuvieron un comportamiento contrario, esto es, presentaron un comportamiento sensible. Estos resultados son interesantes dado que pueden sugerir que el uso indiscriminado del metronidazol puede propiciar cambios moleculares en los parásitos expuestos y generar casos refractarios al tratamiento de la parasitosis.

En función de los datos obtenidos en el análisis estadístico (diseño en bloques completamente azarizados) se determinó que, independientemente de la cepa o clona analizadas, las variaciones en la sensibilidad representaron una característica de las poblaciones obtenidas en cada cosecha ( $P < 0.05$ ).



**FIGURA 15.** Análisis longitudinal de la sensibilidad *in vitro* de trofozoitos de *Giardia duodenalis* del aislado IMSS-3 y clones de éste expuestos a DL50 de metronidazol y tinidazol. La cuantificación de la viabilidad se realizó de acuerdo a lo especificado en la Figura 15. No se encontraron diferencias significativas  $P < 0.05$

**7. Obtención de líneas resistentes de *G. duodenalis* por varios mecanismos (físicoquímico, fisiológico y espontáneo) :** El propósito de esta fase del estudio consistió en la inducción de la resistencia anaeróbica a metronidazol *in vitro*. Para lograr dicho objetivo se ensayaron varios protocolos, y éstos incluyeron los siguientes:

**7.1. Selección inducida por fármaco :** Las cepas WB y P-1 resistentes al metronidazol fueron obtenidas después de cultivarlas durante aproximadamente 10 meses bajo concentraciones ascendentes graduales del fármaco, logrando obtener 31.20 incrementos de dosis con el metronidazol para las cepas WB y P-1 (Tabla VIII). Por otra parte, con el tinidazol fue más difícil aumentar la concentración, no obstante, se obtuvieron 46.5 dosis de incrementos para ambas cepas de referencia (Tabla VIII). Durante el desarrollo de la resistencia es importante mencionar que nunca se presentó una alteración morfológica en el parásito, lo cual en cierta manera indicó que las células entraban a la división y eran capaces de completar su citocinesis. Asimismo, conforme se iban aumentando las concentraciones en cualquiera de los dos 5-Ni probados, se presentaron varias etapas similares involucrando una replicación lenta de los trofozoitos, tardando más de 96 horas en llegar a una confluencia del 100 %. Así, conforme las células se adaptaban al cultivo, había un mejoramiento y estabilización en las propiedades de su crecimiento. Este ensayo es el más adecuado y confiable para tratar de inducir resistencia *in vitro* en una diversidad de fármacos, pero concomitantemente tiene como desventaja que requiere de periodos prolongados de cultivo continuo para poder obtener el fenotipo deseado.

**7.2. Mutagénesis :** La metodología se siguió tal y como se describió en material y métodos, en donde después de someterse los trofozoitos a tratamiento con luz U.V. se logró que la cepa P-1 tolerara una concentración máxima de 5.84  $\mu\text{M}$  de metronidazol, la cual fue una dosis alta comparándola con el método de cultivo en presencia constante de

fármaco, la cual al inicio fue baja. Asimismo, se observó que al tratar de incrementar dicha dosis en la cepa P-1, los trofozoitos no soportaron tales condiciones adversas y los cultivos no progresaron, por lo que no se pudo continuar con la inducción de resistencia empleando esta metodología.

7.3. Espontánea : Tomando en cuenta los resultados obtenidos en el estudio longitudinal se decidió no seleccionar ninguna cepa, aislado o clona debido a la inestabilidad en el comportamiento tolerante o sensible ante el metronidazol ó tinidazol. Por consiguiente, se descartó este método y se optó por transcurrir a los restantes para seleccionar los cultivos adecuados para los estudios siguientes.

**TABLA VIII. HISTORIA DE LAS LÍNEAS RESISTENTES AL METRONIDAZOL Y TINIDAZOL DE LAS CEPAS WB Y P-1 DE *Giardia duodenalis* INDUCIDAS POR SELECCIÓN EN PRESENCIA DE FÁRMACO.**

CEPA	FÁRMACO	TIEMPO REQUERIDO PARA LA INDUCCIÓN (DÍAS)	RANGO [FÁRMACO] ( $\mu\text{M}$ )	DOSIS DE INCREMENTOS
WB	MTZ	331	0.29-9.05	31.20
P-1	MTZ	331	0.29-9.05	31.20
WB	TNZ	427	0.04-1.86	46.5
P-1	TNZ	427	0.04-1.86	46.5

•MTZ = Metronidazol

•TNZ = Tinidazol

8. Cinéticas de incorporación de precursores moleculares durante la replicación, transcripción y traducción en dos líneas de *G. duodenalis* con sensibilidad diferencial al metronidazol : Uno de los objetivos principales en este trabajo fue el tratar de comparar los procesos celulares fundamentales en líneas del parásito con sensibilidades diferenciales, esto es, mediante la utilización de una cepa silvestre y otra con el fenotipo resistente la cual en alguna medida soportaba una concentración alta de fármaco [5.84  $\mu$ M] para evaluar el efecto del metronidazol sobre la replicación del DNA, la transcripción del RNA y la traducción de proteínas; y de esta forma determinar el modo de acción que ejerce el fármaco sobre el parásito bajo estudio.

Con esta finalidad se hicieron mediciones de incorporación de los diferentes nucleótidos radioactivos incubados con  $1 \times 10^6$  trofozoitos de *Giardia* durante un periodo de 24 horas manejándose dos series de tubos. Una serie se utilizó como control, la cual nunca fue expuesta al metronidazol *in vitro* (cepa WB) y la otra (WB-RM) mantenía una tolerancia a dicho 5-Ni ya que era cultivada siempre en presencia de fármaco, aunque antes de iniciar el estudio se le eliminó el agente quimioterápico con la finalidad de poder comparar posibles diferencias metabólicas basales presentes entre cepas.

La capacidad sintetizadora de DNA en *Giardia* se evaluó por la incorporación de  $^3$ H-TdR al núcleo del parásito, pudiendo observarse en la Figura 19 que la cepa silvestre comenzó a sintetizar linealmente su material genético a partir de las 9 hrs logrando tener un porcentaje de viabilidad al finalizar la cinética de 99.68 %, lo cual nos confirmó que el parásito estaba siendo capaz de replicarse, no sucediendo lo mismo con la cepa resistente ya que no se observó un incremento inicial en su síntesis de DNA, notándose un aumento ligero a partir de las 18 hrs. Sin embargo dicha línea no presentó un aumento semejante al de la cepa sensible, considerando estrictamente como parámetro de replicación la incorporación del nucleótido hacia el material genético de *Giardia*. Con respecto a la cuantificación de la viabilidad al finalizar la cinética, éste resultó ser del 95.53 % y ello fue confirmado cualitativamente mediante observaciones de campo realizados a todos los

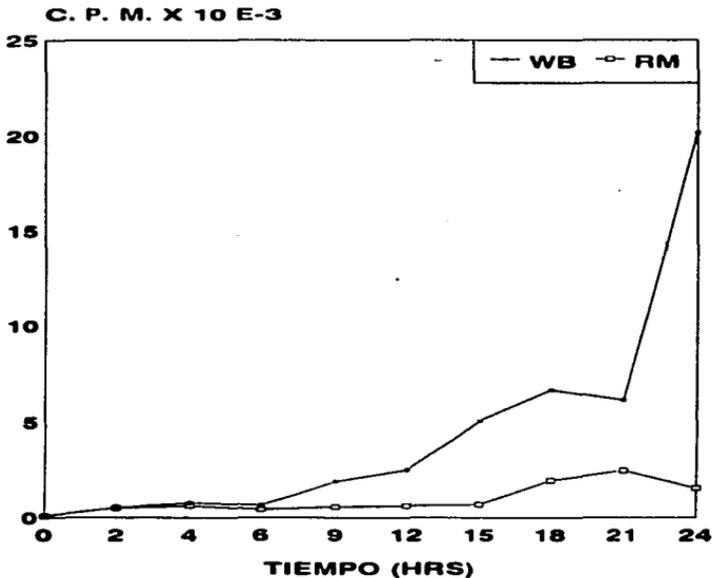


FIGURA 19. Efecto del metronidazol sobre la síntesis de DNA en *Giardia duodenalis*.  $2.2 \times 10^5$  trofozoítos de *Giardia* se marcaron con  $^3\text{H-TdR}$  ( $0.55 \mu\text{Ci/ml}$ ) en medio TYI-S-33. La incorporación del nucleótido radioactivo se efectuó en un contador de centelleo de líquidos (Modelo Beckman 6000). Transcurridas las 24 horas se cuantificó la viabilidad siguiendo el protocolo del FDA-PI descrito en material y métodos. Los puntos en dicha gráfica representan el promedio de experimentos realizados por duplicado en un mismo día. No se encontraron diferencias significativas entre cepas ( $P < 0.05$ ).

viales de experimentación. Esto nos sugiere que la línea resistente presenta diferente metabolización del nucleótido debido probablemente a una baja retoma de éste en sus secuencias o bien a una alteración en el receptor transportador de dicho nucleótido ( $^3\text{H-TdR}$ ). Por otro lado, en base al análisis estadístico aplicado no se encontraron diferencias significativas entre cepas (nivel de significancia  $\alpha=95\%$ ); por otra parte, se seleccionaron algunos tiempos representativos en dicho ensayo encontrándose que a las 6 hrs la probabilidad de obtener diferencias en sus tasas de incorporación del nucleótido radioactivo es del 0.9778, sin embargo a las 18 horas la probabilidad de obtener una diferencia en la captación de  $^3\text{H-TdR}$  entre ambas cepas es del 0.7257.

Con lo que respecta al efecto sobre la síntesis del RNA, la cepa resistente presentó una saturación más rápida en el proceso de transcripción con un pico máximo a las 15 hrs, encontrándose posteriormente un descenso en dicho proceso después del tiempo mencionado (Figura 20). La cepa silvestre mostró un comportamiento bastante semejante con la cepa resistente, siendo su principal diferencia el tiempo de saturación en la síntesis del ácido ribonucleico, en el cual la cepa control presentó un ascenso en la síntesis del RNA a partir de 2 hrs, alcanzando su punto máximo a las 21 hrs y en un tiempo posterior se detuvo este proceso. Por su parte, la cepa resistente saturó su capacidad de síntesis de RNA hacia las 15 hrs. La viabilidad que presentaron la cepa silvestre y la resistente al finalizar dicha experimentación fue de 96.16 % y 99.06 %, respectivamente. En base a la estadística utilizada no se encontraron diferencias significativas entre las dos cepas; sin embargo al aplicar la distribución de la diferencia entre las medias de dos muestras y seleccionando solo algunos tiempos se encontró que la probabilidad de que hallan diferencias en la captación de  $^3\text{H-UdR}$  en ambas cepas es del 0.9834, en tanto que a las 15 hrs la probabilidad es del 0.5832.

En cuanto al efecto del metronidazol sobre la síntesis de proteínas, se modificó la formulación del medio de cultivo TYI-S-33 (Anexo I), al cual sólo se le agregó 0.6 g de cisteína, esto con la finalidad de favorecer la incorporación del aminoácido radioactivo. En

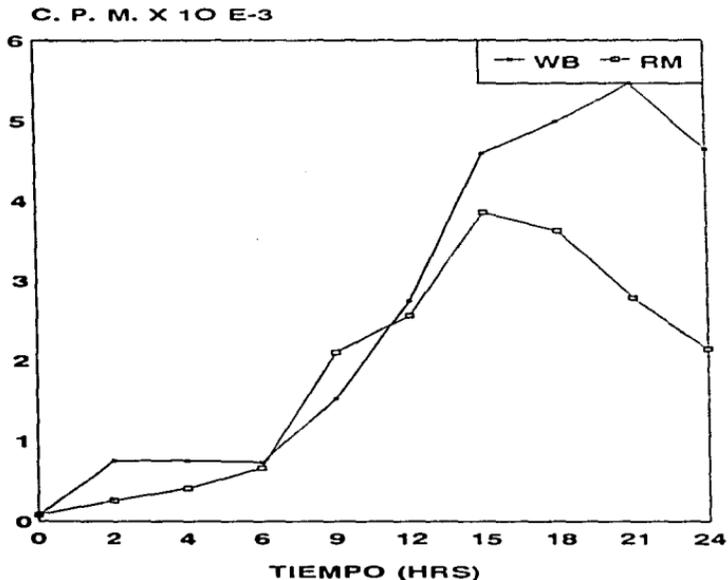


FIGURA 20. Efecto del metronidazol sobre la síntesis del RNA de *Giardia duodenalis*.  $2.2 \times 10^5$  trofozoitos/ml de *Giardia* se incubaron con  $3\text{H-UdR}$  ( $0.55 \mu\text{Ci/ml}$ ) y el monitoreo de la incorporación del nucleótido radioactivo se realizó mediante lecturas en un contador de centelleo de líquidos (Modelo Beckman 6000). Los puntos representan el promedio de dos experimentaciones realizadas en un mismo día. En la parte superior de la gráfica se indican las cepas empleadas. RM = Cepa WB resistente a metronidazol. No se encontraron diferencias significativas entre cepas  $P < 0.05$

la Figura 21 se aprecian claramente las diferencias existentes entre las cepas analizadas. En lo referente a la cepa sensible, se observó en las 2 primeras hrs una tasa de síntesis proteínica alta y a las 7 hrs posteriores se detuvo dicho proceso celular, y nuevamente se disparó esta síntesis a partir de las 21 hrs. En la cepa resistente se presentó un comportamiento muy diferente, ya que durante las primeras 12 hrs iniciales, se presentó una tasa de síntesis prácticamente basal, y a partir de las 15 hrs se disparó este proceso (Figura 21). La cuantificación de la viabilidad al término de dicho estudio mostró valores de 99.33 % para la cepa silvestre, y de 94.58 % para la línea resistente. Con lo que respecta a la estadística aplicada, se encontraron diferencias entre estas cepas con un  $\alpha=95$  %, también en este ensayo se analizó la probabilidad de que hallan diferencias en la retoma de  $^{35}$  S-Cisteína a las 2 hrs es del 0.9922, en tanto que a las 6 hrs fue del 0.5596, mientras que a las 21 hrs se encontró una diferencia del 0.0823.

Tomados en su conjunto estos datos sugieren que la cepa resistente a metronidazol realizó una disminución primaria severa en la tasa de síntesis del DNA, con un efecto ligero cuantitativo en la capacidad de transcripción del RNA, aunque con un efecto secundario severo sobre la tasa de síntesis proteica.

En base al análisis estadístico aplicado a los datos sobre replicación de DNA y síntesis de RNA (diseño en bloques completamente aleatorizado y la prueba de hipótesis: la diferencia entre las medias de dos poblaciones) [Daniels, 1995], se mostró que independientemente de las cepas utilizadas, las diferencias obtenidas en los patrones cinéticos presentados se debieron a características propias de las poblaciones del parásito analizadas ( $P<0.05$ ). Por su parte, la síntesis proteínica presentó diferencias en sus tasas de incorporación de cisteína radioactiva entre ambas cepas ( $P<0.05$ ).

