



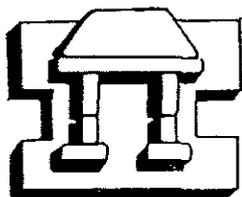
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

DETERMINACION DE LA EFICACIA Y ACTIVIDAD
in vitro DE FARMACOS DE LA FAMILIA DE LOS
BENCIMIDAZOLES EN EL PROTOZOARIO *Giardia*
duodenalis. CARACTERIZACION PARCIAL DE LA
RESISTENCIA A DROGAS EN ESTE PARASITO.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
MARICELA CRUZ SOTO



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, MEXICO

2009

287401



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.

Esta tesis fue desarrollada en el laboratorio 2 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) bajo la dirección conjunta de la Dra. Guadalupe Ortega Pierres y el M en C. Raúl Argüello García.

Dedico esta tesis:

A mi mamá, absolutamente por todo, porque no hay nada que no te deba a ti.

A mi papá, por tu dedicación y ejemplo.

A esos dos chamacos latosos que tengo por hermanos, si los hubiera escogido no le hubiera atinado tan bien, son los mejores hermanos que pude tener; gracias por aguantarme tanto Manuel y Héctor.

A mi mejor amigo, alguien muy especial en mi vida, a quien admiro y amo profundamente, Miguel Angel López Martínez.

A mis liberadores de estrés, la parte mas pequeña de la familia, Tomy, Lobo, Muñe, Chiquis, Mirru y Peque.

Todo mi agradecimiento para:

La Dra. Guadalupe Ortega Pierres por el apoyo, comprensión y afecto que me ha brindado durante mi estancia en su grupo de trabajo, así como la enorme oportunidad que me ha dado de aprender dentro de un ambiente tan familiar y de respeto.

Raúl Argüello García, mil gracias por tantas enseñanzas, por tus comentarios, tu apoyo y amistad.

Lydia Romero Montoya, por tu gran apoyo en todo momento, tu voz de aliento en las cinéticas más cansadas, tus sugerencias y aportaciones, así como tu insistencia en que ya imprima esta tesis. Muchas gracias Dyta.

Arturo Pérez-Taylor Reyes, no sólo has sido un apoyo crucial en mi trabajo y en el de muchos otros, incansable e incondicional compañero y amigo. Muchas gracias por tu entrega, por tu tiempo y tus consejos.

A Rocío Fonseca Liñán por tus aportaciones y comentarios.

A Blanca Herrera Ramírez más que por ser tan trabajadora y eficiente, cuidadosa y responsable así como por haber sido un gran apoyo en mi trabajo, gracias por tu amistad Blanquita

Al Sr. René López Bolaños, sin usted señor, esta tesis simplemente no existiría. Gracias por su apoyo.

A los doctores Lilián Yépez Mulia, Marco Antonio Vega López y Fernando Alba Hurtado por sus comentarios y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

A las secretarias Verónica Ramírez Nieves, Leticia Juárez y Guadalupe Ruiz Granados por su enorme apoyo y colaboración

A todos mis compañeros del laboratorio dos, particularmente a aquellos junto a los que realice el trabajo experimental correspondiente a esta tesis: Fátima, María Elena, Ana María, Matilde, Nancy, Noemí, David, René, Héctor y Patricia. Y a los que vinieron después de ellos: Mónica, Luis, Héctor Alonso, Raúl, Alberto, Leticia, Nancy, Guadalupe, Karla, Mariana, María Luisa y Romel.

Lo que de ustedes he aprendido trasciende por mucho de sólo lo académico.

Un agradecimiento especial para

El Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, institución que me acogió y me ha dado tantas oportunidades de desarrollo.

La Universidad nacional Autónoma de México, que hoy y siempre me hará sentir orgullosamente universitaria.

La Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala y los directivos que en su momento trabajaron en ella, particularmente las profesoras Arlette López Trujillo y Martha Salcedo, directora del plantel y jefa de la carrera de Biología respectivamente durante mi preparación académica. A ustedes y el conjunto de catedráticos que me impartieron clase teóricas y prácticas les debo un enorme agradecimiento pues debido a su dedicación jamás me fue suspendida una sola práctica por falta de materiales o reactivos y siempre pusieron su mayor dedicación a su trabajo.

A todos y cada uno de mis compañeros del grupo 4 de la generación 90-93, en especial a Liliana, Emilio, Norma, Maribel, Cyntia, Eva, Ivonne, Rocío, Daniel Ortiz, Daniel Chávez, Francisco, Mónica, Anabel, Jorge Humberto y Verónica.



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	4
CUADROS	4
FIGURAS	5
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	12
TAXONOMÍA Y CLASIFICACIÓN	12
CICLO DE VIDA	14
TRANSMISIÓN Y PATOGENICIDAD	18
GIARDIOSIS EN MÉXICO	22
DIAGNÓSTICO	24
TRATAMIENTO	26
BENCIMIDAZOLES	29
ANTECEDENTES	32
RESISTENCIA Y TOLERANCIA	32
MECANISMOS DE RESISTENCIA Y MULTIRRESISTENCIA	35
RESISTENCIA A BENCIMIDAZOLES	37
BENCIMIDAZOLES Y PgP	38
RESISTENCIA DE <i>Giardia</i> A DIFERENTES DROGAS	39
EFECTO DE BENCIMIDAZOLES EN <i>Giardia</i>	42
JUSTIFICACIÓN	44
OBJETIVOS GENERALES	45
OBJETIVOS PARTICULARES	45
MATERIAL Y MÉTODOS	46
PARÁSITOS	46
CULTIVO DE TROFOZOÍTOS DE <i>G. duodenalis</i>	46



CRIOPRESERVACIÓN DE TROFOZOÍTOS EN NITRÓGENO LÍQUIDO	47
OBTENCIÓN DE CLONAS DE <i>G. duodenalis</i>	48
TRATAMIENTO CON FÁRMACOS	48
EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE TROFOZOÍTOS DE <i>G. duodenalis</i> EXPUESTOS A ALBENDAZOL <i>in vitro</i>	49
a) Subcultivo en medio líquido	50
b) Subcultivo en medio semisólido de agarosa	50
c) Evaluación morfológica de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	51
d) Incorporación de timidina tritiada ($^3\text{H-TdR}$)	51
e) Reducción de MTT	52
f) Tinción con colorantes fluorogénicos	52
DETERMINACIÓN DE LAS DL_{50} DE DIFERENTES BENCIMIDAZOLES EN TROFOZOÍTOS DE <i>G. duodenalis in vitro</i>	53
EVALUACIÓN DE SINÉRGIA Y ANTAGONISMO ENTRE FÁRMACOS DEL GRUPO DE LOS BENCIMIDAZOLES HACIA TROFOZOÍTOS DE <i>G. duodenalis</i>	53
ANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD DE CEPAS, AISLADOS Y CLONAS DE <i>G. duodenalis</i> EXPUESTOS A DL_{50} DE ALBENDAZOL Y MEBENDAZOL	54
a) Transversal	54
b) Longitudinal	54
OBTENCIÓN DE CULTIVOS RESISTENTES A ALBENDAZOL Y MEBENDAZOL	55
a) Selección espontánea	55
b) Separación de células en gradiente de sacarosa	55
c) Mutagénesis	55
d) Cultivo en concentración subletal ascendente de droga	56
CINÉTICA DE INCORPORACIÓN DE PRECURSORES RADIOMARCADOS	57
MÉTODOS ESTADÍSTICOS	58
RESULTADOS	59
CULTIVO, CRIOPRESERVACIÓN Y CLONACIÓN DE CEPAS Y AISLADOS DE <i>G. duodenalis</i>	59
ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA EXPOSICIÓN DE TROFOZOÍTOS DE <i>G. duodenalis</i> A DERIVADOS DE BENCIMIDAZOL	60
SELECCIÓN DEL MÉTODO DE EVALUACIÓN DE VIABILIDAD PARA TROFOZOÍTOS DE <i>G. duodenalis</i>	61
a) Ensayos bioquímicos	62
i. Tinción con colorantes fluorogénicos	62
ii. Reducción de MTT	66
iii. Incorporación de timidina tritiada ($^3\text{H-TdR}$)	67



b) Ensayos fisiológicos	68
<i>i.</i> Subcultivo en medio semisólido de agarosa	68
<i>ii.</i> Subcultivo en medio líquido	69
<i>iii.</i> Alteración morfológica	70
DETERMINACIÓN DE LAS DL₅₀ DE DIFERENTES BENCIMIDAZOLES EN LA CEPA WB74	
RELACIÓN ENTRE ESTRUCTURA Y EFECTIVIDAD <i>in vitro</i> DE DERIVADOS DE BENCIMIDAZOL CONTRA <i>G. duodenalis</i>	77
EVALUACIÓN DE SINERGIA Y ANTAGONISMO ENTRE FÁRMACOS DEL GRUPO DE LOS BENCIMIDAZOLES	78
DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE TROFOZOÍTOS DE AISLADOS, CEPAS Y CLONAS DE <i>G. duodenalis</i> EXPUESTOS A DL₅₀ DE ALBENDAZOL Y MEBENDAZOL	81
a) Evaluación transversal de la sensibilidad ante albendazol y mebendazol	81
b) Evaluación longitudinal de la sensibilidad ante albendazol y mebendazol	85
OBTENCIÓN DE CULTIVOS DE <i>G. duodenalis</i> TOLERANTES Y RESISTENTES A ALBENDAZOL Y MEBENDAZOL	90
ANÁLISIS CINÉTICO DE INCORPORACIÓN DE PRECURSORES RADIOMARCADOS	94
DISCUSIÓN	102
CONCLUSIONES	131
APÉNDICE	135
MEDIO TYI-S-33 SUPLEMENTADO CON BILIS (ATCC #1404).	135
AMORTIGUADOR DE FOSFATOS - SALINA (PBS) STOCK 10 X	136
PREPARACIÓN DE COLORANTES FLUOROGENICOS (FDA - PI)	136
PREPARACIÓN DE BROMURO DE DIFENIL TETRAZOLIO (MTT)	137
SOLUCIÓN PARA EMISIÓN DE CENTELLEO	137
PREPARACIÓN DE ÁCIDO TRICLOROACÉTICO AL 10 % (V/V)	138
CRIOPRESERVACIÓN DE TROFOZOÍTOS DE <i>G. duodenalis</i> EN N ₂ LIQUIDO	138
DESCONGELACIÓN	139
PREPARACIÓN DE MEDIO LURIA	139
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140



ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS

Cuadro 1. Nombres comerciales, presentaciones y laboratorios que distribuyen albendazol y mebendazol en México _____	31
Cuadro 2. Cepas, aislados y clonas empleados. _____	46
Cuadro 3. Fármacos derivados del grupo de los bencimidazoles empleados en este trabajo. ____	48
Cuadro 4. Eficacia del método de clonación de aislados de <i>G. duodenalis</i> por medio de dilución limitante. _____	60
Cuadro 5. Características de solubilidad en DMFM de los bencimidazoles empleados. _____	61
Cuadro 6. Curvas de regresión y valores de DL para los métodos de evaluación de viabilidad probados. _____	66
Cuadro 7. Eficiencia de formación de colonias de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> en medio semisólido de agarosa _____	69
Cuadro 8. Curvas de regresión y valor de DL para trofozoítos de la cepa WB expuestos a los diferentes bencimidazoles probados. _____	75
Cuadro 9. Combinaciones de fármacos utilizados a DL ₂₅ y DL ₅₀ . _____	78
Cuadro 10. MIC y CFI calculados para las diferentes combinaciones de fármacos en la cepa WB.	79
Cuadro 11. Cepas, aislados y clonas que fueron seleccionados a partir de los resultados del análisis transversal realizado. _____	85
Cuadro 12. Resultados estadísticos de la evaluación de sensibilidad a albendazol de cultivos resistentes obtenidos por diferentes estrategias. _____	93
Cuadro 13. Mutaciones en el gene de la β -tubulina relacionadas con cambios en la sensibilidad a bencimidazoles en diferentes organismos. _____	124



FIGURAS

Fig. 1. Aspectos morfológicos y ciclo de vida de <i>G. duodenalis</i> .	15
Fig. 2. Estructura bidimensional sugerida para la P-glicoproteína de humano.	37
Fig 3. Curvas dosis-respuesta de los métodos de evaluación de viabilidad empleados en trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> de las cepas WB y P1.	63
Fig 4. Evaluaciones microscópicas de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> de la cepa WB expuestos a albendazol.	64
Fig 5. Curvas de incorporación de timidina tritiada en trofozoítos de la cepa WB.	65
Fig. 6a. Cuantificación de trofozoítos por los métodos de alteración morfológica y de subcultivo en medio líquido.	72
Fig 6b. Cuantificación de trofozoítos por los métodos de alteración morfológica y de subcultivo en medio líquido.	73
Fig. 7. Valores de porcentajes de viabilidad <i>in vitro</i> de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> expuestos a fármacos de la familia de los bencimidazoles.	76
Fig. 8. Viabilidad desarrollada por la cepa WB al emplear las MIC independientes de los fármacos y combinaciones de estas.	80
Fig. 9. Determinación de los porcentajes de viabilidad <i>in vitro</i> de las cepas WB, P1 y sus clonas en una evaluación transversal de sensibilidad ante albendazol y mebendazol.	82
Fig. 10. Determinación de los porcentajes de viabilidad <i>in vitro</i> de los aislados de procedencia mexicana IMSS-2 e IMSS-3 y sus clonas en una evaluación transversal de sensibilidad ante albendazol y mebendazol.	83
Fig. 11. Determinación de los porcentajes de viabilidad <i>in vitro</i> de los aislados de origen mexicano CIEA-10 y CIEA-52 con sus clonas en una evaluación transversal de sensibilidad ante albendazol y mebendazol.	84
Fig. 12. Determinación de porcentaje de viabilidad de las cepas WB, P1 y sus clonas en una evaluación longitudinal de sensibilidad <i>in vitro</i> ante albendazol y mebendazol.	87



- Fig. 13.** Determinación de porcentaje de viabilidad de los aislados de origen mexicano IMSS-2 e IMSS-3 y sus clonas en una evaluación longitudinal de sensibilidad *in vitro* ante albendazol y mebendazol. _____ 88
- Fig. 14.** Determinación de porcentajes de viabilidad del aislado de origen mexicano CIEA-52 y sus clonas en una evaluación longitudinal de sensibilidad *in vitro* ante albendazol y mebendazol. ____ 89
- Fig. 15.** Determinación de los porcentajes de viabilidad de las cepas WB, P1 y cultivos de éstas inducidos a resistencia en una evaluación de la sensibilidad *in vitro* con albendazol. _____ 92
- Fig. 16.** Cinética de marcaje con timidina tritiada de las cepas WB sensible y resistente a albendazol. _____ 96
- Fig. 17.** Cinética de marcaje empleando uridina tritiada en las cepas WB sensible y resistente a albendazol. _____ 97
- Fig. 18.** Cinética de marcaje empleando cisteína marcada con S³⁵ en las cepas WB sensible y resistente a albendazol. _____ 98
- Fig. 19.** Cinética de deformación celular de trofozoitos de las cepas WB y resistente a albendazol expuestas a esta droga. _____ 99



ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
% (m/v)	Concentración expresada en masa por volumen
°C	Temperatura en grados centígrados
μCi	Micro Curie
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrómetro
³⁵ S-cisteína	Cisteína marcada con azufre
³ H-TdR	Timidina marcada con tritio
³ H-UdR	Uridina marcada con tritio
ATCC	American Type Culture Collection
ANOVA	Análisis Observacional de Varianza
BI-S-33	Medio Biosate (B), hierro (I), suero(S)
CEM	Línea celular
CIE	Contra Inmuno Electroforésis
cm	Centímetro
CFI	Concentración Fraccional Inhibitoria
cpm	Cuentas por minuto
DI ₁₀	Dosis inhibitoria al 10%
DI ₅₀	Dosis inhibitoria al 50%
DL ₅₀	Dosis letal para el 50% del cultivo
DL ₉₀	Dosis letal para el 90% del cultivo
DMFM	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dot-ELISA	ELISA en gota
Dr.	Doctor
ELISA	Ensayos de inmunoabsorbente acoplado a enzima
EUA	Estados Unidos de América



ABREVIATURA	SIGNIFICADO
<i>et al.</i>	Abreviatura del latín “y colaboradores”
FACS	Fluorescein Activated Cell Sorter
Fd I	Ferredoxina I
FDA	Diacetato de fluoresceína
FVI	Fracción de Viabilidad Independiente
Fig.	Figura
g	Gramos
<i>G. duodenalis</i>	<i>Giardia duodenalis</i>
hr, hrs	Hora y horas
IFV	Índice fraccional de viabilidad
kDa	Kilodaltones
kg	Kilogramo
ki	Constante de inhibición
km	Constante de Michaelis-Menten
M	Molar
MBq	Mega Bequerelios
MDCK	Línea celular obtenida de riñón de perro “Madin-Darby Canine Kidney”
mg	Miligramo
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
MJ/día	Mega Joule por día
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
mmol	Milimol
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato reducido
N₂	Nitrógeno Molecular
nM	Nanomolar
nm	Nanómetros
P1	Cepa Portland-1



ABREVIATURA	SIGNIFICADO
P1-RA	Cepa P1 inducida a resistencia a albendazol
P1-RM	Cepa P1 inducida a resistencia a mebendazol
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFOR	Enzima piruvato ferredoxina oxido reductasa
pH	Potencial de hidrógeno
PI	Yoduro de propidio
pmol	Picomol
PMS	Metasulfato de fenazina
R-1	Radical sustituyente en posición 1 del bencimidazol
R-2	Radical sustituyente en posición 2 del bencimidazol
RAPD	DNA polimórfico amplificado al azar
RFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción
RNA	Ácido ribonucleico
S	Suspensión
T	Tableta
TA	Temperatura ambiente
TBq	Tera Becquerelios
TDP	Timidina difosfato
TMP	Timidina monofosfato
TP-S-1	Medio Tripticasa (T), Peptona (P), suero (S)
TTP	Timidina trifosfato
TYI-S-33	Medio Tripticasa (T), extracto de levadura (Y), hierro (I), suero(S)
UI	Unidades internacionales
UMP	Uridina monofosfato
UV	Luz ultravioleta
WB-C5	Clona 5 de baja adhesión de la cepa WB
WB-C7	Clona 7 mutagenizada a partir de C5
WB-RA	Cepa WB inducida a resistencia a albendazol
WB-RM	Cepa WB inducida a resistencia a mebendazol
x g	Gravedades



RESUMEN

La giardiosis es una infección intestinal causada por el protozoo parásito *Giardia duodenalis*, misma que tiene gran importancia en México y en todo el mundo tanto por sus manifestaciones sintomáticas como las repercusiones de la infección asintomática en la población pediátrica, ya que es capaz de interferir con el desarrollo normal del individuo al provocarle síndrome de malnutrición. Es por ello que en la última década en México se encuentran en desarrollo campañas que buscan la desparasitación infantil como son las Semanas Nacionales de Salud. Durante éstas, se administra a todo niño en edad escolar una dosis única de 400 mg de albendazol, un fármaco del grupo de los Bencimidazoles.

Dada la importancia que está adquiriendo el uso de drogas del grupo de los Bencimidazoles en México, en el presente trabajo se propuso estudiar el efecto de fármacos de este grupo en el protozoo *G. duodenalis in vitro*. Para ello se realizaron comparaciones de métodos de evaluación de viabilidad de tipo bioquímico y fisiológico. Entre los ensayos bioquímicos se incluyeron la tinción con colorantes fluorogénicos, la reducción de sales de formazán a partir de MTT y la incorporación de timidina tritiada ($^3\text{H-TdR}$), y dentro de los ensayos fisiológicos: el subcultivo en medio semisólido de agarosa, el subcultivo en medio líquido y la evaluación de la alteración morfológica. Se determinó que los métodos más adecuados a utilizar para la evaluación de la viabilidad de un cultivo tratado con bencimidazoles *in vitro* fueron los ensayos fisiológicos, particularmente el subcultivo en medio líquido y la evaluación de la alteración morfológica, teniendo este último además la ventaja de una mayor rapidez y sensibilidad.

Empleando dicho método se evaluó la efectividad de varios bencimidazoles en la cepa WB, encontrándose el orden de efectividad siguiente: Nocodazol > Albendazol \geq Mebendazol > Oxibendazol >> Tiabendazol >> Bencimidazol.

Por otra parte también se evaluó la sensibilidad *in vitro* a albendazol y mebendazol (usando la DL_{50}) de aislados de origen mexicano en análisis de tipo transversal así como longitudinal. Las evaluaciones transversales de sensibilidad a DL_{50} de albendazol y mebendazol permitieron identificar algunas clonas con sensibilidad diferencial respecto al cultivo parental en el momento de la evaluación. En las condiciones empleadas se pudieron observar diferencias de sensibilidad dentro de un rango reducido de viabilidad. El orden de variabilidad observado entre las diferentes cepas y aislados considerando su conjunto de clonas fue el siguiente: WB > P1 > IMSS-2 > IMSS-3 > CIEA-52 > CIEA-10.



En las evaluaciones longitudinales de sensibilidad a DL_{50} de albendazol y mebendazol se observó una variación recurrente en la viabilidad observada tanto en las clonas como en las cepas y aislados. El tratamiento con mebendazol desarrolló una variabilidad menor de la que se observó ante albendazol, y no pareció existir una relación entre el estado de sensibilidad o tolerancia a los dos fármacos. El orden de variabilidad observado entre las diferentes cepas y aislados, considerando su conjunto de clonas, fue el mismo que el observado para el análisis transversal.

Posteriormente se realizaron diferentes estrategias en busca de la obtención de cultivos resistentes a albendazol y mebendazol, como son la evaluación de diferentes cepas, aislados y sus clonas, mutagénesis empleando elementos tales como colchicina y luz ultravioleta y cultivo permanente en concentración subletal creciente del fármaco, encontrándose que el único método que permitió obtener resultados con sensibilidad apropiada fue este último con el cual se desarrollaron cultivos de las cepas WB y P1 capaces de crecer en albendazol o mebendazol hasta una concentración de 0.18 a 0.2 μM después de 2 años de iniciado el proceso de cultivo.

De manera particular el cultivo de la cepa WB capaz de crecer 0.18 μM de albendazol fue empleado en la evaluación de incorporación de precursores de procesos celulares fundamentales (replicación de DNA [3H -TdR], transcripción de RNA [3H -UdR] y traducción de proteínas [L- ^{35}S] cisteína]). Se observó que la incorporación de timidina en condiciones basales (en ausencia de fármaco) mostró una alta incorporación de la marca radioactiva para la cepa WB y disminuida para la WB-RA, lo cual es un indicio de la menor capacidad replicativa que muestra esta última como modificación en su condición de resistencia. En presencia de albendazol, la incorporación de este precursor se vio reducida. La incorporación de uridina en condiciones basales en la cepa WB mostró una mayor incorporación que la WB-RA. Por su parte la cepa WB-RA en presencia de fármaco incrementó significativamente la incorporación de este precursor, lo cual hace suponer una posible respuesta a nivel de RNA, sugerentemente de mensajeros específicos inducidos por esta condición de estrés a la cual la cepa se encuentra adaptada. Por su parte, la incorporación de cisteína no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las cepas sensible y resistente en condiciones con o sin fármaco.

Los cultivos resistentes obtenidos resultan un modelo interesante de estudio de los mecanismos de resistencia que puede presentar este parásito, el cual a su vez podrá en el futuro dar lugar al diseño de estrategias que permitan combatir con más eficacia las infecciones causadas por *G. duodenalis* mediante protocolos de quimioterapia.



INTRODUCCIÓN

A través de la historia, las enfermedades parasitarias han sido causantes de importantes problemas de salud para la humanidad que han prevaecido hasta la actualidad manifestándose en todo el orbe. De estas enfermedades, las infecciones entéricas que producen procesos diarreicos son causantes de una gran mortalidad y morbilidad, principalmente en poblaciones rurales o de escasos recursos donde tienen sus mayores efectos sobre la población infantil. En ocasiones el diagnóstico y tratamiento, así como la prevención de dichas enfermedades, no lleva un seguimiento adecuado, o bien presenta dificultad en su desarrollo, lo cual agrava el problema. Entre estos padecimientos, algunas parasitosis intestinales causadas por protozoarios juegan un papel importante en relación a la salud pública nacional y mundial.

En el caso de la giardiosis (antes denominada giardiasis), cuyo agente etiológico es *G. duodenalis* (ó *G. lamblia* ó *G. intestinalis*), resulta ser la infección del tracto intestinal más común causada por un protozoario a nivel mundial. Su prevalencia varía entre 2 % y 5 % en países industrializados y un 20 % a 30 % en naciones en vías de desarrollo (Farthing, 1993; Adam, 1991). Esto hace necesario su estudio, especialmente en aspectos relacionados al control de dicha parasitosis.

TAXONOMÍA Y CLASIFICACIÓN

Los protozoarios clasificados dentro del Género *Giardia* fueron observados y descritos por primera vez por Antony van Leeuwenhoek en 1681, quien al examinar sus propias heces relacionó la diarrea que padecía con la presencia de este protozoario. Doscientos años más tarde, en 1859, el fisico sueco Vilem Lamb observó muestras fecales de niños con diarrea disentérica y describió a los trofozoítos que encontró como protozoarios de 0.018 a 0.021 mm de longitud por 0.0086 a 0.011 mm de ancho con forma semejante a un renacuajo, con un disco suctor y dos núcleos, presentando



movimiento con patrones circulares y le dió el nombre de *Cercomonas intestinalis*. Desde esas fechas y hasta ahora el nombre ha causado controversia (Boreham *et al.*, 1990).

Grassi, en 1879, estableció el género *Dicercomonas* con dos subgéneros, *Monomorphus* (*Hexaminta*) y *Dimorphus* (*Giardia*); más tarde, en 1881, se reemplazó *Dimorphus* por *Megastoma* al observar los mismos organismos en animales domésticos. Blanchard en 1888 propuso el nombre *Lambliia*; sin embargo, Kunstler en 1882 había establecido el género *Giardia* el cual se utiliza actualmente (Boreham *et al.*, 1990).

El nombre específico también ha sido causa de controversia, ya que la determinación de especies se ha hecho tradicionalmente por dos métodos. Inicialmente se empleó el hospedero infectado como criterio de clasificación, aunque este método es poco práctico y preciso, pues la cantidad de especies hospedadoras es enorme, y se demostró que una misma especie de *Giardia* puede parasitar a organismos de diferentes especies. El segundo método fue propuesto por Filice en 1952 y se basa en las variaciones morfológicas observadas por microscopía de luz así como en la apariencia del cuerpo medio del trofozoíto. De este modo se redujo inicialmente a tres el número de especies pertenecientes al género, y fueron: *G. agilis* que parasita anfibios, *G. muris* en roedores y *G. duodenalis* (*G. lambliia* o *G. intestinalis*) en mamíferos incluyendo al hombre. Más tarde surgió también *G. psittaci* que parasita aves domésticas (*Melopsittacus undulatus*) (Erlandsen y Bemrick 1987; Ackers, 1980; Adam, 1991; Thompson y Reynoldson, 1993; Boreham *et al.*, 1990) y a partir de 1990 Erlandsen restableció la especie *G. ardae* (de la garza grande azul *Ardea herodias*) que había estado comprendida dentro de la especie de *G. muris* por la presencia de un único flagelo caudal, pero fue separada de esta por las diferencias en la secuencia de nucleótidos de la subunidad ribosomal 5.8S (Erlandsen *et al.*, 1990); posteriormente surgió una sexta especie denominada *Giardia microti* la cual tiene peculiaridades distintivas en función de la morfología del quiste y a la secuencia de la subunidad pequeña del rRNA (van Keulen *et al.*, 1998; Monis *et al.*, 1999).

Actualmente los protozoarios del Género *Giardia* están clasificados dentro del Phylum Sarcomastigophora, Subphylum mastigophora, en la Clase Zoomastigophorea junto con otros parásitos como *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Trichomona* y *Dientamoeba* y se considera perteneciente al Orden Diplomonadida, suborden Diplomonadina y la Familia Hexamitidae (Levine *et al.*, 1980; Cox, 1981; Baker, 1989; Adam, 1991; Siddall *et al.*, 1992; van-Keulen *et al.*, 1993).



El nombre actualmente aceptado por la Organización Mundial de la Salud para el parásito humano es el de *G. intestinalis*, aún y cuando se mantiene el uso de *G. duodenalis* y *G. lamblia* (Boreham *et al.*, 1990)

Debido a la importancia de los protozoarios del Género *Giardia* desde un punto de vista evolutivo, se han estudiado estos con la finalidad de establecer su posición filogenética. Empleando diferentes métodos se ha observado que este parásito resulta pertenecer al linaje cercano de un ancestro común entre procariotes y eucariotes. Esto se ha concluido a partir de la ausencia de organillos como las mitocondrias (Cavalier, 1987), a la secuencia de genes ribosomales (Sogin *et al.*, 1989), a la secuencia del factor de elongación 2 (Hashimoto *et al.*, 1995) y de actina (Drouin *et al.*, 1995), así como a la comparación los codones usados por *Giardia* con los de otros organismos, donde se ha mostrado incluso más emparentado con algunos procariotes que con otros protozoarios aún pertenecientes a la Clase Zoomastigophorea (Char y Farthing 1992). Incluso se le ha llegado a considerar como un eslabón en la evolución entre procariotes y eucariotes (Kabnick y Peattie, 1991), sin embargo, al analizar caracteres ultraestructurales de especies pertenecientes al Orden Diplomonadida se llegó a considerar a este protozoario como un falso pivote en la evolución de eucariotes (Siddall *et al.*, 1992).

CICLO DE VIDA

El protozoario *Giardia duodenalis* presenta un ciclo de vida directo simple, con dos estadios biológicos que son: el trofozoíto y el quiste.

El quiste es la entidad infectiva (Figura 3) la cual presenta la capacidad de resistir las condiciones adversas del medio ambiente debido a su pared, cuya parte externa está formada de 7 a 20 filamentos y está separada del citoplasma por una capa interna. En relación con la composición de carbohidratos de la pared aún existe controversia sobre cuales monómeros constituyen principalmente a esta estructura (Ward *et al.*, 1985 y Jarroll *et al.*, 1989a). Los organelos más evidentes dentro del quiste son sus 4 núcleos (o 2 si el enquistamiento es reciente y no se ha dado la división nuclear), los cuerpos basales, cuerpos medianos, fragmentos del disco ventral y elementos estructurales del flagelo.

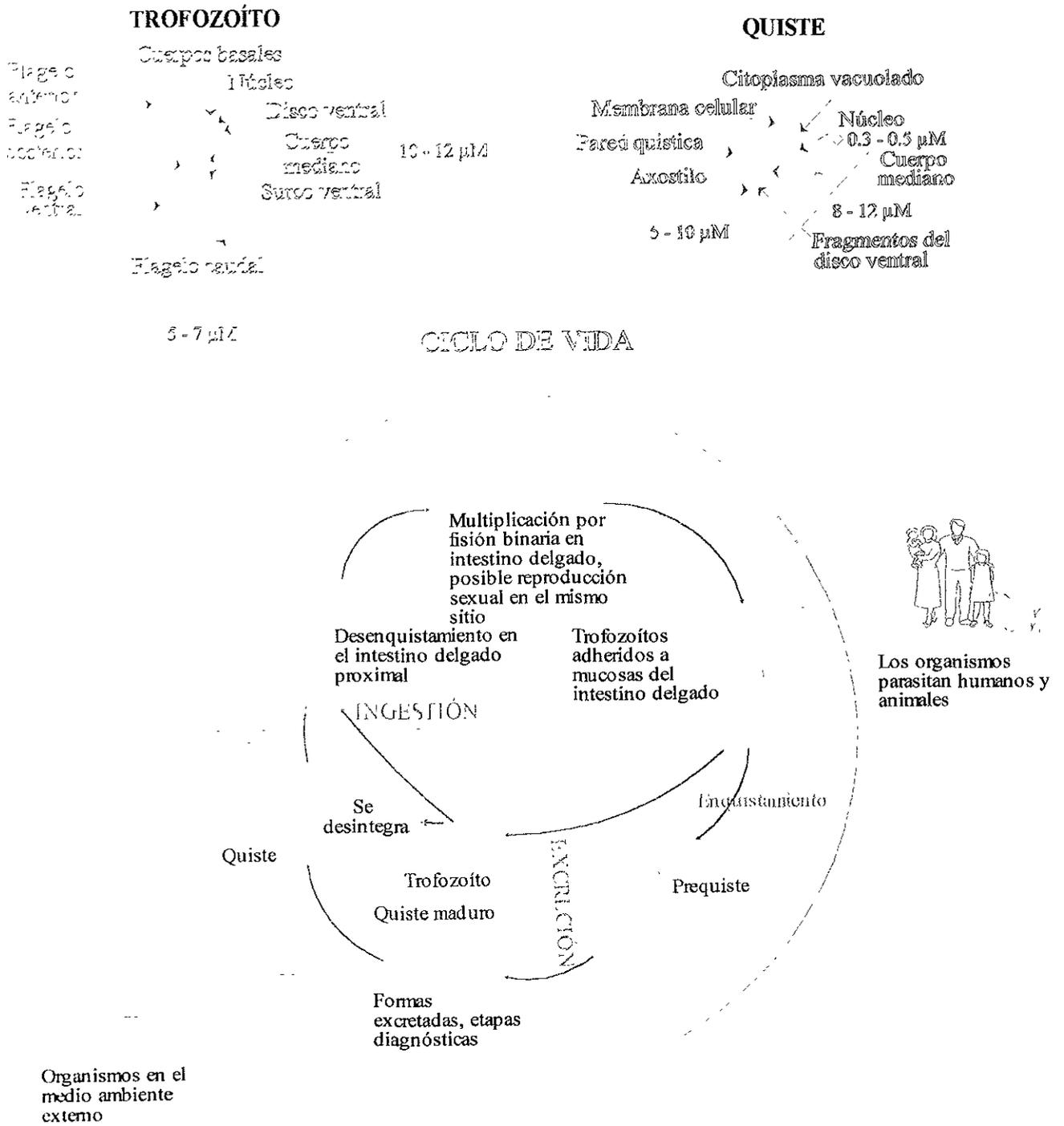


Fig. 1. Aspectos morfológicos y ciclo de vida de *G. duodenalis*.



La infección se adquiere por la ingestión de quistes presentes en agua o alimentos contaminados con éstos. Al paso de los quistes por el estómago y bajo las condiciones ácidas que ahí prevalecen, ocurre el desenquistamiento. Así, de cada quiste emerge un trofozoíto tetranucleado el cual, en poco tiempo (aproximadamente 30 minutos *in vitro*), sufre una citocinesis dando lugar a dos trofozoítos binucleados. Todos los trofozoítos son capaces de reproducirse dando lugar nuevamente a trofozoítos con dos núcleos aparentemente iguales (Kabnick y Peattie, 1991).

El desenquistamiento se ha podido llevar a cabo en condiciones *in vitro* empleando soluciones con un pH ácido entre 1.3 y 4.0, aunque también se ha hecho a un pH neutro. Varios estudios han permitido sugerir la participación de las secreciones pancreáticas en el proceso (Ackers, 1980; Adam, 1991; Thompson y Reynoldson, 1993). Así se han realizados algunos análisis de la ultraestructura del quiste por microscopía electrónica en los cuales han observado la formación de gran cantidad de vesículas durante la fase de enquistamiento y desenquistamiento (Sheffield y Bjorvatn, 1977; Coggins y Shaefer, 1986; Gillin *et al.*, 1991; Luján *et al.*, 1995). Además de esto existe una proteína de ≈ 26 kDa vinculada con estos procesos pues se ha visto que se incrementa en el interior de las vesículas antes mencionadas durante las dos etapas (Mowatt *et al.*, 1995).

El trofozoíto es la entidad patógena, se caracteriza por presentar forma de media pera la cual es mantenida gracias a un citoesqueleto rígido. Presenta en la parte ventral un organelo cóncavo que abarca $2/3$ partes de ella y recibe el nombre de disco adherente, el cual parece ser de gran importancia en la patogenicidad del organismo, pues es una estructura rica en α -actina, miosina y tropomiosina que le permite la adhesión a las microvellosidades intestinales, además se distingue del resto de la superficie por la presencia de la proteína giardina (Peattie *et al.*, 1989) así como por una gran cantidad de microtúbulos organizados en espiral. Su motilidad se debe a la presencia de 4 pares de flagelos (anteriores, posteriores, ventrales y caudales) y además, en la parte dorsal presenta un cuerpo medio el cual se cree está relacionado funcionalmente con el disco ventral y los flagelos posteriores y caudales.