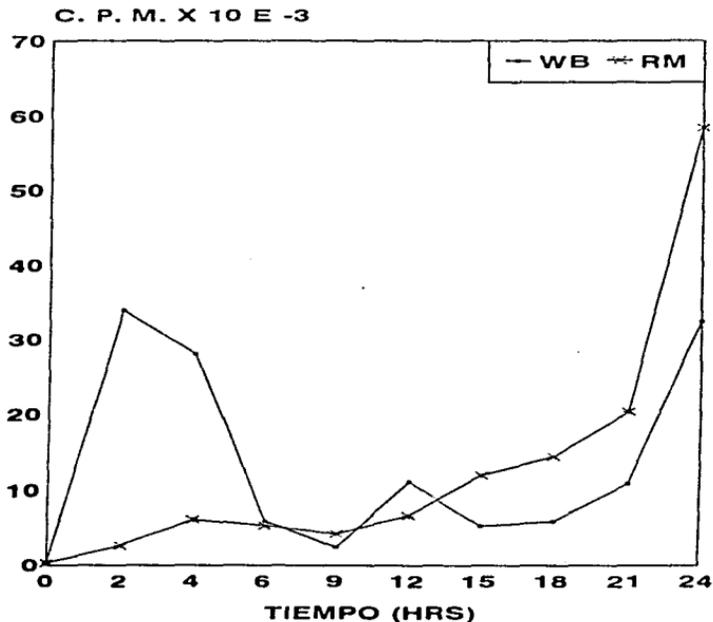


FIGURA 21. Efecto del metronidazol sobre la síntesis de proteínas de *Giardia duodenalis*.  $2.2 \times 10^5$  trofozoitos/ml de *Giardia* se marcaron con  $^{35}\text{S}$ -Cisteína ( $0.55 \mu\text{Ci/ml}$ ) en medio TYI-S-33 con  $0.6 \text{ g}$  de cisteína. La incorporación de la marca radiactiva se realizó mediante lecturas obtenidas en un contador de centelleo de líquidos (Modelo Beckman 6000). A las 24 horas se cuantificó la viabilidad siguiendo el protocolo descrito en material y métodos. Los puntos en la gráfica representan el promedio de experimentos realizados por duplicado en un mismo día. Se encontraron diferencias significativas entre cepas ( $P < 0.05$ ).

## VI. DISCUSIÓN

Durante varias décadas se han realizado diversos estudios involucrados con las variaciones moleculares que presenta el parásito *Giardia duodenalis*. Esto último se ha realizado por una parte con la finalidad de conocer los mecanismos por los cuales dicho parásito logra adquirir la capacidad para sobrevivir ante condiciones adversas no naturales, y por otro lado para diseñar algunas estrategias que ayuden a controlar dicha infección. En este sentido, se ha recurrido principalmente a la quimioterapia y al diseño de nuevos agentes farmacológicos aplicables al tratamiento de la giardiasis.

Tomando en cuenta lo anterior, es importante conocer las interacciones huésped-parásito que ayuden al entendimiento del cuadro clínico que desencadena la giardiasis, estando involucrados factores propios del huésped (estado nutricional e inmunológico, edad, sexo), y también las características intrínsecas del parásito [virulencia, patogenicidad, variabilidad en sus antígenos de superficie (Nash, 1992), susceptibilidad a proteasas intestinales (Nash *et al.*, 1991), diferencias fenotípicas y genotípicas presentes en aislados de diferentes orígenes geográficos y especies (Carnaby *et al.*, 1994), y susceptibilidad a fármacos (McIntyre *et al.*, 1986)]

Dichas investigaciones han podido ser realizadas gracias al desarrollo exitoso del cultivo axénico del parásito (Meyer, 1976) el cual ha sido muy útil para mantener su ciclo vital, esto es el quiste y el trofozoito. En este trabajo se estudio la fase vegetativa del parásito, es decir, el trofozoito, lo cual tiene la ventaja de que esta fase puede mantenerse mediante cultivos continuos *in vitro* por periodos de tiempo indefinidos, mediante la utilización del cultivo TY1-S-33. Este último se caracteriza por ser altamente complejo, siendo algunos de sus componentes principales agentes reductores tales como la cisteína y el ácido ascórbico, sales, antibióticos, amortiguadores de pH, suero, bilis. El empleo de este medio ha permitido realizar estudios farmacológicos, en donde se han analizado aspectos tales

como: el mecanismo de acción, la terapia alternativa para casos refractarios al tratamiento y el papel del parásito al exponerse a fármacos (Smith *et al.*, 1982).

Durante la realización del presente estudio inicialmente se pretendió hacer una evaluación de diversos métodos de viabilidad *in vitro* que ayudaran a probar el efecto de fármacos sobre *Giardia*, dado que en la actualidad no se tiene una convención para establecer una metodología estándar que ayude a evaluar de una forma rápida y eficaz la sensibilidad a fármacos. Así se probaron el subcultivo en medio líquido (Hill *et al.*, 1986), subcultivo en medio semisólido (Gillin y Diamond, 1980), incorporación de nucleótidos radioactivos (Inge y Farthing, 1987, Boreham *et al.*, 1984), tinción con colorantes fluorogénicos (Schupp y Erlandsen, 1987) y reducción de sales de tetrazolio (Mosmann, 1983). Lo anterior se hizo con la finalidad de comparar las características de éstos métodos y seleccionar aquel que tuviera la mejor sensibilidad, confiabilidad, y reproducibilidad, para que eventualmente pueda tener aplicabilidad a nivel clínico y de esta forma poder hacer un sondeo de diversos fármacos y determinar la quimioterapia alternativa en pacientes con fallas al tratamiento en dicha parasitosis.

Para la realización de las técnicas mencionadas anteriormente, se utilizaron trofozoitos de las cepas de referencia ampliamente empleadas [WB y P-1] ocupando al metronidazol como fármaco representativo de la familia de los 5-Ni, en ensayos que permitieron obtener el valor de DL<sub>50</sub> (dosis que mata el 50 % de los organismos), esta última se considera como un parámetro que ayuda a probar el efecto *in vitro* de los agentes antiprotozoarios, y ofrece una medición más exacta de la sensibilidad de los métodos ensayados.

Con lo que respecta al subcultivo en medio líquido, se realizó un ensayo al paralelo de éste con otros fármacos de distinto mecanismo de acción, los cuales fueron los bencimidazoles (Cruz, 1996), y al cotejar los resultados obtenidos con ambas familias de fármacos, se observó que este fue el ensayo idóneo para ambos tipos de agentes quimioterápicos, debido a que se determinaron así valores de DL<sub>50</sub> más bajos para las cepas utilizadas. Estas fueron de 176.1 y 113.2  $\mu$ M de metronidazol para las cepas WB y

P-1 respectivamente, teniendo una variación de 1.75 veces. Cabe mencionar que este último valor representa la variación que hay entre los valores de  $DL_{50}$  obtenidas en ambas cepas utilizadas, lo cual indica que el ensayo permite obtener valores confiables. Lo anterior se puede deber al hecho de que este ensayo fisiológico evalúa específicamente la capacidad de un sistema biológico para seguir realizando sus funciones vitales tal como la replicación celular después de ser expuesto a un agente potencialmente citotóxico. Esto significa que se evalúa el efecto farmacológico del agente antiparasitario después de haberse presentado la interacción fármaco-molécula blanco, no importando que el blanco del agente quimioterápico se encuentre a nivel de material genético, DNA, RNA, proteínas, vías metabólicas del parásito u otros sitios. En el presente trabajo las diferentes técnicas empleadas para evaluar la sensibilidad a fármacos nos permitieron detectar el efecto citostático (viabilidad  $\approx$  90 %) y citocida (mortalidad del 100 %) de los fármacos analizados, sin embargo se considero un agente quimioterápico efectivo aquel que afectara dramáticamente la viabilidad celular, esto es que manifestara un 100 % de mortalidad. Se destaca que las diferencias estructurales y mecanísticas de los distintos fármacos pueden influir en el sistema de evaluación de susceptibilidad a fármacos, los cuales también nos ayudan a predecir si su modo de acción es bioquímico (involucrando reacciones químicas principalmente oxidaciones propiciadas por enzimas), fisiológico (alteraciones en el funcionamiento celular a nivel genómico) o de ambos tipos dependiendo del patrón de su respuesta. Por otro lado, cabe mencionar que dicha técnica ha sido empleada para evaluar los mecanismos de defensa del huésped sobre los trofozoitos de *Giardia* (Hill *et al.*, 1986). De manera particular, este ensayo tiene muchas ventajas con respecto a los demás que se utilizaron en este trabajo, dado que no requiere de material costoso ni equipo sofisticado como: nucleótidos radioactivos, contador de centelleo de líquidos o microscopio de epifluorescencia resultando ser la prueba más útil en lugares que carecen de esta infraestructura. Sin embargo, tiene como limitante el que su realización requiere de mucho

tiempo. Por lo que se le puede postular como el método estándar para probar diversos fármacos con distintas estructuras químicas y propiedades fisicoquímicas

Por otro lado, el subcultivo en medio semisólido, aunque pertenece al grupo de los ensayos fisiológicos presentó limitaciones muy importantes dada su baja sensibilidad. Esto fue evidente al proporcionar valores bajos de  $DL_{50}$ , siendo de  $-3851.98 \mu M$  para la cepa WB y de  $-6827.21 \mu M$  para la cepa P-1. Estos valores presentan diferencias significativas entre las dos cepas, lo cual confirma que el ensayo no es adecuado para tales fines. Asimismo tuvo una variación de 1.77 ( $\approx 2$ ) veces, siendo éste un valor aceptable, pero como se obtuvieron dosis por debajo del umbral de detección experimental (i.e. valores de  $DL_{50}$  negativas) no es representativo y por ello se descartó dicho ensayo. Por otro lado, este análisis presentó algunas limitaciones como el largo tiempo que se requiere para obtener los resultados (7 días), siendo el aspecto más interesante la falta de reproducibilidad de este método debido en parte a que la viabilidad de los trofozoitos puede estar afectada drásticamente por la exposición a cambios dramáticos de temperatura ( $4^{\circ}C$  y  $42^{\circ}C$ ) lo cual posiblemente los daña a nivel de la bicapa lipídica propiciando la muerte celular. Por otra parte, si tomamos en cuenta que dicha técnica se basa en la capacidad de trofozoitos individuales para formar una colonia en la matriz semisólida (agarosa), es probable que al exponer el parásito al metronidazol se dañen seriamente y conjuntando esto con una selección celular de trofozoitos de *Giardia* provenientes de un cultivo que presenta subpoblaciones mixtas con sensibilidad a fármacos diferente, se tienen muy pocas probabilidades de obtener un adecuado % CFE. Sin embargo, el subcultivo en medio semisólido puede tener aplicación en el aislamiento de clonas, las cuales pueden dar información sobre el grado de heterogeneidad en una población determinada.

Respecto a la técnica de incorporación de colorantes fluorogénicos, este se fundamenta en que el diacetato de fluoresceína [FDA] es una molécula no fluorescente pero que sirve como sustrato en ciertas reacciones enzimáticas, en donde las esterasas intracelulares inespecíficas se unen a dos grupos acetatos mediante un enlace éster con dicho sustrato

y producen la fluoresceína, una molécula polar que emite fluorescencia verde a una  $\lambda = 499$  nm (Hoffman y Sernetz, 1983). Se requiere asimismo una bicapa lipídica intacta en las células para que estos tengan la capacidad de retener el fluorocromo. En algunas investigaciones han correlacionado a lipasas, acilasas, y proteinasas en la hidrólisis del FDA; pero la presencia de estas enzimas no se ha investigado con detalle en las dos entidades morfológicas del parásito. En este sentido se decidió usar dicho colorante dado que el FDA no es tóxico, lo cual ha sido corroborado al utilizarse en una variedad de células, entre las cuales se incluyen las células de mamífero y los cultivos de tejidos (Rotman y Papermaster, 1966). Por su parte el fluorocromo fenantrínico (PI) es capaz de penetrar al parásito y ubicarse específicamente en la doble cadena de los ácidos nucleicos debido a una alteración en la estructura membranal del parásito (Barni *et al.*, 1981). En este ensayo resalta como una ventaja DL<sub>50</sub> detectadas en las cepas WB y P-1 de 226 y 226.2  $\mu$ M respectivamente. Como se puede observar, estos valores son muy semejantes y no existieron diferencias significativas, lo cual indica que es un ensayo suficientemente exacto para este tipo de evaluaciones. Asimismo cabe señalar que estos resultados mostraron el valor de variación más bajo, siendo de 1 vez en la sensibilidad, lo cual sugiere que el método es muy adecuado para tales fines.

Es importante mencionar que la tinción con FDA-PI no había sido utilizada en los reportes precedentes para medir la viabilidad en trofozoitos de *Giardia* expuestos a fármacos, pero resultó ser bastante adecuada para nuestros fines, además de tener varias ventajas con respecto a los otros ensayos utilizados como son: la sensibilidad, reproducibilidad, rapidez (ya que los resultados se obtienen en aproximadamente 5 min en el análisis de cada muestra) y para una mayor rapidez en un gran número de muestras en lugares que cuenten con un nivel adecuado de infraestructura, se puede utilizar la citometría de flujo [FACS ó separador de células activadas por fluorescencia] ) y es relativamente económica (donde puede ser bastante evidente el bajo costo de los reactivos utilizados en esta técnica si se compara con el precio de los nucleótidos radioactivos) por

lo que se propone como una técnica potencialmente útil en este tipo de determinaciones, resultando además ser confiable como alternativa al subcultivo en medio líquido.

Con lo que respecta a la incorporación de  $^3\text{H}$ -TdR, ésta nos permitió evaluar de manera parcial el mecanismo de acción del metronidazol, dado que el  $^3\text{H}$ -TdR al incorporarse al DNA nos sugiere que el parásito está siendo capaz de replicarse, y en un menor grado, que existe una pequeña reparación de éste. Dado que se conoce que este 5-Ni actúa a nivel de DNA, dicho ensayo corroboró que el fármaco está interactuando con el material genético y se refleja en una fuerte inhibición del crecimiento celular. En base a las  $\text{DL}_{50}$  de 221.5 y 217.4  $\mu\text{M}$  para las cepas WB y P-1 respectivamente, se obtienen variaciones de 1.01 el cual es comparable con el ensayo del FDA. Si se tomara como base de referencia este parámetro, estos ensayos serían idóneos para los propósitos del estudio. Por otra parte, el contador de centelleo es un aparato que cuenta con un paquete computacional que proporciona ventajas tales como un procesamiento y cuantificación automatizados, permitiendo reportar un mayor número de muestras y entregar resultados completos en un día. Esta tecnología ofrece una gran exactitud así como un ahorro de tiempo sólo al momento de la cuantificación de la viabilidad dado que cada muestra se procesa en un tiempo máximo de 2 min, pero es largo el tiempo en el que deben mantenerse en incubación los trofozoitos con la marca radioactiva (2 hrs), sin embargo a pesar del costo de los nucleótidos radioactivos y el equipo mencionado anteriormente, dicho ensayo también resultó ser alternativo al subcultivo en medio líquido debido a que permitió detectar valores de  $\text{DL}_{50}$  semejantes. Por otra parte es importante mencionar que los núcleos de las células no incorporan la marca en la misma proporción debido primordialmente a la fase S del ciclo celular en la que ocurre la replicación celular (Wiesehahn *et al.*, 1984).