Entre los organelos que presenta destacan el aparato de Golgi (Reiner *et al.*, 1990; Luján *et al.*, 1995; aunque su presencia es controversial en fases diferentes al proceso de enquistamiento), vacuolas y un par de núcleos y carece de mitocondrias, peroxisomas y nucleólo (Cavalier, 1987;



Gillin *et al.*, 1991; Adam, 1991; Thompson y Reynoldson, 1993). En relación al mecanismo de secreción proteica, se ha indicado recientemente la presencia tanto de aparato de Golgi como de retículo endoplásmico atípicos y primitivos (Gillin *et al.*, 1996).

El trofozoito es capaz de adherirse a las microvellosidades intestinales a nivel de duodeno y yeyuno y es ahí donde realiza las funciones de nutrición y reproducción, esta última es llevada a cabo por fisión binaria longitudinal y en últimas fechas se ha sugerido la posibilidad de presentar alguna forma sexual (Baker, 1989; Thompson y Reynoldson, 1993).

Bajo condiciones que intentan reproducir las presentes en el yeyuno medio se ha inducido el enquistamiento *in vitro*, el cual requiere elementos tales como presencia de sales biliares, glicocolato, ácido mirístico y pH 7.8. Entre los elementos que estimulan el enquistamiento *in vitro* se encuentran soluciones de lipoproteínas y colesterol con albúmina sérica bovina en substitución del suero bovino normalmente utilizado en el medio de cultivo (Reiner *et al.*, 1995), así como también se ha visto que existen lectinas que pertenecen a la dieta normal y favorecen este proceso (Ortega *et al.*, 1994).

En cuanto al enquistamiento se ha observado la presencia de antígenos específicos del quiste los cuales aparecen en el interior del aparato de Golgi tras cinco horas de incubación en medio de enquistamiento. Dichos antígenos son transportados por vesículas entre las seis y dieciocho horas posteriores y aparecen en la pared aproximadamente a las 24 horas; así mismo, se ha sugerido la participación de un procesamiento diferencial de RNA mensajero en la regulación del proceso de enquistamiento (Que *et al.*, 1996). El ciclo finaliza al ser expulsados los quistes por las excretas y reingeridos por otro hospedero. Algunos trofozoitos son también liberados, especialmente en casos de diarrea severa y en ocasiones también llegan a ser infectivos (Ackers, 1980; Owen, 1980a; Adam, 1991; Thompson y Reynoldson, 1993). Por su parte los quistes, se ha observado que son viables después de mantenerlos a 4°C hasta por más de dos meses y a 37°C por hasta 4 días (Bingham *et al.*, 1979), esto les permite diseminarse e infectar a un nuevo hospedero a través de diversas vías.

Aparentemente el ciclo de vida de *G. duodenalis* no sólo puede llevarse a cabo en el humano, sino también en animales domésticos y salvajes por lo que se le considera una enfermedad de tipo zoonótica (Buret *et al.*, 1990; Boreham *et al.*, 1990; Castor *et al.*, 1990; Strandén *et al.*, 1990; Schantz, 1991; Thompson y Reynoldson, 1993; Meloni *et al.*, 1995). Este aspecto resulta



más evidente debido a las observaciones realizadas en voluntarios humanos y en jerbos después de haber sido inoculados e infectados con quistes obtenidos de rata canguro gigante de Gambia, en los individuos tanto como en los jerbos se observó la expulsión de quistes, los voluntarios sufrieron síntomas propios de esta parasitosis y presentaron respuesta a nivel de anticuerpos (Majewska, 1994).

TRANSMISIÓN Y PATOGENICIDAD

La giardiosis se transmite principalmente a través de dos vías: el agua y los alimentos. El agua potable en muchas ocasiones proviene de ríos y lagos que se encuentran expuestos a la defecación tanto humana como animal. Esto último aunado a que los procesos de potabilización como la clorinación en ocasiones no son suficientemente efectivos (Leahy *et al.*, 1987; Sauch y Berman 1991; Sauch *et al.*, 1991), ha hecho necesaria la búsqueda de herramientas que permitan una adecuada detección de agua contaminada con quistes (Knight, 1980; Boreham *et al.*, 1990; Adam, 1991; Thompson y Reynoldson, 1993).

Entre los alimentos más comúnmente contaminados con quistes de *Giardia* se encuentran las frutas y hortalizas (Bier, 1991) como la fresa o la lechuga y en México puede ser un factor importante de transmisión dado el uso de aguas negras en el riego de estos productos que suelen comerse crudos. Otro modo de transmisión es la transferencia oro-fecal directa, la cual se presenta principalmente en zonas carentes de higiene y dentro del grupo familiar, así como también en centros de cuidado infantil entre grupos de niños menores de tres años. Una variante de este tipo de transmisión es debida a la actividad sexual en homosexuales, donde el contacto del ano y el área perianal con la boca puede ser la vía de ingestión de los quistes, no sólo de *Giardia* sino también y en mayor porcentaje de *Entamoeba histolytica* (Knight, 1980; Boreham *et al.*, 1990; Thompson y Reynoldson, 1993). Se presenta también transmisión de la enfermedad entre nadadores en albercas o en el mar, así como la transmisión mecánica de quistes por insectos, en los cuales se ha demostrado experimentalmente que un quiste puede sobrevivir el paso por el intestino de moscas (Boreham *et al.*, 1990).



Existe una gran variación en cuanto a la manifestación clínica de la giardiosis, la cual se desarrolla desde procesos totalmente asintomáticos hasta diarrea crónica son síndrome de malabsorción misma que puede derivar en anemia (Jimenez *et al.*, 1999). Entre los síntomas relacionados con la giardiosis se encuentran: diarrea, pérdida del apetito, pérdida de peso, cólicos, distensión abdominal, heces grasas o espumosas, flatulencia, náusea, vómitos, eructos y fiebre entre otros. El tiempo de incubación y manifestación de síntomas es altamente variable lo cual puede atribuirse tanto a factores propios del parásito como al hospedero (Adam, 1991; Katelaris y Farthing, 1992; Farthing, 1993; Farthing, 1996; Thompson y Reynoldson, 1993; Vesey y Peterson, 1999).

Entre los factores propios del hospedero se considera importante la edad y el estado inmune, pues se ha observado que la giardiosis presenta mayor incidencia en niños que en adultos, principalmente entre aquellos menores de tres años, así como también en personas desnutridas o inmunosuprimidas (Adam, 1991; Farthing, 1993; Thompson y Reynoldson, 1993).

El parásito muestra una alta variación en lo que respecta a antígenos de superficie (Adam *et al.*, 1988; Aggarwal y Nash, 1988; Nash *et al.*, 1988; Aggarwal *et al.*, 1989; Nash *et al.*, 1990; Nash *et al.*, 1991; Udezulu *et al.*, 1992; Hopkins *et al.*, 1993b; Butcher *et al.*, 1994), perfiles isoenzimáticos (Bertram *et al.*, 1983; Proctor *et al.*, 1989; Chaudhuri *et al.*, 1991; Homan *et al.*, 1992) y susceptibilidad a proteasas (Strandén *et al.*, 1990; Abaza *et al.*, 1991), los cuales pueden ser factores importantes que determinan su patogenicidad así como la capacidad de evasión a la respuesta inmune del hospedero.

Además se ha observado variabilidad a nivel genético el cual se ha evidenciado por RFLP o polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (Nash *et al.*, 1985; Ey *et al.*, 1993), así como por “fingerprinting” o ensayos de protección al DNA (Upcroft *et al.*, 1990a; Carnaby *et al.*, 1991), variación en el número y tamaño de cromosomas observado por electroforesis en campos pulsantes (Upcroft *et al.*, 1989; Campbell *et al.*, 1990; Sarafis e Isaac-Renton, 1993; Upcroft *et al.*, 1993a), así como en el tamaño de productos de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) observada por RAPD (DNA polimórfico amplificado al azar) (Morgan *et al.*, 1993a; van Belkum *et al.*, 1993), o a partir de secuencias que codifican para RNA ribosomal, las cuales también se ha observado sufren frecuentes rearrreglos génicos (De Jonckheere *et al.*, 1990; Le Blancq *et al.*, 1991; Weiss *et al.*, 1992), o PCR de secuencias antigénicas (Ey *et al.*, 1993); estos procedimientos



han permitido diseñar técnicas de detección del organismo en muestras de agua así como diferenciar entre distintas especies.

Es importante considerar en esta parasitosis la capacidad de variación que desarrolla *Giardia* a diferentes niveles y le brinda oportunidad de evadir al sistema inmune; otros organismos con características semejantes son *Plasmodium spp*, *Trypanosoma spp* y *Leishmania spp* y, al igual que *Giardia*, muestran también variación en sus cariotipos. En todos estos organismos, incluyendo a *Giardia*, se ha sugerido que existe relación entre la variación antigénica que desarrollan con la cercanía de los genes que codifican tanto para esas proteínas variantes como para genes ribosomales con la región del telómero (Adam *et al.*, 1991; Adam, 1992). Esta cercanía se ha sugerido permite flexibilidad al cromosoma, lo cual facilita el desarrollo de la variación, pudiendo ser este un mecanismo compartido entre dichos parásitos para favorecer su permanencia en el hospedero (Le Blancq *et al.*, 1992; Lanzer *et al.*, 1995). En la variación antigénica desarrollada debe tomarse en cuenta también la presencia de múltiples alelos para una misma proteína (Yang *et al.*, 1994).

Sin embargo, recientemente se ha sugerido una mayor participación del sistema inmune del hospedador como determinante en la patogenicidad, puesto que al hacer un estudio en 200 niños, a los cuales se evaluó su estado nutricional, inmunoglobulinas séricas y secretorias, presencia de *Giardia* en heces, aspirados y biopsias duodenales, así como infecciones asociadas, no se encontró correlación entre la manifestación sintomática o asintomática de la enfermedad con infecciones asociadas ni con zimodemos del parásito, pero sí la hubo con defectos inmunes a nivel humoral en los niños sintomáticos (Rajeshwari *et al.*, 1996).

Estudios hechos en personas que adquirieron la infección en un viaje a Leningrado indican que el período promedio de incubación (desde la infección hasta el desarrollo de síntomas) es de 1 a 2 semanas pero varía de 1 a 45 días (Adam, 1991). La duración de la enfermedad suele ser relativamente corta, de 4 a 6 semanas aún sin tratamiento, aunque en algunos casos ha durado varios años (Owen, 1980b). En voluntarios se ha observado una dosis infectiva 50 % de entre 25 y 50 quistes con un período de prepatencia de entre 6 y 15 días y un período de incubación de entre 7 y 21 días (Knight, 1980). La variación es debida a factores tanto del hospedero como del organismo infectante, mismos que ya fueron mencionados.



El fenómeno de adhesión de *Giardia* al borde microvelloso epitelial es el mecanismo que le permite desarrollar una infección. En este sentido han sido propuestos diferentes modelos para explicar el modo en que se lleva a cabo la adhesión de los trofozoítos al epitelio intestinal: la primera sugiere un proceso mecánico relacionado con proteínas contráctiles del disco ventral tales como actinas, miosinas, tropomiosinas, tubulinas, giardinas, talinas, paxilinas, tensinas, vinculinas y otras (Feely *et al.*, 1982; Thompson y Reynoldson, 1993; Narcisi *et al.*, 1994); la segunda atribuye la adhesión a un proceso succionador generado por el disco ventral a partir de la propulsión de líquido generada por los flagelos ventrales (Carrada, 1984), ésta es la teoría hidrodinámica. La tercera explica la adhesión como un proceso dependiente de lectinas y receptores específicos de las células epiteliales del hospedero (Thompson y Reynoldson, 1993). No obstante, ninguna de estas teorías explica como se desarrolla el proceso invasivo de los trofozoítos al epitelio intestinal ni el mecanismo por el cual se desarrolla la patogenicidad.

Se han reportado una gran variedad de anomalías estructurales y funcionales en la mucosa del intestino delgado tanto en humanos como en modelos animales debidos a la giardiasis, entre las cuales están el daño epitelial, la remoción de células epiteliales, el acortamiento de vellosidades y la reducción en la cantidad de enzimas tipo disacaridasas (Ferguson *et al.*, 1980; Thompson y Reynoldson, 1993). La atrofia de las microvellosidades ha mostrado correlación con la baja actividad de disacaridasas y esto a su vez resulta en una inadecuada digestión y malabsorción que repercuten en una pérdida de peso y reducido desarrollo en jerbos y ratones (Thompson y Reynoldson, 1993).

El mecanismo por el cual *G. duodenalis* causa diarrea y malabsorción intestinal se encuentra aún en estudio. La invasión superficial de la mucosa intestinal por los trofozoítos adheridos se ha sugerido como un factor importante en este proceso, ya que constituye una barrera que impide el contacto entre los alimentos localizados en el lumen intestinal y las células epiteliales (Adam, 1991). Así también se han observado procesos invasivos de la mucosa intestinal que causan la destrucción de la misma o bien el desarrollo de procesos inflamatorios, por los cuales las vellosidades se muestran acortadas de modo que la superficie de absorción se ve reducida, impidiendo de este modo la adecuada absorción del alimento. Otro factor que puede influir a este respecto es el consumo de sales biliares por el protozoario, que induce un decremento en la



solubilidad micelar de las grasas la cual es necesaria para la adecuada función de las lipasas pancreáticas (Farthing, 1993).

Un último elemento que se encuentra en estudio a este respecto es la presencia de toxinas. Hasta la fecha han sido reportadas en *Giardia* enzimas con actividad proteolítica en las cuales destaca su acción sobre hemoglobina e inmunoglobulina A1 (Farthing, 1993; Thompson y Reynoldson, 1993; Adam, 1991).

GIARDIOSIS EN MÉXICO

Esta parasitosis es altamente frecuente en México y, al igual que en otros países (Ayala y Hermida, 1987; García *et al.*, 1989; Pasley *et al.*, 1989), se ha reportado con un comportamiento tendiente a incrementos circunuales recurrentes (Hermida *et al.*, 1990), esto fue indicado a partir de estudios realizados entre 1977 y 1985, donde los resultados obtenidos han permitido presentar curvas con incrementos anuales observados entre los meses de mayo y septiembre, los picos que representan la mayor recurrencia de giardiosis se localizan habitualmente en la tercera semana de julio. El período estimado para el cumplimiento de cada ciclo es de 8715.1 hrs.

En fechas recientes se ha observado un incremento en los casos de giardiosis y otras parasitosis. En México, la giardiosis ha alcanzado una frecuencia del 22 %, la cual se ha atribuido a las condiciones prevalentes de escasa higiene, hábitos alimenticios inadecuados y fecalismo al aire libre que se han acentuado en últimos años (Tay *et al.*, 1994); sin embargo estas condiciones son un efecto secundario del problema real que se desencadena en el incremento de las parasitosis. Recientemente se realizó un estudio de toma de energía en niños mexicanos de escasos recursos de entre 6 y 10 años empleando la técnica de doble marcaje con agua durante 7 días antes y después de recibir tratamiento y se observó que la eliminación del parásito por sí misma no incrementa de modo significativo la toma de energía por parte de los niños, pues ésta sólo se ve aumentada en menos de 1MJ/por día (Valencia *et al.*, 1995), esto indica que probablemente otros factores, además de la giardiosis, repercuten en el bajo desarrollo de los niños de modo más importante que este parásito. Dicho elemento de mayor relevancia puede ser la desnutrición, a la par con la presencia de otras enfermedades.



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 a lo largo del período 1990-1995 que del total de niños a quienes se realizaron exámenes coproparasitológicos, el 37 % son positivos a *Giardia* y tienen la distribución por edad siguiente: 21.4 % son lactantes, 41.7 % de edad preescolar, 27.9 % escolares y 9.0 % adolescentes; de éstos, el 60.8 % se presentan como parasitosis única, 27.5 % están asociados a otro parásito intestinal y 12.2 % a comensales del tubo digestivo (Bernal *et al*, 1995).

En la Universidad Autónoma de Aguascalientes también se han realizado estudios poblacionales a partir de muestras de personas que les han solicitado un estudio coproparasitológico y se ha observado un sesgo sobre la población infantil menor de 12 años que forman el 69 % del total de los infectados con *Giardia*. Del total, 41.7 % de los individuos con esta parasitosis son menores de 6 años, 35.5 % tienen entre 6 y 12 años, 10.8 % tiene de 13 a 18 años y el 12 % está entre 19 y 30 años. En 30 % de los individuos fue una parasitosis única, en tanto que en 27 % de los casos estuvo asociada a otro parásito y en el 43 % hubo 2 ó más parásitos asociados (Gómez *et al.*, 1995). Este tipo de trabajos, sin embargo, no muestra confiablemente el comportamiento de la parasitosis en la población, puesto que la presencia de casos asintomáticos es alta, la atención en clínicas y hospitales no se lleva a cabo y una parte de la población no es considerada por la misma razón dentro de este tipo de estudios.

En Mérida, Yucatán, se realizó un estudio poblacional a partir de niños que no presentaban la sintomatología típica de giardiosis, en este caso se recurrió a las escuelas primarias del sistema federal y estatal y se seleccionó aleatoriamente a 382 niños de un total de 65 mil que se presentaban a dichas escuelas. Se observaron quistes de *Giardia* en el 32.05 % de los niños, de estos 30.13 % lo presentaron como parasitosis única y 69.87 % se encontró asociado a otro parásito, 40 % de los niños no mostraron ninguna señal de parasitosis intestinales (González y Belém, 1995).



DIAGNÓSTICO

Debido a la alta incidencia a nivel mundial de esta parasitosis, ha surgido la necesidad de buscar técnicas que faciliten su detección, para lo cual se han empleado métodos de rastreo tanto de quistes como de trofozoítos.

Habitualmente se emplea el examen coproparasitológico para detectar los quistes (y en ocasiones trofozoítos), este método consiste en la observación de muestras fecales al microscópico con la finalidad de detectar los diferentes parásitos que estén presentes en ellas. Sin embargo, este método resulta poco eficiente debido a que los quistes se eliminan intermitentemente, y se requiere repetir en al menos tres ocasiones el procedimiento para tener un mayor grado de confianza. Así mismo, influyen en la detección varios factores como la administración de antibióticos, antiácidos, productos de caolín, aceites laxantes y enemas que inhiben la excreción de quistes (Boreham *et al.*, 1990).

Otros métodos, como la aspiración duodenal y la biopsia, permiten la colecta de trofozoítos, y en ocasiones resultan más eficientes (Goka *et al.*, 1990; Guerreiro *et al.*, 1991). Un método nuevo consiste en la obtención de líquido y moco duodenal a través de un hilo de nylon unido a una cápsula, la cual es exprimida para hacer un frotis de la muestra y observarla al microscopio, en algunos casos este procedimiento se emplea para obtener trofozoítos para cultivo, a esta prueba se le dio el nombre de entero-test (Boghdadi *et al.*, 1988; Korman *et al.*, 1990; Barr *et al.*, 1992).

En las últimas décadas se ha optado por el desarrollo de técnicas inmunológicas para la detección de anticuerpos específicos contra *Giardia* en suero y secreciones, así como detección de antígenos varios en las muestras. Entre las pruebas serológicas más empleadas se encuentran la inmunodifusión, hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia e inmunofluorescencia indirecta (Romía *et al.*, 1990b; Isaac-Renton, 1991), por inmunofluorescencia se han detectado anticuerpos específicos contra *Giardia* en saliva (Osipova *et al.*, 1984) lo cual aporta muchas ventajas por la facilidad en la obtención de la muestra y la sensibilidad del método.

Recientemente se han elaborado procedimientos de ELISA (ensayos de inmunoabsorbente acoplado a enzima) con una gran variedad de antígenos o anticuerpos, algunos de los cuales ya comienzan a utilizarse comercialmente (Addiss *et al.*, 1991; Hopkins *et al.*, 1993a). Esta técnica



1993). Su mecanismo de acción se especula que se desarrolla a dos niveles. inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos por su unión a DNA (Webster, 1990) e inhibiendo componentes respiratorios tales como flavoproteínas y quinonas (Paget *et al.*, 1989)

PAROMOMICINA

Pertenece al grupo de los aminoglicósidos (O-2-amino-2-deoxi- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O-[O-2,6-diamino-2,6-dideoxi- β -L-idopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-ribofuranosil-(1 \rightarrow 5)]-2-deoxi-estreptamina), se usa a una dosis de 30 mg por kilogramo de peso por día en 3 ó 4 tomas por 10 días (Carter, 1962). Se considera que este fármaco actúa inhibiendo la síntesis de proteínas por su unión de alta afinidad con el RNA ribosomal de la subunidad pequeña. Algunos efectos colaterales que se presentan son la ulceración del tracto gastrointestinal y se puede inducir toxicidad renal (Thompson y Reynoldson, 1993). No obstante estos efectos, la paromomicina resulta ser un tratamiento de elección en aquellos casos en los que los tratamientos convencionales causan toxicidad y, particularmente en el caso de mujeres embarazadas, es el tratamiento de elección debido a su baja absorción intestinal (Thompson y Reynoldson, 1993; Edlind *et al.*, 1989b).

FURAZOLIDONA

Es un derivado de los nitrofuranos (3-[[[(5-nitro-2-furanil) metileno]-amino] -2-oxazolidinona) y resulta ser el tratamiento de elección para niños aunque es menos efectivo que otros. Se utiliza a dosis de 8 mg por kilogramo de peso por día en 3 ó 4 tomas durante 10 días, con una efectividad de entre el 72 y 100 % de los casos. Entre los efectos adversos que se presentan durante la administración de este fármaco están: dolor de cabeza, náusea, vómito, diarrea y su ingesta puede producir hemólisis en individuos deficientes en glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Se ha reportado que induce mutaciones en bacterias y en ratas, pero no se ha encontrado este efecto en humanos (Mendelson, 1980; Thompson y Reynoldson, 1993). El mecanismo de acción de la furazolidona consiste en inhibir el sistema de transporte de electrones en la vía anaeróbica por ser un aceptor alternativo de electrones, además de tener la posibilidad de unirse al DNA al formar radicales generados por enzimas NADH y NADPH oxidasas y Piruvato Ferredoxina Oxido-Reductasa (PFOR) en *Trichomonas foetus* (Moreno *et al.*, 1984).



similar a la desarrollada por mebendazol pero con mayor frecuencia de efectos colaterales como dolor abdominal principalmente (Romero *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 1999).

Otros fármacos han sido empleados en modelos *in vitro* o *in vivo* con resultados parcialmente exitosos, o bien se encuentran en experimentación, entre estos se incluyen: análogos de 5-metiltiorribosa (Riscoe *et al.*, 1988), tetraciclinas (Edlind, 1989a; Katiyar y Edlind, 1991), otros aminoglicósidos (Edlind, 1989b), doxiciclina y mefloquina (Crouch *et al.*, 1986; Crouch *et al.*, 1990), derivados de ribavirina (Kini *et al.*, 1990), azitromicina, eritromicina (Boreham y Upcroft, 1991), propranolol (Popovic *et al.*, 1991), análogos de pentamidinas (Bell *et al.*, 1991), 3-cloroimipramina (Weinbach *et al.*, 1992), bis-bencimidazoles (Bell *et al.*, 1993), oxadiazol BTI 2286E (Bhopale *et al.*, 1993), ciprofloxacina, temafloxacina, azitromicina, claritromicina (Ikerd y Koletar, 1993), menadiona (Paget *et al.*, 1993), cuasinoides (Wright *et al.*, 1993), bacitricina, bacitricina-zinc, neomicina (Andrews *et al.*, 1994; Andrews *et al.*, 1995), sulfato de aminocidina (Awadalla *et al.*, 1995), metil-bencimidazoles (Cedillo *et al.*, 1995), praziquantel (Alamillo *et al.*, 1995) y disulfiram (Nash y Rice, 1998). Por otra parte, actualmente se están empleando fármacos que se habían usado anteriormente como antihelmínticos y cuya efectividad muestra ser alta y con menos efectos colaterales, como son los bencimidazoles.

BENCIMIDAZOLES

Los bencimidazoles son un grupo de fármacos de amplio espectro desarrollados a partir de la década de 1950. Fueron obtenidos de una parte estructural de la vitamina B12, llamado 1,6-dimetil-1-(α -D-ribofuranosil) bencimidazol. El primer fármaco desarrollado de esta familia fue el tiabendazol, obtenido en 1961 (Thownsend y Wise., 1990) y entre los más utilizados está el albendazol, desarrollado en 1975 (Theodorides *et al.*, 1976).

Este grupo de fármacos ha sido utilizado en el tratamiento de infecciones por helmintos tanto en humanos como animales domésticos, también han sido empleados como herbicidas,



insecticidas, fungicidas y bacteriostáticos. En perros infectados con *Giardia* el albendazol (dosis única de 25 mg/kg) y fenbendazol (50 mg/kg cada 24 h, en 3 dosis) han sido empleados con resultados efectivos (Barr *et al.*, 1993; Barr *et al.*, 1994).

En helmintos se ha sugerido que los bencimidazoles actúan a nivel de microtúbulos. Estos últimos son estructuras de 25 nm de diámetro, de longitud variable, formados generalmente de una serie de 13 protofilamentos cuya constitución se debe a un equilibrio dinámico entre subunidades de α y β tubulina (ambas proteínas de aproximadamente 50 kDa) y proteínas asociadas. Este equilibrio se rompe por la unión directa de bencimidazoles al dímero α - β tubulina impidiendo la formación del microtúbulo, esto a su vez parece estar asociado a un evento en cascada de cambios bioquímicos que inducen el bloqueo de la absorción de glucosa, la depleción de glicógeno y provoca alteraciones degenerativas en retículo endoplásmico y en la capa germinal de mitocondrias, afectando al sistema de la fumarato reductasa, incrementando la cantidad de lisosomas e induciendo autólisis celular (Lacey, 1988; Lacey, 1990).

El metabolismo de los bencimidazoles en humanos y animales requiere de enzimas presentes en el hígado (citocromo P450 y monooxigenasa acoplada a flavina). Por lo mismo, se ha observado que la ingesta de alcohol repercute en su metabolización (Justel *et al.*, 1994; Moroni *et al.*, 1995). Sin embargo, otros tipos celulares diferentes a los localizados en hígado son capaces de biotransformar el albendazol a albendazol sulfóxido, tal es el caso de células de intestino de rata de las cuales se han purificado microsomas conteniendo un sistema enzimático NADPH-dependiente que es capaz de realizar la misma función (Villaverde *et al.*, 1995).

En México la comercialización de derivados del Bencimidazol se ha incrementado en la última década, y actualmente existen varias marcas comerciales que distribuyen principalmente 2 derivados que son el albendazol y mebendazol.



Cuadro 1. Nombres comerciales, presentaciones y laboratorios que distribuyen albendazol y mebendazol en México.

ALBENDAZOL			MEBENDAZOL		
NOMBRE	A	B	NOMBRE	A	B
COMERCIAL			COMERCIAL		
ALBENZIL	S/T	Arlex	DABEN	S/T	Salfran
BENDAPOR	S/T	Fustery	DIAZOLEN	T	Degort's
BRADELMIN	S/T	Degort's	EXAVERM	S/T	Pharmacos Exakta
DABENZOL	S/T	Tecnofarma	HEDAZOL	S/T	Arlex
DIGEZANOL	S/T	Hormona	HELMINZOLE	S/T	Randall
ENTOPLUS	S/T	Diba	MEBAN	S/T	Kener
ESKAZOLE	S/T	Armstrong	MEBENZOLE	S/T	Sanofi-Winthrop
GASCOP	S/T	Valdecasas	MEBENTINE	S/T	Vitae
LOVERAL	S/T	Rayerer	MEBOVEROID	S/T	Valdecasas
PROTIL	T	Psicofarma	MEBENTABS	S/T	Allen
SEBENZOL	T	Serral	REVAPOR	S/T	A.F.
TENIBEX	T	Lemery	VERMICOL	S	Degart's
VERANZOL	S/T	Collings	VERMIN-DAZOL	S/T	Streger
VERMILAN	S/T	Química y Farmacia	VERMOX	S/T	Janssen
VERMIN-PLUS	S/T	Streger	VERTEX	S/T	Carnot
VERMISEN	S/T	Novay	VERTIZOLE	S/T	Rayerer
ZENTEL	S/T	SKB México	MEBENDAZOL COMBINADO		
			MEBECICLOL (tinidazol)	T	Sanofi-Winthrop

Nombres comerciales de las principales marcas de bencimidazoles distribuidos en México, se enlistan las presentaciones disponibles (A) por los diferentes laboratorios fabricantes (B). S: suspensión, T: tableta.



ANTECEDENTES

Como se mencionó anteriormente, existe un gran número de compuestos que se emplean en el tratamiento de la giardiosis, sin embargo aún se presentan efectos colaterales así como de fallas en los tratamientos de modo cada vez más frecuente (Levi *et al.*, 1977).

Entre los factores que influyen en estas fallas están el mal seguimiento de los tratamientos debido a la falta de rigor en la administración, ya sea por indisciplina o por la presencia de efectos colaterales, las reinfecciones constantes debidas a una mala higiene, la inactivación del fármaco por otras infecciones o problemas en el sistema inmune del hospedero. Así mismo se pueden presentar cambios en la farmacocinética del fármaco, escape de los parásitos a sitios de difícil acceso para éste, el uso indiscriminado de ciertas quimioterapias que inducen la selección de organismos resistentes y, de manera particular, la tolerancia natural de los trofozoítos de *G. duodenalis*.

Para el mejor estudio de este último punto resulta indispensable contar con cultivos resistentes a los tratamientos convencionales. Es por ello que en este trabajo se pretendió, en una de sus partes, obtener cultivos particularmente tolerantes o resistentes a fármacos del grupo de los bencimidazoles. El uso en México de esta familia de fármacos ha ido en aumento en fechas recientes y se prescribe por el Sector Salud para un amplio grupo de parasitosis así como en desparasitaciones rutinarias.

RESISTENCIA Y TOLERANCIA

La resistencia a drogas se define como el cambio en la frecuencia génica de la población inducida por la selección por droga, de modo que dicha población requiere de más droga que antes de la selección para presentar los mismos efectos. La resistencia difiere de la tolerancia a drogas en que ésta última se presenta de modo innato en ciertos individuos de la población sin haber sido sometidos a una selección previa (Schupp, 1993).

La multirresistencia a drogas es el estado en el cual la población ha sido seleccionada independientemente por fármacos de diferente modo de acción, produciendo un mecanismo de



evasión diferente pero concurrente (Schupp, 1993). En este estudio se consideró como sinónimo de resistencia cruzada puesto que en este caso únicamente se consideran fármacos de la misma familia con idéntico mecanismo de acción.

La sensibilidad a distintos fármacos en *Giardia* ha sido evaluada previamente por varios grupos en muy diversas condiciones experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo cual los resultados obtenidos resultan difíciles de comparar entre los diferentes trabajos reportados. El conocer los parámetros de sensibilidad a fármacos resulta indispensable como paso previo a la inducción de tolerancia o resistencia *in vitro*.

En lo referente a sistemas *in vivo*, la interacción hospedador-parásito dificulta el estudio de los mecanismos de tolerancia, mas no necesariamente la inducción a tolerancia. La posibilidad de obtener organismos resistentes tiene relación directa con el mecanismo de acción del fármaco, la frecuencia de uso del mismo y su capacidad mutagénica.

En el caso de la giardiosis el fármaco más frecuentemente utilizado es el metronidazol, mismo que es empleado en una gran gama de infecciones intestinales y del tracto reproductor en las cuales se sospecha la presencia de organismo anaerobios, como bacterias o protozoarios. El mecanismo de acción de este fármaco es ejercido debido a la unión de metabolitos de este sobre DNA, no de forma directa, sino después de haber sido modificado por la PFOR, la cual promueve la reducción del fármaco para formar varios intermediarios tóxicos como el radical nitro anión, el nitroso y derivados de hidroxilamina, y son éstos los que en realidad tienen la actividad tóxica y mutagénica (Boreham *et al.*, 1988a)

Se ha observado que para que se presente un efecto mutagénico debido a fármacos del grupo de los 5-nitroimidazoles, es necesario el paso por un proceso de reducción del grupo nitro. se han reportado tres compuestos mutagénicos en la orina humana después del tratamiento con metronidazol y cuatro para el caso del tinidazol. De éstos, se ha observado que existe correlación entre el potencial reductor del fármaco y su actividad mutagénica, la cual se desarrolla debido a la unión de los metabolitos al DNA que a su vez provoca substituciones en los pares de bases (Voogd, 1981), así como posibles impedimentos estéricos para las enzimas DNA y RNA polimerasas.

Aparentemente el más potente metabolito con capacidad mutagénica producido ante el tratamiento con metronidazol es el 1-(2-hidroxietil)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol, el cual alcanza



una concentración mutagénica en plasma 24 hrs después de la administración de 35 mg/kg en voluntarios humanos; es importante considerar que la dosis terapéutica generalmente empleada es de 15 mg/kg cada ocho horas durante cinco días. Además se ha observado en cultivo que este tipo de fármacos puede actuar sinérgicamente con otros mutágenos ambientales, pues al irradiar linfocitos en cultivo en presencia de metronidazol, el número de aberraciones cromosómicas observadas es mucho mayor que en ausencia del mismo. También se ha observado que en ratones la administración de metronidazol repercute en la formación de espermatozoides atípicos (Voogd, 1981). En relación a los daños causados por el metronidazol en el DNA se ha reportado que bajo condiciones anaerobias es capaz de cambiar su perfil de hibridación, causar rupturas de cadena sencillas y dobles e inhibir la renaturalización de la doble hélice. Se ha calculado así mismo la cantidad de metronidazol que se une al DNA, la cual corresponde a 0.73 moles por 10^3 nucleótidos de DNA purificado de timo de ternera. Se ha reportado que estos daños sólo ocurren en condiciones de anaerobiosis y que la presencia de enterobacterias como *E. coli* y otras provocan un decremento en la concentración de metronidazol impidiendo su actividad tanto farmacológica como mutagénica (Voogd, 1981).

En cuanto a la actividad carcinogénica del metronidazol, este problema ha sido abordado en modelos animales como ratón y rata, en los cuales se ha encontrado un incremento en el número de organismos que desarrollan linfomas malignos y tumores de pulmón, estos últimos se presentan con mayor frecuencia en organismos del sexo masculino después de tratamientos a dosis altas y/o prolongadas. En relación a la terapia en humanos existe dificultad en correlacionar el tratamiento con metronidazol con la presencia de tumores, pues para que éstos sean observados requieren de un tiempo de desarrollo de al rededor de 16 años ó más (Voogd, 1981).

Con el fin de calcular regímenes seguros de metronidazol se han llevado a cabo experimentos en modelos animales en busca de encontrar las concentraciones a las cuales estos comienzan a sufrir daños notorios. En este tipo de experimentos se ha observado que tratamientos de metronidazol en ratón con 270 mg/kg/día de por vida causan la muerte del 50% de los organismos debido a tumores, esta dosis corresponde a 375 mg/día que es la dosis capaz de provocar la muerte en las mismas condiciones del 1% de individuos humanos de peso promedio. Dicha dosis puede variar de acuerdo a la cantidad de alimento ingerido habitualmente por el organismo, de manera que la dosis "segura" calculada corresponde a 0.1% del total de alimento



ingerido para ratón y 0.3% para rata, con lo cual la dosis “segura” extrapolada a humanos es de 10g/día de modo que las dosis terapéuticas típicas no debieran ser carcinogénicas (Voogd, 1981).

Respecto a los bencimidazoles, estos comienzan a ser utilizados de modo indiscriminado en la población de México y otros países, pero ya anteriormente habían sido empleados a nivel veterinario. Dado su mecanismo de acción (unión en la subunidad β -tubulina) su potencial mutagénico es elevado al ser esta proteína parte estructural de los microtúbulos que, entre otros muchos procesos, participan en la formación de los usos mitóticos y en la segregación de cromosomas. Sin embargo, estas mutaciones suelen ser letales por abarcar delecciones de gran número de genes. El potencial mutagénico de los derivados bencimidazoles no ha sido tan ampliamente estudiado como en el caso de los 5-Nitroimidazoles ni para los radicales que de ellos se generan.