Otro método empleado fue la reducción del MTT, la cual es una prueba colorimétrica que mide la actividad glucolítica de parásitos viables. En ésta se presenta reducción metabólica de la sal de tetrazolio propiciando la precipitación del formazán en el interior

del citoplasma de los trofozoitos, ya que en la bioreducción del núcleo de tetrazolio central cargado positivamente se reduce la carga neta positiva a cero y así el formazán del MTT resulta ser insoluble (Scudiero *et al.*, 1988). Dicho ensayo careció de sensibilidad debido a que dio valores muy altos de las DL<sub>50</sub> siendo de 349.3  $\mu$ M para la cepa WB y de 780.1  $\mu$ M para la P-1, presentando variaciones de 2.23 veces. Resultó evidente que este ensayo mostró variaciones más grandes, y otras desventajas concomitantes fueron el que siempre se presentó un fondo debido a que las células recién muertas todavía podían tener actividad enzimática y dar lugar a falsos positivos, esto se supuso ya que al comparar dicho ensayo con los otros probados se notó claramente que a concentraciones elevadas del metronidazol se afectaba drásticamente la viabilidad. Basados en los resultados anteriores se decidió extrapolar y considerar en este ensayo que a esas concentraciones se carecía de viabilidad celular, si bien el MTT no permitía evaluar estos criterios fue debido a que todavía había precipitación de formazán en trofozoitos no viables de *Giardia*. Esta sal de tetrazolio (MTT) no ha sido empleada para evaluar la viabilidad en *Giardia* después de ser expuesta a fármacos. Sin embargo, el NTT si se ha utilizado específicamente con estos fines (Wright *et al.*, 1992) y este último tiene como ventaja que genera un producto color naranja hidrosoluble que permite realizar varias determinaciones en un mismo cultivo sin necesidad de lisar las células, y como consecuencia se requieren cantidades mínimas de muestra para poder obtener resultados. Por otra parte, algunos estudios realizados en este laboratorio han mostrado que las subpoblaciones de trofozoitos de *Giardia* en un cultivo, esto es, células adheridas, no adheridas y totales presentan variaciones metabólicas en su capacidad para reducir la sal de tetrazolio [MTT], siendo las no adheridas las que presentan una mayor tasa metabólica (Pérez *et al.*, 1990).

Retomando los datos obtenidos en las diversas técnicas que ayudaron a evaluar la viabilidad en *Giardia*, estos confirmaron que el mecanismo de acción del metronidazol es inicialmente bioquímico ya que se efectúan una serie de reacciones químicas realizadas por la enzima biotransformadora del fármaco llamada PFOR, involucrando principalmente

oxidaciones. Estas últimas dan lugar a la generación de varios intermediarios reactivos los cuales se intercalan en el DNA aceptor para propiciar la interacción fármaco-receptor. La biofase es un aspecto cuyo requisito implica una concentración adecuada de fármaco para que pueda llevarse a cabo una interacción efectiva que conduzca al efecto farmacológico deseado, en donde es necesario considerar que para que un agente quimioterápico alcance su sitio de acción debe ser capaz de interactuar en dos ambientes diferentes, el lipofílico (membranas) y el acuoso (citoplasma). El citoplasma de una célula es esencialmente una solución diluida de sales en agua, y todas las células vivas están rodeadas de una fase no acuosa que es la membrana. Algunas funciones de la membrana son proteger a la célula de sustancias hidrosolubles para evitar la citólisis, o bien formar una superficie en la cual enzimas y otras proteínas pueden unirse para producir una organización estructural, y también ayuda a separar soluciones que presentan diferentes potenciales electroquímicos. Aunque la estructura de la membrana no ha sido completamente dilucidada, el modelo ampliamente aceptado es el del mosaico fluido, donde hay proteínas integrales que se encuentran embebidas en la bicapa lipídica, y proteínas periféricas que se asocian solo a la superficie de la membrana. La estructura de la membrana es determinada primariamente por la estructura de los lípidos de los cuales está compuesta, siendo los principales el colesterol neutro y los fosfolípidos iónicos (Stryer, 1988). Asimismo se mencionó que el mecanismo de acción posterior es fisiológico, ya que al haber un daño serio en el material genético (DNA) los trofozoitos son incapaces de realizar sus funciones vitales como la replicación y el crecimiento, dando lugar a la muerte del parásito.

También es importante considerar el papel que juega la estabilidad de los intermediarios reactivos, ya que de esto depende el que haya un efecto deseado, influyendo principalmente el pH del medio el cual determina la protonación y así la posible reactividad del radical libre producido, la protonicidad o el grado de componentes acuosos en el medio, y finalmente la presencia de algún otro componente con el cual las especies reducidas producidas puedan interactuar propiciando un inadecuado efecto citotóxico.

Estudios recientes han mostrado que la influencia del pH modifica la estabilidad del radical anión del metronidazol y por lo consiguiente se propician interacciones reducidas del fármaco con las bases del DNA (Tocher y Edwards, 1994). Es importante considerar que el fármaco sólo ejerce su acción en trofozoitos, no sucediendo lo mismo con el quiste. Esto trae como consecuencia que el uso de este fármaco no permita un control adecuado en dicha parasitosis, propiciando la diseminación de la enfermedad.

De forma global, las concentraciones de  $DL_{50}$  obtenidas en este trabajo no se parecen a las reportadas por otros investigadores, entre los cuales destacan: Gillin y Diamond (1981) que utilizaron la cepa P-1 y reportaron un intervalo de concentraciones de 0.88-5.84  $\mu M$  empleando al crecimiento clonal, Smith *et al* (1982) reportaron un intervalo de 5.84-9.35  $\mu M$  utilizando al crecimiento clonal, Gordts *et al* (1985) reportaron MIC de 2.92-5.84  $\mu M$  empleando 25 aislados y el método de macrodilución en medio semisólido, Boreham *et al* (1987) reportaron  $DL_{50}$  de 0.68-1  $\mu M$  utilizando los aislados 106/1/1 hasta el 106/1/11 en tanto que para los aislados 120/1/1 al 120/1/15 se detecto un intervalo desde 0.56-1.18  $\mu M$  y la captación de timidina tritizada, Walh *et al* (1988) reportaron  $DL_{50}$  de 1.75-4.38  $\mu M$  con los aislados WB, PO, RS, LT, CAT y la prueba de adherencia en microcultivo, Meloni *et al* (1990) utilizaron a BAH54 reportando concentraciones de 7.65, 17.22 y 164  $\mu M$  con la prueba de adhesión, Majewska *et al* (1991) emplearon LSLP-116, SLP, GGPRP-114, HP-98, HP-109 reportando un rango de 0.51-6.53  $\mu M$  mediante la inhibición de crecimiento, Wrigth *et al* (1992) utilizaron el XTT y el conteo visual encontrando  $DL_{50}$  de 1.16-2.98 con el aislado VNB1, Favennec *et al* (1992) emplearon la prueba de adherencia de crecimiento con el aislado PARIS/86/LCF/3 encontrando un intervalo de 6.72-8.76  $\mu M$ . Algunas posibles explicaciones de estas variaciones experimentales son: primero, la utilización de diferentes cepas que se caracterizan por tener sensibilidad diferencial a fármacos lo cual ocasiona variaciones en los valores de  $DL_{50}$  ó MIC; segundo, el uso de los diferentes métodos que determinan el efecto citotóxico de los fármacos, ya que en el presente trabajo, se pudo observar que no

todos los métodos son los adecuados para lograr este fin lo cual está en función del mecanismo de acción que presenten los fármacos a evaluar y puede influir determinadamente en la selección de alguno de ellos. Tercero las adaptaciones realizadas a las metodologías ya reportadas, así como la concentración de las diversas sustancias utilizadas, y cuarto, no se descarta la posibilidad de una baja actividad del metronidazol en contra de los trofozoitos obtenidos en distintos aislados y clones.

Así, los resultados obtenidos con los diferentes métodos de viabilidad sugirieron el uso de la tinción con colorantes fluorogénicos como un método de elección por las ventajas antes mencionadas, además de ser un ensayo que puede tener aplicabilidad en diversos campos de investigación a nivel clínico y epidemiológico.

Otra meta del trabajo consistió en comparar la actividad farmacológica de seis derivados del 5-Ni los cuales fueron dimetridazol (se utilizó como un fármaco alternativo que pudiera tener aplicabilidad en Medicina Humana), metronidazol (se seleccionó por ser de prescripción frecuente), ornidazol (por ser un fármaco que empieza a utilizarse en el tratamiento de la giardiosis), ronidazol (por ser un agente quimioterápico con acción prometedora a dosis bajas y también con la finalidad de hacer comparaciones con los 2-metil-5-Ni ya que éste es 1-metil-5-Ni, aunque es ampliamente utilizado en Medicina Veterinaria), secnidazol (por ser un fármaco de elección alternativa al tratamiento de la giardiosis) y tinidazol (por utilizarse en tratamientos combinatorios especialmente en casos fallidos con metronidazol). Para ello se utilizó la cepa de referencia (WB) ampliamente empleada en investigación, y se construyeron curvas dosis-respuesta para obtener los valores de DL<sub>50</sub> y MIC con la finalidad de comparar su actividad citotóxica evaluando el porcentaje de viabilidad con la tinción de colorantes fluorogénicos (FDA-PI).

La actividad anti-giardia de estos derivados del 5-Ni variaron ampliamente con valores de DL<sub>50</sub> en un intervalo de 5.18 µM hasta 226 µM para el compuesto menos potente, por lo que la efectividad en orden decreciente fue: ornidazol>tinidazol>ronidazol>secnidazol>dimetridazol>>>metronidazol. Este análisis se basó en la MIC (concentración

de fármaco que causa la completa inhibición del crecimiento del parásito) expresada como concentración micromolar. Las concentraciones molares son más relevantes en evaluaciones comparativas dado que la actividad biológica de varios 5-Ni dependen de la reducción de un grupo nitro por molécula (Knox *et al.*, 1981 a; Lindmark y Muller, 1976; y Reynolds *et al.*, 1975). Tomando en cuenta los resultados obtenidos y con base en las estructuras químicas de los derivados empleados (Tabla II), se descarta la posibilidad de que el incremento en el peso molecular (P.M.) o el tamaño del sustituyente en la posición 1 de los distintos derivados del 5-Ni incrementen la actividad contra *Giardia*. Estos resultados sugieren que el efecto farmacológico no está relacionado por el aumento en la complejidad del sustituyente en la posición 1, que como es bien sabido todos los 2-metil-5-nitroimidazoles varían solo en esta sustitución (Tabla II). Sin embargo, es posible que grupos químicos presentes en esta posición puedan potenciar la actividad del fármaco en contra de trofozoitos de *Giardia*. Algunos de ellos son la presencia de halógenos como el cloruro en el ornidazol, o bien metileno en el dimetridazol y el ronidazol, no descartándose la posibilidad de que otras partes de la molécula puedan contribuir a una potenciación del efecto citotóxico. Asimismo, existe la posibilidad de poder generar mecanismos de acción alternos aparte de la clásica reducción del grupo nitro en la posición 5 del anillo imidazol, y esto se basa principalmente en la siguiente hipótesis: 1) los reportes más recientes mencionan que los bencimidazoles que contienen grupos carbamatos ejercen su acción en proteínas contráctiles del parásito [tubulinas y giardinas] (Morgan *et al.*, 1993 b) y así por observaciones de microscopía óptica, cuando se expusieron trofozoitos de *Giardia* ante el ronidazol, un derivado que presenta un grupo carbamato en la posición 2 del anillo imidazol, se observó una alteración en su morfología, por lo que sería interesante realizar estudios de microscopía electrónica analizando la ultraestructura del parásito. Retomando lo anterior, resalta la importancia de las relaciones existentes entre la estructura química y la actividad biológica de ésta última. Se deben tomar en cuenta 1) la lipofilia que es requerida para que el fármaco llegue al sitio de acción, y 2) los

factores electrónicos requeridos para la interacción con el sitio de acción, entre los que están contemplados enlaces débiles (fuerzas electrostáticas, enlaces de hidrógeno) y fuertes (de tipo covalente) lo cual propicia que se genere la acción farmacológica

De la misma forma nos percatamos que el índice citotóxico presentado en la tabla VI nos indica los efectos deseables e indeseables de un fármaco, es decir la MIC y la  $DL_{50}$ , en donde valores altos de este índice nos sugiere que tenemos un margen de seguridad más grande, en tanto que valores pequeños nos indican lo contrario, lo cual en parte bien puede sugerirnos que al tener un margen bastante estrecho puede llevarnos más fácilmente a los efectos adversos de cualquier fármaco, siendo uno de los más importantes su toxicidad. Otro aspecto interesante es el tiempo de vida media de los compuestos  $t_{1/2}$  (es el tiempo en que tarda en ser eliminado un fármaco de un organismo) el cual no se ha estudiado *in vivo*. Sin embargo, si extrapolamos estos conceptos a nuestras experimentaciones podemos sugerir que cuando se agregaba fármaco a nuestros cultivos se encontraba una concentración alta de éste lo cual provocaba un efecto serio en la viabilidad de los trofozoitos, y contrariamente, cuando transcurría el tiempo probablemente disminuía la concentración de metronidazol en el medio, lo cual propiciaba un incremento celular de *Giardia*. Por otro lado, cabe mencionar que se han reportado en humanos valores de  $t_{1/2}$  para el ornidazol de 10.9 hrs (Jokipii y Jokipii, 1982), el tinidazol tiene 11.1 horas (Jokipii y Jokipii, 1982), el secnidazol con 17 horas (Videau *et al.*, 1978) y el metronidazol con 9.5 hrs (Jokipii y Jokipii, 1979). Otro aspecto interesante en el estudio de los fármacos son los farmacóforos (la parte activa de la molécula del fármaco) los cuales son los responsables de la eficacia de un agente farmacológico. Por otra parte, se ha mostrado que la actividad mutagénica de algunos 5-Ni como el dimetridazol, metronidazol, ornidazol, y tinidazol a bajas concentraciones es semejante, por lo que se ha sugerido una relación entre la actividad mutagénica y la naturaleza química de los sustituyentes en la posición 1 del anillo del imidazol (Voogd *et al.*, 1979). En cuanto a la relación estructura química-mutagenicidad, se sabe que el

imidazol es una molécula que se encuentra cargada positivamente y se comporta como base débil, mientras que el grupo  $\text{NO}_2$  atrae  $e^-$  debido a que la molécula está cargada negativamente. Por su parte el grupo metilo tiene la propiedad de donar  $e^-$ , lo cual incrementa la capacidad reductiva de los nitroimidazoles con el grupo alquilo unido a un átomo del núcleo adyacente al átomo del núcleo imidazol que lleva al grupo  $\text{NO}_2$ . Si el grupo metilo no está adyacente al grupo  $\text{NO}_2$ , la capacidad reductiva disminuye y esto propicia que sean menos mutagenicos. Sin embargo, cuando hay un grupo que atrae  $e^-$  o una estructura de resonancia en la posición 2 de los compuestos 1-metil-5-nitroimidazol la mutagenicidad se incrementa p.e. el ronidazol (Tabla II).

Es importante resaltar que un cultivo continuo del parásito puede implicar cambios en su genoma, produciendo sensibilidades diferenciales a los fármacos en *Giardia* (Carnaby *et al.*, 1994), ya que observamos que durante las determinaciones de las  $\text{DL}_{50}$  en días diferentes, en ocasiones se modificaban dichos valores, habiendo variaciones entre ellas, por lo que el determinar esto en un estudio transversal puede generar este tipo de problemas y no ser un valor representativo.

Entre otras de las perspectivas de este trabajo se puede considerar la combinación de fármacos de esta misma familia para determinar si existe sinergia o antagonismo pudiendo evaluarse esto al aplicar el índice de concentración fraccional inhibitoria [FIC] (Eliopoulos y Moellering, 1991), lo cual puede ser bastante útil a nivel clínico principalmente en casos de giardiasis refractaria al tratamiento tradicional, aunque cabe la posibilidad de realizar combinaciones con fármacos diferentes estructural y mecanísticamente con la finalidad de controlar dicha infección.