Con relación al mecanismo de acción del metronidazol en *Giardia* se ha observado que la enzima PFOR, la cual se encuentra asociada a membrana en forma de homodímero de 138 kDa, al ser purificada es capaz de donar electrones a sólo uno de los 3 tipos de ferredoxina (Fd I), o de estar presente, al metronidazol, provocando la reducción del grupo nitro; sin embargo al cuantificar esta actividad en trofozoítos resistentes a metronidazol se observa un decremento de la misma (Townson *et al.* 1996). Por otra parte, se ha purificado PFOR de cultivos sensibles y se ha hecho interactuar con Fd I de cultivos tanto sensibles como resistentes observándose que la actividad se encuentra decrementada hasta 11 veces en este último extracto (Liu *et al.* 2000), lo cual implica que en el mecanismo de resistencia hay una participación tanto de la PFOR como de Fd I. Dicho mecanismo, cabe destacar, parece ser exclusivo de metronidazol y no compartido con furazolidona u otros fármacos.

MECANISMOS DE RESISTENCIA Y MULTIRRESISTENCIA

La resistencia a fármacos usualmente esta asociada al mecanismo de acción del fármaco en cuestión, el cual puede estar en función de la activación del fármaco como ocurre en el caso de metronidazol (Smith *et al.*, 1988), o la unión a su sitio blanco como ha ocurrido con



bencimidazoles en helmintosis (Driscoll *et al.*, 1989). Otra posibilidad es la expulsión activa del fármaco así como la inactivación del mismo.

La expulsión activa de fármaco ha sido ampliamente estudiada en casos de cáncer humano resistente a quimioterapia. Este fenómeno ha recibido el nombre de multirresistencia debido a que, aunque sea desarrollado inicialmente a un agente quimioterápico, finalmente involucra la resistencia a otros más, inclusive no relacionados químicamente o en cuanto a su mecanismo de acción.

La multirresistencia ha sido observada tanto en bacterias (en ellas recibe el nombre de MAR o Multi-Antibiotics Resistance) como en organismos eucariotes, entre ellos protozoarios, helmintos, nemátodos y células de mamífero donde recibe el nombre de MDR (Multi-Drug Resistance).

Particularmente cabe resaltar que este fenómeno ha sido reportado con anterioridad en parásitos filogenéticamente cercanos con *Giardia* como *Leishmania major*, *L. tarentolae* (Callahan y Beverley, 1991), *Entamoeba histolytica* (Orozco *et al.*, 1985; Samuelson *et al.*, 1993), *Plasmodium falciparum* (Ouellette *et al.*, 1991; Foote *et al.*, 1989) y *Trypanosoma brucei* (Triglia *et al.*, 1991) entre otros. Así mismo se ha estudiado ampliamente en células cancerosas humanas con multirresistencia a drogas; en todos estos casos el elemento al cual se atribuye la propiedad de permitir este fenotipo es una proteína altamente conservada denominada P-glicoproteína, PgP o P-170 debido a que este es el peso molecular que se observa con más frecuencia en células de mamífero, aunque hay variación respecto a su movilidad electroforética (ver figura 2).

La PgP está relacionada con la presencia de resistencia cruzada a gran variedad de productos naturales lipofílicos citotóxicos debido a la disminución en la acumulación de fármacos, lo cual trae como resultado la resistencia o tolerancia. Según parece el gene que da lugar a la PgP se originó de una duplicación dando lugar a una molécula simétrica con 12 dominios intramembranales y 2 sitios de unión a ATP internos en la célula en los cuales, al romperse esta molécula, permiten la obtención de energía necesaria para el bombeo.

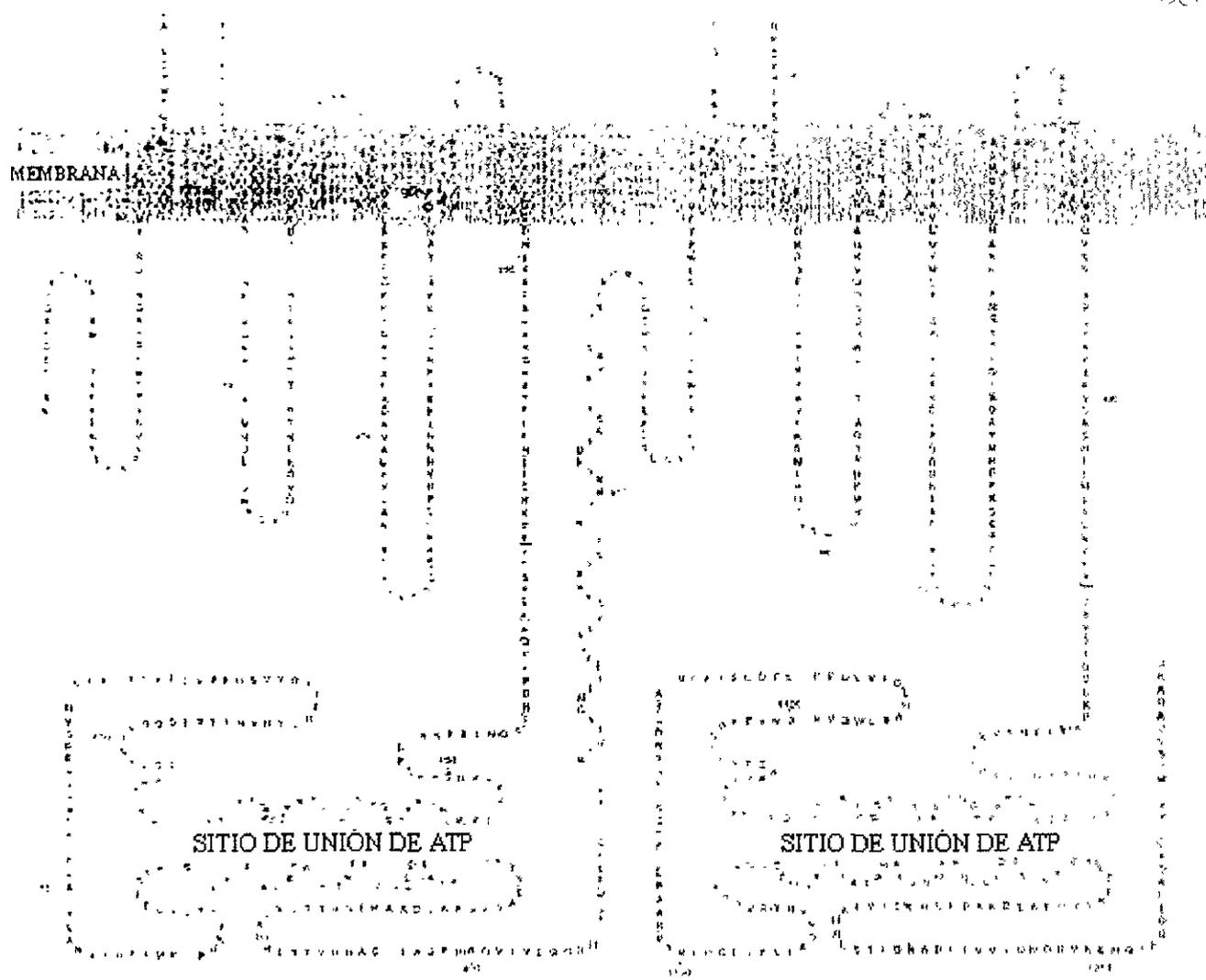


Fig. 2. Estructura bidimensional sugerida para la P-glicoproteína de humano.

RESISTENCIA A BENCIMIDAZOLES

El grupo de fármacos llamados bencimidazoles se ha observado que presenta una importante capacidad inhibitoria sobre la mitosis y polimerización de microtúbulos en hongos y nemátodos causando cambios ultraestructurales en ellos. Este fenómeno se observa de forma más evidente en células especializadas en absorción en el parásito en cuestión (Lacey, 1988; Enos y coles, 1990).

Es importante destacar que los bencimidazoles se unen selectivamente a la tubulina de los parásitos, de modo que esta proteína resulta poco afectada en el hospedador, lo cual se ha



considerado como un mecanismo primario de tolerancia en el que se sugiere esté involucrado el número de protofilamentos que integran al microtúbulo, pues las células de mamífero presentan 13 protofilamentos mientras que en nemátodos éste número es diferente, por ejemplo: *Ascaridia galli* presenta 11 y *Trichostrongylus colubriformis* tiene 11, 12 y 14 (Davis y Gull, 1983). Sin embargo, en cultivos *in vitro* de células de mamífero se ha observado una unión estable de tubulina-bencimidazol (Lacey *et al.*, 1988; Nare *et al.*, 1994).

En lo que respecta a la resistencia, se ha observado que la migración electroforética de isoformas de tubulina en cepas resistentes y tolerantes de *Haemonchus contortus* (Lubenga y Pichard, 1990) y *Caenorhabditis elegans* (Enos y coles, 1990) puede o no mostrar diferencias. Esto puede deberse a muchos factores, entre ellos el tipo de mutación que desencadenó el fenotipo. En *H. contortus* al realizarse un análisis por enzimas de restricción (RFLP) y luego por Southern blot (Roos, 1990) se observó que casi todas las poblaciones resistentes, excepto una, no presentan sitio de corte con la enzima HpaI sobre la tubulina, mientras que entre las poblaciones sensibles algunas presentan este sitio de corte y otras no lo tienen. Por otra parte, en *C. elegans* (Driscoll *et al.*, 1989) se han encontrado seis diferencias en aminoácidos entre un gene de β -tubulina que confiere susceptibilidad y dos que permiten resistencia, pero se desconoce cuál o cuáles de los 6 grupos resultan indispensables para ello, ya que se desconoce el sitio específico de unión de los bencimidazoles a esta proteína.

Los estudios realizados muestran que existe relación entre la presencia de resistencia y mutaciones sobre el gene de la β -tubulina. Así también se ha observado que existe una posible competencia por un sitio de unión compartido entre colchicina y bencimidazoles, y que la resistencia ante estos fármacos en helmintos no necesariamente involucra sólo cambios en el gene de la β -tubulina, sino que puede tratarse de un fenómeno poligénico (Lacey, 1988).

BENCIMIDAZOLES Y PgP

Se considera que los bencimidazoles son un posible substrato para la PgP principalmente por las características químicas que presenta, en especial la presencia del anillo bencénico y la



carga catiónica, ambas características importantes y muy comunes entre drogas que interactúan con la PgP.

Existen pocos reportes que relaciona a un componente del grupo de bencimidazoles con la actividad de PgP Nare *et al.* en 1994 emplearon el nocodazol en una línea celular de linfoma humano (CEM) previamente inducida a expresar PgP por crecimiento en medio con vinblastina a dos diferentes concentraciones. Se observó que al tratar las células CEM con nocodazol se desarrolla una resistencia cruzada. La resistencia relativa a vinblastina en células CEM tolerantes es de hasta 800 veces la concentración tolerada por células CEM que no han sido inducidas a expresar PgP, mientras que para el nocodazol sólo llega a ser de 2.6 veces ésta concentración.

En *Candida albicans* se ha observado un incremento en la expresión de mRNA de proteínas de multirresistencia llamadas Cdr1p y Cdr2p en presencia de azoles como fluconazol, donde la resistencia a este fármaco es revertida en presencia de albendazol, indicando de éste último puede estar interactuando con estas proteínas íntimamente emparentadas con PgP (Henry *et al.*, 1999).

RESISTENCIA DE *Giardia* A DIFERENTES DROGAS

La droga más comúnmente empleada en la giardiosis es el metronidazol, por ello y por la observación de que se presentan casos refractarios a este tratamiento en diversas poblaciones se ha estudiado el mecanismo por el cual *Giardia* adquiere este fenotipo. La línea celular de *Giardia* llamada BRIS/83/ HEPU/106 2ID₁₀ fue de las primeras en desarrollarse como modelo de estudio (Boreham *et al.*, 1988a, b). Esta se obtuvo mediante biopsia de un paciente y se cultivó *in vitro* por 66 semanas en una concentración de 4.96×10^{-6} M de metronidazol que corresponde a 2 veces la DI₁₀ (Dosis Inhibitoria al 10%), en estos estudios se reporta un decremento en la incorporación celular de metronidazol marcado y este fenotipo se pierde si la droga deja de ser suministrada.

Trabajando con esta misma línea (Smith *et al.*, 1988) se observó la relación existente entre el fenotipo resistente a metronidazol y el decremento de la enzima Piruvato Ferredoxina Oxido Reductasa (PFOR); esto sugiere que la activación provocada por las enzimas PFOR sobre el metronidazol se muestra reducida, impidiéndose de este modo la formación de los radicales tóxicos



del metronidazol. Por otro lado, la actividad de peroxidasa y reductasa dependiente de tiol se ve incrementada en células tolerantes a furazolidona, éstas enzimas pueden catalizar la producción de peróxidos producidos en presencia de Oxígeno. En estos estudios no se encontró actividad de catalasas ni superoxidodismutasas (Smith *et al.*, 1988; Boreham *et al.*, 1991; Upcroft *et al.*, 1993b). Este fenotipo resistente no muestra una correlación con resistencia a furazolidona, pero sí a otros 5-nitroimidazoles (Boreham *et al.*, 1988b).

A nivel molecular, la resistencia a metronidazol está asociada con cambios en el DNA (Upcroft *et al.*, 1990b; Boreham *et al.*, 1991; Upcroft *et al.*, 1993b). Al hacer un análisis de DNA de distintas cepas digeridas por enzimas de restricción, la hibridación contra el DNA del gene de prueba G6/1 muestra diferentes patrones entre líneas sensibles y la línea tolerante, y aparentemente este cambio es debido a una translocación entre el 3er y 4o cromosomas, la cual puede revertirse (Upcroft *et al.*, 1993b). Posteriormente se observó que el gene G6/1 está involucrado no sólo en la resistencia a 5-nitroimidazoles sino también en la división celular (Upcroft *et al.*, 1992).

También han sido empleados protocolos de selección de organismos tolerantes por exposición intermitente o constante a drogas como metronidazol y furazolidona, así como también se indujo mutagénesis por luz UV (Townson *et al.*, 1992) con el mismo fin. En este reporte todos los procedimientos que se emplearon son eficientes a diferentes niveles según la cepa a la cual se haya realizado el procedimiento. En general la mejor eficiencia se obtuvo con la selección por exposición intermitente, donde se alcanzó una concentración de 397 μM de metronidazol en cepas que mostraban inicialmente una IC_{50} de 0.85 μM (467 veces superior), en tanto que para furazolidona el método más eficiente fue la mutagénesis por UV, donde los cultivos alcanzaron un crecimiento a 56 μM cuando se partió de una IC_{50} de 0.9 μM (62.2 veces menor).

En otros estudios se han obtenido otras líneas resistentes a partir de aislados provenientes de diferentes lugares del mundo (Townson *et al.*, 1992). En las líneas BAC2, OAS1, WB1B y BRIS/87/HEPU/713 se indujo a resistencia a metronidazol y furazolidona por tres métodos: exposición intermitente a droga, exposición constante y mutagénesis inducida por luz UV. Así se obtuvieron líneas tolerantes a metronidazol hasta a 100 veces la DI_{50} de la cepa parental y 20 veces la DI_{50} para furazolidona. El mecanismo por el cual son resistentes estas cepas aparentemente es semejante al de las obtenidas con anterioridad aún cuando esto no ha sido probado.



Existen también clonas resistentes a colchicina reportadas por Hernández (1992), éstas fueron obtenidas por selección de trofozoítos deficientes en adhesión y mutagenizadas con nitrosoguanidina. Este fenotipo tiene correlación con una proteína de aproximadamente 200 kDa, el procedimiento por el cual fueron obtenidas se menciona en el apartado de material y métodos, ya que estas clonas también se emplearon en la presente tesis.

Para el caso de los cultivos resistente a quinacrina, estos fueron reportados por Upcroft *et al.* (1996a). El procedimiento empleado en su selección consistió en un cultivo a una concentración subletal de 1 μM seguida de incrementos posteriores de 1 μM hasta alcanzar una dosis de hasta 20 μM en cultivo. Los trofozoítos así obtenidos muestran una fluorescencia debida a la quinacrina localizada en la periferia de los trofozoítos, posiblemente en vacuolas, a diferencia de los trofozoítos sensibles, los cuales muestran una distribución más homogénea en el citoplasma. En dicho trabajo se sugiere una posible participación de un sistema de eflujo de fármaco semejante a los debido a productos de genes *mdr* en este fenómeno.

Los intentos de selección de cultivos de *Giardia* resistentes o tolerantes a bencimidazoles han sido reportados por distintos grupos y métodos. Para albendazol Morgan *et al.* (1993b) reportó haber utilizado concentraciones subletales de entre 0.08 y 0.64 μM para crecer una clona de la cepa P1; sin embargo, tras de un tratamiento por un tiempo máximo de 96 hrs el cultivo muere. Por su parte Farbey *et al.* en 1995 reportaron haber encontrado un aislado de un individuo caucásico que muestra una IC_{50} de 3.6 μM .

Para el mebendazol Edlind *et al.* (1990) reportaron haber probado concentraciones de entre 0.101 y 0.338 μM pero en ningún caso se pudieron recuperar trofozoítos viables. No obstante esto, recientemente se reportó la obtención de cultivos resistentes a albendazol por cultivo en presencia de fármaco (Upcroft *et al.*, 1996b). En dicho reporte se indica no haber encontrado mutaciones relacionadas con el aminoácido 200, el cual ha sido involucrado en resistencia a bencimidazoles en diferentes organismos (Edlind *et al.*, 1994, Katiyar *et al.*, 1994), sin embargo esto no implica que en cultivos resistentes se deba excluir a este o a otros aminoácidos alterados. Al parecer la resistencia a albendazol mencionada tiene relación con una tinción preferencial de un anticuerpo contra tubulina sobre el cuerpo mediano en trofozoítos resistentes. Dicha línea fue obtenida de la cepa WB inducida a resistencia a metronidazol por mutagénesis con luz UV a la cual se le dio el nombre de WB1B-M3, y esta fue cultivada paulatinamente en presencia de albendazol.



debido a la farmacocinética del albendazol en este modelo animal (Reynoldson *et al.*, 1991). Otros estudios que han sido realizados en perros de 2 a 5 años de edad muestran una relativamente baja efectividad del albendazol empleando dosis únicas de 25 mg por kilogramo de peso (2 casos fallidos de un total de 7). Esto no sucede cuando se da el mismo tratamiento en cuatro dosis, una cada 12 horas con la misma cantidad de fármaco (2 casos fallidos de un total de 25). En esta quimioterapia no se observaron signos de toxicidad en los animales empleados (Barr, 1993).

En cuanto a estudios realizados en humanos, el bencimidazol que se ha reportado con más uso en niños es el mebendazol (Al-Waili *et al.*, 1988; Al-Waili y Hasan 1992). Este se empleó a dosis de 200 mg por toma tres veces al día, y se mostró una efectividad del 65% al ingerirse durante 3 días la cual se incrementa al 95% con 5 días de tratamiento. Durante la quimioterapia entre los individuos no se reportaron efectos colaterales y al realizar exámenes en las heces de estos niños dos meses después del tratamiento no se observó la presencia de quistes (Al-Waili *et al.*, 1988). Estudios posteriores han permitido corroborar la efectividad del tratamiento al observarse un 95% de casos que respondieron positivamente al uso del fármaco (21 casos de un total de 23) empleando la misma dosis y en ausencia nuevamente de efectos secundarios adversos. Esto fue comparado con un tratamiento de metronidazol a la misma concentración, observándose una efectividad semejante (18 casos de un total de 21) pero en este caso los efectos adversos fueron desarrollados por tres de los niños tratados. Por otro lado al compararse mebendazol con nitazoxanida en una población pediátrica resultaron ser igualmente efectivos (80.4 y 78.0% respectivamente) al emplearse durante tres días 100mg cada 12 h, en este estudio se observa una mayor frecuencia de efectos colaterales al emplear nitazoxanida (Rodríguez *et al.* 1999).

Respecto al albendazol, éste ha sido probado también en niños de entre 5 y 10 años mostrando poca actividad a dosis únicas de 600 y 800 mg (67 y 79% de efectividad). A dosis de 400 mg por día durante 3 o 5 días la efectividad aumenta a 81 y 95% respectivamente de manera que resulta ser tan exitoso como el metronidazol a la misma dosis (efectividad del 97%) (Hall y Nahar, 1993) Esto indica que los bencimidazoles pueden ser una alternativa en el tratamiento de la giardiosis, en particular en los casos donde el tratamiento con metronidazol presente efectos adversos



JUSTIFICACIÓN

La giardiosis es una parasitosis muy frecuente en todo el mundo, y particularmente muestra sus efectos de modo más importante sobre la población infantil. En relación a México existe una alta incidencia de esta enfermedad, puesto que las condiciones de hacinamiento en el área urbana y periurbana, así como la deficiente higiene existente permiten el adecuado desarrollo de esta y otras infecciones intestinales

A pesar de la existencia de gran variedad de tratamientos contra esta parasitosis la presencia de casos refractarios a ellos (Levi *et al.*, 1977), así como la alta incidencia de efectos adversos en la gran mayoría de los tratamientos, hacen necesaria la evaluación de nuevos quimioterapicos capaces de interferir en el desarrollo de la infección.

Una nueva alternativa viable es el uso de los bencimidazoles, los cuales muestran un alto potencial por su actividad selectiva sobre ciertas formas de tubulina, particularmente presentes en parásitos. Este hecho resulta tener mayor importancia en el caso de *G. duodenalis* ya que al inhibir la polimerización de esta proteína también inhibe la adhesión del estadio infectante considerado como el paso inicial en la patogenia de *Giardia*. Sin embargo la presencia de posibles mecanismos de resistencia a dichos tratamientos en el protozooario *Giardia* también es un punto importante a ser evaluado, ya que se ha encontrado que esta familia de fármacos tiene actividad inductora sobre la proteína PgP la cual no sólo actúa impidiendo la acumulación de estos fármacos en particular, sino también podría participar en la resistencia a otros agentes quimioterapicos.

De manera particular, resalta la importancia de identificar métodos de evaluación de viabilidad que permitan, después de un proceso de validación, ser utilizados en la práctica clínica en la evaluación de tratamientos e identificación de casos de resistencia y multirresistencia desarrollada por aislados de pacientes evaluados *in vitro*, lo cual podrá iniciar su desarrollo como estrategia en el control de esta parasitosis a partir de comparaciones controladas de los métodos actualmente reportados, el cual es también uno de los objetivos de este trabajo.



OBJETIVOS GENERALES

- ◇ Implementar y evaluar técnicas para determinar la sensibilidad *in vitro* de trofozoítos de *G. duodenalis* a distintas drogas de la familia de los Bencimidazoles.
- ◇ Determinar el modo de acción de las drogas empleadas incluyendo la relación estructura-actividad, así como la posible presencia de variabilidad y variación en la susceptibilidad de *Giardia* a éstas.
- ◇ Inducir resistencia en cepas y clonas de *G. duodenalis* a miembros representativos del grupo de los Bencimidazoles y caracterizar parcialmente este fenómeno.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ◇ Seleccionar el método óptimo para evaluar la sensibilidad de trofozoítos de *G. duodenalis* a drogas.
- ◇ Determinar la sensibilidad *in vitro* de distintos aislados y clonas de *G. duodenalis* a drogas de la familia de los Bencimidazoles.
- ◇ Establecer la relación estructura-actividad de las drogas del grupo de los Bencimidazoles con su acción citotóxica y el daño morfológico causado a los trofozoítos de *G. duodenalis*.
- ◇ Seleccionar líneas celulares de *G. duodenalis* con sensibilidad diferencial a las drogas empleadas.
- ◇ Implementar diferentes técnicas de mutagénesis celular (físicoquímicos, fisiológicos y espontáneo) para inducir resistencia en trofozoítos de *G. duodenalis* a drogas, y caracterizar este fenómeno en las líneas resistentes.
- ◇ 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.



MATERIAL Y MÉTODOS

PARÁSITOS

En el desarrollo del presente proyecto se emplearon trofozoítos de *G. duodenalis* de la cepa Portland-1 (P1) proporcionada por el Dr. E. Weinbach y la cepa WB proporcionada por el Dr. T. Nash, ambos del National Institute of Health en Bethesda, Md. (EUA). La cepa P-1 (ATCC #30888) fue aislada originalmente por Visvesvara y Healty de una paciente sintomática de 36 años (Meyer, 1976); en tanto que la cepa WB (ATCC #30957) fue aislada por Gillin *et al.* en 1982 a partir del fluido intestinal de un paciente de 27 años con giardiosis sintomática refractaria a tratamientos de metronidazol y quinacrina, quien adquirió la enfermedad en Afganistán y la manifestó por dos años y medio (Gillin *et al.*, 1982; Smith *et al.*, 1982)

Así mismo se emplearon aislados obtenidos de individuos mexicanos con giardiosis de diferentes cursos clínicos (Tabla 1). Estos se obtuvieron en el Centro Médico Nacional Siglo XXI en la Unidad de Investigación Clínica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría (aislados IMSS-2 e IMSS-3) y en el Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN (aislados CIEA-10 y CIEA-52, ver tabla 1) Todos los aislados fueron clonados en el desarrollo del presente trabajo.

Cuadro 2. Cepas, aislados y clonas empleados.

CEPA O AISLADO	CURSO CLÍNICO DEL PORTADOR	NUMERO DE CLONAS	REFERENCIA
P-1	Sintomático	9	Meyer, 1976
WB	Crónico asintomático	14	Gillin <i>et al.</i> , 1982
IMSS-2	Crónico sintomático	7	Cedillo, no publicado
IMSS-3	Crónico asintomático	8	Cedillo, no publicado
CIEA-52	Asintomático	11	Cedillo <i>et al.</i> , 1991
CIEA-10	Sintomático	11	Cedillo <i>et al.</i> , 1991

CULTIVO DE TROFOZOÍTOS DE *G. duodenalis*

Los aislados, cepas o las clonas de estos se cultivaron en medio TYI-S-33 (medio ATCC #1404, desarrollado por Diamond en 1978 y modificado por Keister en 1983) suplementado con



bilis bovina al 0.05% p/v, suero bovino descomplementado 10% v/v y antibióticos (penicilina 50 UI/ml y estreptomycinina 50 µg/ml, ver anexo)

Los trofozoítos se cultivaron en tubos de borosilicato o plástico de 15 ml, en viales de borosilicato de 4.5 ml, o en botellas de plástico de 40 ó 60 ml de acuerdo a los requerimientos experimentales. Los cultivos se mantuvieron a 37°C (incubadora Precision modelo 4EG) hasta alcanzar la confluencia y se realizaron resiembras de los mismos cada 2 ó 3 días en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar. Para realizar las resiembras y cosechas, los recipientes de cultivo se enfriaron por 20 minutos o más en baño hielo-agua y después de agitar para homogeneizar los trofozoítos ya despegados de las paredes dentro del tubo, se decantó el medio sustituyéndolo con medio nuevo. Dicho cultivo en ocasiones, en vez de ser decantado, fue cosechado para los diferentes ensayos realizados.

Para asegurar la esterilidad de los cultivos se realizaron periódicamente pruebas de crecimiento bacteriano o de hongos en cajas petri con Medio Agar Luria las cuales se incubaron por al menos 24 hrs a 37 °C (ver anexo).

CRIOPRESERVACIÓN DE TROFOZOÍTOS EN NITRÓGENO LÍQUIDO

Para la preservación de trofozoítos los tubos cultivados con *G. duodenalis* en fase logarítmica, éstos se colocaron en baño hielo-agua por 20 minutos o más. Posteriormente se contaron en cámara de Neubauer y se centrifugaron a 210 x g durante 10 minutos (centrífuga Beckman modelo TJ-6 con sistema de refrigeración acoplado modelo TJ-R). La pastilla se resuspendió en tubos Nunc® conteniendo medio TYI-S-33 adicionado con 10% de suero bovino descomplementado y DMSO al 10% de modo que estuvieran a una concentración de 5×10^6 células/ml; inmediatamente después se almacenaron a -70 °C durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, los tubos se transfirieron a nitrógeno líquido hasta el momento de su descongelación. Para esto último, los tubos se recuperaron del nitrógeno líquido y se descongelaron en baño a 37°C o a TA. El contenido de los tubos Nunc® se transfirió a tubos Falcon® de 15 ml agregando 14 ml de medio TYI-S-33, posteriormente se centrifugaron a 210 x g durante 10 minutos. Este lavado se repitió una vez más para retirar los residuos de DMSO.



Finalmente se contó el número de trofozoítos viables recuperados en cámara de Neubauer (Diamond, 1995).

OBTENCIÓN DE CLONAS DE *G. duodenalis*

La clonación de los aislados de *G. duodenalis* (WB, IMSS-2, IMSS-3 y CIEA-52) se llevó a cabo mediante el método de dilución limitante (Baum *et al.*, 1988). Para ello, los trofozoítos se contaron en cámara de Neubauer y se inocularon 25 viales de 4.5 ml a una densidad de una célula por cada 9 ml. Los viales se incubaron a 37°C y se revisaron al microscopio óptico invertido (Olympus modelo BHA) periódicamente para verificar su crecimiento.

TRATAMIENTO CON FÁRMACOS

Los fármacos del grupo de los bencimidazoles probados fueron: albendazol, mebendazol, bencimidazol, oxibendazol, tiabendazol y nocodazol (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) (tabla 2). Estos fueron almacenados a TA (albendazol, mebendazol, bencimidazol y tiabendazol) o a 0°C (nocodazol y oxibendazol) tanto en su estado cristalino (en desecador) como las diluciones de los mismos.

Cuadro 3. Fármacos derivados del grupo de los bencimidazoles empleados en este trabajo.

FÁRMACO	FÓRMULA
Albendazol	metil-5-[propiltio]-2-bencimidazolcarbamato
Mebendazol	5-Benzoil-2-bencimidazol-metilester ácido carbámico
Nocodazol	metil [5-(2-tienilcarbonil)-1H-bencimidazol-2-il] carbamato
Oxibendazol	metil (5-propoxi-1H-bencimidazol-2-il) carbamato
Tiabendazol	2-[4-tiazolil]-bencimidazol
Bencimidazol	bencimidazol

Los fármacos fueron disueltos en diferentes solventes como agua, alcohol, acetona, DMFM y DMSO para evaluar su capacidad de solubilización y su toxicidad al cultivo. Empleando estos criterios se eligió el solvente óptimo y a partir de la solución máxima concentrada se hicieron diluciones en el mismo solvente (DMFM) para obtener las concentraciones deseadas las cuales se ajustaron finalmente en el medio de cultivo.

Inicialmente las alícuotas de todos los fármacos fueron esterilizadas por filtración, pero al elegirse la DMFM por su alta toxicidad se eliminó este paso substituyéndolo por un periodo de



preincubación de al menos 48 hrs. Para verificar la esterilidad se tomaron alícuotas tanto de las soluciones de fármaco como de los medios de cultivo adicionados con éste de las cuales se realizaron pruebas de esterilidad en Medio Agar Luria.

Los cultivos fueron cosechados por enfriamiento en baño hielo-agua durante un tiempo mínimo de 20 minutos. Las células se lavaron 3 veces en PBS (Solución amortiguadora salina de fosfatos, ver anexo) frío estéril o medio de cultivo TYI-S-33 según se requirió y se contaron en cámara de Neubauer. Posteriormente se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células por 4.5 ml y se agregaron las concentraciones correspondientes de los fármacos a probar. Dichos ensayos se realizaron según se requirió en viales de 4.5 ml, tubos Falcon® de 15 ml, botellas Nunc® de 30 ml o botellas Nunc® de 60 ml respetándose las concentraciones finales de trofozoítos y de los fármacos probados. En todos los casos los cultivos se incubaron por 24 hrs a 37°C en presencia del fármaco y se incluyó un cultivo control al cual sólo se le adicionó el solvente. Estas condiciones fueron empleadas para todas las evaluaciones realizadas durante la tesis, con excepción de los casos en que se indica lo contrario.

EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE TROFOZOÍTOS DE *G. duodenalis* EXPUESTOS A ALBENDAZOL *in vitro*

Con el fin de establecer un método capaz de evaluar la sensibilidad de diferentes cepas a los fármacos mencionados, se estandarizaron diferentes protocolos de evaluación de viabilidad celular empleando las cepas de referencia WB y P1 así como un fármaco representativo del grupo de los Bencimidazoles (albendazol) y se compararon así métodos fisiológicos (subcultivo en medio líquido, subcultivo en medio semisólido de agarosa y evaluación morfológica), así como métodos bioquímicos (tinción con colorantes fluorogénicos, incorporación de timidina radiomarcada y reducción de MTT).

En estos ensayos los trofozoítos expuestos o no a droga como se mencionó anteriormente fueron lavados 3 veces en PBS frío estéril por centrifugación a 210 x g, y se contaron en cámara de Neubauer para ser empleados en la evaluación de su viabilidad mediante los siguientes métodos:



a) Subcultivo en medio líquido

En este caso se siguió el protocolo reportado por Hill en 1986. La técnica fue estandarizada empleando distintos inóculos de trofozoítos luego de lo cual se decidió usar 100,000 células tratadas con fármaco o control (con DMFM), los cuales se cultivaron en viales de 4.5 ml con medio TYI-S-33 sin albendazol, incubando estos por 48 horas a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo, se cosecharon en baño hielo-agua por un tiempo mínimo de 20 minutos y se contó el número final de trofozoítos en cámara de Neubauer. El porcentaje de replicación fue calculado considerando como 100% de replicación el número de trofozoítos que se contó en el cultivo control

b) Subcultivo en medio semisólido de agarosa

En este ensayo se siguió y modificó el protocolo reportado por Gillin (Gillin y Diamond, 1980, Gillin y Diamond, 1981). Para realizar esta técnica se requirió estandarizar las condiciones a emplear tales como: inóculo celular, concentración, marca y tipo de agarosa, tipo de recipiente de cultivo y se verificó el tamaño y tipo de colonia obtenida bajo las diferentes condiciones empleadas.

Al realizar los ensayos se tomaron de 100 a 5000 células y se llevaron a tubos de ensayo de borosilicato con tapón de rosca de 15 ml o tubos Falcon® de plástico del mismo volumen. Estos tubos se preincubaron por al menos 2 horas a 42°C con medio TYI-S-33 completo. Posteriormente se adicionó agarosa (se probaron las siguientes: Sigma tipo I [baja electroendosmosis], Sigma tipo III [alta electroendosmosis], Bio Rad Ultrapura de bajo punto de fusión, Sea Kem y Bio Rad grado reactivo) a una concentración final evaluada entre 0.13 y 0.3%, esta concentración fue obtenida a partir de una solución stock estéril de agarosa al 2% p/v en medio de cultivo sin suero. Inmediatamente después de agregar el cultivo celular al medio con agarosa fundida, se agitó vigorosamente cada tubo (manualmente, en agitador vortex [modelo Genie 2] o en agitador de plataforma [Bellco]) y se enfrió en baño hielo-agua hasta su solidificación. Los tubos se incubaron durante al menos 6 a 7 días a 37°C tras de lo cual se contó el número de colonias formadas (cuentacolonia New Brunswick Scientific). Una vez transcurrido el tiempo mencionado se determinó la eficiencia de formación de colonias, considerando como 100% de eficiencia el número de colonias obtenido en el cultivo control.



c) Evaluación morfológica de trofozoítos de *G. duodenalis*

Para realizar este ensayo se tomaron inóculos de 1×10^6 células que se trataron con albendazol (50, 65, 80, 120, 300, 350 y 450 nM) en viales de 4.5 ml por 24 horas a 37°C , se enfriaron en baño hielo-agua, tras lo cual se lavaron tres veces en medio TYI-S-33 y se contaron en cámara de Neubauer. Al realizar este conteo, se tomó en cuenta el porcentaje de deformación observado; para esto se consideró un trofozoíto viable como aquel que mantiene su forma piriforme habitual; y no viable a aquel que presentaba un contorno distorsionado de apariencia ondulada con forma piriforme muy irregular o ausente y generalmente con mayor volumen celular y motilidad irregular provocada por flagelos normales pero desalineados, y en ocasiones mayor granularidad. Se cosechó paralelamente un cultivo de trofozoítos no tratado con fármaco el cual se contó de igual manera. Posteriormente se tomaron diferentes inóculos de trofozoítos de cada concentración (10×10^3 , 30×10^3 , 60×10^3 , 100×10^3 y 150×10^3 trofozoítos) y se recultivaron en medio sin fármaco por 48 horas en viales de 4.5 ml Para cada concentración e inóculo cultivado de trofozoítos tratados con albendazol, se realizó un cultivo paralelo de trofozoítos no tratados con este fármaco empleando un inóculo que corresponde a la cantidad de células no deformadas con el tratamiento correspondiente. Una vez transcurridas las 48 horas de incubación a 37°C , los trofozoítos fueron cosechados y contados al microscopio óptico a 400X.

d) Incorporación de timidina tritiada ($^3\text{H-TdR}$)

Este método fue empleado anteriormente y reportado como un sistema de evaluación muy eficaz en los estudios de Inge *et al.*, 1987 y Boreham *et al.*, 1988, por lo que se decidió implementar su uso durante el presente trabajo. En este caso fue necesario estandarizar el inóculo inicial (entre 2.5×10^5 y 2×10^6) y el tiempo de incubación con el substrato radioactivo (entre 2 y 10 hrs); la concentración de marca ya había sido establecida previamente (Pérez-Taylor *et al.*, 1995 y Ortega, 1995).

Al realizar las evaluaciones se tomaron inóculos de 1×10^6 células expuestas o no a droga que se cultivaron en viales de 4.5 ml con medio TYI-S-33 donde se preincubaron por 2 horas a 37°C . Una vez transcurrido este tiempo se adicionaron $12.52 \mu\text{Ci/ml}$ de ^3H -timidina (actividad



específica de 4.11 TBq/mmol y concentración radioactiva de 1.0 mCi/ml), y los cultivos se incubaron nuevamente por 4 horas más. Posteriormente los trofozoítos se lavaron 3 veces en PBS frío, la suspensión celular se ajustó a 1ml con la misma solución y se mezcló en líquido para contador de centelleo (ver anexo). Las cpm de cada cultivo se cuantificaron empleando un contador de centelleo (Beckman 6000).

e) Reducción de MTT

El procedimiento original fue reportado por Wright *et al.* en 1992. En este caso 1×10^6 trofozoítos expuestos o no a droga se lavaron 3 veces en PBS por centrifugación durante 45 segundos a 16,000 x g (microcentrífuga Eppendorf modelo 5414) dentro de tubos Eppendorf de 1.5 ml enseguida se agregaron 50 μ l de PMS (metasulfato de fenazina) preparado con 5 mg/ml en PBS, y se aforó a 1.3 ml con MTT (bromuro de difenil tetrazolio) 0.05% en PBS (ver anexo). La suspensión se homogeneizó en un agitador vortex y se incubó a TA por 45 minutos. Los trofozoítos se lavaron en PBS y finalmente se contó al microscopio óptico el número de células metabolizan el sustrato y lo convierten en cristales de formazán de color café intenso (viables) y las que no lo hicieron (metabólicamente inactivas).

f) Tinción con colorantes fluorogénicos

Para este ensayo se realizó una adaptación de la técnica reportada por Schup y Erlandsen en 1987. Así se tomaron 1×10^6 células en tubos y se lavaron 3 veces con PBS del mismo modo que en la técnica anterior, posteriormente se les agregaron 100 μ l de solución de FDA (diacetato de fluoresceína a 40 μ g/ml en PBS) y 100 μ l de solución de PI (Yoduro de propidio a 30 μ g/ml de PBS). Los trofozoítos se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y finalmente se cuantificaron las células vivas empleando un sistema de epifluorescencia (microscopio Zeiss) con filtro de 436 nm, donde los trofozoítos viables que transformaban el FDA y se observaban verdes, mientras que aquellos no viables incorporaban PI tomando una coloración entre rojo y naranja fuerte.



DETERMINACIÓN DE LAS DL₅₀ DE DIFERENTES BENCIMIDAZOLES EN TROFOZOÍTOS DE *G. duodenalis* in vitro

Se realizaron evaluaciones de la sensibilidad de la cepa de referencia WB a 6 diferentes fármacos del grupo de los bencimidazoles (albendazol, mebendazol, nocodazol, oxibendazol, tiabendazol y bencimidazol) con el fin de comparar la eficacia de cada uno de ellos ante la misma cepa. Para esto se cultivaron inóculos de 1×10^6 trofozoítos de la cepa WB en viales de 4.5 ml con diferentes concentraciones de alguno de los fármacos mencionados. Inicialmente se realizaron ensayos considerando las concentraciones mínimas de la droga diluibles en el solvente utilizado, para finalmente emplear aquellas concentraciones que permitieran obtener curvas dosis-respuesta apropiadas para realizar análisis de regresión lineal que a su vez facilitaran calcular las DL₂₅, DL₅₀ y MIC (dosis letal al 25%, 50% y concentración mínima inhibitoria). La viabilidad fue evaluada empleando el método más adecuado de los mencionados con anterioridad.

EVALUACIÓN DE SINÉRGIA Y ANTAGONISMO ENTRE FÁRMACOS DEL GRUPO DE LOS BENCIMIDAZOLES HACIA TROFOZOÍTOS DE *G. duodenalis*

Con el fin de observar posibles efectos sinérgicos o antagónicos entre los fármacos empleados se realizaron evaluaciones de viabilidad en trofozoítos de la cepas WB. En estos ensayos se emplearon las MIC calculadas para cada uno de los fármacos y algunas de las posibles combinaciones de ellos. Las combinaciones empleadas fueron: dos fármacos de alta eficiencia, un fármaco de alta eficiencia con uno de intermedia, un fármaco de alta eficiencia con uno de baja efectividad, uno de baja eficiencia con otro de actividad intermedia, dos de baja efectividad y dos de actividad intermedia. Estas se emplearon en la combinación de la MIC, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{5}$ y $\frac{1}{6}$ de estas. A la par se corrieron dos tipos de controles: por una parte, cada fármaco a MIC y a $\frac{1}{3}$ de la MIC. Los resultados de interacciones farmacológicas fueron analizados estadísticamente calculando la Concentración Fraccional Inhibitoria (CFI) según fórmula reportada por Li y Rinaldi en 1999, la cual es muy similar al Índice Fraccional de Viabilidad (IFV) reportado previamente por Pendland *et al.*, 1994.



ANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD DE CEPAS, AISLADOS Y CLONAS DE *G. duodenalis* EXPUESTOS A DL_{50} DE ALBENDAZOL Y MEBENDAZOL

a) Transversal

Los trofozoítos de las cepas y aislados empleados, una vez clonados, fueron evaluados en función de su sensibilidad a DL_{50} de fármacos representativos del grupo de los bencimidazoles (albendazol y mebendazol) bajo las condiciones que se mencionaron anteriormente. Para ello, cada cepa o aislado fue evaluado a la par de su conjunto de clonas para poder comparar la viabilidad obtenida entre todas las clonas y el cultivo parental correspondiente, a fin de definir si existían diferencias en sensibilidad para alguna de ellas; se procuró hacer esta evaluación única al poco tiempo de realizada la clonación. En este caso también se empleó el método seleccionado como óptimo para la evaluación de viabilidad. Cabe mencionar que esta también fue una de las estrategias empleadas con el fin de obtener trofozoítos tolerantes a los fármacos sin inducción previa en cultivo (selección espontánea).

b) Longitudinal

Se evaluó de igual manera la sensibilidad de algunas clonas que mostraron un comportamiento diferencial en su sensibilidad a albendazol y mebendazol en el análisis transversal, pero en este caso el estudio se realizó a través de 12 determinaciones las cuales fueron realizadas en cultivos continuos a lo largo de 1.5 meses (dos evaluaciones por semana). En todos los casos, las clonas seleccionadas fueron cultivadas a la par del aislado o cepa del cual se originaron. Para ello, se mantuvieron cultivos continuos en tubos Falcon® de 15 ml -en ausencia de fármaco- de las cepas, aislados y clonas a los cuales se les nombró cultivos madre. De estos cultivos, la cosecha celular total se destinó a las evaluaciones; y para este fin se cosecharon de 1 a 3 tubos de 15 ml por cada cepa, aislado o clona, los cuales se concentraron en una sola pastilla para su conteo. De dicha cosecha se inocularon 1×10^6 trofozoítos en viales de 4.5 ml con albendazol o mebendazol a la DL_{50} previamente determinada para la cepa WB y se incubaron por 24 hrs a 37°C tras lo cual se evaluó la viabilidad por el método seleccionado inicialmente.



OBTENCIÓN DE CULTIVOS RESISTENTES A ALBENDAZOL Y MEBENDAZOL

Con la finalidad de obtener trofozoitos que mostraran resistencia o tolerancia a alguno de los fármacos probados se recurrió a diferentes estrategias:

a) Selección espontánea

Se buscaron cultivos con tolerancia espontánea, para lo cual se realizó un análisis transversal de las cepas, aislados y clonas de éstas empleando la DL_{50} . Para ello se incubaron los trofozoitos por 24 horas con la DL_{50} de albendazol y mebendazol, y se seleccionaron los cultivos que mostraran mayor tolerancia a los fármacos representativos de la familia de los bencimidazoles (albendazol y mebendazol) utilizando para ello el método seleccionado como óptimo para la estimación de viabilidad en los cultivos.

b) Separación de células en gradiente de sacarosa

Con el fin de enriquecer subpoblaciones de trofozoitos que hubiesen tenido una sensibilidad diferente ante un tratamiento con bencimidazoles a partir del mismo cultivo se realizó un método de tamizaje en sacarosa para lo cual se lavaron trofozoitos previamente tratados con albendazol en PBS frío para luego centrifugarse a $210 \times g$ por 5 minutos a $4^{\circ}C$ dentro de tubos Falcon® de 15 ml con sacarosa en un gradiente continuo de esta (Formador de gradientes con bomba peristáltica, Sage instruments) el gradiente fue de 0.85 M a 0.15M de 14 cm de longitud. Una vez centrifugados se obtuvieron fracciones de 0.5 ml las cuales fueron observadas al microscopio con el fin de seleccionar las fracciones que muestren células dañadas y las que presenten células no deformadas.

c) Mutagénesis

Se probaron dos métodos de mutagénesis al azar: la exposición a luz UV y exposición a colchicina. En la estandarización de la técnica de mutagénesis por luz UV se utilizaron diferentes condiciones. Para todos los casos se emplearon cultivos confluentes de trofozoitos de las cepas WB y P1, las cuales se colocaron en una cámara oscura en presencia de una lámpara de luz UV (Blak Ray UVL.22 115 voltios 60 ciclos 0 17 amperes), la cual fue colocada a una distancia de entre 15 y 40 cm del recipiente de cultivo. Los trofozoitos se expusieron así por espacio de 30 minutos a 6 hrs, debido a que este fue el tiempo mínimo en el cual se encontraron efectos visibles



en el cultivo. El medio en el cual se mantuvieron los trofozoítos durante ese tiempo fue TYI-S-33 o PBS y, en todos los casos, la temperatura de incubación fue de 37°C, a excepción de los ensayos efectuados en la campana de flujo laminar en cuyo caso fue a TA. Los recipientes empleados para esta técnica fueron viales de 4.5 ml, frascos de vidrio, tubos de 15 ml o cajas petri de plástico abiertas (en este caso la exposición a UV fue realizada en la campana de flujo laminar). Sólo fueron evaluados ante el tratamiento con albendazol los trofozoítos expuestos bajo las condiciones que se consideraron como óptimas (ver resultados).

En el caso de mutagénesis por colchicina se utilizó una concentración fija de 10 mM de droga a la cual se expuso el cultivo confluyente de trofozoítos de la cepa WB en viales de 4.5 ml por 6 hrs a 37°C. A lo largo de este tiempo el cultivo fue observado cada hora para ver su apariencia general, posteriormente los trofozoítos fueron enfriados en baño hielo-agua y se lavaron por centrifugación 3 veces en medio TYI-S-33 para eliminar el fármaco y finalmente las células se sembraron en tubos de plástico de 15 ml con medio fresco.

Cabe señalar que en el laboratorio se habían obtenido previamente cultivos deficientes en adhesión por protocolos de mutagénesis al azar mediante exposición a N-metil-N-nitro-N'-nitrosoguanidina seguida de dos procesos de selección por incubación en presencia de colchicina 25 mM por 24 hrs a 37°C cada uno y un proceso de clonación y selección de trofozoítos deficientes en adhesión a monocapas de células epiteliales de riñón de perro (MDCK). Este cultivo llamado WB-C5 proviene de la clonación inicial de la cepa WB seguida por procesos de subclonación y selección de trofozoítos con mayores deficiencias en adhesión se obtuvo la clona WB-C7 (Hernández, 1992). Ambas clonas fueron utilizadas en el proceso de selección de cultivos resistentes a bencimidazoles.

d) Cultivo en concentración subletal ascendente de droga

Las cepas WB y P1 se cultivaron en presencia constante de los fármacos albendazol o mebendazol empleando la concentración inicial más alta que éstas fueron capaces de tolerar. En el momento en que los cultivos mostraron un crecimiento estable, la concentración de droga les fue incrementada. Para realizar los incrementos se recurrió a probar una gama de concentraciones superiores a la anterior hasta encontrar la concentración más alta a la cual los trofozoítos pudieran



mantenerse aún viables. Después de cada incremento y estabilización de un cultivo, los trofozoítos fueron congelados en Nitrógeno líquido para su criopreservación hasta su uso

CINÉTICA DE INCORPORACIÓN DE PRECURSORES RADIOMARCADOS

Se realizaron ensayos longitudinales de radiomarcaje celular empleando precursores de procesos celulares fundamentales tales como timidina, uracilo y cisteína marcados radioactivamente con el fin de observar cual de los tres procesos (replicación, transcripción o traducción) se muestra afectado como consecuencia de las adaptaciones sufridas por cepas resistentes en ausencia de droga, así como también se pretendió observar que variaciones se desarrollan en estos procesos cuando la misma está presente (Sigeti *et al.*, 1983). Para ello se utilizaron trofozoítos de la cepa WB y de cultivos resistentes a albendazol (WB-RA) bajo dos condiciones que fueron con o sin tratamiento con albendazol a la concentración MIC (0.1667 μM) hasta por 22 hrs.

En este caso los trofozoítos cosechados de los recipientes de cultivo fueron sometidos a tres lavados en medio fresco estéril para eliminar el fármaco del cultivo de trofozoítos WB-RA. Posteriormente se realizó un conteo celular para inocular 1×10^6 trofozoítos en viales de 4.5 ml e incubarlos a 37°C por 2 hrs (periodo de estabilización). Una vez transcurrido este tiempo, la marca radioactiva fue adicionada y este momento se consideró como inicio de la cinética (tiempo cero). Las marcas radioactivas empleadas (Amersham Int. PLC) fueron las siguientes: ^3H -TdR [(*metil*, $1',2'-^3\text{H}$) timidina (empleada a una concentración de 3.33 $\mu\text{Ci/ml}$, act. esp. 4.11 TBq/mmol)], ^3H -UdR [(5,6- ^3H) uridina (empleada a una concentración de 3.33 $\mu\text{Ci/ml}$, act. esp. 1.52 Tbq/mmol)] y ^{35}S -Cisteína [L- ^{35}S] cisteína (empleada a una concentración de 0.55 $\mu\text{Ci/ml}$, act. esp. 37 Mbq/mmol)]. Al iniciar la cinética los viales correspondientes a tiempo cero no llevaron marca radioactiva y mostraban así la radioactividad basal del sistema; Así mismo se dejó un cultivo control de 24 hrs sin marca el cual además se empleó para cuantificar la viabilidad del cultivo por el método de evaluación seleccionado. De la misma forma, durante una de las cinéticas realizadas se evaluó la viabilidad a lo largo de todas las determinaciones. Al resto de los viales sí se les adicionó la marca correspondiente a la concentración indicada y se incubaron por dos horas más. En este



momento a todos los viales se les adicionó la concentración de albendazol correspondiente a una MIC (0.1667 μ M), con excepción de los viales que les correspondió ser cosechados en ese momento y aquellos que se evaluaron en condiciones basales (en ausencia de albendazol). El resto de los viales fueron cosechados a los tiempos de 4, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 hrs por enfriamiento en baño hielo-agua. En cada paso del proceso los viales fueron observados al microscopio invertido para verificar que éste se llevara de manera adecuada. Posteriormente el contenido de los viales fue decantado en tubos Falcon® de plástico de 15 ml conteniendo PBS frío, donde se realizó un proceso de tres lavados por centrifugación a 4°C. La pastilla obtenida de ellos fue resuspendida en 2 ml de PBS y filtrada en un cosechador de células de presión negativa (Millipore modelo 1225) con filtros circulares de papel de nitrocelulosa (diámetro 2.5 cm y poro 0.22 μ m) utilizando 5 ml de solución fría estéril de ácido tricloroacético 10% (ver anexo). Finalmente los papeles de nitrocelulosa fueron secados a TA, colocados en viales de 20 ml con 5 ml de solución para contador de centelleo (ver anexo) y las cpm de los viales fueron obtenidas en un contador de centelleo de líquidos.

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Las pruebas estadísticas empleadas fueron la comparación por métodos de χ^2 y t de Student realizados en el Programa Excel versión 5.0, así como Regresiones Lineales por ajuste semilogarítmico empleando el método de mínimos cuadrados; ANOVA de dos vías para comparación de modelos lineales seguida de un método de comparación de pares por prueba t de Bonferroni, estos fueron realizados en el programa Sigma Stat de Jandel Scientific. También se empleó un método de comparación de regresiones lineales (Weisberg, 1980, y Allen y Cady, 1982) y un método de evaluación de interacciones farmacológicas (sinergia, aditividad, indiferencia y antagonismo) reportado por Li y Rinaldi en 1999; estos últimos también fueron realizados empleando el programa Excel para su ejecución.



RESULTADOS

CULTIVO, CRIOPRESERVACIÓN Y CLONACIÓN DE CEPAS Y AISLADOS DE *G. duodenalis*

Los trofozoítos de las diferentes cepas, aislados y clonas empleadas en este trabajo fueron cultivados hasta alcanzar la confluencia en medio TYI-S-33 en el cual crecieron eficientemente a lo largo de períodos de entre 2 a 4 días, tras los cuales se realizaron las resiembras correspondientes. Para realizar estas resiembras, los cultivos fueron sometidos a períodos de enfriamiento en baño hielo agua por tiempos variables (de 20 minutos hasta toda la noche). Durante las resiembras y cosechas realizadas se observó, particularmente en las cepas P1 y WB, una tendencia a incrementar la capacidad de adhesión a las paredes de los recipientes de cultivo, por lo cual las condiciones de enfriamiento llegaron a ser extremas (refrigeración por más de 10 hrs).

El medio de cultivo y las condiciones empleadas resultaron ser eficientes para el crecimiento de trofozoítos de *G. duodenalis* así como para la criopreservación de los mismos. Los cultivos que pasaron por procesos de congelación y descongelación bajo las condiciones descritas en material y métodos mostraron en general características de viabilidad y tiempo necesario para la resiembra semejante al mostrado antes de dicho proceso, por lo cual se consideró que éste fue realizado eficientemente.

Con la finalidad de tener cultivos con características más homogéneas que las cepas y aislados, fue necesario realizar clonaciones de los mismos empleando el método de dilución limitante. Las clonaciones realizadas mostraron ser exitosas al obtenerse un número adecuado de ellas en cada clonación como se muestra en el cuadro 1.

Las clonas obtenidas no mostraron diferencias en cuanto a su tiempo de replicación al compararse entre sí y con los cultivos parentales de los cuales se obtuvieron. Al analizarse por el método de χ^2 y comparar el número de clonas obtenido experimentalmente con el esperado para una distribución de tipo Poisson, no se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) para las cepas clonadas lo cual indica que, estadísticamente, el número de clonas obtenido es apropiado para considerarse confiablemente como tales. Un valor de χ^2 menor al observado en tablas (5.991)



para $P < 0.05$ indica semejanza entre ambos datos, que a su vez representa que la distribución de los trofozoítos clonados en los viales de cultivo fue al azar y no hubo factores externos que influyeran en la misma; de manera que se pueden considerar confiablemente como clonas según el procedimiento empleado.

Cuadro 4. Eficacia del método de clonación de aislados de *G. duodenalis* por medio de dilución limitante.

CEPA O AISLADO EMPLEADO	# CLONAS OBTENIDO	ESPERADO	INTERVALO	χ^2
P-1	9	7.58	1.34 - 14.81	0.1112
WB	14	7.58	1.34 - 14.81	4.6199
IMSS-2	7	7.58	1.34 - 14.81	0.1543
IMSS-3	8	7.58	1.34 - 14.81	0.0008
CIEA-52	11	7.58	1.34 - 14.81	1.1233
CIEA-10	11	7.58	1.34 - 14.81	1.1233

El valor esperado corresponde al calculado para una distribución de Poisson, en tanto que el valor de χ^2 indica las diferencias entre dicho valor y el observado. Un valor de χ^2 menor al observado en tablas (5.991) para $\alpha=0.05$ indica semejanza entre ambos datos.

ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA EXPOSICIÓN DE TROFOZOÍTOS DE *G. duodenalis* A DERIVADOS DE BENCIMIDAZOL

Inicialmente se realizaron diluciones de los bencimidazoles a probar para conocer el límite de solubilidad que muestran los fármacos en diferentes solventes y así seleccionar el que mejor conviniera a los ensayos considerando su toxicidad al cultivo, así como el volumen necesario a emplear. Algunos solventes polares tales como el agua o el etanol no permitieron en absoluto la disolución, en tanto que compuestos no polares tales como la acetona, el DMSO o la DMFM permitieron una adecuada disolución. De estos solventes, los que mostraron mejores resultados fueron la DMFM y el DMSO. Sin embargo, este último ha sido reportado que presenta un efecto estabilizante de microtúbulos (Gill y Lacey, 1992); considerando esto se optó por el uso de la DMFM, el cual se empleó como solvente óptimo de los fármacos. En todos los casos se consideró que la concentración del solvente en el medio de cultivo no sobrepasara un límite del 0.5%, aunque al realizar curvas de viabilidad con éste la cantidad de DMFM que puede emplearse sobrepasa esta



concentración. El valor del límite de solubilidad permitió elaborar soluciones patrón con cantidades de fármaco que fuesen confiablemente pesadas y adecuadamente disueltas para trabajarse en otras diluciones las cuales llamamos soluciones de trabajo (cuadro 2).

Cuadro 5. Características de solubilidad en DMFM de los bencimidazoles empleados.

BENCIMIDAZOL	PESO MOLECULAR	LIMITE DE SOLUBILIDAD EN DMFM (soluciones patrón)	SOLUCIÓN DE TRABAJO
Albendazol	265.33	50 mM	0.10 mM
Bencimidazol	118.13	superior a 3.3 M	3.33 mM
Mebendazol	295.32	40 mM	0.10 mM
Nocodazol	301.30	superior a 11 mM	0.11 mM
Oxibendazol	248.29	superior a 5 mM	0.41 mM
Tiabendazol	201.26	superior a 100 mM	10.0 mM

Una vez obtenidos los límites de solubilidad en DMFM, se procedió a evaluarlos empleando las soluciones señaladas en el cuadro 4 y se determinó las diluciones de éstas dentro de las cuales se encontrara el rango de letalidad del fármaco (soluciones de trabajo). En todos los casos estas diluciones también fueron hechas en DMFM y finalmente ajustadas en el medio de cultivo a la concentración necesaria, en general al diluirse en el medio de cultivo el medio previamente disuelto en DMFM no hubo precipitación del fármaco salvo con albendazol a concentraciones superiores a 1mM.

SELECCIÓN DEL MÉTODO DE EVALUACIÓN DE VIABILIDAD PARA TROFOZOÍTOS DE *G. duodenalis*

Con el fin de obtener parámetros confiables de viabilidad que mostraran las condiciones de sensibilidad o tolerancia de cepas, aislados o clonas ante los bencimidazoles, se realizaron ensayos de viabilidad empleando las cepas de referencia P1 y WB expuestos a un fármaco representativo del grupo, el albendazol. Dichos ensayos se clasificaron en dos grupos: fisiológicos y bioquímicos.



a) Ensayos bioquímicos

Se clasificó dentro de este grupo a aquellos ensayos cuyo resultado mostró de modo indirecto el estado de viabilidad de la cepa en cuestión. Los indicadores de viabilidad son, en estos casos, rutas metabólicas importantes para el parásito las cuales fueron evaluadas por los procedimientos que a continuación se mencionan:

i. Tinción con colorantes fluorogénicos

Las observaciones de tinción celular con los colorantes FDA y PI mostraron una adecuada reproducibilidad en los ensayos realizados (fig. 3). Además esta prueba permitió obtener resultados rápidos con una apropiada resolución entre células que transforman el FDA (verdes) y las que integran el PI (rojo-naranja).

La diferencia de tinción es debida a una adecuada actividad de las enzimas estererasas y otras hidrolasas las cuales catalizan la formación de fluoresceína a partir del FDA. Este último compuesto es capaz de atravesar la bicapa lipídica y entrar en contacto con las enzimas dando lugar a la fluorescencia verde. Por su parte la integridad de la membrana celular impide la entrada del PI cuando el trofozoíto está viable y, cuando no es así, este colorante penetra al interior de las células, las cuales, por la acumulación del mismo, adquieren una coloración rojiza típica al ser excitado por la luz UV. Uno de los principales sitios de unión de este colorante es el DNA, de manera que es frecuente observar trofozoítos no viables con los núcleos fuertemente teñidos.

En los casos que ambos colorantes llegaron a observarse dentro del mismo trofozoíto se consideró a la célula como viable, ya que al iniciarse la evaluación por este método tenía la capacidad de transformar el FDA a fluoresceína. Cuando los trofozoítos carecían de la fluorocromasia con ambos reactivos también se consideraban viables, debido a que se pudo observar que algunos trofozoítos con esta característica, a un mayor tiempo de incubación, sí lograban mostrar la tinción con el FDA. Los efectos anteriormente expuestos eran muy raros de observar y, aún de haberse ignorado, no hubiesen afectado de modo importante los resultados obtenidos.

No obstante las ventajas del método, éste no fue seleccionado como el óptimo por su menor sensibilidad comparando los resultados obtenidos con los de otros métodos (fig. 3 y 4),

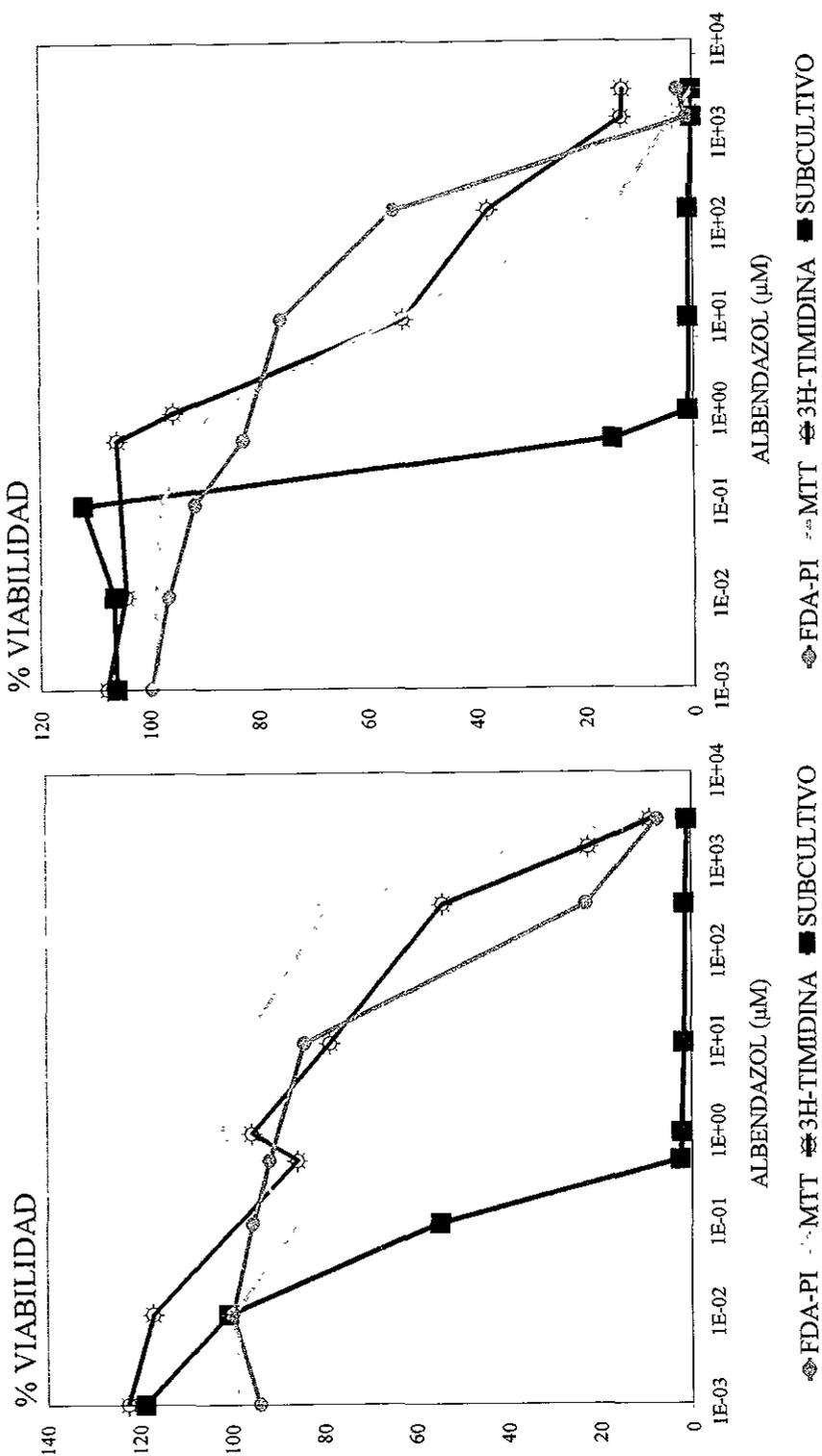


Fig 3. Curvas dosis-respuesta de los métodos de evaluación de viabilidad empleados en trofozoitos de *G. duodenalis* de las cepas WB y PI. 222222 trofozoitos/ml de las cepas mencionadas fueron tratados con la concentración de fármaco indicada en los ejes de las ordenadas (µM) por 24 hrs, tras de las cuales fueron cosechados y lavados para realizar las técnicas de evaluación de viabilidad. El procedimiento seguido en cada método se explica en material y métodos. Todas las evaluaciones fueron realizadas por triplicado y se grafica el promedio calculado. FDA-PI (tinción con colorantes fluorogénicos), MTT (reducción de MTT), 3H-Timidina (incorporación de timidina tritiada) y subcultivo (subcultivo en medio líquido).

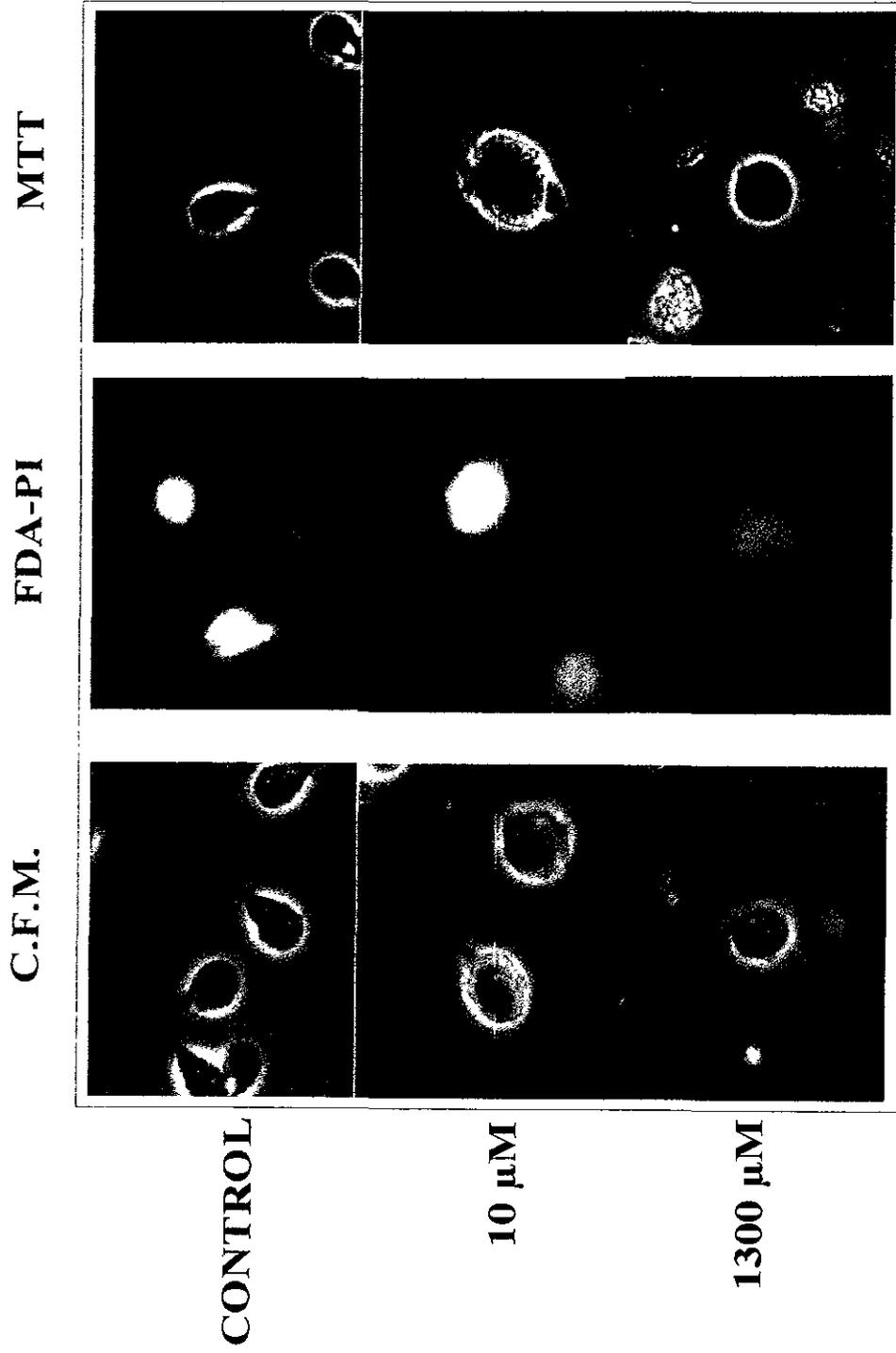


Fig 4. Evaluaciones microscópicas de trofozoítos de *G. duodenalis* de la cepa WB expuestos a Albendazol. Se muestran los resultados obtenidos con los tratamientos de 10 y 1300 μ M de albendazol así como un cultivo control tratado con DMFM, estos se analizaron por microscopía en contraste de fase, tinción con colorantes fluorogénicos (FDA-PI), así como la capacidad de reducción de MTT.