Los datos precedentes ayudaron a analizar la sensibilidad de los trofozoitos en un estudio transversal en donde pudo notarse que, al clonar diferentes cepas de referencia (WB y P-1) y aislados mexicanos (IMSS-2, IMSS-3, CIEA-10, y CIEA-52) se generaban poblaciones con diferentes características fenotípicas, especialmente a nivel de susceptibilidad a  $\text{DL}_{50}$  de tinidazol y metronidazol, teniendo en general un

comportamiento más homogéneo ante el tinidazol que con el metronidazol. Esto último puede estar influenciado, al menos en parte, por el uso indiscriminado del fármaco en áreas endémicas, la resistencia a los fármacos utilizadas, la inadecuada dosificación y el incumplimiento del régimen terapéutico. Nuestros resultados han sido comparables con los obtenidos por Boreham *et al.* (1987) y Majewska *et al.* (1991), en donde también se ha mostrado una heterogeneidad en la respuesta de sensibilidad a fármacos. Estos estudios indican claramente que los aislados o cepas están compuestos de una mezcla de poblaciones (clonas) que presentan algunas características diferentes a los cultivos parentales de los cuales se derivan dichas clonas. Aunque los mecanismos moleculares y fisiológicos responsables para explicar la diferente susceptibilidad no se conocen en detalle, se sugiere que los cambios genómicos sean los responsables de que se presente esta variabilidad fenotípica. Los trofozoitos individuales generan variantes como son una sensibilidad diferencial a fármacos entre los aislados y clonas, aunque la velocidad de aparición de dicho fenotipo puede variar dramáticamente, dependiendo del aislado y en parte de la plasticidad genómica. De la misma manera, las diferencias en la sensibilidad a fármacos sugiere que la enzima biotransformadora de este puede tener niveles enzimáticos alterados. Estas adaptaciones de los trofozoitos sugiere su capacidad para sobrevivir y de esta forma explicar el amplio rango de huéspedes a los que infecta *Giardia*. Al mismo tiempo, estas variaciones o heterogeneidad en la susceptibilidad a fármacos puede conducir a casos refractarios al tratamiento tradicional de dicha parasitosis, ya que los trofozoitos de *Giardia*, al no ser homogéneos, pueden implicar la presencia de unos cuantos organismos que no se mueren por la acción del fármaco y son potencialmente capaces de sobrevivir al tratamiento y continuar la infección. Lo anterior podría ser una explicación parcial de la persistencia de la parasitosis o bien la cronicidad de la giardiosis, lo cual se observa particularmente en áreas endémicas o en poblaciones con alto riesgo a la reinfección.

Otro perfil que se contempló en la realización del presente estudio consistió en evaluar el comportamiento que presentaron ciertos aislados, cepas y clonas de *Giardia* seleccionados en el estudio anterior en un cultivo continuo, con base en patrones de sensibilidad diferencial a nivel transversal. Estos se analizaron partiendo de su respuesta inicial hacia DL<sub>50</sub> de metronidazol y tinidazol. En este estudio longitudinal se observó con frecuencia una gran variabilidad en la sensibilidad a dichos fármacos, mostrándose una estabilidad hacia una respuesta ya sea tolerante (con el metronidazol) o de sensibilidad (hacia el tinidazol). El comportamiento con el metronidazol en cierta manera se esperaba, debido a que es un fármaco de prescripción frecuente, mientras que aunque el tinidazol parece tener una mejor actividad a dosis más bajas sugiere que puede ser más efectivo. Sin embargo, también se presentó el mismo comportamiento (variabilidad) lo cual puede deberse a la similitud estructural de ambos agentes anti-Giardia. Así, es probable que fármacos de familias semejantes pueden conducir con el tiempo a la generación del mismo problema, por lo que se sugiere que la combinación de agentes quimioterápicos sea preferiblemente con fármacos diferentes estructuralmente, ya que estudios realizados en protozoarios como *Plasmodium falciparum* se han encontrado que uno de los factores que influyen en el desarrollo de la resistencia o tolerancia a la mefloquina es la resistencia cruzada con otros antimaláricos los cuales son semejantes en sus estructuras químicas (Brasseur *et al.*, 1992). Incluso cabe la posibilidad de la existencia de la P-glicoproteína, en *G. duodenalis* aunque es probable que durante el cultivo de los parásitos exista selección de trofozoitos que pueden tener un fenotipo particular, esto es, tolerantes o sensibles a los fármacos probados, proliferando eventualmente en el cultivo lo cual da dichos resultados. Por otra parte, estos resultados refuerzan lo mencionado anteriormente en el sentido de que el parásito, al ser expuesto a fármacos y soportar dichas condiciones adversas no naturales, adquiere la capacidad de seguir infectando a otros huéspedes además de continuar la propagación de la enfermedad.

Actualmente se han estado presentando casos refractarios al tratamiento de la giardiasis debido a la existencia de trofozoitos de *Giardia duodenalis* resistentes al metronidazol (Uperoñ y Uperoñ, 1993; Johnson, 1993) por lo que surgió nuestro interés en realizar estudios parciales enfocados en este aspecto. De esta forma, se propuso obtener líneas resistentes a dicho agente farmacológico bajo condiciones de laboratorio.

Para lo anterior se utilizaron diferentes metodologías de selección de resistencia a fármacos. De éstas, se consideró al cultivo continuo en presencia de concentración creciente de fármaco como la más adecuada, descartando definitivamente a la selección espontánea o innata dado la gran variabilidad que presenta el parásito lo cual sucedió cuando se realizaron evaluaciones en cultivos continuos. Asimismo se descartó la mutagénesis por radiación UV cuyos resultados no fueron comparables con aquellos de Townson *et al.* (1992) dado que en su estudio lograron obtener de esta forma dos líneas bastante resistentes o tolerantes al metronidazol, siendo WB1B-M3 (obtenida de un adulto) y BRIS/87/HEPU/713/M3 (obtenida de un niño) líneas que soportaron 50 veces la  $DL_{50}$  (62 y 42  $\mu M$  de metronidazol respectivamente) de la cepa parental. Se ha reportado que las alteraciones propiciadas por la irradiación con luz UV se encuentran a nivel de la membrana del plasma, enzimas y biomoléculas tales como proflavina y el DNA, los cuales han sido sugeridos como los blancos intracelulares posibles para la UV en los microorganismos (Jagger, 1976; Thomas, 1977). En este proceso, una mutación se considera efectiva siempre y cuando solo resulten viables aproximadamente el 5 % de la población total y posterior al tratamiento deben mantenerse en obscuridad ya que de lo contrario se activan las enzimas reparadoras del DNA corrigiendo el daño producido (Lewin, 1994). Tomando en cuenta este criterio, nuestros resultados no sugirieron una irradiación altamente efectiva, ya que los cultivos de trofozoitos presentaban una confluencia del 40 %, los cuales tenían características aparentemente normales en base a la motilidad y morfología, aunque no se elimina la idea de que éstos parásitos tenían alguna alteración a nivel de información genética porque soportaron una concentración máxima

de fármaco de 5.84  $\mu$ M. Estos estudios, de una forma indirecta, nos reflejan la capacidad clonal del parásito dado que cuando se intentó rebasar la concentración máxima tolerada se afectaba drásticamente la viabilidad, permaneciendo en los recipientes de cultivo un número muy bajo de parásitos (probablemente menos de 0.5 células/vial), los cuales conforme transcurría el tiempo se replicaban e incrementaba la población celular. Los datos presentados en este trabajo confirman que la resistencia anaeróbica de *G. duodenalis* al metronidazol puede ser inducida *in vitro*. Esto fue logrado mediante el cultivo continuo del parásito (cepas WB y P-1) en medio TYI-S-33 ante la presión continua de concentraciones ascendentes de metronidazol y tinidazol por varios meses. Se tuvo así 31 2 incrementos de dosis de metronidazol que fueron toleradas por las cepas P-1 y WB, en tanto que para el tinidazol se utilizaron en ambas cepas incrementos de dosis de hasta 46.5.

Con lo que respecta a la progresión de la resistencia anaeróbica de *Giardia* en cultivo continuo en concentraciones ascendentes de metronidazol y tinidazol se presentaron varias etapas características, siendo 1) una replicación disminuida de los parásitos al exponerse inicialmente a los dos fármacos probados, 2) conforme se adaptaban éstos a las fármacos había un mejoramiento y estabilidad en las propiedades de crecimiento del parásito, y 3) cuando *Giardia* se exponía a concentraciones altas se presentaba un retardamiento muy marcado en la replicación de los parásitos pero éstas eran viables y los cultivos ya no llegaban a la confluencia, presentando este fenotipo sólo una población muy reducida de trofozoitos. Si bien durante la realización de este experimento no se notaron alteraciones en la capacidad adhesiva del parásito a superficies inertes (paredes del recipiente de cultivo), los trofozoitos que entraron en división celular fueron capaces de completar su citocinesis lo cual fue confirmado al no detectarse alteraciones morfológicas en los parásitos, lo cual sugiere que el metronidazol no ejerce a este nivel un arresto en el ciclo celular de *Giardia*.

La etapa de adaptación fue muy importante en este proceso, ya que los parásitos tuvieron cambios quizá en algunos procesos bioquímicos lo cual les permitió soportar y eliminar los efectos adversos de los fármacos viéndose reflejado en una normalización de su velocidad replicativa. Considerando el mecanismo de acción propuesto para el metronidazol en *T. vaginalis* y otros microorganismos anaeróbicos (Ings, 1974) se sugiere que pueden existir modificaciones en su metabolismo posiblemente a nivel de actividad de PFOR la cual imposibilita la activación del fármaco y con ello se evita un efecto farmacológico eficaz. De manera global, estas observaciones indican que el desarrollo de la resistencia al metronidazol es un proceso multifactorial.

Por otra parte, se pueden sugerir alternativamente como mecanismos de resistencia al metronidazol en este parásito la amplificación de genes, una regulación alterada de genes, una reducida permeabilidad celular por el fármaco o cambios estructurales en la enzima PFOR, aunque el fármaco puede ser secuestrado o no convertido en un intermediario reactivo cuando tenga que interactuar con su blanco, propiciando una escasa o nula eficacia citotóxica.

Es importante mencionar que se han logrado obtener líneas resistentes al metronidazol *in vitro* en protozoarios tales como *Trichomonas foetus* (Kulda *et al.*, 1984), *Trichomonas vaginalis* (Honigberg y Livingston 1966, de Carneri 1966), y *G. duodenalis* con la cepa BRIS/S3/HEPU/106-21D<sub>10</sub> (Borcham *et al.*, 1988 b). En el presente estudio no se evaluó la estabilidad de la resistencia a metronidazol en *Giardia* con estos agentes antiprotozoarios probados, la cual pudiera ser una perspectiva interesante. Sin embargo, esto ha sido reportado en otros parásitos como *P. falciparum* cultivado en presión continua de mefloquina, donde la resistencia se mantuvo estable por un periodo de tres años (Oduola, 1988), mientras que *T. foetus* expuesta a metronidazol permaneció con resistencia estable durante dos años (Kulda *et al.*, 1984).

A nivel clínico, si consideramos que los pacientes con cuadros bien definidos de giardiasis sufren una infección por poblaciones mixtas de parásitos, y son sometidos a un tratamiento

quimioterapéutico en el cual están contemplados fármacos tales como el metronidazol, furazolidona, quinacrina (de uso común), es obvio que decline la replicación de algunos parásitos, especialmente las cepas sensibles permaneciendo las resistentes, las cuales conforme transcurre el tiempo pueden expandir su población generando casos refractarios a dicha parasitosis o bien cronicidad de la misma. Asimismo estos estudios enfatizan el hecho de que un aislado está constituido por una población heterogénea genotípica y fenotípicamente de parásitos, los cuales promueven diferencias en la susceptibilidad a fármacos que son usados indiscriminadamente debido a una falta de agentes alternativos para el tratamiento de la giardiosis o cualquier otra parasitosis, y esto sucede frecuentemente en México.

Se ha reportado recientemente que aislados y clonas obtenidas de un paciente con giardiosis crónica antes y después de someterse a varios tratamientos fallidos con metronidazol y también el cultivo continuo de la cepa WB mostró diferencias genotípicas lo cual sugiere que dicha heterogeneidad en *G. duodenalis* es debido a la plasticidad del genoma o a la presencia de una población mezclada de trofozoitos en la infección (Carnaby *et al.*, 1994). En otro estudio realizado en un paciente refractario al tratamiento tradicional, se aislaron y axenizaron sus trofozoitos antes y después de haberse tratado varias veces con metronidazol, lo cual propició la obtención de una línea resistente, encontrándose diferencias en sus perfiles antigénicos (Butcher *et al.*, 1994). Estos estudios sugieren como perspectivas del presente trabajo por una parte el análisis antigénico y por otro lado efectuar estudios a nivel genético.

En el presente trabajo se determinaron algunas diferencias en procesos celulares fundamentales tales como la replicación [mediante la incorporación de  $^3\text{H-TdR}$ ], transcripción [incorporación de  $^3\text{H-UdR}$ ] y traducción de proteínas [captación de  $^{35}\text{S-Cisteína}$ ], en una cepa silvestre y en la línea resistente al metronidazol obtenida mediante el cultivo continuo bajo la presencia de metronidazol. También se analizó el efecto que presenta dicho fármaco directamente en el parásito en ambas líneas. Cabe mencionar que

la cepa resistente utilizada en estos experimentos fue capaz de crecer anaeróbicamente en 5.84  $\mu$ M de metronidazol

En base al proceso de replicación no se detectaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las cepas silvestre y la resistente, asimismo ésta última tenía afectada drásticamente su captación de  $^3\text{H-TdR}$  al material genético (DNA), sin embargo su replicación era normal, confirmando al determinar su porcentaje de viabilidad (95.53 %) Algunos de los factores que afectan la incorporación del nucleótido radioactivo son alteraciones en el transportador específico de la base timidina, como pueden ser cambios conformacionales, una baja expresión en el gen que lo expresa, reportándose en la literatura que el 80 % del flujo de la timidina es mediado por este mecanismo (Davey *et al.*, 1992), encontrándose dos tipos de permeasas de membrana involucradas con la incorporación de los nucleótidos, el transportador tipo 1 que se caracteriza por tener una alta afinidad por uracilo, timina, timidina y uridina, y el transportador tipo 2 que es de amplia especificidad (Ey *et al.*, 1992), también en la actividad de ciertas enzimas, el tamaño de la timidilato y *pools* endógenos de TTP, su catabolismo en la célula y sistemas de cultivo de tejidos, la degradación por bacterias, siendo lo más probable las diferencias en la utilización de  $^3\text{H-TdR}$  durante el periodo S (Kotelnikov, 1986) Al respecto hubiese resultado interesante efectuar la localización del nucleótido radioactivo en los trofozoítos de *Giardia* mediante estudios autorradiográficos. En estudios realizados con misonidazol (un 2-nitro-1-imidazolil-3-metoxi-2-propanolol) se ha efectuado la reducción del DNA de varios organismos con diferente composición de bases electrolyticamente a potencial constante y han detectado una liberación de mono y difosfatos de timidina. Por lo anterior, se propuso que el misonidazol causa ruptura de enlaces fosfodiéster alrededor de los residuos de timina en el DNA y se predijo que el grado de daño que consiste en la liberación de derivados de timina pueden estar relacionados con el contenido de A+T del DNA, además encontraron que había una relación entre la composición de bases del DNA y la cantidad de derivados de timina que se liberaban (Knox *et al.*, 1981 b). Sin embargo hay otros

trabajos que muestran que el metronidazol también presenta el mismo efecto que el misonidazol (LaRusso, 1977).