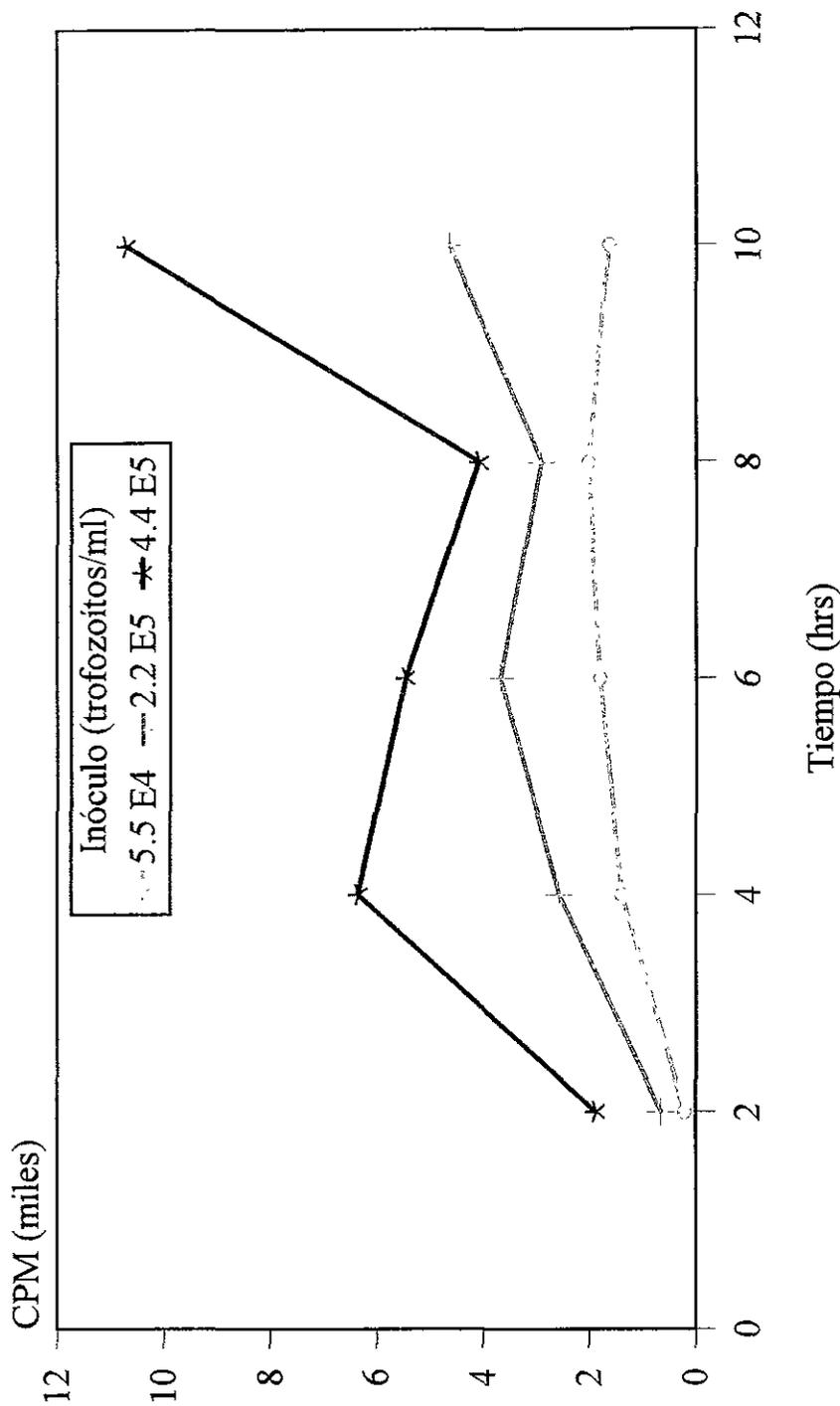


Fig 5. Curvas de incorporación de timidina tritiada en trofozoítos de la cepa WB. Con el objeto de estandarizar las condiciones óptimas para realizar el método de incorporación de timidina tritiada se probaron diferentes inóculos (5.5 E4, 2.2 E5 y 4.4 E5) y se verificó el tiempo óptimo de incorporación (entre 2 y 10 horas) empleando para ello viales de cultivo de 4.5 ml. Se incubó la cantidad indicada de trofozoítos por 2 hrs a 37°C, posteriormente se les adicionó 12.52 μ Ci/ml de timidina tritiada y se les cosechó a los tiempos indicados para finalmente tomar las lecturas en un contador de centelleo de líquidos. Todas las evaluaciones fueron realizadas por triplicado.



particularmente al comparar los resultados con el método de subcultivo. Esto resultó evidente al observar los diferentes patrones en las curvas dosis-respuesta obtenidas, así como las DL_{50} DL_{90} observadas para este método (cuadro 3). Dichas dosis no muestran diferencias relevantes entre las cepas empleadas, así como tampoco las pendientes de las curvas dosis-respuesta son estadísticamente diferentes entre sí.

Cuadro 6. Curvas de regresión y valores de DL para los métodos de evaluación de viabilidad probados.

WB				
Método	Ecuación	r^2	DL_{50}	DL_{90}
FDA-PI	70.4-13.5X	0.71	245.0	>>500
MTT	81.6-11.6X	0.55	27800	>>500
³H-TdR	81.8-17.6X	0.94	183.0	>>500
Subcultivo	33.7-21.3X	0.70	1.9	45.73
PI				
Método	Ecuación	r^2	DL_{50}	DL_{90}
FDA-PI	70.1-15.4X	0.84	200.0	>>500
MTT	67.6-18.2X	0.88	92.0	377.48
³H-TdR	79.5-16.7X	0.87	120.0	>>500
Subcultivo	45.6-19.2X	0.67	5.9	44.49

Para el cálculo de estos parámetros se emplearon los datos mostrados en las curvas dosis-respuesta de la figura 3, se siguió el procedimiento de mínimos cuadrados. Las dosis letales (DL_{50} DL_{90}) se expresan en concentración nM.

ii. Reducción de MTT

La incorporación del MTT se observó por la precipitación de sales de tetrazolio que tiene lugar debido a la reacción que se produce con enzimas de la vía glucolítica. Las sales de formazán que se forman dentro de los trofozoítos fueron observadas al microscopio como pequeños gránulos color café oscuro los cuales se distinguen fácilmente a 400 aumentos en el microscopio óptico. Esta técnica, además de sus ventajas en función de economía y rapidez, mostró una adecuada reproducibilidad. Sin embargo, fue el método de menor sensibilidad entre los utilizados en estas evaluaciones. Esto en parte fue debido al rigor con el que se siguió la prueba, pues al observarse al menos un gránulo de sales de tetrazolio en el trofozoíto éste se consideró como viable (figs 3 y 5). Por otra parte el número de gránulos de formazán observado en cada célula fue variable y en algunas concentraciones de albendazol se encontró un mayor número de gránulos que en los cultivos no tratados (fig 4).



Las diferencias observadas entre la pendiente calculada para cada una de las cepas por este método con respecto al resto de los métodos empleados resultó estadísticamente significativa. Sin embargo, el patrón es diferente para cada cepa empleada; en tanto que para la WB la pendiente es la menor de todas, para la PI es la más alta entre las obtenidas por los métodos bioquímicos, estas diferencias se reflejan en las DL_{50} calculadas para las mismas cepas y pueden ser indicativas de una diferente capacidad de metabolización del substrato para dar origen al formazán, más que a diferentes sensibilidades reales de las cepas, puesto que otros métodos no reflejan el mismo efecto (cuadro 3).

iii. Incorporación de timidina tritiada ($^3\text{H-TdR}$)

La incorporación de timidina se realiza por toda célula a lo largo de la fase S del ciclo celular como una preparación para la duplicación del genoma antes de la mitosis. En el caso de los ensayos realizados en este parásito, se observó una apropiada reproducibilidad en cuanto a las cuentas por minuto (cpm) incorporadas. Durante la estandarización de esta técnica fue necesario realizar varios ensayos previos con el fin de seleccionar las condiciones de cantidad de trofozoítos inoculados y tiempo de marca óptimos, ya que la concentración de marca radioactiva había sido establecida previamente a $12.52 \mu\text{Ci/ml}$ (Pérez-Taylor *et al.*, 1995). En este sentido fueron probados tres inóculos celulares diferentes de (5.55×10^4 , 2.22×10^5 y 4.44×10^5 trofozoítos/ml) de la cepa WB, observándose una mejor incorporación por célula en los inóculos 5.55×10^4 y 2.22×10^5 , y una mayor incorporación total en los inóculos de 2.22×10^5 y 4.44×10^5 . Por lo anterior, se eligió el inóculo de 2.22×10^5 trofozoítos/ml. En forma simultánea, los cultivos con los tres inóculos fueron cosechados a los tiempos de 2, 4, 6, 8 y 10 hrs encontrándose un tiempo óptimo de cosecha de 4 hrs ya que en ese momento se inició una meseta en la incorporación de la marca (fig. 5).

Bajo estas condiciones, la incorporación de timidina radiomarcada mostró una adecuada reproducibilidad. Sin embargo, entre las desventajas que mostró este método se encontró una baja sensibilidad con respecto a otros métodos empleados. Dichas diferencias se hicieron evidentes al observar los patrones dosis respuesta obtenidos, donde se observó que existen diferencias de los resultados obtenidos con respecto al subcultivo (fig. 3). Cabe destacar que los resultados de DL_{50}



calculados no difirieron significativamente de los obtenidos por el método de FDA-PI, así como tampoco la pendiente de las gráficas.

En general, este grupo de métodos mostró una adecuada reproducibilidad con patrones dosis-respuesta semejantes entre sí (diferencia significativa $P \leq 0.01$) mostrando como única excepción a la evaluación por reducción de MTT donde la prueba estadística de comparación de regresiones (Weisberg, 1980) indica que presentó una pendiente diferente, menos pronunciada que el resto de los métodos para la cepa WB y la más elevada para la cepa P1 entre los métodos de este grupo. De esta forma los valores de DL_{90} resultaron mucho más elevados para la cepa WB (fig. 3 y cuadro 3). Así mismo no se observaron diferencias significativas entre las dos cepas empleadas ($P < 0.05$) con excepción del método de MTT. Estos datos en conjunto sugieren que el tratamiento de trofozoítos con albendazol en las condiciones empleadas y a baja concentración ($0.001 \mu\text{M}$ a $1 \mu\text{M}$) no afecta principalmente los mecanismos enzimáticos de la vía glucolítica que participa en la formación de sales de formazán a partir del MTT, ni tampoco afectan la activación de enzimas hidrolasas involucradas en la inducción de fluorescencia del FDA. Tampoco parece interferir inicialmente en la fase S del ciclo celular del parásito, puesto que la timidina también es incorporada bajo dichas condiciones.

b) Ensayos fisiológicos

Se agruparon en esta clasificación a aquellos ensayos que de modo directo permitieron conocer la sensibilidad del cultivo empleando su nivel de replicación celular como indicador de viabilidad, o bien, a los ensayos en que se demostró que tienen efecto directo sobre este parámetro. Aquí se consideraron los siguientes métodos:

i. Subcultivo en medio semisólido de agarosa

Este fue el único método que no mostró reproducibilidad debido a que se observó que en éste pueden influir variables tales como las condiciones de agitación, el recipiente de cultivo, las temperaturas de preincubación, solidificación e incubación, el tipo de agarosa y posiblemente la más importante sea la posibilidad de que se presenten diferentes capacidades en cada trofozoíto para formar o no colonias en el medio semisólido de agarosa. Este método fue descartado para su



uso posterior, pues en los ensayos realizados, al variar dichas condiciones, no se encontró una adecuada correlación entre el número de células inoculadas y el número de unidades formadoras de colonias (datos no mostrados).

No obstante esto, fue posible obtener algunos parámetros importantes a considerar. Entre ellos destacó la correlación existente entre la concentración de agarosa probada (entre 0.13 y 0.3 %) y la estructura de la colonia la cual era muy difusa a bajas concentraciones o pequeña y compacta a concentraciones altas. Así, la concentración más adecuada a emplear correspondió a un valor de 0.16 % aunque la de 0.22 % también mostró una efectiva formación de colonias. Utilizando esta concentración se probó con diferentes tipos y marcas de agarosa como son Sigma tipo I (baja electroendoosmosis), Sigma tipo III (alta electroendoosmosis), Bio Rad Ultrapura de bajo punto de fusión, Sea Kem y Bio Rad grado reactivo. De éstas, los mejores resultados fueron obtenidos con las agarosas de Sea Kem y Bio Rad grado reactivo con una eficiencia de formación de colonias superior al 20% (cuadro 4). Así mismo, se realizó el ensayo en tubos Falcon® de plástico o tubos de ensayo con tapón de rosca de vidrio resultando más eficiente el vidrio para esta técnica. Al emplearse con diferentes concentraciones de albendazol, los datos obtenidos no correlacionaron entre sí, por lo cual se descartó este método para los análisis posteriores.

Cuadro 7. Eficiencia de formación de colonias de trofozoítos de *G. duodenalis* en medio semisólido de agarosa

MARCA DE AGAROSA	Eficiencia en formación de colonias
Ultrapura de bajo punto de fusión.	5.80
Sigma Tipo I.	19.33
Sigma Tipo III.	16.86
Sea Kem.	20.13
Bio Rad Grado reactivo	26.60

Se indican las marcas de agarosas empleadas en la estandarización. La eficiencia en la formación de colonias se observó con un inóculo de 500 trofozoítos por tubo de ensayo con tapón de rosca de aproximadamente 16 ml. sin tratamiento con fármacos, a 6 hrs de preincubación a 42 °C, agitación manual vigorosa, un periodo de solidificación de 30 minutos en baño hielo-agua y una incubación a 37°C por una semana.

ii. Subcultivo en medio líquido

Este método resultó ser muy ventajoso en la práctica, al ser el más sensible de todos los métodos empleados. En la figura 3 se puede observar que tanto en la gráfica de la cepa WB como



en la P1 las curvas dosis-respuesta correspondientes a este método presentaron una pendiente más pronunciada y el punto de intersección con el eje de las ordenadas es más bajo que para el resto de los métodos. Esto indica que es más sensible que el resto de las evaluaciones, pues a una concentración menor de fármaco, el efecto citocida resultó ser más notorio. Dicho efecto es un indicio directo de ausencia de mitosis en los trofozoítos en cultivo.

No obstante las ventajas mostradas de sensibilidad, economía y sencillez en la realización de este método, tiene el inconveniente de requerir períodos de incubación prolongados (48 horas después del tratamiento con fármacos) para poder obtener resultados. Es por ello que se optó por la búsqueda de un método alternativo. A lo largo de las evaluaciones realizadas fue posible observar el efecto severo que desarrolla el albendazol sobre la morfología de los trofozoítos tratados (foto 1), aún en concentraciones en las cuales sólo el método de subcultivo indicaba efectos sobre la viabilidad. Por ello se decidió evaluar tal efecto y compararlo con la viabilidad observada por el método de subcultivo.

iii. Alteración morfológica

Con la finalidad de comparar los resultados observados ante el mismo tratamiento empleando el método de subcultivo en medio líquido y la observación morfológica de los trofozoítos, se realizó un ensayo donde ambos elementos (división celular y daño morfológico) fueron evaluados a la par (fig. 6). Esto fue realizado debido a las graves alteraciones morfológicas observadas en los trofozoítos al ser expuestos a concentraciones bajas de albendazol y otros bencimidazoles, donde sólo el método de subcultivo en medio líquido permitía detectar efectos sobre la viabilidad (fig. 4).

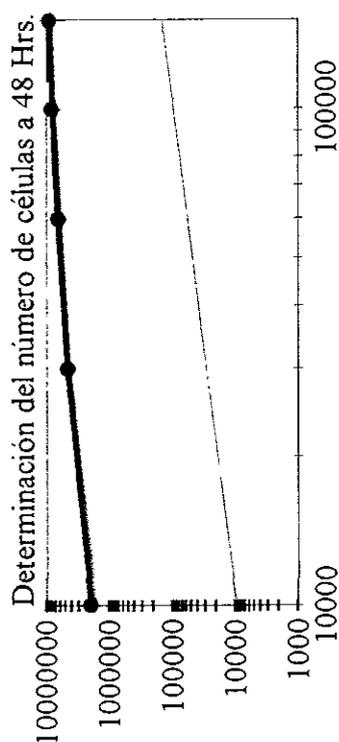
A nivel microscópico, entre las alteraciones consideradas como deformaciones resultó evidente la total pérdida de la estructura típica del trofozoíto, así como un incremento del volumen celular y en la *granularidad citoplasmática*, además la *membrana* de los trofozoítos se mostró ondulada. En varias ocasiones se observó que trofozoítos durante la división mitótica pueden estar uno de los dos productos deformado mientras el otro no lo está. En tal caso, fueron contados como un trofozoíto viable pues era capaz de reproducirse aún y cuando generaba clonas abortivas.



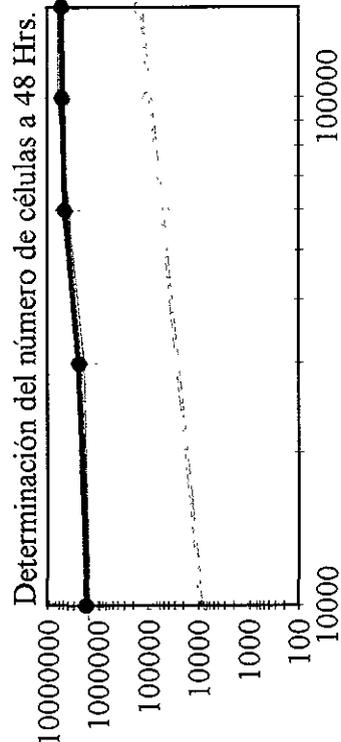
La evaluación morfológica mostró reproducibilidad, además de ser un método rápido, sencillo de realizar y de bajo costo. A lo largo de la comparación de estos dos métodos se observó que a concentraciones bajas de albendazol no existieron diferencias evidentes entre el número de trofozoítos cosechados a partir de cultivos tratados con fármaco y aquellos que se inocularon en cantidades semejantes a la observada de trofozoítos no deformados; en tanto que a concentraciones intermedias o altas (superiores a 50 nM) sí existieron diferencias, de manera que se observó que trofozoítos no deformados tratados con albendazol se replicaron más lentamente que aquellos que no fueron expuestos al fármaco (fig. 6).

Estos resultados indican que el método de subcultivo es menos eficiente que el de observación de la alteración morfológica, pues la cantidad de trofozoítos viables obtenidos es calculada en el método de subcultivo por extrapolación a una curva patrón con un número conocido de trofozoítos inoculados y no se considera que los trofozoítos viables pueden tener una capacidad de replicación disminuida con respecto a células no tratadas con fármaco como se observa a partir de la evaluación realizada. Es por lo anterior que el método de observación de la alteración morfológica se seleccionó como el método óptimo, pues es rápido, sencillo de realizar, no es costoso y fue el más sensible entre el total de los evaluados.

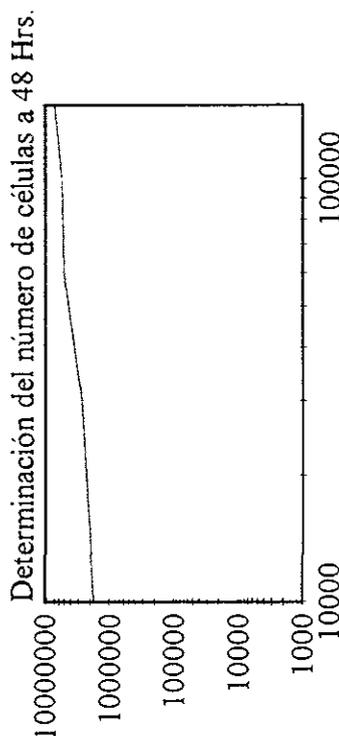
Al considerar este método como óptimo se procedió a eliminar la comparación con subcultivo. Para su uso rutinario en las diferentes aplicaciones empleadas en este trabajo se inocularon 2.22×10^5 trofozoítos/ml los cuales se incubaron por 24 hrs a 37 °C, tras de lo cual se procedió a cosechar los trofozoítos por enfriamiento en baño hielo-agua. Después se les observó y contó al menos 300 trofozoítos empleando el sistema de contraste de fases con microscopio óptico con objetivo 40X. El porcentaje de deformación siempre fue calculado con referencia a un cultivo control tratado sólo con el solvente del fármaco (DMFM) el cual no sobrepasó el 0.5% de deformación. Este procedimiento se empleó en la mayor parte de los experimentos posteriormente realizados, salvo aquellos en los que se indican otras condiciones de evaluación.



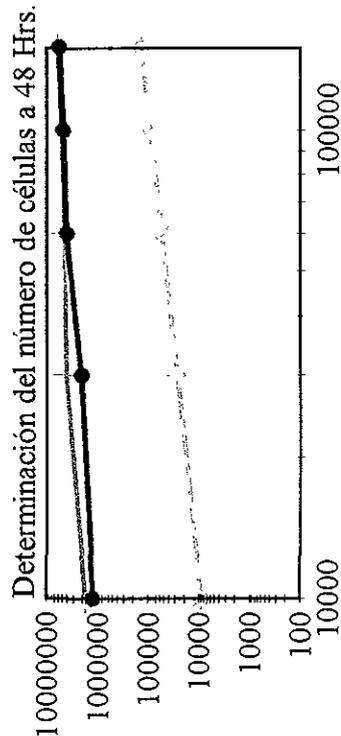
Conteo inicial
◆ ALB 50 ▬ 50 I.



Conteo inicial
◆ ALB 80 ▬ 80 I.



Conteo inicial
◆ CONTROL



Conteo inicial
◆ ALB 65 ▬ 65 I.

Fig. 6a. Cuantificación de trofozoítos por los métodos de alteración morfológica y de subcultivo en medio líquido. Trofozoítos de la cepa WB fueron tratados con albendazol a la concentración que se indica en cada figura (nM) por 24 hrs, luego fueron lavados y se contó el número de trofozoítos no deformados de cada concentración, se subcultivó el número de trofozoítos que se indica en el eje de las ordenadas y se contó después de 48 hrs el número total de trofozoítos obtenido (ALB 50, p. ej.). Paralelamente un cultivo de trofozoítos no tratados con albendazol se cosechó y cuantificó, de éste se subcultivó un número de trofozoítos semejante al obtenido en el tratamiento con albendazol que no hubiesen sufrido alteración morfológica (50 C, p. ej.). Se muestra también una curva teórica considerando la ausencia total de replicación para cada caso (50 I, p. ej.), así como la curva obtenida de cultivos control inoculados a la concentración real indicada (CONTROL).

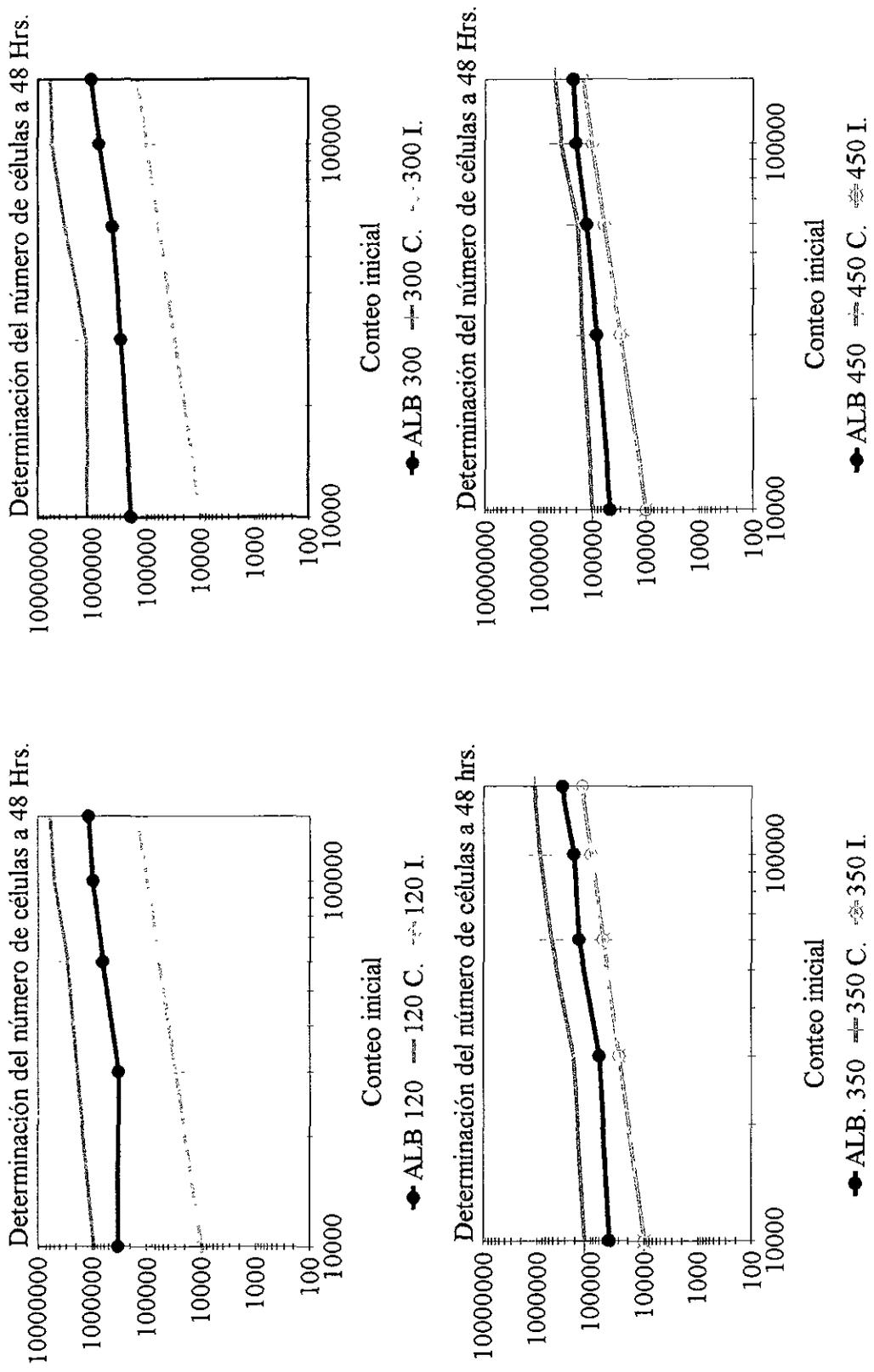


Fig 6b. Cuantificación de trofozoítos por los métodos de alteración morfológica y de subcultivo en medio líquido. En todos los casos las gráficas muestran ambos ejes en escala logarítmica y representan ensayos hechos por triplicado (Ver figura 6a).



De manera global los métodos contemplados en este grupo tuvieron mayor heterogeneidad en sus resultados. El cultivo en medio semisólido con agarosa bajo las condiciones empleadas, resultó de menor reproducibilidad que cualquier otro. Por su parte, las evaluaciones de alteración morfológica y subcultivo en medio líquido mostraron semejanza entre sí, e incluso existió una mayor precisión al determinar la morfológica como parámetro de viabilidad, ya que de este modo pudimos saber directamente cuántos trofozoítos viables se presentaban en un cultivo. En cambio, en el método de subcultivo en medio líquido esto se hizo por interpolación del número de células a una curva patrón (expuestas sólo a DMFM) y no se consideró de ningún modo que pudiese existir un retraso en la velocidad de duplicación de los trofozoítos (efecto citostático) además del efecto citocida que se presentó. Esto resultó evidente al observar (fig. 6) que las curvas en las cuales se contaron trofozoítos control (sin albendazol y sólo con DMFM) tuvieron una mayor tasa de reproducción (mayor número de trofozoítos contados después de 48 hrs de cultivo) que aquellos que fueron expuestos al fármaco, aún cuando los primeros se encontraban en un inóculo equivalente al número de trofozoítos tratados con albendazol que no mostraban daño morfológico (fig. 6).

Al comparar ambos grupos de métodos, destacaron las diferencias observadas entre el subcultivo en medio líquido (y por ende la evaluación morfológica) con el resto de métodos probados (fig. 3 y cuadro 4). Esto fue evidenciado al utilizar la prueba de comparación de rectas la cual mostró diferencias estadísticamente significativas entre la pendiente obtenida por el método de subcultivo y el resto de las evaluaciones realizadas para las dos cepas ($P < 0.01$). Esto podría estar relacionado con el mecanismo de acción del fármaco, ya que los bencimidazoles, al actuar a nivel de microtúbulos, sus efectos se pueden reflejar muy tardíamente sobre vías metabólicas. Así, en las condiciones empleadas, el primer efecto observado es sobre el ciclo celular, particularmente la mitosis, así como sobre la morfológica del trofozoíto.

DETERMINACIÓN DE LAS DL_{50} DE DIFERENTES BENCIMIDAZOLES EN LA CEPA WB

Los 6 fármacos del grupo de los bencimidazoles mencionados anteriormente fueron evaluados *in vitro* ante la cepa WB de referencia empleando diferentes concentraciones de éstos



para poder determinar por interpolación matemática las DL_{25} , DL_{50} y MIC de cada uno de ellos. Al comparar estos valores y las gráficas obtenidas, se observó una susceptibilidad diferente de los trofozoítos a dichos fármacos. El método de evaluación empleado fue la observación de la morfología que, como se determinó, resultó alterada ante el tratamiento con todos los fármacos empleados, aunque para el caso de tiabendazol y bencimidazol la deformación mostró características diferentes a las observadas con el resto de los bencimidazoles (fig. 7). En el caso del bencimidazol la diferencia en la deformación fue más notoria, puesto que ésta no consistió en un incremento en granularidad ni en un ondulamiento de membranas importante, sino sólo en un notorio incremento en el volumen celular. En tanto, el tiabendazol sí mostró un aumento ligero en la granularidad citoplásmica y ondulamiento de la membrana celular.

El más efectivo de los fármacos del grupo probado resultó ser el nocodazol con una DL_{50} de $0.048 \mu\text{M}$; le siguieron el albendazol, mebendazol y oxibendazol con una efectividad ligeramente menor; y el tiabendazol y bencimidazol fueron los menos efectivos del grupo evaluado (Fig. 7 y cuadro 5). Estas diferencias, por ser tan elevadas, debieron ser graficadas en escala logarítmica de concentración.

Cuadro 8. Curvas de regresión y valor de DL para trofozoítos de la cepa WB expuestos a los diferentes bencimidazoles probados.

FÁRMACO	ECUACIÓN	n	R ²	DL ₅₀	DL ₉₀
Nocodazol	$120.9 - 1.469 \times 10^9 X$	11	0.918	0.048	0.075
Albendazol	$116.6 - 698.8 \times 10^6 X$	8	0.957	0.078	0.154
Mebendazol	$127.0 - 725.4 \times 10^6 X$	8	0.907	0.111	0.171
Oxibendazol	$134.8 - 341.9 \times 10^6 X$	11	0.783	0.24	0.36
Tiabendazol	$156.4 - 5.702 \times 10^6 X$	11	0.957	18.0	25.0
Bencimidazol	$121.6 - 12.23 \times 10^3 X$	11	0.937	5830.0	9120.0

Resultados obtenidos por el método de mínimos cuadrados a partir de los datos experimentales observados ante el tratamiento con varias concentraciones de cada fármaco del grupo de los Bencimidazoles en la cepa WB mostrados en la figura 7. Las concentraciones se expresan en el orden micromolar.

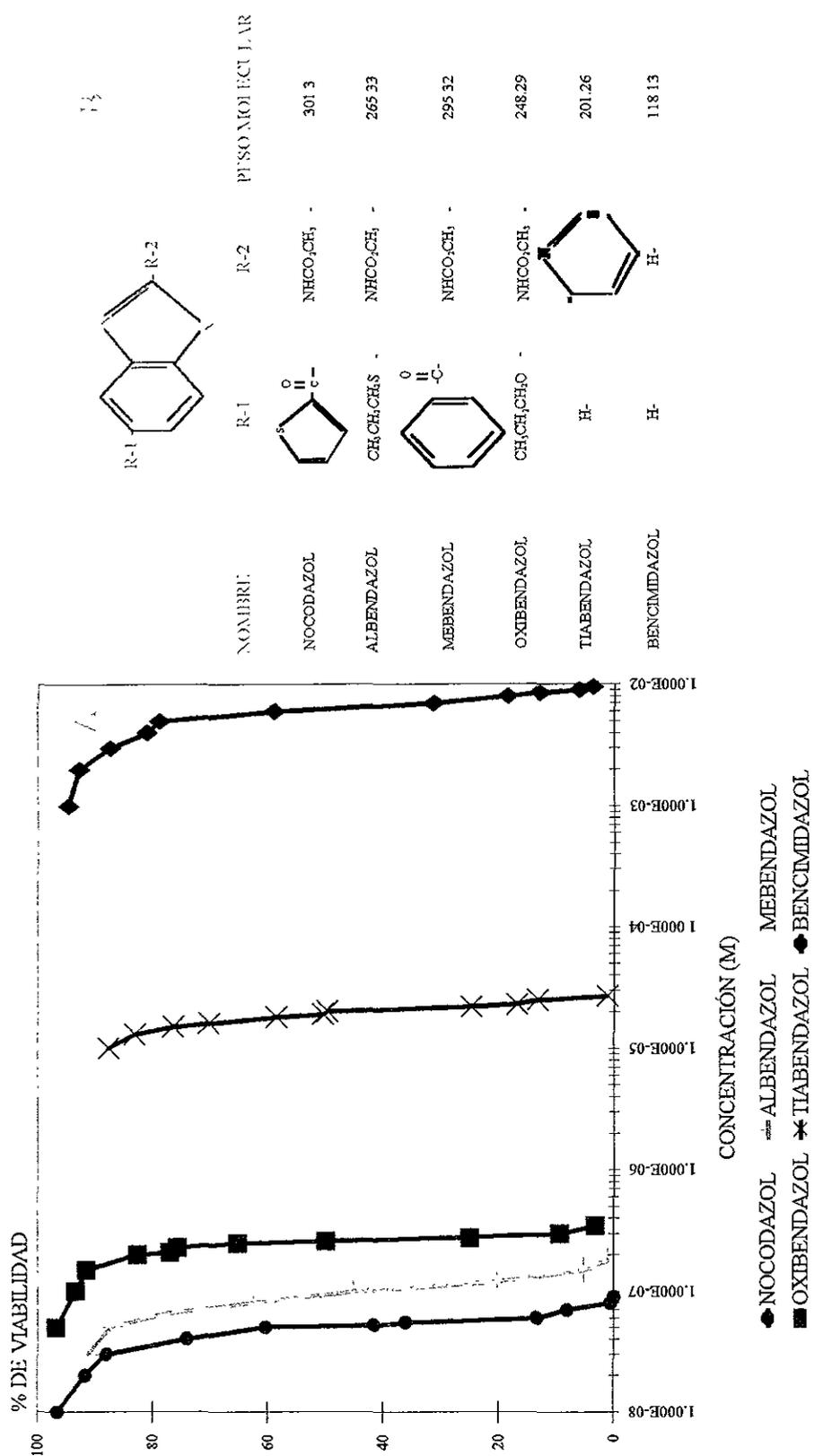


Fig. 7. Valores de porcentajes de viabilidad *in vitro* de trofozoítos de *G. duodenalis* expuestos a fármacos de la familia de los benzimidazoles. 7a. Curvas dosis-respuesta obtenidas al emplear la cepa WB con 6 diferentes miembros del grupo de los benzimidazoles. Se emplearon inóculos de 2.2 E5 trofozoítos/ml los cuales se incubaron en presencia del fármaco indicado por 24 hrs. posterior a esto se determinó su viabilidad por el método de evaluación de la alteración morfológica. Todos los puntos de las gráficas corresponden a promedios de experimentos realizados por triplicado. 7b. Fórmulas químicas y pesos moleculares de los benzimidazoles empleados en la presente tesis. Se indican los sustituyentes ubicados en posición 5 (R-1) y 2 (R-2).



Las curvas obtenidas mostraron una apropiada reproducibilidad debido a la precisión de las evaluaciones realizadas y aunque en general la tendencia fue la misma, los valores de DL_{50} y DL_{90} llegaron a ser heterogéneos debido a la variabilidad que desarrollaron los trofozoitos de *G. duodenalis* en su respuesta ante el fármaco. Sin embargo, a pesar de la variación observada, los datos se mantuvieron dentro de ciertos intervalos.

Como se puede observar en la figura 7, las curvas obtenidas mostraron patrones dosis-respuesta muy característicos y perfectamente distinguibles entre los diferentes Bencimidazoles empleados y la prueba estadística de comparación de rectas lo corroboró. El caso en el cual la diferenciación de los patrones dosis respuesta no fue tan notoria fue aquel entre Albendazol y Mebendazol, pues en algunos puntos las concentraciones empleadas y viabilidades observadas se traslaparon, por lo cual se realizó una prueba de comparación de rectas independiente para este par. De dicha prueba se concluyó que las curvas obtenidas para estos fármacos son diferentes entre sí pues mostraron pendientes estadísticamente diferentes ($P < 0.01$).

RELACIÓN ENTRE ESTRUCTURA Y EFECTIVIDAD *in vitro* DE DERIVADOS DE BENCIMIDAZOL CONTRA *G. duodenalis*

La estructura más sencilla de los fármacos de este grupo es la del bencimidazol el cual sólo presenta átomos de hidrógeno en sus radicales 1 y 2 (R-1 y R-2) (Fig. 7), lo cual coincidió con ser el mismo fármaco que mostró la menor efectividad sobre el protozoario *G. duodenalis*. Esto posiblemente se debe a que la interacción con su molécula blanco (β -tubulina) es dependiente de las características de esos dos radicales.

En su gran mayoría, los fármacos evaluados corresponden al grupo de los bencimidazol-carbamatos por contener este grupo como sustituyente en la posición del segundo radical (R-2) y las únicas excepciones son el tiabendazol y bencimidazol. Esto sugiere el alto potencial giardicida atribuible a este radical, puesto que los dos derivados que no lo presentan fueron los menos efectivos. Así, no obstante que la complejidad del R-2 presente en el tiabendazol es mayor, el R-1 del mismo fármaco es muy sencillo (un átomo de hidrógeno) y por lo mismo podría estar enmascarando la efectividad del anterior.

Entre los bencimidazol-carbamatos no se encontró una relación evidente entre la complejidad del R-1 y su actividad giardicida, pero sí pareció existir una relación entre la



simplicidad de este radical y su baja efectividad, es decir, probablemente no es tan importante la complejidad de la molécula como lo podría ser la estructura activa que ésta tiene y su capacidad de interacción con el sitio blanco.

Si bien los resultados obtenidos a este respecto son limitados por la gama de fármacos ensayados y se necesitaría la evaluación de un conjunto mayor de variaciones en los sustituyentes para realizar las observaciones correspondientes, los resultados obtenidos coincidieron con los reportes de la bibliografía. Así por ejemplo, se ha señalado como un factor importante en la actividad del fármaco a la distribución de cargas en los extremos de la molécula constituidos justamente por esos dos radicales, de manera que mientras más cargado positivamente esté el R-1 y negativamente el R-2, la efectividad de la molécula es mayor. En este sentido también resulta importante la estructura tridimensional de la molécula (ver discusión).

EVALUACIÓN DE SINERGIA Y ANTAGONISMO ENTRE FÁRMACOS DEL GRUPO DE LOS BENCIMIDAZOLES

En este experimento se empleó la MIC de los Bencimidazoles así como algunas de las combinaciones posibles entre ellos. Las combinaciones se eligieron según la efectividad que mostró cada uno de los fármacos por separado. Estos ensayos fueron realizados con trofozoítos de la cepa WB. Las combinaciones empleadas fueron las que se muestran en el cuadro 9. El criterio empleado para considerar la efectividad relativa de los bencimidazoles fue en base al comportamiento de las curvas dosis-respuesta, donde el más efectivo fue el nocodazol, los poco eficientes fueron tiabendazol y bencimidazol y los de efectividad intermedia fueron albendazol, mebendazol y oxibendazol.

Cuadro 9. Combinaciones de fármacos utilizados a DL_{25} y DL_{50} .

Fármaco	Características
Nocodazol- Albendazol	(+/+)
Nocodazol- Oxibendazol	(+/ \pm)
Nocodazol- Bencimidazol	(+/-)
Bencimidazol- Oxibendazol	(-/ \pm)
Bencimidazol- Tiabendazol	(-/-)
Oxibendazol -Mebendazol	(\pm / \pm)

Se muestran las características de efectividad relativa de los fármacos empleados (+, muy eficiente; \pm , de eficiencia regular; -, poco eficiente).



Se empleó la MIC de cada fármaco y sus combinaciones con el fin de observar los efectos independientes y sumatorios de los fármacos empleados (fig. 8) Los resultados obtenidos de tales combinaciones, al ser analizados estadísticamente (Li y Rinaldi, 1999), permitieron identificar las interacciones entre los fármacos en las condiciones empleadas (fig. 8). Estas se determinaron empleando la Concentración Fracciona Inhibitoria (CFI) que fue calculada como la suma de las Concentraciones Fraccionales Inhibitorias independientes ($CFI_{mn}=CFI_m+CFI_n$), donde $CFI_m=$ MIC calculada en la combinación mn dividida entre la MIC calculada con el fármaco m sólo; y $CFI_n=$ MIC observada en la combinación mn dividida entre la MIC observada el fármaco n sólo La forma de interacción fue determinada al comparar la CFI calculada de cada combinación con el valor establecido previamente por Li y Rinaldi; esto es, se consideró que existe una sinergia si el valor de la CFI de la combinación fue ≤ 0.5 , se identificó como aditivo si fue > 0.5 pero ≤ 1 , indiferente si fue > 1 pero ≤ 2 , y antagonico si fue >2 . Los resultados obtenidos permitieron observar para las combinaciones de Nocodazol- Albendazol y Nocodazol- Oxibendazol una interacción de tipo indiferente, en tanto que para el resto de las combinaciones se observó un antagonismo muy moderado puesto que la CFI de dichas combinaciones se encontró muy cercano al valor de corte de 2 (cuadro 10).

Cuadro 10. MIC y CFI calculados para las diferentes combinaciones de fármacos en la cepa WB.

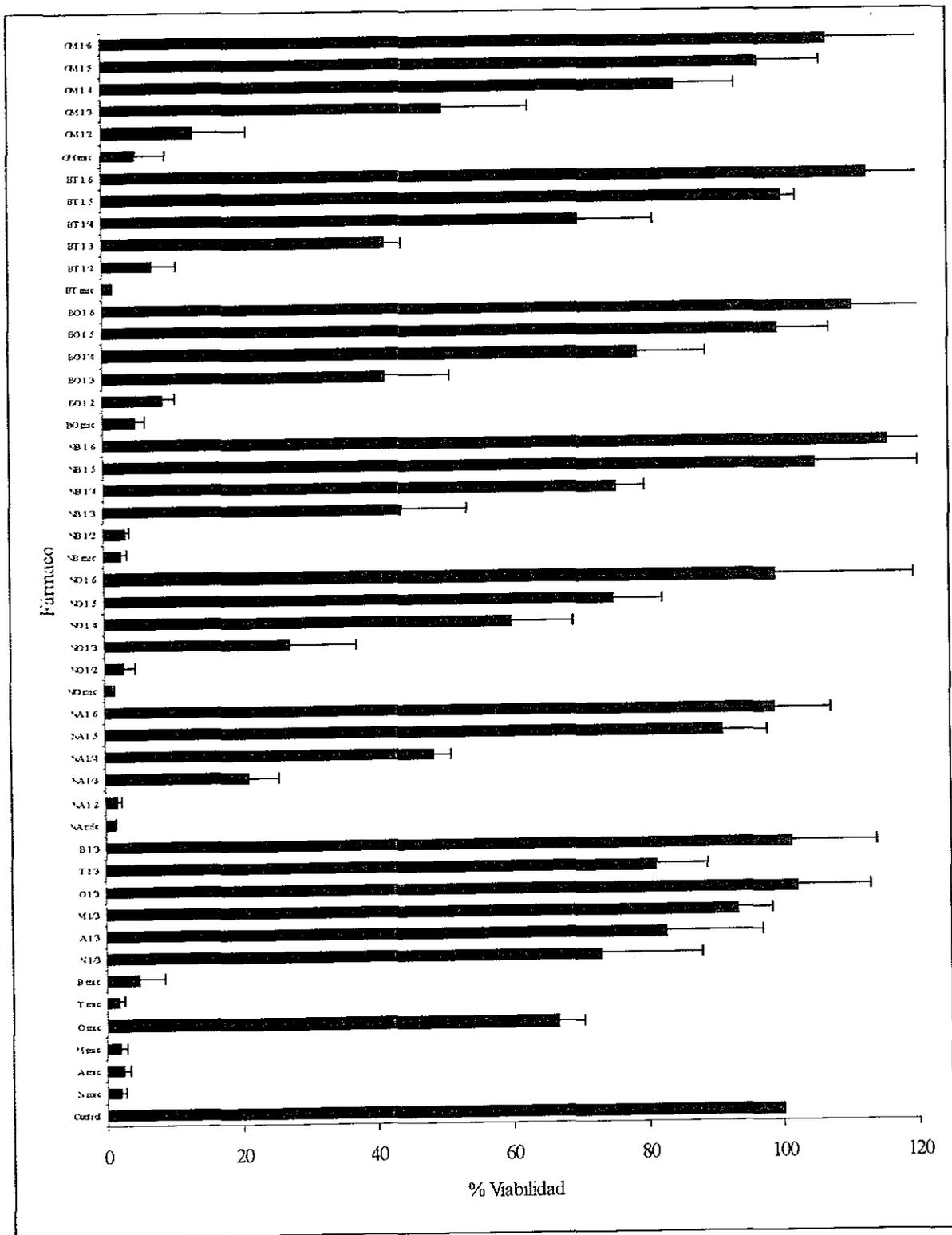
COMBINACIÓN	MIC		MIC COMBINACIÓN		CFI mn	INTERACCIÓN
	m	n	m	n		
Nocodazol- Albendazol	0.107	0.237	0.097	0.215	1.814	Indiferencia
Nocodazol- Oxibendazol	0.107	0.539	0.098	0.496	1.836	Indiferencia
Nocodazol- Bencimidazol	0.107	12322	0.108	12514	2.025	Antagonismo
Bencimidazol- Oxibendazol	12322	0.539	12464	0.545	2.023	Antagonismo
Bencimidazol- Tiabendazol	12322	43.44	12340	43.55	2.003	Antagonismo
Oxibendazol -Mebendazol	0.53	0.37	0.55	0.385	2.078	Antagonismo

MIC calculadas para cada fármaco independiente y en combinación. m y n representan al primer y segundo fármaco respectivamente listados en la combinación correspondiente. El criterio de determinación del tipo de interacción entre fármacos es indicado en el texto.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**



Fig. 8. Viabilidad desarrollada por la cepa WB al emplear las MIC independietes de los fármacos y combinaciones de estas





DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE TROFOZOÍTOS DE AISLADOS, CEPAS Y CLONAS DE *G. duodenalis* EXPUESTOS A DL₅₀ DE ALBENDAZOL Y MEBENDAZOL

a) Evaluación transversal de la sensibilidad ante albendazol y mebendazol

Los aislados y cepas, así como sus respectivas clonas, fueron evaluados ante fármacos representativos del grupo de los bencimidazoles (albendazol y mebendazol) con el fin de obtener del conjunto alguna o algunas clonas con una sensibilidad diferente (más sensible o tolerante que el resto). Para ello se empleó la DL₅₀ de dichos fármacos en las condiciones antes mencionadas.

Los resultados obtenidos (figs 9, 10 y 11) mostraron un incremento en la tolerancia de la cepa WB (misma que se utilizó para la determinación de la DL₅₀) ante los dos fármacos, en tanto que el resto de las cepas y aislados, así como sus clonas, presentaron un porcentaje de viabilidad por encima del 50%. Dentro de los resultados obtenidos destacó el grupo de clonas del aislado CIEA-10 (fig. 11), donde globalmente la viabilidad fue superior al 80%; sin embargo, el comportamiento en general no fue homogéneo como en este caso. Así, entre clonas de una misma cepa o aislado se observó una variación importante en la susceptibilidad y se mostró de manera más evidente en el grupo de clonas de los aislados WB e IMSS-3 (figs 9 y 10 respectivamente). Dentro del grupo evaluado sobresalieron los resultados de los cultivos que se mencionan en el cuadro 8.

Las características a que se refiere dicho cuadro fueron consideradas utilizando como parámetro de comparación el comportamiento del conjunto de clonas que corresponde a la cepa o aislado del cual se originaron y al comportamiento de éste inclusive. También se seleccionó el cultivo de origen el cual encabeza a las clonas seleccionadas en las gráficas.

En estos ensayos se esperaba encontrar una posible correlación entre las cepas y aislados obtenidos de pacientes sintomáticos cuyo tratamiento con fármacos hubiera sido prolongado con una mayor tolerancia *in vitro* ante los bencimidazoles utilizados. Sin embargo no ocurrió así, por el contrario, fue observada una alta heterogeneidad en la sensibilidad aún dentro del mismo aislado, lo cual es un indicio de la potencial variabilidad de respuestas ante tratamientos que puede mostrar el protozooario *G. duodenalis*.

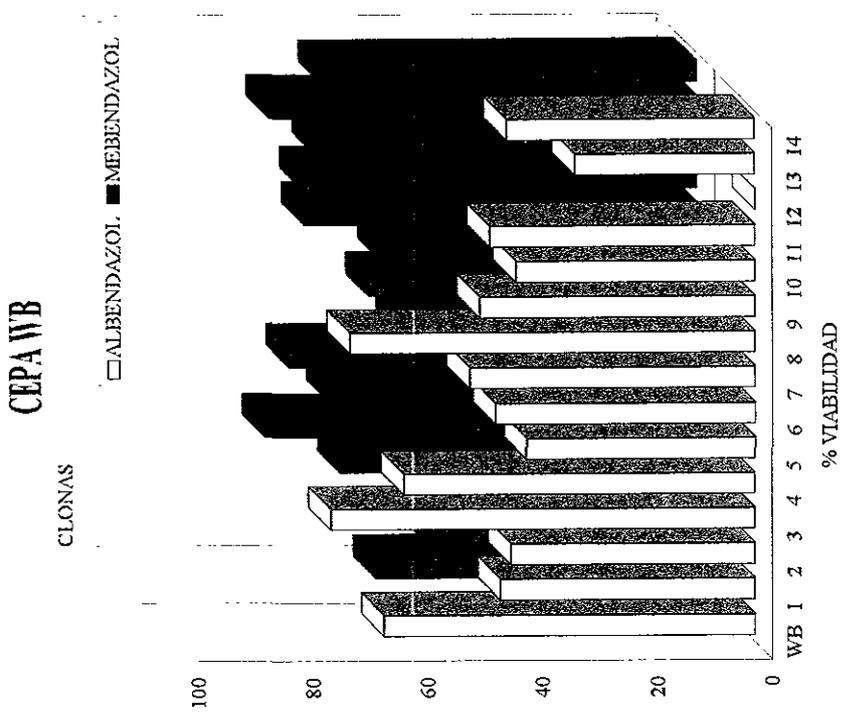
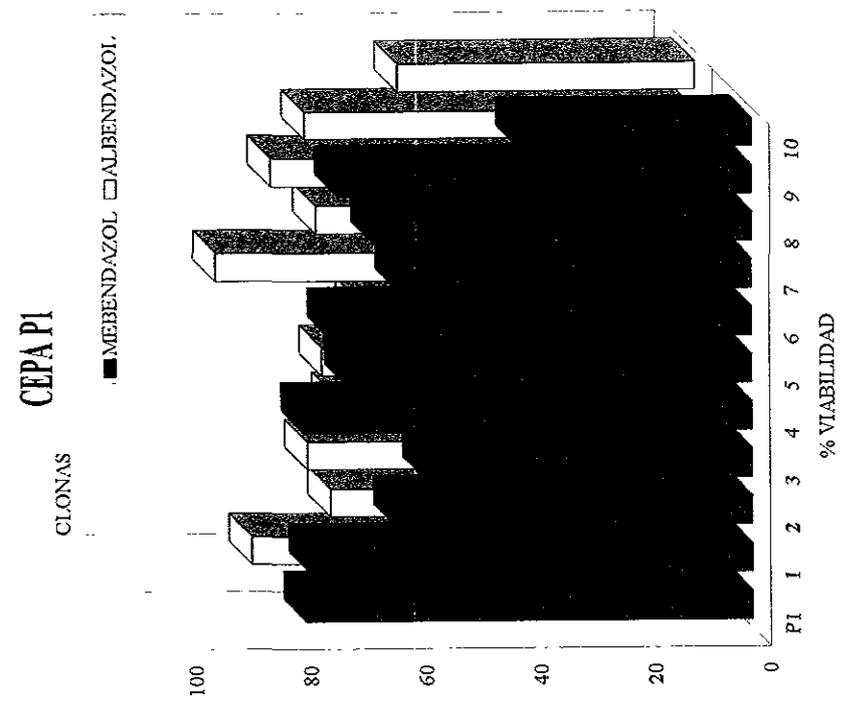


Fig. 9. Determinación de los porcentajes de viabilidad *in vitro* de las cepas WB, P1 y sus clonas en una evaluación transversal de sensibilidad ante albendazol y mebendazol. Esta evaluación fue realizada empleando la DL₅₀ de los fármacos albendazol y mebendazol en las cepas de referencia WB y P1, así como sus conjuntos de clonas. Se emplearon 2.2E5 trofozoítos/ml, mismos que se incubaron por 24 hrs en presencia de fármaco y luego se evaluó el efecto por el método de observación de alteración morfológica. Las evaluaciones del cultivo original encabezan los valores obtenidos para el conjunto de clonas en cada figura.

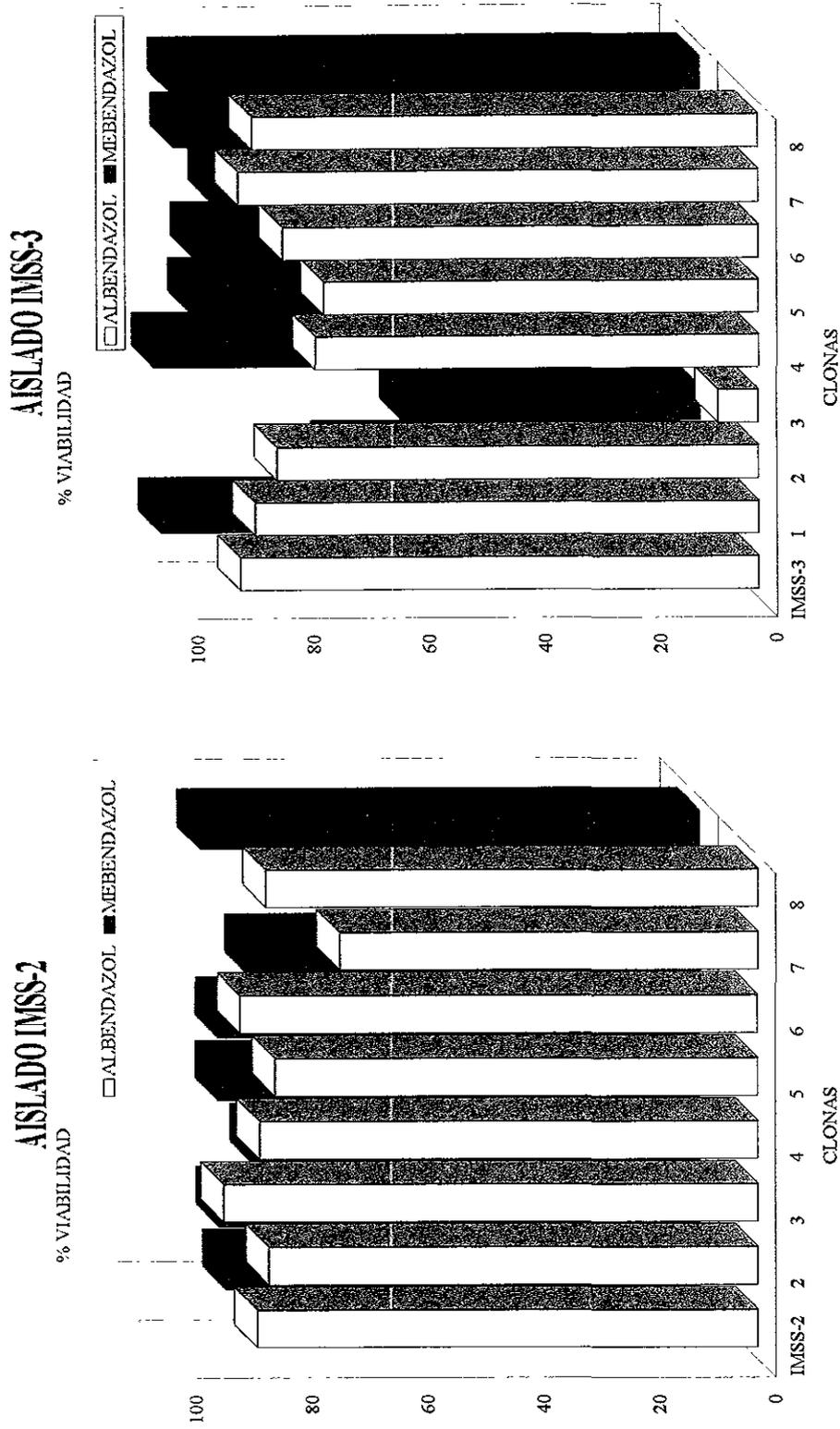


Fig. 10. Determinación de los porcentajes de viabilidad *in vitro* de los aislados de procedencia mexicana IMSS-2 e IMSS-3 y sus clones en una evaluación transversal de sensibilidad ante albendazol y mebendazol. Esta evaluación fue realizada empleando la DL_{50} de los fármacos albendazol y mebendazol en los aislados mexicanos IMSS-2, IMSS-3 y sus clones (ver figura 9).

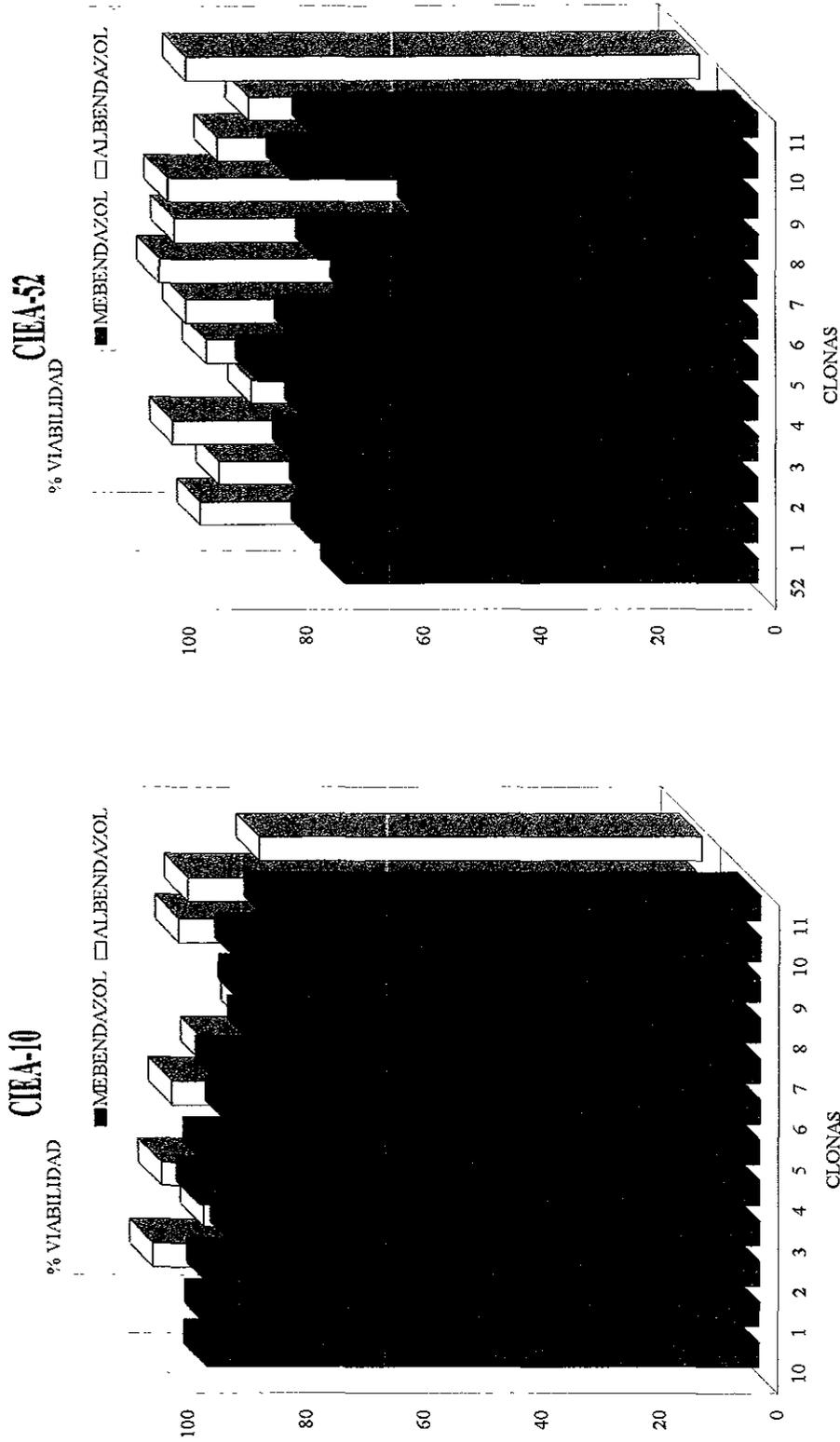


Fig. 11. Determinación de los porcentajes de viabilidad *in vitro* de los aislados de origen mexicano CIEA-10 y CIEA-52 con sus clones en una evaluación transversal de sensibilidad ante albendazol y mebendazol. Esta evaluación fue realizada empleando la DL₅₀ de los fármacos albendazol y mebendazol en los aislados mexicanos CIEA-10, CIEA-52 y sus clones (ver figura 9).



Cuadro 11. Cepas, aislados y clones que fueron seleccionados a partir de los resultados del análisis transversal realizado.

Cepa, aislado o clona	Característica de sensibilidad	
	<i>albendazol</i>	<i>mebendazol</i>
WB	intermedia	intermedia
wb-1	sensible	sensible
wb-8	tolerante	tolerante
wb-12	muy sensible	tolerante
P1	tolerante	tolerante
p1-6	intermedia	tolerante
p1-10	sensible	sensible
IMSS-2	tolerante	tolerante
imss2-2	tolerante	tolerante
imss2-7	intermedia	sensible
IMSS-3	tolerante	tolerante
imss3-3	muy sensible	tolerante
imss3-7	tolerante	tolerante
CIEA-52	intermedia	tolerante
ciea52-5	intermedia	tolerante
ciea52-9	sensible	intermedia
CIEA-10	tolerante	intermedia
ciea10-1	tolerante	tolerante
ciea10-8	sensible	intermedia

Se empleó en este caso como parámetro de selección al comportamiento del conjunto de clones que corresponde a la cepa o aislado del cual se originaron y al comportamiento de éste inclusive. En todos los casos también se seleccionó el cultivo de origen.

b) Evaluación longitudinal de la sensibilidad ante albendazol y mebendazol

Una vez seleccionadas las clones con sensibilidad diferencial en un análisis transversal, se procedió a evaluar la posible variabilidad en la sensibilidad de cada una de ellas a través del tiempo, para observar si la sensibilidad mostrada es o no constante. Este seguimiento fue hecho en cultivos continuos mantenidos durante un período de cinco y media semanas (39 días), aunque en las gráficas correspondientes (Figs. 12 a 14) se presentan también los datos que corresponden a la evaluación transversal como el primer punto. El aislado CIEA-10 no fue incluido en esta serie de evaluaciones

En estos ensayos se observó una amplia variabilidad tanto en el comportamiento de las clones como en el de las cepas y aislados. El comportamiento general de todos éstos ante mebendazol mostró una variabilidad menor de la que se desarrolló ante albendazol y no pareció



existir una relación entre el estado de sensibilidad o tolerancia a los dos diferentes fármacos a pesar de que las células provenían del mismo cultivo para los dos tratamientos y de que fueron trabajados a la par en las mismas condiciones. En el caso de las clonas tratadas con albendazol, la sensibilidad mostró rangos de variación mayores y entre ellos sobresalieron los puntos correspondientes al día 7, en el cual todos los cultivos mostraron un pico inverso de tolerancia. Esto podría ser un efecto de algún factor externo pero hasta el momento no es posible asegurarlo, puesto que las mismas condiciones de trabajo se siguieron para el mebendazol y no se observó el mismo comportamiento. La única diferencia que existió entre ellos fue el fármaco probado y esa alícuota fue la misma que se utilizó días antes y después del mencionado, por lo cual a pesar de baja probabilidad existente, se sugiere que este comportamiento homogéneo fue efecto del azar.

En general el comportamiento de los cultivos fue heterogéneo, aunque la mayor variabilidad fue observada en la cepa WB y sus clonas (del mismo modo que fue observado en la evaluación transversal). Dentro de este grupo, la cepa WB fue la que mostró una variación más paulatina, particularmente entre los días 7 a 36 donde desarrolló un comportamiento general que da indicio de un incremento en la tolerancia. Dicho comportamiento quizá sea indicador de una tendencia cíclica en los datos, pues también se encontró un pico de tolerancia entre los días 1 a 4 (fig. 12). Por su parte, el resto de las clonas de ese grupo, así como la cepa WB, se desarrollaron con comportamientos aparentemente cíclicos donde se observaron picos de tolerancia entre los días 1 a 4, 15 y 25 (aproximadamente cada 10 días). Este comportamiento no mostró relación con lo observado en el caso de mebendazol, donde el rango de variación se desarrolló entre 80 y 100% de viabilidad al igual que ocurrió con el resto de las cepas, aislados y clonas (figs. 12 a 14).

Para la cepa P1 y sus clonas también se observó un comportamiento que podría considerarse cíclico, pero en el caso de este grupo resaltó la clona P1-6 en cuanto a su comportamiento con mebendazol, ya que ante este fármaco se observó una curva entre los días 1 a 32 encontrándose un valor máximo cercano al centro de la curva en el día 16; posterior al día 32 pareció iniciar el desarrollo de una segunda curva que podría o no tener una tendencia semejante (fig. 12).

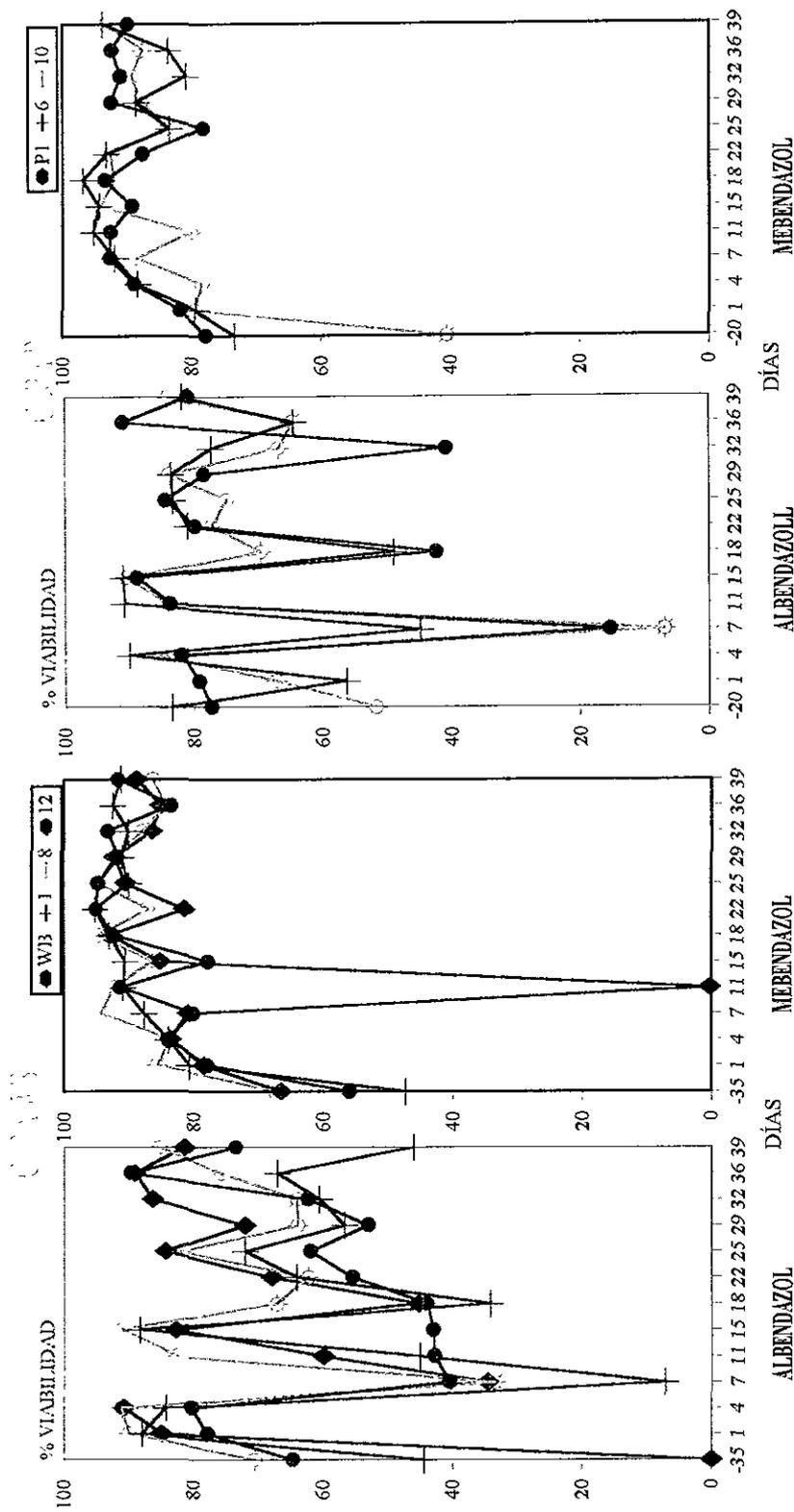


Fig. 12. Determinación de porcentaje de viabilidad de las cepas WB, P1 y sus clones en una evaluación longitudinal de sensibilidad *in vitro* ante albendazol y mebendazol. En los ensayos se emplearon 2.2E5 trofozoítos/ml de las cepas de referencia WB y P1 así como sus clones, éstos fueron tratados con la DL₅₀ de albendazol o mebendazol. Los cultivos empleados corresponden a aquellos seleccionados del análisis transversal. Para estas evaluaciones se emplearon cultivos continuos los cuales se mantuvieron durante las 5 semanas y media que duró la evaluación. El método de evaluación empleado fue la observación de la alteración morfológica que fue realizado después de 24 hrs de tratamiento con el fármaco indicado. En todos los casos el tratamiento con ambos fármacos fue realizado a partir del mismo cultivo y en el mismo momento.

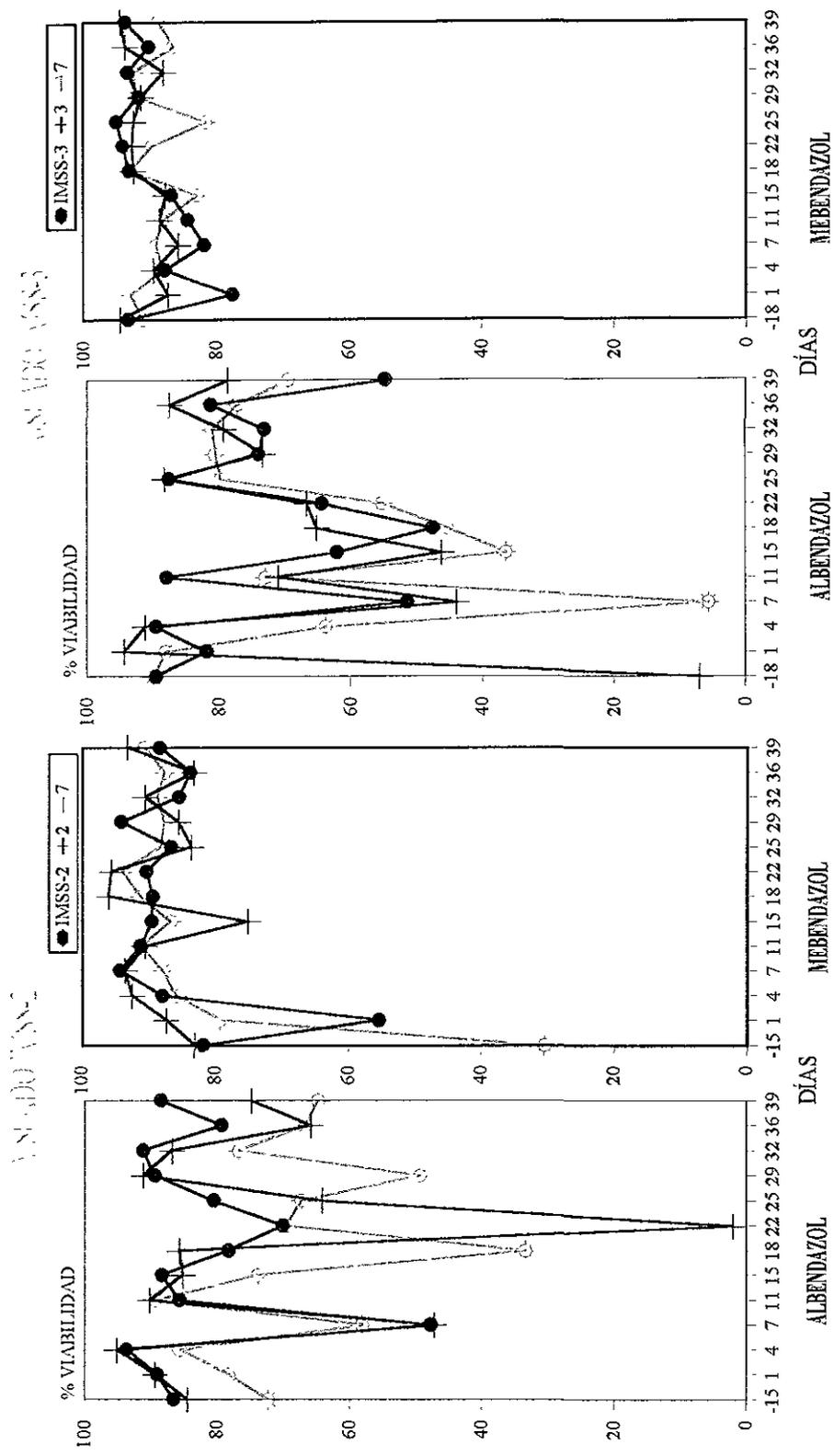


Fig. 13. Determinación de porcentaje de viabilidad de los aislados de origen mexicano IMSS-2 e IMSS-3 y sus clones en una evaluación longitudinal de sensibilidad *in vitro* ante albendazol y mebendazol. En estos ensayos se emplearon 2.2E5 trofozoítos/ml de los aislados IMSS-2 e IMSS-3 así como sus clones, éstos fueron tratados con la DL₅₀ de albendazol o mebendazol (ver figura 12).