Con lo que respecta a la transcripción no se detectaron diferencias significativas entre cepas. Se ha estimado que el metronidazol ejerce un efecto en este nivel secundariamente, ya que no se está afectando tan seriamente dicho proceso celular fundamental debido probablemente a una actividad de RNA polimerasas poco afectada.

Por otro lado en la incorporación de <sup>35</sup>S-cisteína se sabe que este aminoácido es muy importante en *Giardia* tanto a nivel de superficie (composición de antígenos de superficie los cuales están compuestos de secuencias de aminoácidos que contienen aproximadamente 12% de cisteína [Aggarwal *et al.* 1989, Nash *et al.* 1988, 1990 a, 1992, Thompson y Meloni 1993a]) como intracelularmente. También este aminoácido juega un papel muy importante como agente reductor, ya que disminuye los efectos tóxicos propiciados por las altas tensiones de oxígeno, por lo que durante la realización de este experimento, con la finalidad de facilitar la incorporación de <sup>35</sup>S-Cisteína al interior del parásito, se modificó la formulación del medio TYI-S-33 el cual como se mencionó al inicio contiene cisteína como agente reductor. En base a los datos obtenidos, resultó interesante que la cepa resistente al metronidazol mantuviera baja su tasa de incorporación de dicho nucleótido radioactivo. Esto sugiere que si dicha cepa no está captando este aminoácido, probablemente otras vías alternas se están disparando para promover la detoxificación de radicales tóxicos actualmente llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS) (Jacobson, 1996) tales como el ión superóxido (O<sup>-2</sup>), hidroxilo (OH<sup>·</sup>) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), aunque en estudios recientes en *Giardia* se han evaluado estas ROS y se ha encontrado que líneas resistentes al metronidazol no tienen actividad de superóxido dismutasa (SOD), catalasa y peroxidasa. Sin embargo, en aislados silvestres se encontró que la NADH oxidasa citosólica no produce O<sup>-2</sup> ni H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pero se detecta como producto final al agua, y también se detectó una baja actividad en la NADH peroxidasa a nivel de membrana, por lo que se sugiere que estas enzimas son las

responsables de la eliminación de los productos tóxicos mencionados (Brown *et al.*, 1995). Por otro lado, se han realizado estudios sobre la cisteína en *Giardia* en donde se ha analizado el papel de dicho aminoácido y se han utilizado otros agentes reductores tales como L-cisteína, D-cisteína, glutatión, ácido-L ascórbico, ditiotreitól, ac cisteico, L-metionina, ác. tioglicólico, L-cistina, entre otros. En estos estudios se reportó que la L-cisteína es el único agente reductor que permite un crecimiento favorable del parásito (Gillin y Diamond, 1981), o bien la presencia de centros Fe-S, componentes cruciales en la cadena transportadora de e<sup>-</sup> en *Giardia*. Dada la importancia de estas proteínas, se puede explicar el que el parásito use altos niveles de cisteína, o bien pudiera ser por el continuo recambio de antígenos de superficie lo cual le da al parásito la capacidad de sobrevivir ante condiciones adversas no naturales (Nash, 1992). Al respecto Jocelyn (1972) sugiere que las propiedades más importantes de la cisteína también como de otros tioles es su capacidad para actuar como agentes reductores, ya que dos moléculas se oxidan a cistina, además el Fe<sup>2+</sup> y los grupos tioles pueden actuar catalíticamente en reacciones de intercambio. Al respecto, sería interesante analizar el perfil antigénico de dichas cepas para ver las posibles diferencias cuantitativas en base a la cantidad de un epitopo particular, o bien a la variedad de éstos en la superficie del parásito, ya que si se está utilizando la cisteína y está involucrada en este nivel, resultaría interesante ver los cambios en estos, lo cual le da al parásito la capacidad de adaptarse ante condiciones agresivas propiciadas por el medio ambiente en el que se encuentre. No obstante, también pudieran presentarse alteraciones a nivel de membrana, la cual pudiera estar modificada y de esta forma propiciar esta baja incorporación.

Se sugiere que los niveles alterados de esta enzima biotransformadora del fármaco (PFOR) apoyan fuertemente la definición propuesta por Lacey (1990) la cual postula que la resistencia a fármacos en algún organismo puede ser el resultado de un cambio en la farmacocinética del agente quimioterápico, por lo que la resistencia no necesariamente se presenta en el sitio de acción del mismo.

Con respecto a la resistencia al metronidazol en *Tritrichomonas foetus*, se ha reportado que elevadas concentraciones del fármaco propician el consumo de oxígeno y la formación de  $H_2O_2$  por los hidrogenosomas presentes en el parásito, además se sugiere que la ferredoxina juega un papel importante en el proceso de reducción del fármaco (Moreno *et al.*, 1984). Estudios realizados con la cepa resistente de *T. Foetus* KV1-1M1R-100 han encontrado que el fenotipo de resistencia al metronidazol se correlaciona con una ausencia en la actividad de la enzima piruvato ferredoxina oxidoreductasa y con un incremento en la fermentación alcohólica (Cerkasovová *et al.*, 1984).

En estudios recientes se menciona que *Giardia* presenta cambios en el transporte de agentes quimioterápicos por lo cual sugiere la existencia de un fenotipo de múltiple resistencia a fármacos en parásitos resistentes a la quinacrina (Uproft *et al.*, 1996). En este sentido, no se descarta la idea de la existencia de la P-glicoproteína (PgP) en la membrana del parásito, la cual puede tener dos configuraciones funcionales que generan funciones distintas como el transporte de fármacos (que requiere la hidrólisis de ATP) y como canal de cloruros (que tan solo necesita la unión de ATP) (Gill *et al.*, 1992). Dicha proteína fue encontrada en células cancerígenas. La PgP es codificada por un gen de múltiple resistencia a fármacos (gen *mdr*) el cual es amplificado a nivel de DNA o de expresión de RNA (Wilson *et al.*, 1989).

Estudios realizados en parásitos protozoarios han mostrado que la resistencia a la mefloquina en *P. falciparum* es debido a la amplificación y sobreexpresión del gen *pfmdr1* que está codificado en el cromosoma 5 (Cowman *et al.*, 1994). En el mismo parásito se ha reportado que la resistencia a pirimetamina es debida a mutaciones en punto en el gen dihidrofolato reductasa-sintasa timidilato (Zolg *et al.*, 1989). En *Entamoeba histolytica* se han identificado genes de P-gP y su genoma contiene al menos 6 genes P-gP, de los cuales 4 son genes completos y dos pseudogenes además de un gen *Ehabc 1* que codifica para un miembro nuevo de la familia unida de cassettes ATP, el cual se ha secuenciado y codifica para una proteína de 91.7 kDa (Zhang y Samuelson, 1993). Por

otra parte, en *T. vaginalis* han aislado un gen que codifica para una proteína parecida a la P-gP (Johnson *et al.*, 1994). Estudios recientes se han enfocado a correlacionar los cambios en la actividad y/o niveles de varias protein-cinasas con los niveles de *mdr* y/o acumulación del fármaco, en donde han demostrado que células multiresistentes a fármacos expuestas con estimuladores de protein-cinasa tales como el éster de forbol promotor de tumores [12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato] (TPA) estimulan la fosforilación de la P-gP reduciendo la acumulación del agente farmacológico y propiciando la resistencia a fármacos (Hamada *et al.*, 1987, Fine *et al.*, 1988, Chambers, 1990), aunque no para todos los compuestos (Bates *et al.*, 1992). Sin embargo, el tratamiento de células multiresistentes a fármacos con inhibidores de protein-cinasa (p.e. estaurosporina, calfoestina C) disminuyen la fosforilación de la P-gP e incrementan la acumulación del agente farmacológico (Bates *et al.*, 1993). Los agonistas aumentan la expresión de genes MDR1 tanto a nivel de RNA como a nivel de proteína. Todo esto sugiere que se puede activar un proceso de transducción de señales mediado por la protein-cinasa C (PKC) la cual puede estar involucrada en la regulación de la expresión de genes MDR1, aunque no necesariamente la fosforilación de la P-gP puede conducir a la aparición del fenotipo resistente (Germann *et al.*, 1995). Al respecto cabe la posibilidad de realizar estudios en este tópico para determinar el posible papel que pudiera tener la P-gP y la transducción de señales en el parásito bajo estudio, en la cual se podrían utilizar estimuladores de PKC.

Estos datos, sugieren primeramente que la actividad biológica de un compuesto está dada por su estructura química por lo que sería interesante que se diseñaran fármacos cada vez más selectivos, esto es, que tengan una mayor potencia en su efecto terapéutico y menos efectos colaterales indeseables, por lo que el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas y de los efectos producidos permite realizar correlaciones sobre la manera en que ciertos parámetros fisicoquímicos [p.e. solubilidad, lipofiliencia, efectos electrónicos, ionización y estereoquímica] inciden en el efecto. De esta manera se pueden

diseñar de una manera racional los fármacos a sintetizar logrando estructuras químicas cuyas propiedades les infieran mayor selectividad y eficacia. Por otro lado también el análisis antigénico entre cepas sensibles y resistentes al metronidazol mediante estudios longitudinales puede indicarnos posibles diferencias entre éstas, estudios a nivel de genoma involucrando el uso de sondas moleculares que codifiquen para un determinado gen que en este caso sería el de la piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) o alternativamente el gen de la P-gP que ayudaría a discernir el papel de la amplificación y sobreexpresión de los mismos genes que estuvieran mediando el fenotipo de resistencia. Por otra parte, se puede abordar la evaluación de la actividad de dicha enzima así también como la expresión de RNAm o bien alteraciones en el sitio activo de la PFOR mediante estudios a nivel de cristalografía. Sin embargo, el análisis de la permeabilidad membranal del parásito pudiera efectuarse mediante la utilización de fármaco marcado con nucleótidos radioactivos en donde se evaluara la cantidad de agente quimioterápico incorporado por la célula, o posiblemente con agentes quimioterápicos que emitieran por sí mismos fluorescencia y que mediante el empleo del microscopio de epifluorescencia pudiera localizarse el fármaco en el interior del parásito.

Algunas posibles implicaciones de los resultados obtenidos, sugieren que un determinante importante en la selección de algún método de evaluación de viabilidad a fármacos puede ser el mecanismo de acción del agente quimioterápico y el mecanismo molecular del sistema de evaluación. Por otra parte, las poblaciones de parásitos están compuestas por subpoblaciones mixtas con sensibilidad diferente a fármacos observada en los cultivos continuos, además de que los trofozoitos individuales presentan diferencias fenotípicas y genotípicas, lo cual puede reflejar un papel activo de *G. duodenalis* en las fallas al tratamiento. Esto último propiciaría casos refractarios al tratamiento con agentes quimioterápicos. Por otro lado, la resistencia a fármacos en *G. duodenalis* sugiere que el parásito se está adaptando ante condiciones adversas, además de presentarse diferencias

metabólicas en ambas cepas tanto a nivel de replicación, como de transcripción y traducción.

## VII. CONCLUSIONES :

- El método óptimo para evaluar la sensibilidad de *Giardia duodenalis* a fármacos de la familia de los 5-nitroimidazoles resultó ser el subcultivo en medio líquido, siendo ensayos alternos la tinción con colorantes fluorogénicos (FDA-PI) e incorporación de timidina tritiada ( $^3\text{H-TdR}$ ) en función de su sensibilidad y reproducibilidad ( $P < 0.05 \%$ ).
- El método utilizado en los estudios longitudinales y transversales para evaluar la viabilidad en trofozoitos de *G. duodenalis* fue la tinción de colorantes fluorogénicos debido a su reproducibilidad, sensibilidad y facilidad de realización.
- Las curvas dosis-respuesta mostraron que el orden decreciente de efectividad en los 5-Nitroimidazoles fue: ornidazol  $\approx$  tinidazol > ronidazol > secnidazol > dimetridazol >> metronidazol, tomando como parámetro de sensibilidad la MIC.
- El análisis transversal en cepas aislados y clonas de *G. duodenalis* mostró una gran variabilidad en la sensibilidad a fármacos, siendo estas diferencias más graduales con el metronidazol que con el tinidazol. Sin embargo, el aislado CIEA-10 presentó un comportamiento homogéneo tolerante con ambos fármacos.
- El análisis longitudinal de sensibilidad a fármacos en cultivos continuos presentó variaciones graduales y repentinas en la susceptibilidad a fármacos representativos del grupo de los 5-Ni, mostrándose en general un comportamiento tolerante con el

metronidazol [i.e. WB, P1(8), I2(2), e I3(3)], mientras que con el tinidazol las clonas P1(6) e I3(3) manifestaron una mayor sensibilidad

- Los datos reunidos en este estudio demostraron que el efecto primario del metronidazol en *Giardia duodenalis* se puede observar a nivel de una disminución en la tasa de síntesis de DNA, afectando secundariamente la síntesis de RNA y de proteínas

## ANEXO I: REACTIVOS Y SOLUCIONES COMPLEMENTARIAS

### 1. MEDIO TYI - S - 33 SUPLEMENTADO CON BILIS (ATCC) # 1404

Bilis bovina bacteriológica (Sigma Chem-Cu)	0.5 g
Tripticasa (casein digest peptone, BBL)	20.0 g
Extracto de levadura (BBL)	10.0g
Dextrosa (Baker An)	10.0 g
Cloruro de sodio	2.0 g
Cisteína - monohidrato	2.0 g
Acido ascórbico	0.1 g
Fosfato de potasio monobásico (Baker An)	0.6 g
Fosfato de potasio dibásico (Baker An)	1.0 g
Citrato férrico de . monio (Baker An)	23.0 g

- Disolver en agua destilada hasta 800 ml
  - Ajustar pH de 6.8 - 6.9 y aforar a 900 ml.
  - Filtrar en membrana de 0.22 µm de diámetro de poro.
  - Realizar la prueba de esterilidad
  - Completar con 100 ml de suero bovino descomplementado (HyClone) y 1 ml de stock de penicilina (>0,000 U. I.), estreptomicina (50 mg). Almacenar a 4°C hasta su uso.
- Es estable por dos semanas una vez completado.

## ττ. AMORTIGUADOR DE FOSFATOS - SALINA (PBS) STOCK 10 X

Cloruro de sodio	80.0 g
Cloruro de potasio	2.0 g
Fosfato de sodio dibásico heptahidratado	21.7 g
o dodecahidratado	28.98 g
Fosfato de potasio monobásico	2.0 g

- Disolver en agua destilada hasta 800 ml.
- Ajustar pH a 7.2 y aforar a 1 litro
- Para su uso a 1 X disolver 1:10 en agua destilada.

Es estable varias semanas

## τττ. PREPARACIÓN DE COLORANTES FLUOROGÉNICOS [FDA - PI]

### Solución stock de FDA

- |                                     |       |
|-------------------------------------|-------|
| • FDA                               | 10 mg |
| • CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub> | 1 ml  |

Se almacena a -20 °C protegido de la luz.

### Solución de trabajo de FDA (40 mg/ml)

- |                         |       |
|-------------------------|-------|
| • Solución stock de FDA | 40 µl |
| • PBS pH 7.2            | 10 ml |

**Solución stock de PI (30 mg/ml)**

- PI 1.5 mg
- PBS pH 7.2 50 ml

Se almacena a -4 °C en oscuridad

**Solución de trabajo de PI.**

- Igual a la solución stock (30 mg/ml).

**tu. PREPARACIÓN DE (3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENIL BROMURO  
DE TETRAZOLIO [MTT]**

- PMS 5 mg/ml de PBS 1X
- MTT 0.05 % en PBS 1X

**u. SOLUCIÓN PARA EMISIÓN DE CENTELLEO**

Para preparar 200 ml de dicha solución :

- Ornifluór al 0.4 % 0.8 g
- Tritón 100 X al 30 % 60 ml

Se afora con tolueno a 200 ml.

**UT. PREPARACIÓN DE ÁCIDO TRICLOROACÉTICO [CCl<sub>3</sub>COOH] AL 10 %  
(V/V)**

- Se colocan 10 ml de ácido tricloroacético y se afora con 90 ml de agua destilada estéril, si se observan impurezas se procede a realizar la filtración mediante papeles filtro.

**UTT. PREPARACIÓN DE MEDIO LURIA PARA PRUEBA DE ESTERILIDAD**

- Peptona (Dibco) 10 g
- NaCl (Monterrey) 10 g
- Extracto de levadura (Dibco) 5 g
- NaOH 2 M (Baker) 1 ml
- Agar bacteriológico (Dibco) 15 g

Se disuelven todos los reactivos mencionados anteriormente en 500 ml de agua destilada estéril y se afora a 1 lt con agua.

## ANEXO II : TÉCNICAS COMPLEMENTARIAS

### II.A. CRIOPRESERVACIÓN DE TROFOZOITOS DE *G. duodenalis* EN N<sub>2</sub> LÍQUIDO

- Cultivar los trofozoitos en medio TYI - S - 33 hasta fase logarítmica de crecimiento.
- Enfriar los tubos de cultivo 60 minutos en un baño de agua - hielo.
- Centrifugar a  $840 \times g$  durante 10 minutos a 4° C.
- Retirar el sobrenadante y contar en cámara de Newbauer.
- Agregar medio adicionado con DMSO al 10 % ( en razón 1:1 por cada  $5 \times 10^6$  trofozoitos ) y se resuspenden.
- Transferir el contenido a criotubos Nunc MR de 1.8 ml de capacidad y enfriar en baño de hielo-agua.
- Almacenar los tubos en ultracongelador a -70° C una noche.
- Transferir los criotubos a inmersión en N<sub>2</sub> líquido y almacenarlos hasta su descongelación. Son viables hasta por tres años.

### II.B. DESCONGELACIÓN DE TROFOZOITOS DE *G. duodenalis*

- Colocar los criotubos en baño a 37° C hasta su fusión (ó a temperatura ambiente).
- Transferir el medio con células a un tubo cónico de 15 ml conteniendo 1 ml de medio TYI - S - 33 fresco.

- Centrifugar a  $840 \times g$  durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Decantar el sobrenadante y llenar con 15 ml de medio fresco.
- Revisar los trofozoitos al microscopio óptico.
- Incubar a  $37^{\circ} C$ .
- Cambiar el medio al día siguiente para eliminar las células muertas.

## VIII. REFERENCIAS

- Abbaszadegan M., Gerba C.P., y Rose J.B. (1991) Detection of *Giardia* cyst with a cDNA probe and applications to water samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 927-931
- Adam R.D. (1991) The biology of *Giardia* spp. *Microbiological Reviews* 55 (4): 706-732
- Aggarwal A., Merritt J.W., Jr., y Nash T.E. (1989) Cysteine-rich variant surface proteins of *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 32: 39-48
- Al-Tukhi M.H., Ackers J.P., Al-Ahdal M.N., y Peters W. (1993) Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of anti-giardia specific immunoglobulin G in filter paper blood samples. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87: 36-38
- Andrews R.H., Adams M., Boreham P.F.L., Mayrhofer G., y Meloni B.P. (1989) *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. *International Journal of Parasitology*, 92: 209-217.
- Andrews B.J., Panitescu D., Jipa G.H., Vasile-Bugarin A.C., Vasiliu R.P., y Ronnevig J.R. (1995) Chemotherapy for giardiasis: Randomized clinical trial of bacitracin, bacitracin zinc, and a combination of bacitracin zinc with neomycin. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 52 (4): 318-321.
- Archibald S.C., Mitchell R.W., Upcroft J.A., Boreham P.F.L., y Upcroft P. (1991) Variation between human and animal isolates of *Giardia* as demonstrated by DNA fingerprinting. *International Journal of Parasitology*, 21 (1): 123-124.
- Ayala D.E., y Hermida R.C. (1987) Circannual variation in the incidence of giardiasis: illustrative rationale for timing intervention for health education. *Chronobiologia*, 14: 149
- Barni S.P., De Piccis P., Gerzeli G., y Nano R. (1981) Propidium iodide as a probe to the study of chromatin thermal denaturation *in situ*. *Histochemistry Journal*, 13: 781-791.
- Bates S.E., Currier S.J., Alvarez M., y Fojo T.A. (1992) Modulation of P-glycoprotein phosphorylation and drug transport by sodium butyrate. *Biochemistry*, 31: 6366-6372.
- Bates S.E., Lee J.S., Dickstein B., Spolyar M., y Fojo A.T. (1993). Differential modulation of P-glycoprotein transport by protein kinase inhibition. *Biochemistry*, 32: 9156-9164
- Baum K.F., Berens R.L., Jones R.H., y Marr J.J. (1988) A new method for cloning *Giardia lamblia*, with a discussion of the statistical considerations of limiting dilution. *Journal of Parasitology*, 74 (2): 267-269.
- Bell C.A., Cory M., Fairley T.A., Hall J.E., y Tidwell R.R. (1991) Structure-activity relationships of pentamidine analogs against *Giardia lamblia* and correlation of anti-giardial activity with DNA-binding affinity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35 (6): 1099-1107.

- Bell C.A., Dykstra C.C., Nauman N.A., Cory M., y Fairley T.A. (1993) Structure-activity studies of dicationically substituted bis-benzimidazoles against *Giardia lamblia*. Correlation of anti-giardial activity with DNA binding affinity and giardial topoisomerase II inhibition. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37 (12): 2668-2673.
- Bernal R.R., Hernández S.G., Gámez A.A., y Ramírez H.E. (1995) Giardiasis infantil en un hospital de concentración. Memorias del Primer Encuentro Nacional de Giardiasis, México, D.F.:14.
- Bingham A.K., Jarrol E.L. Jr, Meyer E.A., y Radulescu S (1979) Induction of *Giardia* excystation and the effect of temperature on cyst viability as compared by coim-exclusion and *in vitro* excystation. En *Waterborne Transmission and Transmission of Giardiasis* Edited by Jakubowski W., and Hoff J.C., U.S. Environmental Protection Agency, Ohio 217-226
- Birkhead G., y Vogt R.I. (1989) Epidemiologic surveillance for endemic *Giardia lamblia* infection in Vermont: the role of waterborne and person-to-person transmission. *American Journal of Epidemiology*, 129: 762-768
- Borcham P.F.L., Phillips R.E., y Shepherd R.W. (1984) The sensitivity of *Giardia intestinalis* to drugs *in vitro*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 14: 449-461
- Borcham P.F.L., Phillips R.E., y Shepherd R.W. (1986) The activity of drugs against *Giardia intestinalis* in neonatal mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 18: 393-398
- Borcham P.F.L., Phillips R.E., and Shepherd R.W. (1987) Heterogeneity in the responses of clones of *Giardia intestinalis* to anti-giardial drugs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 406-407
- Borcham P.F.L., Phillips R.E., y Sheperd R.W. (1988 a) Altered uptake of metronidazole *in vitro* by stocks of *Giardia intestinalis* with different drug sensitivities. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82: 104-106
- Borcham P.F.L., Smith N.C., y Shepherd R.W. (1988 b) Drug resistance and the treatment of giardiasis. *Advances in Giardia Research*, P.M. Wallis & B.R. Hammond (eds) University of Calgary Press, Calgary 3-7.
- Borcham P.F.L., Upcroft J.A., y Upcroft P. (1990) Changing approaches to the standard of *Giardia* epidemiology: 1681-2000. *International Journal of Parasitology*, 20: 479-487
- Botero D. (1986) Nematode infections of man: intestinal infections. En: W.C. Campbell and R.S. Rew. (ed) *Chemotherapy of parasitic diseases*. Plenum Press, New York: 267-276.
- Bradley D. (1977) Health aspects of water supplies in tropical countries. En: *Water, wastes and health in hot climates*. Feachem R., McGarrand M., Mara D. (editors). Chichester: John Wiley: 115.

- Brasseur P., Kovanova J., Somo R.M., y Druille P. (1992) Multi-drug resistant *falciparum* malaria in Cameroon in 1987-1988 II. Mefloquine resistance confirmed *in vivo* and *in vitro* and its correlation with quinine resistance. *Journal Tropical of Medicine*, 46 (1) 8-14.
- Britz M.L., y Wilkinson R.G. (1979) Isolation and properties of metronidazole-resistant mutants of *Bacteroides fragilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 16: 19-27.
- Brodsky R.E., Spencer H.C., Jr., y Schultz M.G. (1974) Giardiasis in american travelers to the Soviet Union. *Journal of Infectious Diseases*, 130: 319-323.
- Brown H.W., y Neva F. A. (1983) Basic clinical parasitology, 5a. edición, Appleton-Century-Crofts, U.S.A.: 43-46
- Brown D.M., Upcroft J.A., y Upcroft P. (1995) Free radical detoxification in *Giardia duodenalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 72 : 47-56.
- Buret A., den Hollander, N., Wallis, P.M., Befus D., y Olson M.E. (1990) Zoonotic potential of giardiasis in domestic ruminants. *Journal of Infectious Diseases*, 162: 231-237.
- Butcher P.D., Cevallos A.M., Carnaby S., Alstead E.M., Swarbrick E.T., y Farthing M.J. (1994) Phenotypic and genotypic variation in *Giardia lamblia* isolates during chronic infection. *Gut*, 35 (1): 51-54.
- Carnaby S., McHugh T.D., y Farthing M.J.G. (1991) DNA fingerprinting of *Giardia lamblia* with the M13 bacteriophage genome. *Gut*, 32 (5) A596-597.
- Carnaby S., Katselis P.H., Naccin A., y Farthing M.J.G. (1994) Genotypic heterogeneity within *Giardia lamblia* isolates demonstrated band M13 DNA fingerprinting. *Infection and Immunity*, 62 (5): 1875-1880.
- Carosi G., Gulletta M., Chiodera A., Caligaris S., Matteelli A., y Castelli F. (1994) Parasitological implications of population mobility, amoebiasis and other protozoal intestinal infections. 8<sup>th</sup>. International Congress of Parasitology, Izmir, Turkey. 35.
- Carrada B.T. (1984) Giardiasis intestinal. *Epidemiologia (Primera de dos partes)*. *Revista Mexicana de Pediatría*: 497-505.
- Cavalier S.T. (1987) Eukaryotes with no mitochondria. *Nature*, 326: 332-333.
- Cedillo R.R., Enciso A.M., Martínez A.P., y Ortega G.P. (1991) Isolation of axenic strains of *Giardia lamblia* from symptomatic and asymptomatic patients in México. *Archives of Investigation of Medicine*, 22: 79-85.
- Cerkasovová A., Cerkasov J., y Kulda J. (1984) Metabolic differences between metronidazole resistant and susceptible strains of *Tritrichomonas foetus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 11: 105-118.

- Chacón R.A., Chio M.W., y Sosa C.E.C. (1991) Eficacia de la furazolidona, metronidazol y secnidazol en el tratamiento de la giardiasis en niños. En Compendium Laboratorios Columbia, 11 (2)
- Chambers T.C., McAvoy E.M., Jacobs J.W., y Eilon G. (1990) Protein kinase C phosphorylates P-glycoprotein in multidrug resistant human KB carcinoma cells. The Journal of Biological Chemistry, 265 (13): 7679-7686
- Char S., Shetty N., Narasimha M., Elliot E., Macaden R., y Farthing M.J.G. (1991) Serum antibody response in children with *Giardia lamblia* infection and identification of an immunodominant 57-kilodalton antigen. Parasite Immunology, 13: 329-337
- Char S., Cevallos A.M., Yanson P., Sullivan P.B., Neale G., y Farthing M.J.G. (1992) Impaired IgA response to *Giardia* heat shock antigen in children with persistent diarrhoea and giardiasis. Gut., 10 (5): 125-130
- Chávez B., Cedillo R.R., y Martínez P.A. (1992) *Giardia lamblia*: ultrastructural study of the *in vitro* effect of benzimidazoles. Journal of Protozoology, 39 (4): 510-515
- Chawla L.S., Sehgal A.K., Broor S.L., Verma R.S., y Chhuttani P.N. (1975) Tryptic activity in the duodenal aspirate following a standard test meal in giardiasis. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 10: 445-447.
- Church D.L., Rabin H.R., y Lashley E.J. (1988) Role of hydrogenase 1 of *Clostridium pasteurianum* in the reduction of metronidazole. Biochemical Pharmacology, 37 (8): 1525-1534.
- Cowman A.F. (1991) The P-glycoprotein homologues of *Plasmodium falciparum*: Are they involved in chloroquine resistance?. Parasitology Today, 7(4): 70-75
- Cowman A.F., Galatis D., y Thompson J.K. (1994) Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the pfmdr1 gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. Proceedings of the National Academy of Sciences (U.S.A.), 91: 1143-1147.
- Crouch A.A., Seow W.K., y Thong Y.H. (1986) Effect of twenty-three chemotherapeutic agents on the adherence and growth of *Giardia lamblia* *in vitro*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 80: 893-896.
- Cruz S.M. (1996) Determinación de la eficacia y actividad biológica de drogas del grupo de los benzimidazoles hacia *Giardia duodenalis*. Caracterización parcial de la resistencia a drogas. Tesis de Licenciatura. ENEP-Iztacala. UNAM. En prensa
- Daniel W.W. (1995) Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Primera edición. Ed. Limusa, México: 345-360, 367-369, 467-477.
- Daniels C.W., y Belosevic M. (1995) Disaccharidase activity in male and female C57BL/6 mice infected with *Giardia muris*. Parasitology Research, 81: 143-147.

- Danzig S., y Hatchuel W.L.F. (1977) Single-dose treatment of giardiasis with tinidazole. *S. African Medicine Journal*, 52: 708.
- Davey R.A., Mayrhofer G., y Ey P.L. (1992) Identification of a broad-specificity nucleoside transporter with affinity for the sugar moiety in *Giardia intestinalis* trophozoites. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1109: 172-178.
- Davidson R.A. (1984) Issues in clinical parasitology: the treatment in giardiasis. *American Journal Gastroenterology*, 79: 256-261.
- Davies R.B., y Hibler C.P. (1979) Animal reservoirs and cross-species transmission of *Giardia*. In *Waterborne Transmission of giardiasis*. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio: 104-126.
- De Carneri I. (1966) Variation of the sensitivity of a strain of *Tritrichomonas vaginalis* to metronidazole after culturing in the presence of absence of the drug. En: "Proceedings of the First International Congress of Parasitology" 366-367.
- De Jonckheere J.F., Majewska A.C., y Kasprzak W. (1990) *Giardia* isolates from primates and rodents display the same molecular polymorphism as human isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 39: 23-29.
- Dennis D.T., Smith R.P., Welch J.J., Anderson B., Herndon J.L., y von Reyn C.F. (1993) Endemic giardiasis in New Hampshire: a case-control study of environmental risk. *The Journal of Infectious Diseases*, 167: 1391-1395.
- Diamond L.S., Harlow D., y Cunnick C.C. (1978) A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 4: 431-432.
- Duncombe V.M., Bolin T.D., Davis A.E., Cummins A.G., y Crouch R.L. (1978) Histopathology in giardiasis: a correlation with diarrhoea. *Australian and New Zealy Journal of Medicine*, 8: 392-396.
- Edlind T.D., y Chakraborty P.R. (1987) Unusual ribosomal RNA of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Nucleic Acids Research*, 15: 7889-7901.
- Edlind T.D. (1989) Susceptibility of *Giardia lamblia* to aminoglycoside protein synthesis inhibitors: correlation with rRNA structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33: 484-488.
- Edwards D.I., Dye M., y Carne Hilary. (1973) The selective toxicity of antimicrobial nitroheterocyclic drugs. *Journal of General Microbiology*, 76: 135-145.
- Edwards D.I., Thompson E.J., Tomusange J., y Shanson D. (1979) Inactivation of metronidazole by aerobic organisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 5: 315-316.