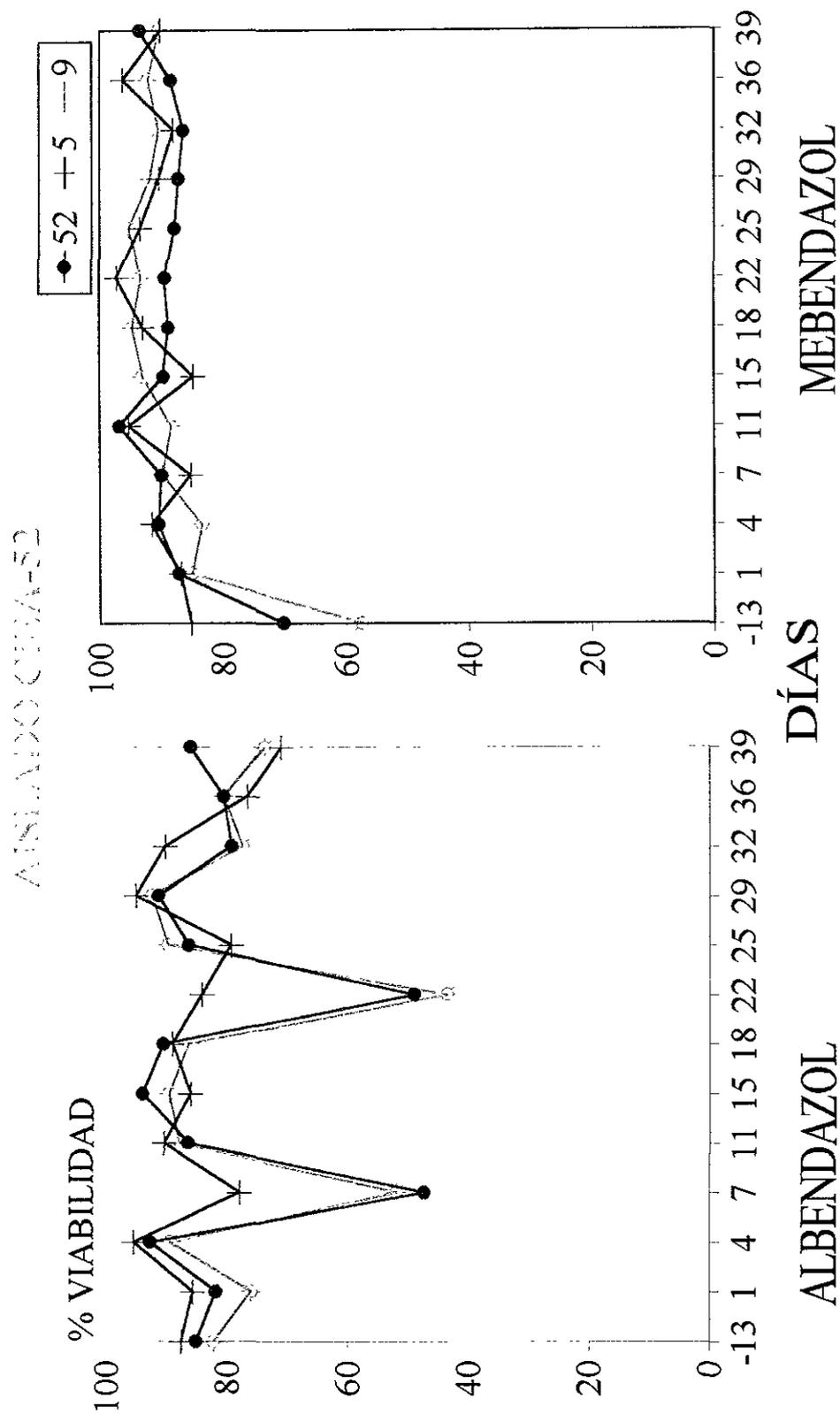


Fig. 14. Determinación de porcentajes de viabilidad del aislado de origen mexicano CIEA-52 y sus clones en una evaluación longitudinal de sensibilidad *in vitro* ante albendazol y mebendazol. En este ensayo se emplearon 2.2E5 trofozoítos/ml del aislado CIEA-52 así como sus clones, éstos fueron tratados con la DL₅₀ de albendazol o mebendazol (ver figura 12).



En lo que respecta a los aislados IMSS-2 e IMSS-3 el comportamiento fue parecido, puesto que las clonas imss2-2 e imss2-7 desarrollaron tres picos inversos de tolerancia a intervalos de 14 y 11 días respectivamente para el caso de tratamientos con albendazol, mientras que con mebendazol esto no ocurrió. La clona imss3-7 también aparentó un comportamiento cíclico el cual fue evidenciado por picos inversos cada 11 días aproximadamente (fig. 13). En lo que se refiere al aislado CIEA-52 y sus clonas frente al tratamiento con albendazol, no sólo pareció presentarse una ciclicidad, sino que también existió una coincidencia entre el aislado CIEA-52 y la clona ciea52-9, lo cual no ocurrió para el mebendazol (fig. 14).

OBTENCIÓN DE CULTIVOS DE *G. duodenalis* TOLERANTES Y RESISTENTES A ALBENDAZOL Y MEBENDAZOL

Con el fin de obtener cepas, aislados o clonas con una sensibilidad diferente ante fármacos representativos del grupo de los bencimidazoles se realizaron tres estrategias. La primera contempló un rastreo entre un conjunto de cepas y aislados de diferentes características así como entre sus clonas de modo que se seleccionara entre ellas aquellas tolerantes o sensibles de modo natural (selección espontánea). Esta estrategia aportó pocos resultados en este aspecto pues todas las cepas, aislados y sus clonas mostraron un comportamiento heterogéneo al través del tiempo, además presentaron una tendencia semejante con variaciones recurrentes de sensibilidad que, en todos los casos, se mantuvo dentro de un intervalo de viabilidad a la concentración empleada (figs. 12, 13 y 14).

La segunda estrategia contempló la inducción a resistencia por métodos de mutagénesis, empleando para ello elementos tales como colchicina y luz ultravioleta. Estos procedimientos tampoco permitieron la obtención de trofozoítos con sensibilidad diferencial a la cepa WB puesto que al ser expuestos a diferentes concentraciones de albendazol, las comparaciones no mostraron diferencias significativas al considerar los datos de viabilidad obtenidos por una prueba de *t* para datos no homoscedásticos (cuadro 9 y fig. 15). Los trofozoítos tratados con luz UV correspondieron a aquellos que fueron expuestos por 6 hrs a una distancia de ≈ 20 cm en viales de cultivo de borosilicato de 4.5 ml a 37°C, en tanto que la cepa WB expuesta a colchicina fue



mutagenizada bajo las condiciones que se describen en material y métodos. Durante los procesos de mutagénesis empleados se observó un efecto moderado del procedimiento sobre la adherencia, replicación, así como leves cambios en la morfología de los trofozoítos. Sin embargo, a nivel genético aparentemente los procedimientos empleados no tuvieron las repercusiones deseadas, puesto que no se observaron diferencias respecto a la cepa parental en relación a su sensibilidad a fármacos

Por su parte, los trofozoítos previamente mutagenizados por el procedimiento descrito por Hernández (1992) y seleccionados por su deficiencia en adhesión a células MDCK, mostraron diferencias en sensibilidad mínimas con respecto a las observadas para la cepa WB, y sólo para el caso de la clona WB-C7 la diferencia fue estadísticamente significativa ($P < 0.05$) lo cual era esperado ya que pasaron también por un proceso de selección en colchicina (cuadro 9). Como se sabe, este fármaco también tiene como sitio de acción a los microtúbulos, al igual que los bencimidazoles. Una característica particular de estas clonas, además de su deficiencia en adhesión, es la alteración morfológica que presenta, así como también su menor tasa de replicación. Es por ello que aún a una concentración de $0.65 \mu\text{M}$ la deformación observada fue alta (fig. 15).

La tercera estrategia correspondió al crecimiento permanente *in vitro* de los trofozoítos de *G. duodenalis* en concentraciones máximas permisivas de droga con incrementos de concentración a intervalos que la sensibilidad de la cepa permitió. Esta última estrategia fue la que mejores rendimientos mostró, puesto que fue la única que permitió de manera consistente la obtención de cepas con diferencias en sensibilidad estadísticamente significativas (cuadro 9 y fig. 15). La concentración máxima de fármaco bajo la cual los trofozoítos crecieron a aproximadamente un año del inicio de su inducción fue de $0.18 \mu\text{M}$ de albendazol (cepa WB) y $0.2 \mu\text{M}$ de albendazol (cepa P1) y $0.2 \mu\text{M}$ de mebendazol (cepas WB y P1) como se muestra en el cuadro 9.

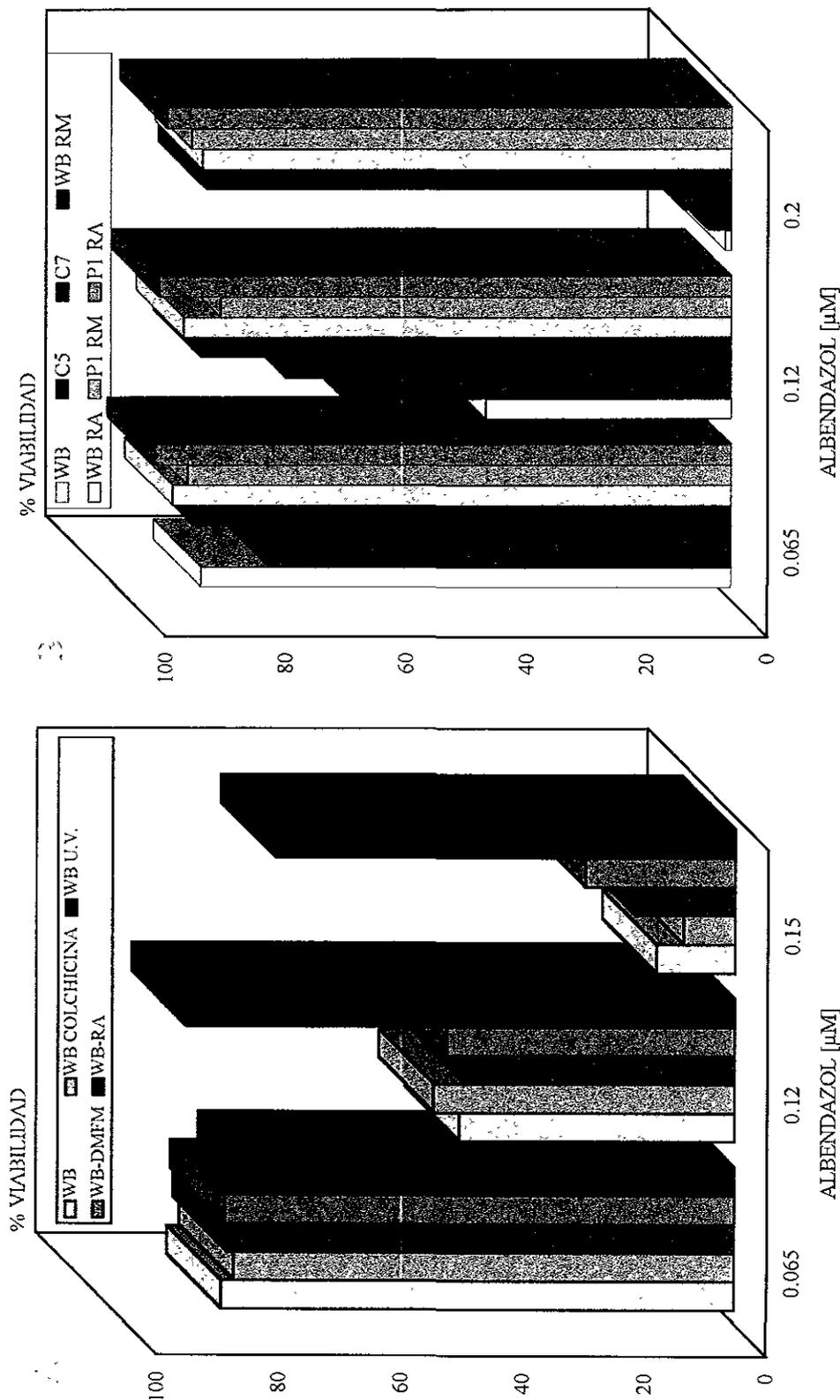


Fig. 15. Determinación de los porcentajes de viabilidad de las cepas WB, P1 y cultivos de éstas inducidos a resistencia en una evaluación *in vitro* con albendazol. La evaluación de la viabilidad se realizó en cepas con resistencia inducida por (Panel A): mutagénesis con colchicina, luz UV, cultivo permanente a concentración subletal creciente de albendazol y los controles que corresponden a la cepa WB cultivada en presencia y ausencia permanente de DMFM. (Panel B) cultivos deficientes en adhesión (C5 y C7), cultivo permanente a concentración subletal creciente de albendazol y mebendazol en las cepas WB y P1, y el control correspondiente a la cepa WB. Las evaluaciones de viabilidad se hicieron empleando albendazol a la concentración que se indica usando un inóculo celular de 2.2 E5 trofozoitos/ml. Las gráficas representan resultados obtenidos en un ensayo único.



Cuadro 12. Resultados estadísticos de la evaluación de sensibilidad a albendazol de cultivos resistentes obtenidos por diferentes estrategias.

Cultivos	Valor de <i>t</i> calculado
WB - PIRA (0.2μM)	0.1767
WB - WBRA (0.18μM)	0.2006
WB - PIRM (0.2μM)	0.2152
WB - WBRM (0.2μM)	0.2156
WB-WBC7	0.7811
WB - WDMFM	0.8767
WB-WBC5	0.8875
WB - WB COLCHICINA	0.9819
WB - WB UV	0.9860
<i>t</i> (0.05,2)	0.8160

Se muestran los valores de *t* obtenidos para cada comparación empleada, así como el valor de tablas, las cifras en negritas corresponden a los valores de *t* que indican diferencias estadísticamente significativas, lo cual permite concluir que éstas cepas tienen una mayor tolerancia que la cepa WB. Las dosis mostradas entre paréntesis corresponden a la concentración de fármaco a la cual se encuentra en cultivo permanente la cepa.

Como se indicó en material y métodos, durante el procedimiento de obtención de trofozoítos sensibles por el método de cultivo permanente en concentración subletal creciente se mantuvo a la par un cultivo control con trofozoítos en presencia del solvente (DMFM). La sensibilidad de esta cepa también fue evaluada y se observó que, si bien no existieron diferencias estadísticamente significativas en sensibilidad con respecto a la WB, los valores de *t* indicaron que el tratamiento por el cual pasaron fue más eficiente que los procedimientos de mutagénesis por luz UV o colchicina. Esto podría ser un indicio de que este solvente también es un estabilizante de microtúbulos. Por su parte, la cepa WB sin ningún tratamiento previo mostró un comportamiento dosis-respuesta típico y fue la que menor viabilidad mostró para la mayoría de las concentraciones probadas, con excepción de la cepa WB expuesta a colchicina y con 0.15 μ M de albendazol, en la cual la mayor letalidad pudo deberse a la variación propia de la misma (fig. 15).

Como se mencionó anteriormente, en cultivos resistentes también se observaron trofozoítos en división con diferencias en sensibilidad entre las dos células originadas de la mitosis. Es por ello que, para hacer más eficiente el proceso de selección, se recurrió a elaborar gradientes de sacarosa para subdividir la población original, esto con el fin de recuperar una población enriquecida de trofozoítos resistentes.



Después de probar con diferentes concentraciones de sacarosa realizando los ensayos a partir de la concentración usualmente empleada para la purificación de quistes (Bingham *et al.*, 1979) como la concentración más alta (0.85 M), se realizaron diluciones de la misma en agua o PBS. Se encontró que la presencia de sales del PBS, aunque deben alterar la densidad de la matriz de sacarosa, los resultados que se obtuvieron en la separación de subpoblaciones con diferente grado de deformación no se alteraron de manera importante al usar uno u otro solvente. En cambio, la velocidad de centrifugación y el tiempo de duración de ésta sí fueron altamente relevantes. Sin embargo, bajo las condiciones empleadas no fue posible determinar un límite en el gradiente que permitiera separar de manera inequívoca trofozoítos íntegros de trofozoítos deformados, puesto que en ciertas regiones ambas subpoblaciones coexistieron. Esto último resultó más relevante en presencia de trofozoítos en división, puesto que la densidad de estos resultó ser igual o menor que la de muchos trofozoítos deformados.

En las fracciones colectadas, los trofozoítos que mantuvieron su morfología íntegra y no se encontraban en división migraron en el gradiente hacia el fondo del tubo por su mayor densidad, en tanto que los trofozoítos deformados por el incremento de volumen que muestran disminuyeron su densidad migrando en las partes intermedias y altas del gradiente, en tanto que los trofozoítos en división se ven enriquecieron en las fracciones que correspondieron a aproximadamente las dos terceras partes superiores de la matriz de sacarosa.

Este procedimiento mostró ser útil en el enriquecimiento de poblaciones resistentes, sin embargo depende del estado de adaptación del cultivo a la concentración de fármaco a la cual se encuentre y las condiciones de esterilidad pueden perderse debido a la dificultad de mantener estéril la cámara formadora de gradientes. Por ello, este protocolo no pudo ser empleado para la obtención de cultivos con una resistencia mayor que la obtenida sólo por el cultivo permanente ante el fármaco.

ANÁLISIS CINÉTICO DE INCORPORACIÓN DE PRECURSORES RADIOMARCADOS

Se realizaron cinéticas de incorporación de precursores de procesos celulares fundamentales tales como timidina (replicación), uracilo (transcripción) y cisteína (traducción)



marcados radioactivamente con el fin de observar en un nivel global los mecanismos adaptativos y de respuesta desarrollados ante el tratamiento con albendazol en trofozoítos sensibles y resistentes de la cepa WB. Se observó también cuál de los tres procesos es el primero en mostrarse afectado y en qué momento el precursor correspondiente sufre un cambio en su nivel de incorporación. Para ello se utilizaron trofozoítos de la cepa WB y de cultivos resistentes a albendazol (WB-RA) bajo dos condiciones experimentales que fueron: con o sin tratamiento con albendazol a su MIC (0 1667 μ M) hasta por 22 hrs (Figs. 16, 17, 18 y 19).

En los marcajes con timidina, en condiciones basales en ausencia de fármaco, se observó una alta incorporación de la marca radioactiva para la cepa WB y disminuida para la WB-RA, lo cual es un indicio de la menor capacidad replicativa que muestra la segunda como modificación en su condición de resistencia (fig. 16). La diferencia en incorporación fue evidente desde períodos muy tempranos (4 hrs) y al paso del tiempo ésta se fue acentuando ($P < 0.05$).

Al observar la incorporación de esta marca radioactiva en presencia y ausencia de albendazol, se observó que este fármaco provocó en la cepa WB una disminución considerable de la incorporación habitual la cual comenzó a diferir a las 9 hrs, aunque es estadísticamente diferente hasta las 12 hrs (fig. 16). Para la cepa WB-RA ocurrió lo mismo pero a mucho menor proporción y a mayor tiempo (24 hrs).

Los resultados anteriores sugieren que el mecanismo adaptativo por el cual pasó la WB-RA involucró un decremento importante de su síntesis de DNA, reflejada en este caso por una reducción en la incorporación de timidina y hace sugerir que probablemente mientras mayor capacidad replicativa presenten los trofozoítos mayor será su susceptibilidad al fármaco. Esto se evidencia aún más al observar que las mayores diferencias en incorporación de esta marca se observaron entre la cepa WB sin albendazol y la WB-RA con dicho fármaco (fig. 16). Estadísticamente, al emplear una prueba ANOVA de dos vías se observó que para este experimento hubo diferencias significativas tanto entre las cepas como a lo largo del tiempo ($P < 0.01$). La prueba *t* de Bonferroni mostró que la mayor diferencia entre cepas se observó entre WB y WB-RA cuando esta última ha sido tratada o no con fármaco. En relación al tiempo, se

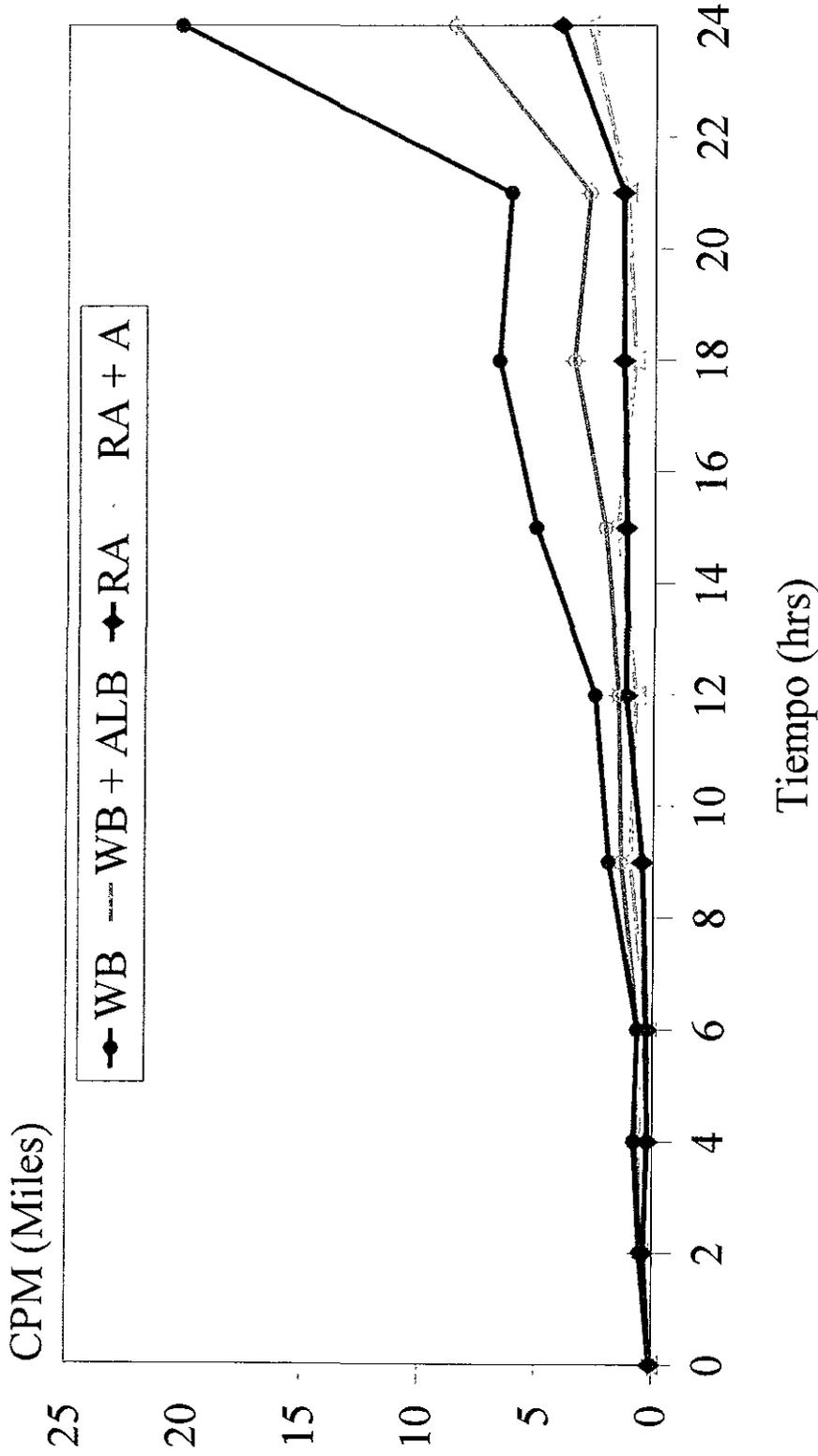


Fig. 16. Cinética de marcaje con timidina tritiada de las cepas WB sensible y resistente a albendazol. Esta evaluación fue realizada empleando timidina marcada radioactivamente (3.33 μ Ci/ml) y en presencia o ausencia de la MIC de albendazol calculada para la cepa WB. Los trofozoítos de las cepas indicadas fueron incubados a una concentración celular de 2.2 E5 trofozoítos/ml en viales de 4.5 ml en presencia de la marca radioactiva, después de cultivarse por 2 hrs en estas condiciones se procedió a adicionar el fármaco (0.1667 μ M), los trofozoítos fueron cosechados a los tiempos indicados en el eje de las ordenadas. Cada punto corresponde al promedio de evaluaciones realizadas por triplicado

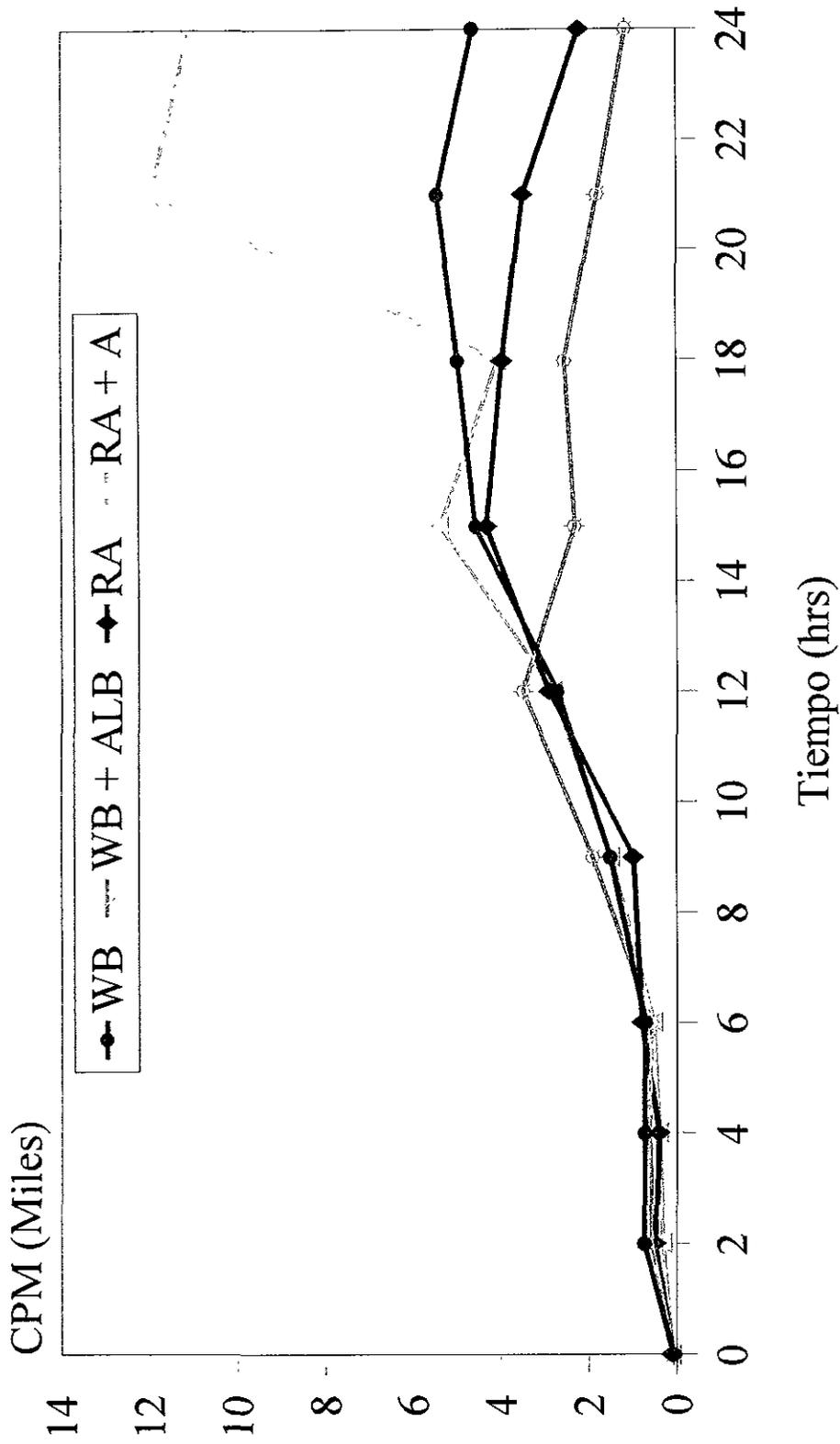


Fig. 17. Cinética de marcaje empleando uridina tritiada en las cepas WB sensible y resistente a albendazol. Esta evaluación fue realizada empleando uridina marcada radioactivamente ($3.33 \mu\text{Ci/ml}$) y en presencia o ausencia de la MIC de albendazol calculada para la cepa WB (ver fig 16).

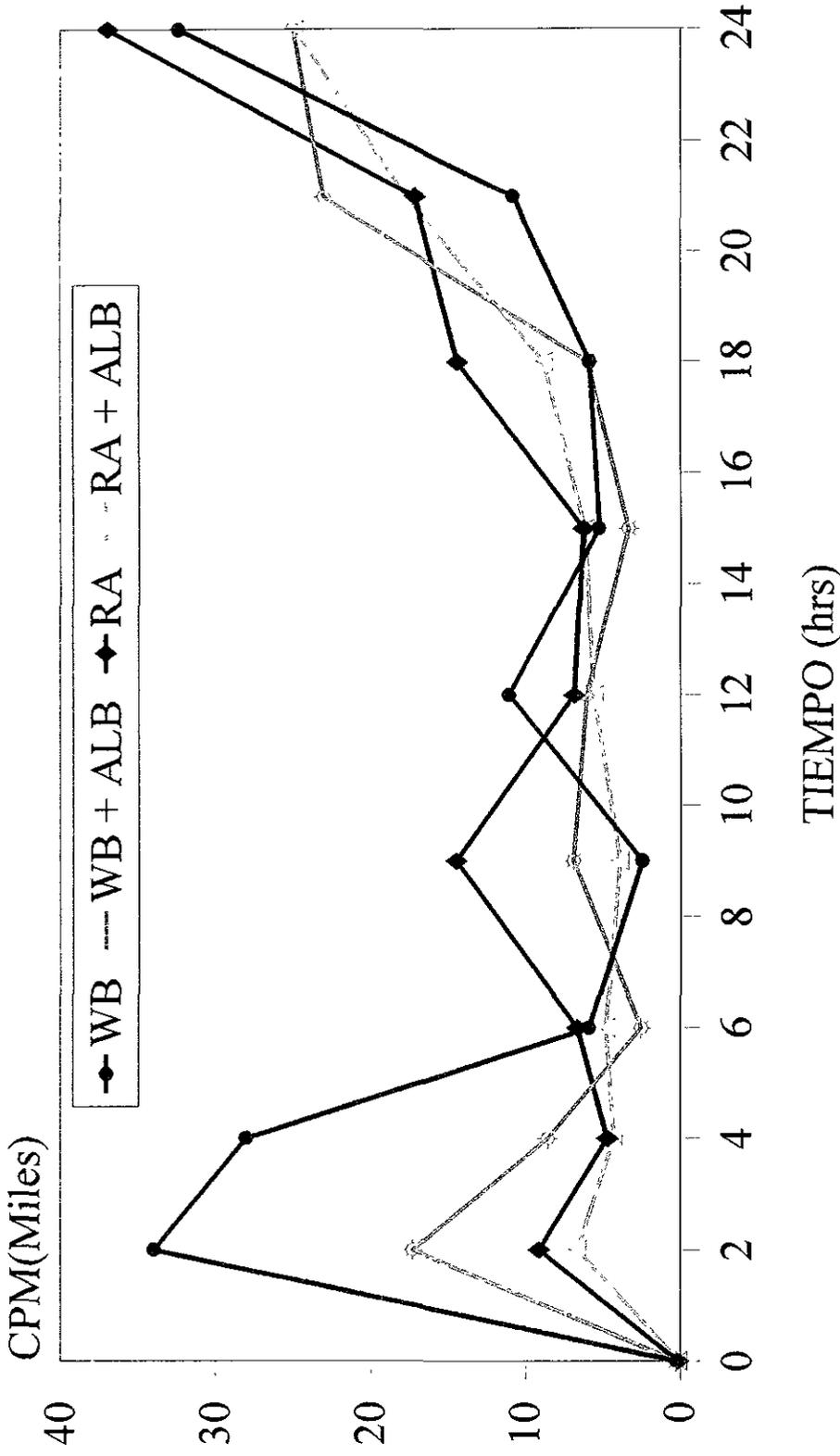


Fig. 18. Cinética de marcaje empleando cisteína marcada con azufre-35 en las cepas WB sensible y resistente a albendazol. Esta evaluación fue realizada empleando cisteína marcada radioactivamente ($0.55 \mu\text{Ci/ml}$) y en presencia o ausencia de la MIC de albendazol calculada para la cepa WB (ver figura 16). El medio de cultivo se modificó por la adición de 0.6g de cisteína no marcada por litro de medio TYI-S-33.

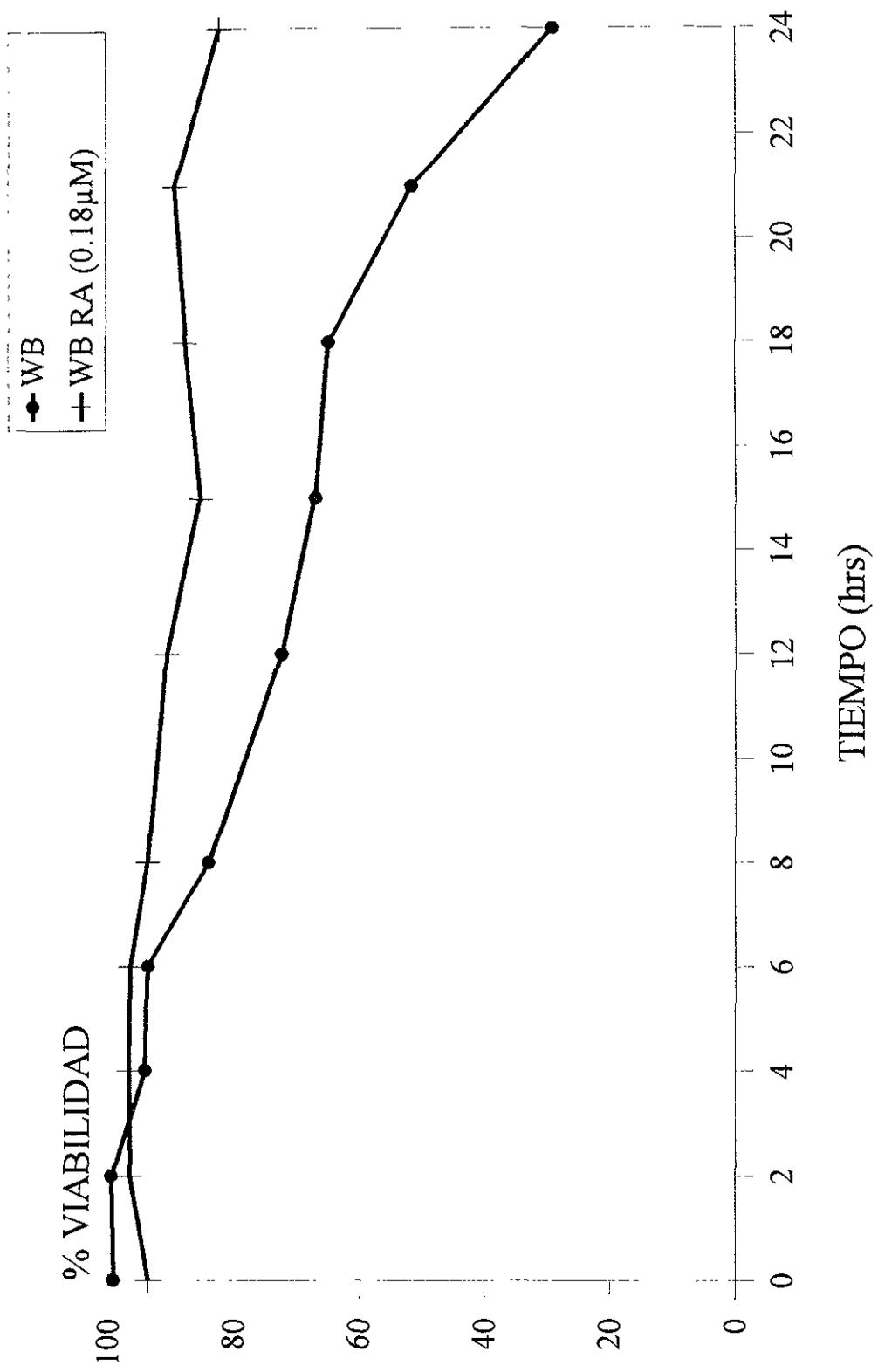


Fig. 19. Cinética de deformación celular de trofozoítos de las cepas WB y resistente a albendazol expuestas a esta droga. Esta evaluación fue realizada paralelamente con la cinética de incorporación de uridina tritiada empleando la MIC de albendazol calculada para la cepa WB (ver figura 16).



encontró que las diferencias más notorias y estadísticamente significativas fueron a 24 hrs con respecto a cualquier otro tiempo evaluado ($P < 0.01$)

En lo que respecta a la incorporación de uridina, nuevamente se observó que en condiciones basales la cepa WB tuvo una mayor incorporación que la WB-RA (fig. 17) la cual no fue tan significativa como en el caso anterior y mostró diferencias a tiempos mayores (a partir de 18 hrs y es estadísticamente significativa a 21 hrs), en tanto que al comparar la cepa WB con y sin albendazol se hizo evidente que la presencia del fármaco provocó un decremento en la incorporación de este precursor, lo cual se observó a partir de las 15 hrs ($P < 0.01$). Por su parte, la cepa WB-RA en presencia de fármaco incrementó significativamente las cpm correspondientes a esta marca radioactiva, lo cual hace suponer una posible respuesta a nivel de RNA, sugerentemente de mensajeros específicos inducidos por esta condición de estrés a la cual la cepa se encuentra adaptada.