- Eliopoulos G.M., y Moellering R.C. Jr. (1991) Antimicrobial combinations. En V. Lorian (ed.) Antibiotics in laboratory medicine, 3rd. ed. The Williams & Wilkins Co. Baltimore . 432-492.
- Erlandsen S.L., y Chase D.G. (1974) Morphological alterations in the microvillus border of villous epithelial cells produced by intestinal micro-organisms. American Journal of Clinical Nutrition, 27: 1277-1286.
- Erlandsen S.L., y Bemrick W.J. (1987) SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. Journal of Parasitology, 73: 623-629.
- Erlandsen S.L., Meyer E.A., y Nash T.E. (1988) Panel discussion on taxonomy of the genus *Giardia*. Advances in *Giardia* Research, P.M. Wallis & R.R. (eds ), University of Calgary Press, Calgary : 287-289.
- Erlandsen S.L., Bemrick W.J., Schupp D.E., Shields J.M., Jarroll E.L., Sauch J.F., y Pawlay J.B. (1990 a) High resolution immunogold localization of *Giardia* cyst wall antigens using field emission SEM with secondary and backscatter electron imaging. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 38: 625-632.
- Erlandsen S.L., Bemrick W.J., Wells C.L., Feely D.E., Knudsen L., Campbell S.R., van Keulen H., y Jarroll E.L. (1990b) Avenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great heron (*Ardea herodias*). Journal of Parasitology, 76: 717-724.
- Ey P.L., Davey R.A., y Duffield G.A. (1992) A low-affinity nucleobase transporter in the protozoan parasite *Giardia intestinalis*. Biochimica et Biophysica Acta, 1109: 179-186.
- Farid Z., El-Masry, N.A., Miner W.F., y Hassan A. (1974) Tinidazole in treatment of giardiasis. Lancet. 2: 721.
- Farthing M.J.G., Mata L., Urrutia J.J., y Kronmal R.A. (1986a) Natural history of *Giardia* infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth. American Journal of Clinical Nutrition, 43: 393-403.
- Farthing M.J.G., Pereira M.E.A., y Keusch G.T. (1986 b) Description and characterization of a surface lectin from *Giardia lamblia*. Infection and Immunity, 51: 661-667.
- Farthing M.J.G. (1990) Immunopathology of giardiasis. Springer Seminars in Immunopathology, 12: 269-282.
- Faubert G.M. (1988) Evidence that giardiasis is a zoonosis. Parasitology Today, 4(3): 66-68.
- Favennec L., Chochillon C., Magne D., Meiller D., Raichvarg D., Savel J., and Govert J.G. (1992) A new screening assay for anti-giardial compounds. effects of various drugs on the adherence of *Giardia intestinalis* to Caco2 cells. Parasitology Research, 78: 80-81.
- FDA. (1991) Nitrofurans. withdrawal of approval of new animal drug applications. Federal Register, 56: 41902-41912.

- Feachem R.G. (1977) Water supplies for low-income communities: resource allocation, planning and design for a crisis situation. In: Water, wastes and health in hot climates Feachem R., McGarry M., Mara D., (eds). Chichester: John Wiley: 81-85.
- Figueroa L., Navarrete N., Franjola R., y Puga S. (1981) A coproparasitoscopic survey among school children from the city of Concepcion, Chile. *Boletín Chileno de Parasitología*, 36: 66-67.
- Filice F.P. (1952) Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. University of California Publications in Zoology, 57: 53-143.
- Fine R.L., Patel J., y Chabner B.A. (1988) Phorbol esters induce multidrug resistance in human breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences (U.S.A.)*, 85: 582-586.
- Fuentes N. I., Escobar B.T., González U.B.J., y Jung C.H. (1992) Determinación de constantes de ionización (pKa) de compuestos con actividad antihelmíntica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 23 (4): 102.
- Ganguly N.K., y Mahajan R.C. (1981) Comparative evaluation of indirect haemagglutination and immunofluorescence tests in sero-diagnosis of giardiasis. *Indian Journal of Medicine Research*, 73 (suppl.): 111-113.
- García L., Hermida R.C., Ayala D.E., y Arroyave R.J. (1989) Geographic differences in the circannual incidence of giardiasis. *Journal Interdis Cycle Research*, 20: 185-186.
- Germann U.A., Chambers T.C., Ambukdar S.V., Pastan I., y Gottesman M.M. (1995) Effects of phosphorylation of P-glycoprotein on multidrug resistance. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 27(1): 53-61.
- Gill D.R., Hyde S.C., Higgins C.F., Valverde M.A., Mintenig G.M., y Sepúlveda F.V. (1992) Separation of drug transport and chloride channel functions of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Cell*, 71: 23-32.
- Gillin F.D., y Diamond L.S. (1978) Clonal growth of *Entamoeba histolytica* and other species of *Entamoeba* in agar. *Journal of Protozoology*, 25 (4): 539-543.
- Gillin F.D., y Diamond L.S. (1980) Clonal growth of *Giardia lamblia* trophozoites in a semisolid agarose medium. *Journal of Parasitology*, 66 (2): 350-352.
- Gillin F.D., y Diamond L.S. (1981) *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: Growth responses to reducing agents. *Experimental Parasitology*, 51: 382-391.
- Gordts B., Hemelhot W., Tilborgh K.V., Retore P., Cadranal S., y Butzler J.P. (1985) Evaluation of a new method for routine *in vitro* cultivation of *Giardia lamblia* from human duodenal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, 22: 702-704.
- Gupta R.K., y Mehta S. (1973) Giardiasis in children: a study of pancreatic functions. *Indian Journal of Medical Research*, 61: 743-748.

- Hall A., y Nahar Q. (1993) Albendazole as a treatment for infections with *Giardia intestinalis* in children in Bangladesh. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 87:84-86.
- Hamada H., Hagiwara K.I., Nakajima T., y Tsuruo T. (1987) Phosphorylation of the Mr 170,000 to 180,000 glycoprotein specific to multidrug-resistant tumor cells: Effects of verapamil, trifluoperazine and phorbol esters. Cancer Research, 47: 2860-2865.
- Hare D.D., Jarroll E.L., y Lindmark D.G. (1989) *Giardia lamblia*: characterization of proteinase activity in trophozoites. Experimental Parasitology, 68: 168-175.
- Harley V.S. (1988) The importance of non-waterborne modes of transmission for giardiasis a case study. Advances in *Giardia* Research. P.M. Wallis & B.R. Hammond (eds). University of Calgary Press, Calgary.: 15-19.
- Hartong W.A., Gourley W.K., y Arvanitakis C. (1979) Giardiasis. clinical spectrum and functional structural abnormalities of the small intestinal mucosa. Gastroenterology, 77: 61-69.
- Hason P.R., y Patterson B.A. (1987) Epidemiology of *Giardia lamblia* infection in children: cross-sectional and longitudinal studies in urban and rural communities in Zimbabwe. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 37: 277-282.
- Hernida R.C., Ayala D.E., y Arroyave R.J. (1990) Circannual incidence of *Giardia lamblia* in México. Chronobiol International, 7 329-340.
- Hernández S.J. (1992) Identificación de una molécula de superficie de *Giardia lamblia* de  $\approx$  200 kDa y su participación en el fenómeno de adherencia. Tesis de Doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Departamento de Inmunología I.P.N. México : 27.
- Hill D.R., Pohl R., y Pearson R.D. (1986) *Giardia lamblia*: a culture method for determining parasite viability. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 35 (6): 1129-1133.
- Hoffman J., y M. Smetz. (1983) A kinetic study on the enzymatic hydrolysis of fluorescein diacetate and fluorescein di-beta-D-galactopandranoside. Analytical Biochemistry, 131: 180-186.
- Honigberg B.M., y Livingston I.C. (1966) *In vitro* sensitivity of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole. En "Proceedings of the First International Congress of Parasitology": 365.
- Hoskins L.C., Winawer S.Y., Broitman S.A., Gottlieb L.S., y Zamcheck N. (1967) Clinical giardiasis and intestinal malabsorption. Gastroenterology, 53: 265-279.
- Hossain M.M., Ljungstrom I., Glass R.I., Lundin L., Stoll B. J., y Hultdt G. (1983) Amoebiasis and giardiasis in Bangladesh: parasitological and serological studies. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 77: 552-554.
- Hoyle G.F., Borcham P.F.L., Parsons P.G., Ward C., y Biggs B. (1989) The effect of drugs on the cell cycle of *Giardia intestinalis*. Parasitology, 99: 333-339.

- Hyde J.E. (1990) The dihydrofolate reductase-thymidylate synthetase gene in the drug resistance of malaria parasites. *Pharmacology Therapeutic*, 48: 45-59.
- Inge P.M., y Farthing J.G. (1987) A radiometric assay for anti giardial drugs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 345-347.
- Inge P.M.G., Edson C.M., y Farthing M.J.G. (1988) Attachment of *Giardia lamblia* to mammalian intestinal cells. *Gut*, 29: 795-801.
- Ings R.M.J., McFadzean J.A., y Ormerod W.E. (1974) The mode of action of metronidazole in *Trichomonas vaginalis* and other micro-organisms. *Biochemical Pharmacology*, 23: 1421-1429.
- Jacobson M.D. (1996) Reactive oxygen species and programmed cell death. *TiBS Trends en Biochemical Sciences*, 21 (3): 83-86.
- Jagger J. (1976) Effects of near-ultraviolet radiation on microorganisms. *Photochemistry Photobiology*, 23: 451-454.
- Janoff E.N., Craft J.C., Pickering L.K., Novotny T., Blaser M.J., Knisley C.V., y Reller L.B. (1989) Diagnosis of *Giardia lamblia* infections band detection of parasite-specific antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, 27 (3): 431-435.
- Jocelyn P.C. (1972) *Biochemistry of the SH group*. Academic Press, London, New York:: 55.
- Jokipii L., y Jokipii A.M.M. (1979) Single-dose metronidazole and tinidazole as therapy for giardiasis: success rates, side effects, and drug absorption and elimination. *Journal of Infectious Diseases*, 140: 984-988.
- Jokipii L., y Jokipii A.M.M. (1980) *In vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites to metronidazole and tinidazole. *Journal of Infectious Diseases*, 141 (3): 317-325.
- Jokipii L., y Jokipii M.M. (1982) Treatment of giardiasis: comparative evaluation of ornidazole and tinidazole as a single oral dose. *Gastroenterology*, 83: 399-404.
- Jones K.H., y Senft J.A. (1985) An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *The Journal of Histochemistry*, 33 (1): 77-79.
- Johnson P. J. (1993) Metronidazole and drug resistance. *Parasitology Today*, 9 (5): 183-186.
- Kabickova H., et al (1986) *Acta Universitatis Carolinae-Biologica*, 30: 513-519.
- Kabnick K.S., y Peattie D.A. (1991) *Giardia*: a missing link between prokaryotes and eukaryotes. *American Scientist*, 79: 34-43.

- Kamath K.R., y Murugasu R. (1974) A comparative study of four methods for detecting *Giardia lamblia* in children with diarrheal disease and malabsorption. *Gastroenterology*, 66: 16-21
- Kappas K., y Juranek D. (1988) *Giardia* in the well (letter). *Journal of the American Medical Association*, 259: 1810.
- Karanis P., Maier W., Schoenen D., y Seitz H.M. (1991) Studies on the lethal effect of ultraviolet light on *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Research*, 77: 369-373
- Kateleris P.H., McHugh T.D., Camaby S., Cavellos A.M., Char S., y Farthing M.J.G. (1991) Bile modulates genotypic and phenotypic characteristics of *Giardia lamblia*. *Gut*, 32: A1260
- Kateleris P.H., y Farthing M.J.G. (1992) Diarrhoeal and malabsorption in giardiasis: a multifactorial process. *Gut*, 33: 295-297.
- Katz M. (1989) *Parasitic Diseases*, 2nd edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, U.S.A.: 129-133.
- Keister D.B. (1983) Axenic culture of *Giardia lamblia* in TANDI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77: 487-488
- Kelly J.D., and Hall C.A. (1979) Resistance of animal helminths to anthelmintics. *Advanced Pharmacology Chemotherapy*, 16: 89-128
- Keystone J.S., Kraiden S., y Warren M.R. (1978). Person-to-person transmission of *Giardia lamblia* in day-care nurseries. *Cancer Medicine Association Journal*, 119: 241-242, 247-248
- Knight R., (1980), Epidemiology and transmission of giardiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74 (4): 433-435.
- Knox R.J., Knight R.C., y Edwards D. I. (1981 a) Interaction of nitroimidazole drugs with DNA *in vitro*: structure-activity relationship. *British Journal of Cancer*, 44: 741-745.
- Knox R.J., Knight R.C., y Edwards D.I. (1981 b) Misonidazole-induced thymidine release from DNA. *Biochemical Pharmacology*, 30 (14): 1925-1929.
- Koch R.L., Chrystal E.J., Beaulieu B.B.Jr., y Goldman P. (1979 a) Acetamide-a metabolite of metronidazole formed by the intestinal flora. *Biochemical Pharmacology*, 28: 3611-3615
- Koch R.L., y Goldman P. (1979 b) The anaerobic metabolism of metronidazole forms N-(2-hydroxyethyl) oxamic acid. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 208: 406.
- Kotel'nikov V.M. (1986) Factors influencing the <sup>3</sup>H-thymidine uptake and DNA synthesizing cells. *Eksp. Onkd.*, 8 (6): 9-15.
- Kulda J., Cerkasov J., Demes P., y Cerkasov A. (1984) *Trichomonas foetus*: stable anaerobic resistance to metronidazole *in vitro*. *Experimental Parasitology*, 57: 93-103.

- Lacey E. (1990) Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today*, **6**: 112-115.
- Lamb W. (1859) Mikroskopische untersuchungen der darmexcrete. *Vierteljahrsschrift für die Praktische Heilkunde*, **61**: 1-58.
- LaRusso N.F., Tomasz M., Muller M., y Lipman R. (1977) Interaction of metronidazole with nucleic acids *in vitro*. *Molecular Pharmacology*, **13**: 872-882.
- Legator M.S., Conor T.H., y Stoeckel M. (1975) Detection of mutagenic activity of metronidazole and nirdazole in body fluid of humans and mice. *Science*, **76**: 1118-1119.
- Lew B., Ward H., Keusch G.T., y Pereira M.E.A. (1986) Lectin activation in *Giardia lamblia* by host protease: a novel host-parasite interaction. *Science*, **232**: 71-73.
- Lewin B. (1994) Mutations. En: *Genes V*. Oxford University Press, U.S.A.: **59**: 101-107.
- Lindley T.A., Chakraborty P.R., y Edlind T.D., (1988). Heat shock and stress response in *Giardia lamblia*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **28**: 135-144.
- Lindmark D.G., y Müller M. (1976) Antitrichomonal action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. *Antimicrobiological Agents and Chemotherapy*, **10**: 476.
- Lindmark D.G. (1980) Energy metabolism of the anaerobic protozoon *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **1**: 1-12.
- Lindmark D.G., y Miller J.J. (1988) Enzyme activities of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* trophozoites and cyst. *Advances in Giardia Research*. P.M. Wallis & B.R. Hammond (eds). University of Calgary Press, Calgary: 187-189.
- MacDonald T.T., y Spencer J. (1988) Evidence that activated mucosal T cells play a role in the pathogenesis of enteropathy in human small intestine. *Journal of Experimental Medicine*, **167**: 1341-1349.
- Mahbubani M.G., Bej A.K., Perlin M.G., Schaefer F.W., Jakubowski W., y Atlas R.M. (1992) Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes. *Journal of Clinical Microbiology*, **30**: 74-78.
- Majewska A.C., Kasprzak W., DeJoneckere J.F., y Kaczmarek E. (1991) Heterogeneity in the sensitivity of stocks and clones of *Giardia* to metronidazole and omidazole. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **85**: 67-69.
- McIntyre P., Borcham P.F.L., Phillips R.E., y Shepherd R.W. (1986) Chemotherapy in giardiasis: clinical responses and *in vitro* drug sensitivity of human isolates in axenic culture. *Journal of Pediatrics*, **108**: 1005-1010.

- Meloni B.P., Thompson R.C.A., Reynoldson J.A., y Seville P. (1990) Albendazole: a more effective anti giardial agent *in vitro* than metronidazole or tinidazole. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **84**: 375-379.
- Meloni B.P., Lymbery A.J., y Thompson R.C.A. (1995) Genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis* by enzyme electrophoresis: Implications for reproductive biology, population structure, taxonomy and epidemiology. *Journal of Parasitology*, **81** (3): 368-383.
- Mendelson R.M. (1980) The treatment of giardiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **74**: 438-439.
- Meyer E.A. (1976) *Giardia lamblia*. isolation and axenic cultivation. *Experimental Parasitology*, **39**: 101-105.
- Meyer E.A., y Jarroll E.M. (1980) Giardiasis. *American Journal of Epidemiology*, **111**: 1-11.
- Miotti P.G., Gilman R.H., Santosham M., Randder R.W., y Yolken R.H. (1986) Age-related rate of seropositivity of antibody to *Giardia lamblia* in four diverse populations. *Journal of Clinical Microbiology*, **24**: 972-975.
- Mockenhaupt F.P. (1995) Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Today*, **11** (7): 248-253.
- Morecki R., y Parker J.G. (1967) Ultrasound studies of the human *Giardia lamblia* and subjacent jejunal mucosa in a subject with steatorrhea. *Gastroenterology*, **52**: 151-164.
- Moreno S.N., Mason R.P., y Docampo R. (1984) Distinct reduction of nitrofurans and metronidazole to free radical metabolites by *Tritrichomonas foetus* hydrogenosomal and cytosolic enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, **259**: 8252-8259.
- Morgan U.M., Constantine C.C., Greene W.K., y Thompson R.C.A. (1993 a) RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis of *Giardia* DNA and correlation with isoenzyme data. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene*, **87**: 702-705.
- Morgan U.M., Reynoldson J.A., y Thompson R.C.A. (1993 b) Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **37**: 328-331.
- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65**: 55-63.
- Nash T.E., y Keister D.B. (1985) Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of *Giardia*. *Journal of Infectious Diseases*, **152** (6): 1166-1171.
- Nash T.E., Aggarwal A., Adam R.D., Conrad J.T., y Merritt J.W., Jr. (1988) Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Journal of Immunology*, **141** (2): 636-641.

- Nash T.E., Herrington D.A., Levine M.M., Conrad J.T., y Merritt J.W. (1990 a) Antigenic variation of *Giardia lamblia* in experimental human infections. *Journal of Immunology*, **144**: 4362-4369.
- Nash T.E., Conrad J.T., y Merritt J.W. Jr. (1990 b) Variant specific epitopes of *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **42**: 125-132.
- Nash T.E., Merritt J.W., y Conrad J.T. (1991) Isolate and epitope variability in susceptibility of *Giardia lamblia* to intestinal proteases. *Infection and Immunity*, **59**: 1334-1340.
- Nash T. (1992) Surface antigen variability and variation in *Giardia lamblia*. *Parasitology Today*, **8** (7): 229-234.
- North M.J., Mottram J.C., y Coombs G.H. (1990) Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitology Today*, **6**: 270-275.
- Oduola A.M.J., Wilhous W.K., Weatherly N.F., Bowdre J.H., y Desjardins. (1988) *Plasmodium falciparum*: Induction of resistance to mefloquine in cloned strains by continuous drug exposure *in vitro*. *Experimental Parasitology*, **67**: 354-360.
- Okada M., Fuchigami T., Ri S., Kohroggi N., y Omae T. (1983) The PTPABA pancreatic function test in giardiasis. *Postgraduate Medical Journal*, **59**: 79-82.
- Osipova S.O., Giandasov Z.A., Dekhan-Khodzhaeva N.A., y Shafer N.P. (1984) Detection of specific antibodies in saliva in lamblia infection. *Medicine Parazitoly Parazite Bolezni*, **5**: 57-60.
- Parenti D.M. (1989) Characterization of a thiol proteinase in *Giardia lamblia*. *Journal of Infectious Diseases*, **160**: 1076-1080.
- Pasley J.N., Daly J.J., McCullough D., McChesney T., Daly E.B., y Tank S.K. (1989) Circannual incidence of *Giardia lamblia*. *Chronobiologia International*, **6**: 185-189.
- Pérez, A., Argüello, R., y Ortega M.G. (1990) Estudios sobre el ciclo celular de *Giardia lamblia*. Identificación de subpoblaciones de trofozoitos con características diferenciales en cultivos axénicos. Memorias del XVIII Congreso Nacional. Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. San Luis Potosí, S.L.P.:172.
- Pettersson T. (1975) Single-dose tinidazole therapy for giardiasis. *British Medicine Journal*, **1**: 395.
- Popovic S.O. (1990) Propanolol and metronidazole for the treatment of metronidazole resistant giardiasis. *Journal Clinical Gastroenterology*, **12** (5): 604-605.
- Reynolds A.V., Hamilton J.M.T., y Brumfitt W. (1975) A comparison of the *in vitro* activity of metronidazole, tinidazole, and nimorazole against gram-negative anaerobic bacilli. *Journal Clinical Pathology*, **28**: 775-778.

- Rosenkranz H.S., y Speck W.T. (1975) Mutagenicity of metronidazole: activation by mammalian liver microsomes. *Biochemistry and Biophysical Research Communications*, **66**: 520.
- Rosentein E. y Del Campo A.M. (1979) Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 25ava. edición Mexicana, Ediciones P.L.M.:126.
- Rotman B., y Papermaster B.W. (1966) Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proceedings of the National Academy of Sciences (U.S.A.)*, **55**: 134-141.
- Rustia M., y Shubik P. (1979) Experimental induction of hepatomas, mammary tumors and other tumors with metronidazole in non-inbred Sas: MRC(W1)BR rats. *Journal of the National Cancer Institute*, **63**: 863.
- Salih S.Y., y Abdalla R.E. (1977) Symptomatic giardiasis in Sudanese adults and its treatment with tinidazole. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **80**: 11-13.
- Samra H.K., Ganguly N.K., Garg U.C., Goydal J., y Mahajan R.C. (1988) Effect of excretory-secretory products of *Giardia lamblia* on glucose and phenylalanine transport in the small intestine of Swiss albino mice. *Biochemistry International*, **17**: 801-812.
- Seudiero D.A., Shoemaker R.H., Paull K.D., Monks A., Tierney S., Nofziger T.H., Currens M.J., Seniff D., y Boyd M.R. (1988) Evaluation of a soluble tetrazolium formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumour cell lines. *Cancer Research*, **48**: 4827-4833.
- Schenone H., Orfali A., Galdames M. y Rojo M. (1975) Tratamiento de la amebiasis and la giardiasis en niños mediante la administración oral de tinidazol, un agente antiprotozoario de amplio espectro. *Boletín Chileno de Parasitología*, **30**: 76-79.
- Schmerin M.J., Jones T.C., y Klein H. (1978) Giardiasis: association with homosexuality. *Annual International of Medicine*, **88**: 801-803.
- Schupp D. G., y Erlandsen S. L. (1987) A new method to determine *Giardia* cyst viability: Correlation of fluorescein diacetate and propidium iodide staining with animal infectivity. *Applied and Environmental Microbiology*, **53** (4): 704-707.
- Smith P.D., Gillin F.D., Spira W.M., y Nash T.E. (1982) Chronic giardiasis: studies on drug sensitivity, toxin production and host immune response. *Gastroenterology*, **83**: 797-803.
- Smith N.C., Bryant C., y Borcham P.F.L. (1988) Possible roles for pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thiol-dependent peroxidase and reductase activities in resistance to nitroheterocyclic drugs in *Giardia intestinalis*. *International Journal of Parasitology*, **18**: 991-997.
- Sogin M.L., Gunderson J.H., Elwood H.J., Alonso R.A., y Peattie D.A. (1988) Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science*, **243**: 75-77.

- Speelman P. (1985). Single dose tinidazole for the treatment of giardiasis. *Agents Chemotherapeutics*, 27: 227-229.
- Sullivan P.B., Marsh M.N., Phillips M.B., Dewit O., Neale G., Cevallos A.M., Yamson P., y Farthing M.J.G. (1991) Prevalence and treatment of giardiasis in chronic diarrhoea and malnutrition. *Archives of Disease in Childhood*, 60: 304-306.
- Takano J., y Yardley J.H. (1965) Jejunal lesions in patients with giardiasis and malabsorption. An electron microscopic study. *Bulletin of Johns Hopkins Hospital*, 116: 413-429.
- Tandon B.N., Tandon R.K., Satpathy B.K., y Shrinivas. (1977) Mechanism of malabsorption in giardiasis: a study of bacterial flora and bile salt deconjugation in upper jejunum. *Gut*, 18: 176-181.
- Thomas G.(1977) Effects of near ultraviolet ligh on microorganisms. *Photochemistry Photobiology*, 26: 669-674.
- Thompson R.C.A., Lymbery A.J., y Meloni B.P. (1988) Giardiasis a zoonosis in Australia?. *Parasitology Today*, 4: 201.
- Thompson R.C.A., y Meloni B.P. (1993 a) Molecular variation in *Giardia*. *Acta Tropica*, 53: 167-184.
- Thompson R.C.A., Reynoldson J.A., y Mendis A.H.W. (1993 b) *Giardia* and giardiasis. *Advances in Parasitology*, 32: 70-160.
- Tocher J.H., y Edwards D.I. (1994) Evidence for the direct interaction of reduced metronidazole derivatives with DNA bases. *Biochemical Pharmacology*, 48(6): 1089-1094.
- Townson S.M., Laqua H., Upercroft P., Borcham P.F.L., y Upercroft J.A. (1992) Induction of metronidazole and furazolidone resistance in *Giardia*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86: 521-522.
- Townson S.M., Hanson G.R., Upercroft J.A., y Upercroft P. (1994) A purified ferredoxin from *Giardia duodenalis*. *European Journal of Biochemistry*, 220: 439-446.
- Upercroft J.A., Borcham P.F.L., y Upercroft P. (1989) Molecular mechanisms of drug resistance in *Giardia intestinalis*. *Immunological and Molecular Basis of Pathogenesis in Parasitic Diseases*, ed. R. C. Ko. University of Hong Kong, Hong Kong: 141-153.
- Upercroft P., Mitchell R., y Borcham P.F. (1990 a) DNA fingerprinting of the intestinal parasite *Giardia duodenalis* with the M13 phage genome. *International Journal of Parasitology*, 20: 319-323.
- Upercroft J.A., Upercroft P., y Borcham P.F.L. (1990 b) Drug resistance in *Giardia intestinalis*. *International Journal of Parasitology*, 20 (4) : 489-496.

- Uproft J.A., Healey A., Murray D.G., Borcham P.F.L., y Uproft P. (1992) A gene associated with cell division and drug resistance in *Giardia duodenalis*. *Parasitology*, 104: 395-405.
- Uproft J.A., y Uproft P. (1993) Drug resistance and *Giardia*. *Parasitology Today*, 9 (5): 187-189.
- Uproft J.A., Campbell R.W., y Uproft P. (1996) Quinacrine-resistant *Giardia duodenalis*. *Parasitology*, 112: 309-313.
- Videau D., Niel G., Siboulet S., y F. Catalan. (1978) Secnidazole: A new 5-nitroimidazole derivate with a long half-life. *British Journal of Venereal Diseases*, 54: 77-80.
- Vinayak V.K., Jain P., y Naik S.R. (1978) Demonstration of antibodies in giardiasis using the immunodiffusion technique with *Giardia* cyst as antigen. *Annual Tropical Medicine Parasitology*, 72: 581.
- Voogd C.E., Stel J.J.V.D., y Jacobs J.A. (1979) The mutagenic action of nitroimidazoles. A comparison of the mutagenic action of several nitroimidazoles and some imidazoles. *Mutation Research*, 66: 207-221.
- Wahl M.S., Gilman R.H., O'Hare J.P., keister D.B., and Spira W.M. (1988) A new technique for determining *in vitro* antimicrobial agent sensitivity of axenically cultivated strains of *Giardia lamblia*. *Advances in Giardia Research*. P.M. Wallis & B.R. Hammond (eds.) University of Calgary Press, Calgary :21-24.
- Warren K. S. (1988) *The biology of parasitism: a molecular and immunological approach*, New York : 3-12.
- Weinbach E.C., Costa J.L., y Wieber S.C. (1985) Antidepressant drugs suppress growth of the human pathogenic protozoan *Giardia lamblia*. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 47: 145-148.
- Wellems T.E. (1991) Molecular genetics of drug resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasitology Today*, 7(5): 110-112.
- White G., Bradley D., y White A. (1972) *Drawers of water*. Chicago: Chicago University Press : 162-176.
- Wiesehahn G.P., Jarroll E.L., Lindmark D.G., Meander E.A., y Hallick L.M. (1984) *Giardia lamblia*: autoradiographic analysis of nuclear replication. *Experimental Parasitology*, 58: 94-100.
- Wilson C.M., Serrano A.E., Wasley A., Bogenschutz M.P., Shankar A.H., y Wirth D.F. (1989) Amplification of a gene related to mammalian *mdr* genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum* *Science*, 244: 1184-1186.

- Wolfe M.S. (1984) Symptomatology, diagnosis, and treatment. En: *Giardia and Giardiasis: Biology, pathogenesis and Epidemiology* Erlandsen S.L., y Meyer E.A.(eds.) Plenum Press, New York :147-161.
- Wright R.A., Spencer H.C., Brodsky R.E., y Vernon T.M. (1977) Giardiasis in Colorado: an epidemiologic study. *American Journal of Epidemiology*, 105: 330-336.
- Wright W., Melwani I., Phillipson J., y Warhurst C. (1992) Determination of anti-Giardial activity *in vitro* by means of soluble formazan production. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*, 86: 517-519.
- Zhang W.W., y Samuelson J. (1993) Molecular cloning of the gene for a novel ABC superfamily transporter of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 62: 131-134.
- Zolg J.W., Plitt J.R., Chen G., y Palmer S. (1989) Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene as the molecular basis for pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 36: 253-262.