La mayor diferencia en incorporación de este precursor fue observada entre la cepa WB y la WB-RA ambas en presencia de albendazol, lo cual aparentemente indicó que el proceso adaptativo de respuesta al tratamiento seguido por esta cepa involucró para su sobrevivencia, la necesidad de incorporar uridina en grandes proporciones. Estadísticamente la diferencia principal fue debida al tiempo más que a los cultivos empleados ($P < 0.01$) y las horas a las cuales hubo diferencia fueron a 15, 21 y 24 hrs. Probablemente el tiempo de 18 hrs no fue estadísticamente significativo debido a alguna variable interna o externa que redujo de incorporación de marca radioactiva detectada.

Por su parte, la incorporación de cisteína no mostró diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los casos (fig. 18), aún y cuando las pruebas estadísticas indicaron diferencias significativas a través del tiempo para 2 y 24 hrs con respecto al resto ($P < 0.01$) lo cual sugiere que, de ser correcta la aseveración anterior en relación al incremento de la transcripción de mensajeros específicos, la traducción diferencial de estos provocaría una alteración fisiológica de manera que, aunque la traducción global de proteínas no se muestre afectada, posiblemente la traducción de proteínas específicas sí muestre alteraciones importantes.

En los resultados obtenidos, suponiendo un tiempo de generación promedio de 8 hrs para la cepa WB normal, habría de esperar una duplicación en la incorporación de esta marca radioactiva así como de timidina aproximadamente en ese momento. Esto resultó cierto para la síntesis de DNA pero no para la de proteínas, la cual por el contrario mostró una aparente reducción. Esto puede ser indicativo de un posible error experimental, ya que no es posible que



selectivamente los trofozoítos tomen de la poza cisteína no radiactiva ni tampoco existió una degradación de proteínas, puesto que los trofozoítos sin tratamiento con el fármaco no sólo se mantenían estables como el resto para ese tiempo en particular, sino que además estaban en un proceso replicativo importante. En estos experimentos, a pesar de haberse empleado la concentración MIC, la viabilidad mostrada por parte de la cepa WB fue mayor al 20% y esto es un efecto de la variabilidad propia de la cepa. Por su parte la cepa WB-RA mostró una viabilidad de entre el 80 y 100%, misma que fue debida a la presencia permanente de clonas abortivas en el cultivo (fig. 19). De cualquier forma, la sensibilidad de las 2 cepas fue distinta tanto cualitativa como cuantitativamente.

A partir de los resultados obtenidos pudo calcularse el tiempo necesario para que se presentara el efecto del fármaco sobre la viabilidad. Este se obtuvo como el sitio de intersección entre la cepa resistente y la sensible tratadas con albendazol en la gráfica 17, dicho tiempo es de 4.4 hrs. Así mismo, se calculó por el método de mínimos cuadrados el tiempo necesario para observar la muerte del 50% d trofozoítos, este fue de 20.2 hrs para la cepa sensible. Por extrapolación se calculó el tiempo necesario para observar el 0% de viabilidad, el cual correspondió a 37.27 hrs.

En conjunto, los datos anteriores sugieren que el mecanismo adaptativo basal de la cepa WB-RA involucra una reducción en la síntesis de material genético y su respuesta ante la exposición a estos fármacos resulta en un incremento en traducción. Esta última se sugiere pueda ser selectiva a partir de mensajeros específicos que se incrementan en respuesta al fármaco como una condición de estrés; también se sugiere a partir de los resultados obtenidos que la mayor capacidad replicativa de la cepa WB puede tener relación directa con su mayor sensibilidad a albendazol.



DISCUSIÓN

La terapia farmacológica es la estrategia de control más empleada en el caso de giardiasis así como otros tipos de parasitosis; en muchas ocasiones el abuso en la utilización de los tratamientos de amplio espectro y el mal seguimiento de los regímenes quimioterapicos pueden dar lugar a una incompleta erradicación del parásito en cuestión y facilitar de este modo la selección de organismos resistentes

En el caso del presente trabajo se empleó un modelo *in vitro* de cultivo de trofozoítos del parásito *G. duodenalis* el cual fue utilizado en la comparación de diversos métodos de evaluación de viabilidad, en la observación de la efectividad de fármacos del grupo de los bencimidazoles, así como en la evaluación de la sensibilidad desarrollada por aislados de origen mexicano del mismo parásito.

Durante los experimentos realizados, en el modelo de cultivo *in vitro* del parásito, en general los procedimientos de cultivo, congelación en nitrógeno líquido y clonación no mostraron problema alguno en su realización, aunque podría modificarse el protocolo de clonación a fin de hacerlo estadísticamente más confiable, por ejemplo incrementando el número de recipientes de clonación. Los recipientes de cultivo empleados en general *no mostraron diferencia* en cuanto a la capacidad replicativa o de adhesión por parte de los trofozoítos que en ellos se cultivaron, pero sí existió diferencia en relación al tiempo de enfriamiento requerido para desadherir a los trofozoítos ya que el plástico es mejor aislante de temperatura que el borosilicato.

Un punto importante a destacar es precisamente el enfriamiento de los cultivos pues, como se mencionó en material y métodos, en ocasiones se debieron realizar condiciones extremas de enfriamiento de algunas cepas, como son la WB y P1, para que los trofozoítos se desprendieran de las paredes del recipiente. En los casos en que esto ocurrió, en tanto fue posible, se procuró mantener al resto de los cultivos en las mismas condiciones para que las diferencias observadas en las evaluaciones realizadas fueran debidas al experimento y no al manejo de los cultivos, esto considerando que el enfriamiento de los cultivos hasta por 12 hrs no afecta la viabilidad de los cultivos.

Una explicación al fenómeno antes mencionado tiene relación con posibles modificaciones postraduccionales de proteínas, particularmente el caso de α -tubulina, la cual en diferentes



organismos como mamíferos, peces y algunos protozoarios (Bulinski *et al.*, 1988; Torres y Delgado, 1989; Webster y Borys, 1989; Takemura *et al.*, 1992; Rutberg *et al.*, 1995; Delgado *et al.*, 1996) incluyendo *Giardia* (Crossley *et al.*, 1986; Soltys y Gupta, 1994) se ha observado que al sufrir un proceso de acetilación adquiere mayor tolerancia al frío, esto es, los microtúbulos que habitualmente tienden a despolimerizar a bajas temperaturas, cuando esta proteína está acetilada, lo hacen pero en menor proporción.

Los reportes realizados en relación a evaluaciones *in vitro* de bencimidazoles con diferentes parásitos, incluyendo *Giardia*, coinciden generalmente en el empleo de DMSO como solvente para este grupo de fármacos por su baja toxicidad al cultivo y la adecuada solubilidad alcanzada. No obstante esto, se prefirió emplear DMFM puesto que también existen publicaciones que consideran que el DMSO es capaz de estabilizar los microtúbulos (Gill y Lacey, 1992), lo cual quizá podría influir en los resultados obtenidos al trabajar con desestabilizantes de éstos. Las concentraciones usualmente reportadas como límite del solvente del fármaco van de ≤ 0.5 a $\leq 0.05\%$. En esta tesis fue utilizada una concentración de DMFM $\leq 0.5\%$ aunque, como observamos en algunos ensayos realizados, aún a concentraciones superiores el solvente no es apreciablemente tóxico para el cultivo.

Por otra parte, destaca el hecho de que todos los bencimidazoles trabajados son altamente hidrofóbicos, de manera que no fue posible disolverlos en agua o alcohol. Esto puede ser importante al considerar que entre las pocas características que comparten los fármacos capaces de inducir resistencia mediada por Pgp están: la presencia de dos anillos heterocíclicos y la hidrofobicidad de los mismos, y estas características se encuentran presentes en los bencimidazoles utilizados (Lipkowitz y McCracken, 1993). De igual manera, la hidrofobicidad del fármaco repercute de modo importante en su transporte *in vivo*, dando lugar al desarrollo de toxicidad hacia aquellos parásitos para los cuales el fármaco requiere de procesos complejos de transporte para tener contacto con su sitio blanco. Así también el organismo que las consume puede presentar efectos en casos en que el fármaco sea más hidrosoluble.

Actualmente existe controversia en cuanto al método de evaluación de viabilidad más adecuado para emplearse *in vitro*, ya que aún dentro de cada método hay muchas variaciones en el seguimiento de éstos (Gillin y Diamond, 1980; Hill 1986; Inge *et al.*, 1987; Boreham *et al.*, 1988;



Wright *et al.* 1992), por lo cual los resultados reportados en la mayoría de las ocasiones no son comparables confiablemente.

Inicialmente se pretendió realizar un estudio comparativo de métodos de viabilidad con el fin de proponer aquel que fuera más sensible, sencillo, rápido y económico, y que pudiera ser realizado a nivel clínico y rutinario. Sin embargo, dados los resultados obtenidos, consideramos que deben tomarse en cuenta muchos factores para la elección de un método.

En la literatura se encuentran gran cantidad de métodos que pueden ser utilizados bajo diferentes condiciones. En el presente trabajo se propuso desarrollar una evaluación comparativa de varios métodos igualando las condiciones experimentales lo más posible considerando aquellas reportadas en trabajos previos con el fin de poder comparar eficientemente la sensibilidad de cada método ante un tratamiento con albendazol en el parásito *G. duodenalis*. Así, se pudo observar una variación cualitativa y cuantitativa de resultados al utilizar los procedimientos de subcultivo en medio líquido y la evaluación morfológica con respecto al resto de métodos empleados.

El método estándar utilizado, incluso para validar otras estrategias, resultó ser el subcultivo en medio líquido, pues los resultados que se obtienen de esta técnica son altamente confiables ya que todo trofozoíto viable debe ser capaz de reproducirse e incrementar la población (Gault *et al.*, 1985; Hill *et al.*, 1986; Wahl *et al.*, 1988; Edlind *et al.*, 1990; Majewska *et al.*, 1991; Cedillo y Muñoz, 1992; Katiyar *et al.*, 1994). No obstante, aún empleando este procedimiento cabe la duda del tiempo que es adecuado utilizar para verificar el crecimiento del cultivo, puesto que ante el tratamiento con fármacos existe la posibilidad de que los trofozoítos se encuentren dañados reversiblemente y que el tiempo de replicación sea diferente al mostrado por el cultivo antes del tratamiento. Así mismo, al emplear diferentes aislados o cepas con tiempos de replicación distintos, hallan sido o no tratados con drogas, este factor crearía problemas en la interpretación de los resultados. En el caso de las evaluaciones por el método de subcultivo se eligió un tiempo de 24 hrs, el cual es suficiente para que un trofozoíto normal pase aproximadamente por tres ciclos de replicación.

Como era de esperarse, el método de subcultivo en medio líquido no sólo fue reproducible, si no que además mostró una adecuada sensibilidad a diferencia del resto de los procedimientos inicialmente empleados. Esto puede deberse a que el mecanismo de acción del fármaco puede influir en la estimación del estado de una célula, de manera que un trofozoíto vivo y



metabólicamente activo puede resultar no viable, esto es, puede no ser capaz de regenerar un cultivo como ocurre en los resultados obtenidos. Es por ello que las dosis calculadas se indicaron como dosis letales (DL) y no como concentraciones inhibitorias (IC).

No obstante esto, el método de subcultivo en medio líquido requiere de 2 días para la observación de resultados; pero en el caso del presente trabajo, para la realización de los experimentos, fue indispensable contar con un método confiable, barato y sensible como el subcultivo en medio líquido y que a la vez permitiera una mayor rapidez en la obtención de resultados. Así, se realizó una evaluación morfológica la cual fue considerada tomando en cuenta tanto los reportes referentes a la alteración física sufrida por los trofozoítos tras el tratamiento con este grupo de fármacos (Gault *et al.*, 1985; Chavez *et al.*, 1992; Oxberry *et al.*, 1994), como a las observaciones realizadas durante este trabajo.

En relación a la evaluación morfológica de trofozoítos reportada es usual que, independientemente del método de viabilidad empleado en las publicaciones, antes de realizar cualquiera de ellos se hace una observación somera (o algo más detallada en el caso de realizarse conteos) del estado general del cultivo, para lo cual se considera la movilidad y capacidad de adhesión de los trofozoítos como criterio de evaluación (Crouch *et al.*, 1986; Crouch *et al.*, 1990; Edlind *et al.*, 1990; Meloni *et al.*, 1990; Cedillo y Muñoz, 1992; Chavez *et al.*, 1992; Morgan *et al.*, 1993b; Katiyar *et al.*, 1994; Oxberry *et al.*, 1994; Farbey *et al.*, 1995). Esto también fue hecho en este trabajo, sin embargo, el método de evaluación morfológica no se basó en tales aspectos sino en la alteración física de la estructura los trofozoítos. Si bien también se observó una alteración en la movilidad y en la capacidad de adhesión, éstos dos criterios son altamente variables entre los diferentes cultivos de manera que no fueron considerados apropiados a emplear. El ensayo de adhesión a substrato es de los más usados para evaluar viabilidad de trofozoítos en cultivo (Crouch *et al.*, 1986; Crouch *et al.*, 1990; Meloni *et al.*, 1990; Morgan *et al.*, 1993b; Farbey *et al.*, 1995, Pearce *et al.*, 1996, Baveja *et al.*, 1998), aunque en este trabajo no fue empleado pues se consideró que, como parte del metabolismo normal de los trofozoítos, existen períodos en los cuales éstos se encuentran adheridos a superficies y etapas en las cuales no lo están, de manera que la estimación de viabilidad por este criterio tendría un valor basal muy variable dependiendo de la cepa o aislado del que se trate.

Las evaluaciones morfológicas realizadas resultaron cumplir con todas las expectativas que teníamos para considerarlo como un método eficiente y adecuado debido a que el tratamiento con bencimidazoles conlleva a una alteración de la morfología típica muy evidente. Así mismo se evita el error presente en el método de subcultivo en medio líquido referente a la subestimación de un efecto sólo de retardamiento del ciclo celular como se mencionó anteriormente, pues el tiempo empleado permitió en teoría una triplicación de la población inoculada inicialmente cuando el efecto del fármaco no era evidente. Sin embargo, a concentraciones intermedias y altas de droga, la capacidad replicativa de trofozoítos viables se puede reducir sólo parcialmente. Esto es observado en las gráficas de la fig. 6 (a y b) donde, a pesar de haber inoculado una cantidad de trofozoítos normales en los controles igual a la cantidad de trofozoítos viables obtenidos en respuesta al tratamiento, el comportamiento de las curvas es diferente, pues muestra una mayor replicación por parte de los trofozoítos que no habían sido inoculados con albendazol a la que presentan los que sí habían sido tratados con dicho fármaco.

No obstante lo adecuado y reproducible que resultó ser el método de evaluación morfológica, cabe pensar en la posibilidad de automatizarlo para hacerlo menos susceptible al error humano, en cuyo caso existen dos alternativas. Una de ellas involucra el empleo de un sistema de conteo y separación de células por FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter), lo cual resulta costoso puesto que el equipo que se requiere es sofisticado; en tanto que la segunda alternativa puede ser el empleo de centrifugación en gradientes continuos o discontinuos para la separación de subpoblaciones celulares, de manera que en cualquiera de los dos casos se cuantifiquen los trofozoítos de acuerdo a su densidad, puesto que el daño inducido por bencimidazoles tiene como efecto un incremento en el volumen celular y consecuentemente un decremento en la densidad. Bajo las condiciones empleadas el método depende en absoluto de la percepción y experiencia de quien lo realiza y, si bien no es subjetivo, sí es susceptible a mejoras que no son indispensables si se tiene el entrenamiento adecuado. Sin embargo debe tomarse en cuenta también la rapidez en la obtención de resultados que se tiene en este método, misma que se reduciría en caso de llevarse a cabo estrategias alternativas como las mencionadas.

En relación a los métodos evaluados que fueron descartados, sólo uno de ellos mostró una reproducibilidad sumamente baja y fue el de subcultivo en medio semisólido de agarosa. La eficiencia en formación de colonias obtenida fue incluso inferior a la reportada por Gillin y

colaboradores, quienes lo publicaron y validaron por primera vez en *Giardia* (Gillin y Diamond, 1980 y 1981) indicando una efectividad de 20 a 40%. En el caso de los resultados obtenidos, ésta fue inferior al 20% y encontramos muchas dificultades para llevarlo a cabo pues, en gran parte, los trofozoítos viables que no formaron colonia en la agarosa en cambio sí formaron una monocapa en las paredes del tubo del cultivo. La diferencia principal existente entre el procedimiento empleado y el llevado a cabo por Gillin fue el medio de cultivo empleado (TP-S-1), lo cual hace pensar en la posibilidad de que en un medio rico en nutrimentos como lo es el TYI-S-33 usado en el presente trabajo, los trofozoítos tengan mayor facilidad para recuperarse del proceso de enfriamiento de manera que logran migrar y adherirse rápidamente a las paredes del tubo antes que la agarosa alcance a solidificar.

En general, los reportes en que se emplea dicho método no suelen mencionar la eficiencia en formación de colonias que obtienen y en su caso ésta suele ser muy baja como en los resultados obtenidos en el presente trabajo e igualmente poco reproducible (Shaio *et al.*, 1987). Por otra parte, resalta el hecho de que en los reportes previos se menciona una proporcionalidad entre los trofozoítos inoculados y el número de colonias obtenidas (Gillin y Diamond 1981; Gordts *et al.*, 1985); pero esta relación no es altamente equitativa, esto es, aunque a mayor número de trofozoítos inoculados se obtenga un mayor número de colonias, siempre hay trofozoítos que no forman colonia. Lo anterior puede deberse a que existen diferencias intrínsecas entre los trofozoítos que determinan la posibilidad de formar o no colonias, independientemente de que se encuentren viables.

Así mismo, existe la posibilidad de que los trofozoítos reduzcan o pierdan su capacidad replicativa habitual por el procedimiento propio del método; sin embargo, esto se descarta puesto que existieron una gran cantidad de trofozoítos adheridos a las paredes que incluso alcanzaron la confluencia sobre esta superficie. Otra posible explicación es referente a la adhesión de trofozoítos a un sustrato (normalmente células intestinales, o cultivos *in vitro* de líneas celulares o las paredes del recipiente), donde se desconoce que tan dispensable es para el trofozoíto este proceso, pero aparentemente es muy importante. Una matriz de agarosa no es un sustrato tan sólido como los mencionados y puede ser que sólo algunos trofozoítos estén en posibilidades de “adherirse” a él, favoreciendo la posibilidad de replicarse y formar una colonia. Una vez que tienen lugar las

primeras replicaciones es probable que las siguientes se vean facilitadas ya que, por la cercanía a la cual se encuentran los trofozoítos entre ellos pueden servirse mutuamente como “substrato”.

En relación a los métodos bioquímicos para evaluar la viabilidad del parásito, aquel de incorporación de colorantes fluorogénicos no ha sido reportado a la fecha para trofozoítos de *Giardia*, pero sí para quistes (Schupp y Erlandsen, 1987) donde se encuentra, al igual que en este trabajo, la situación de ausencia de tinción por los dos fluorocromos y coinciden en la posibilidad de que por alguna circunstancia los parásitos requieran de un tiempo de incubación más prolongado para la observación de fluorescencia por FDA. Pese a ello, las dobles tinciones no son mencionadas en dicho trabajo, lo cual puede deberse a que en las preparaciones observamos una muerte muy reciente de los trofozoítos, la cual da lugar a la pérdida de la integridad de membrana y favorece la entrada del PI sin que haya pérdida del FDA en tanto que, para el caso de quistes, la pérdida de la integridad de la pared requiere de un tiempo mayor, de manera que es más difícil localizar un quiste con doble tinción que un trofozoíto. No obstante esto, aún para los trofozoítos empleados, las dos circunstancias fueron poco frecuentes y de no haberse considerado ninguno de los dos efectos, los resultados no se habrían visto alterados de manera significativa.

En lo que se refiere al método de incorporación de timidina tritiada y de colorantes fluorogénicos se observaron resultados semejantes pues en ambos hay reproducibilidad pero con menor sensibilidad. Esto último puede explicarse por el mecanismo de acción de los bencimidazoles y la relación que este puede tener con la efectividad del método. En virtud de que el mecanismo de acción de los bencimidazoles se lleva a cabo sobre proteínas de tipo tubulina, los efectos se reflejan sobre procesos que dependen de estas proteínas como son la mitosis, la adhesión, el ciclo celular y la alteración de la morfología debida a la pérdida de integridad del citoesqueleto. Tales efectos repercuten muy tardíamente en procesos metabólicos relacionados con la bioquímica intracelular como es el caso de la presencia y actividad de enzimas, transportadores de nucleótidos, etc. El método de incorporación de timidina ha sido muy utilizado en la evaluación *in vitro* de fármacos como metronidazol, tinidazol, quinacrina, mepacrina, furazolidona, eritromicina y azitromicina los cuales sí tienen un efecto inicial sobre vías metabólicas, de manera que esto concuerda con la eficiencia en los resultados obtenidos (Boreham *et al.*, 1984; McIntyre *et al.*, 1986; Boreham *et al.*, 1987; Inge *et al.*, 1987; Hoyne *et al.*, 1989; Boreham y Upcroft, 1991; Pearce *et al.*, 1996).



Trabajos realizados por Romero-Montoya (1996) muestran que, al emplear metronidazol, los métodos bioquímicos como la incorporación de timidina tritiada y la tinción con colorantes fluorogénicos resultan ser tan sensibles como el subcultivo en medio líquido y más eficientes que éste por la rapidez con que se obtienen resultados. Dicho trabajo, en conjunto con el presente, permiten afirmar que el mecanismo de acción del fármaco en cuestión resulta determinante en la elección del método de evaluación, pues de no tomarse este en cuenta puede caerse en una subestimación o sobreestimación de la efectividad de un tratamiento *in vitro*. Estos resultados han sido recientemente corroborados por el trabajo de Pearce *et al.* (1996) donde al trabajar tanto con albendazol como con metronidazol y empleando el método de cuantificación de la inhibición de la adherencia e incorporación de timidina tritiada observan que cada fármaco es evaluado de mejor manera por un método diferente, en su caso los efectos sobre la viabilidad del albendazol son eficientemente evaluado por la reducción en la adherencia a sustrato mientras que para metronidazol resulta más adecuado el uso de la timidina tritiada (Pearce *et al.*, 1996). Es importante destacar que en su desarrollo experimental ellos hacen uso de un diferente inóculo de trofozoítos de acuerdo con la capacidad replicativa del cultivo en cuestión, lo cual únicamente es posible hacerlo si se conoce la velocidad de crecimiento del cultivo previamente; esto resultaría muy difícil de aplicar en la práctica clínica pues en su caso retardaría mucho la obtención de resultados.

Así mismo otros métodos de carácter bioquímico han sido empleados con buenos resultados para evaluar la susceptibilidad de trofozoítos en cultivo ante metronidazol como son la retoma de oxígeno (Sousa y Poiars-Da-Silva, 1999) y un ensayo colorimétrico en microplaca que se basa en la liberación de actividad de nucleósido hidrolasa durante la lisis inducida; aunque este método es mas bien una forma indirecta de conteo celular, mostró ser útil en la evaluación de viabilidad en cultivos de *Giardia* tratados con metronidazol, tinidazol y furazolidona *in vitro* (Kang *et al.*, 1998).

Para el caso del método de reducción de sales de formazán a partir de MTT los resultados fueron fuertemente influenciados por el rigor con el cual se realizó la prueba, e incluso usualmente esta técnica emplea métodos ópticos como espectrofotometría o en un contador de ELISA para la obtención de resultados. En este último caso, la cuantificación del formazán se realiza después de haber roto los trofozoítos en un medio ácido para propiciar la liberación de los gránulos, o bien por



sonicación (Wright *et al.*, 1992). Sin embargo, en este caso se decidió hacerlo por conteo bajo el microscopio porque consideramos la posibilidad existente de que diferentes trofozoítos mostraran también diferencias metabólicas que, independientemente del tratamiento, dieran lugar a diferencias en la formación de gránulos; aunque esto no fue observado en la presente tesis sí ha sido detectado en otros trabajos (Pérez-Taylor, 2000). En otros trabajos realizados con esta técnica se ha encontrado que al utilizar un cultivo con trofozoítos muertos (por cinco procesos de congelación en N₂ líquido-descongelación a 80°C por 5 minutos) como control negativo los valores de absorbancia que se obtienen son elevados (Navarro, 1993; Ponce *et al.*, 1994). Esto indica que la presencia de las enzimas de vía glucolítica activas no es indicativa de una capacidad replicativa por parte de los trofozoítos, y que probablemente dichas enzimas se mantengan al menos parcialmente activas a tiempos relativamente cortos después de la muerte de los trofozoítos.

Los bencimidazoles como el albendazol actúan sobre la tubulina en otros parásitos y posiblemente también en este caso. No obstante, una causa de la letalidad del fármaco puede ser la interferencia sobre una fase importante del ciclo celular del parásito que es la adhesión, la cual de manera natural se desarrolla sobre el epitelio intestinal a nivel de duodeno y yeyuno. En el sistema *in vitro* empleado en este trabajo se refleja que la adhesión no sólo es un mecanismo que le permite al parásito mantenerse fijo a un sustrato, sino una fase metabólicamente importante a otro nivel tal vez relacionado con el ciclo celular (Pérez-Taylor, 2000).

La deformación de trofozoítos ha sido comúnmente observada ante el tratamiento con bencimidazoles, pero no suele ser empleada como un parámetro de viabilidad, lo cual a la luz de los resultados de este trabajo puede hacerse teniendo la certeza de una alta sensibilidad del método.

Aunque los métodos bioquímicos empleados no permitieron calcular verdaderas dosis letales al porcentaje indicado (DL₅₀, por ejemplo) debido a que, como se indicó anteriormente, la letalidad del cultivo sólo fue probada para el caso de los métodos de subcultivo en medio líquido y la evaluación morfológica, referimos genéricamente con éstos términos a las dosis calculadas aunque estrictamente representan concentraciones inhibitorias metabólicas (CIM) pues reflejan una inhibición de algunos procesos. No obstante, todos los métodos están en o sobre el rango de letalidad del fármaco, por lo cual y para evitar confusión de términos, hemos referido en todos los casos con el termino de DL a las concentraciones calculadas para los diferentes métodos.

En el caso de los bencimidazoles probados empleando el método de evaluación morfológica como criterio de viabilidad *in vitro*, éste permitió obtener patrones dosis-respuesta característicos para cada fármaco. Dichas gráficas incluso debieron presentarse en escala logarítmica debido a las diferencias de sensibilidad mostradas por los trofozoítos para los diferentes fármacos.

El más eficiente de los bencimidazoles bajo las condiciones probadas resultó ser el Nocodazol. Este bencimidazol ya anteriormente había sido evaluado en *G. duodenalis* (Katiyar *et al.*, 1994) y se le consideró también como una de los bencimidazoles más eficientes. Sin embargo, como suele ocurrir al comparar resultados de diferentes publicaciones, las DL_{50} calculadas no son comparables entre sí confiablemente puesto que las condiciones de evaluación fueron muy diferentes. En el caso del trabajo mencionado los trofozoítos fueron incubados en presencia del fármaco por 48 hrs después de las cuales se realizó un conteo y se comparó el número de trofozoítos obtenidos con un cultivo control con solvente (DMSO). Bajo dichas condiciones su DL_{50} fue ≈ 10 veces menor ($0.0016 \mu M$), a la que observamos, lo cual es debido al mayor tiempo de incubación de los trofozoítos con la droga. De aquel trabajo es importante destacar que probaron en forma simultánea la toxicidad del fármaco a un cultivo de células Vero (pertenecientes a una línea de células de riñón de mono verde africano) encontrando que, aunque resultaba tóxico al cultivo, la concentración necesaria para observar daño en estas células es muy superior (30 a 60 veces) a la requerida para los trofozoítos.

Un trabajo anterior realizado por Morgan *et al.* (1993b) es mucho más concordante con los resultados de esta tesis en el sentido de considerar al nocodazol como el más eficiente al emplearlo por 24 hrs (al igual que esta tesis) y la DL_{50} reportada en su caso es muy cercana a la determinada en el presente estudio ($0.07 \mu M$ comparada con $0.048 \mu M$), aun a pesar de que difirió en el método empleado (reducción en la capacidad de adhesión con respecto a un cultivo control), así como el medio de cultivo utilizado, que en su caso recibe el nombre de BI-S-33 y contiene suero fetal bovino y Biosate® en substitución del suero bovino y la tripticasa y extracto de levadura respectivamente (Meloni y Thompson, 1987).

El método empleado en este reporte tiene mucha relación con la evaluación morfológica pues ambos son consecuencia de la disrupción de los microtúbulos. Por otra parte el medio de cultivo no parece ser muy diferente al TYI-S-33, o al menos las diferencias no parecen interferir



con la actividad del fármaco en cuestión. Sin embargo, en su reporte Morgan *et al.* (1993b) consideran que el efecto debido al nocodazol se pierde si se mantiene el cultivo en ausencia de fármaco por más de 48 hrs. Esto indica que el nocodazol provoca alteraciones reversibles bajo las condiciones empleadas. En esta tesis, no realizamos evaluaciones por un tiempo mayor a las 24 hrs, pero dada la grave deformación observada, resulta difícil pensar que los trofozoítos puedan recuperarse del daño.

El albendazol por su parte también mostró adecuados resultados, pues es el segundo en efectividad entre los bencimidazoles probados. En esto concuerdan la mayoría de las publicaciones pero alguna lo consideran el tercero después del nocodazol y mebendazol (Morgan *et al.*, 1993b). Este fármaco es de los más evaluados para *Giardia* tanto *in vivo* como *in vitro*. Entre las publicaciones existentes se encuentran datos coincidentes con los de la presente tesis dentro de ciertos intervalos pues hay que considerar las diferencias en método.

Así por ejemplo, Meloni *et al.*, (1990) publicaron un estudio comparativo entre albendazol, metronidazol y tinidazol para el cual emplearon tiempos de cultivo con fármaco de 4 y 24 hrs con incubaciones posteriores en ausencia del fármaco de tiempos variables. Se empleó un método semicuantitativo de adherencia (por conteo el número de trofozoítos adherentes por campo después de terminado el tratamiento). Sus resultados indican que, para el caso del albendazol, la MIC calculada a 24 hrs con fármaco y 24 hrs de subcultivo en medio fresco es 2 veces mayor (0.158 μm) a la observada en esta tesis. Cabe destacar que ellos también emplearon el medio BI-S-33 antes mencionado, el solvente fue DMSO y se trabajó con 48 hrs de subcultivo en medio fresco en lugar de las 24 empleadas en su reporte (el doble al igual que la dosis calculada).

Un punto muy importante a considerar del trabajo mencionado es que, mientras mayor sea el período de incubación en ausencia de droga, después de que los trofozoítos fueron expuestos por 4 hrs a la misma, la IC_{50} del fármaco se redujo para el caso del albendazol, en tanto que para metronidazol y tinidazol la IC_{50} se incrementó; y esto es un indicio de que el efecto provocado por el albendazol (y posiblemente la mayoría de los bencimidazoles) es irreversible porque, una vez provocado un efecto se desarrolla un proceso que trae como consecuencia tardía la muerte del trofozoíto aún en casos en los que el fármaco ya no está presente en el medio de cultivo.

Otro estudio semejante (Edlind *et al.*, 1990) donde se empleó el medio TYI-S-33 e incubaciones con fármaco por 3 hrs con un subcultivo posterior de 48 hrs, se observó que la IC_{50}



es muy semejante a la DL_{50} obtenida en este trabajo, siendo únicamente 0.5 veces superior (1.22 μM) a pesar de la gran discrepancia en el tiempo de incubación. Por su parte Cedillo y Muñoz (1992) reportaron una IC_{50} 0.5 veces inferior (0.037 μM) cuando utilizan un tiempo de incubación con fármaco de 48 hrs y 48 hrs posteriores de subcultivo en medio fresco TYI-S-33.

Morgan *et al.* (1993b) reportaron que, si bien el efecto del nocodazol es reversible, el albendazol no tiene el mismo comportamiento, por el contrario, es sumamente eficiente. La IC_{50} calculada para albendazol en este trabajo fue 3.5 veces (0.25 μM) superior a la encontrada en este trabajo caso bajo las condiciones metodológicas mencionadas anteriormente.

Posteriormente Oxberry *et al.* (1994) reportaron una IC_{50} 5.5 veces superior a la determinada en este estudio (4 μM); en aquel caso se empleó un tratamiento por 24 hrs con el fármaco seguido de un periodo de subcultivo también de 24 hrs en medio BI-S-33. La viabilidad en este caso fue observada por subcultivo. Cabe destacar que ellos hicieron evaluaciones morfológicas por microscopía de transmisión y encontraron que el albendazol provocaba ondulamientos, deformación y aumento en la granularidad del trofozoito conforme se incrementaba el tiempo de subcultivo (a un tiempo constante de incubación con droga de 4 hrs). A pesar de no tener la resolución que ellos emplearon, concordamos con sus observaciones microscópicas, así como también con el hecho de que los trofozoitos deformados por el proceso de envejecimiento normal del cultivo no muestran las mismas alteraciones morfológicas que aquellos tratados con albendazol.

En el mismo año Katiyar, por el procedimiento ya mencionado, reportó una IC_{50} para albendazol ligeramente inferior a la calculada en el presente trabajo (0.060 μM) y una toxicidad a células Vero a concentraciones mucho mayores (entre 11 y 22 μM), lo cual es sugerente del efecto selectivo de éstos fármacos.

Cabe destacar que usualmente se considera al albendazol-sulfóxido como la forma activa del albendazol en reportes donde se emplean helmintos como modelo (Pérez-Serrano *et al.*, 1994; Pérez-Serrano *et al.*, 1995). No obstante esto, en *Giardia* el albendazol-sulfóxido muestra una eficiencia muy baja *in vitro* según reportan Katiyar *et al.* (1994) y Morgan *et al.* (1993b). En este último trabajo observó una IC_{50} de 3.15 μM . Esto puede ser debido a que el albendazol-sulfóxido es más hidrosoluble, lo cual facilita su acceso a tejidos en los cuales puede estar embebido el parásito en tanto que, para el caso de *Giardia*, por ser un parásito del lumen intestinal la metabolización del albendazol por el citocromo p450 para convertir el fármaco a la forma de



sulfóxido no facilita el acceso del fármaco al parásito como en el caso anterior, de manera que las evaluaciones *in vitro* pueden resultar más representativas de lo que ocurre *in vivo* en el caso de la giardiosis tratada con albendazol.

Para el mebendazol Edlind *et al.* (1990) reportaron una IC_{50} ligeramente inferior (0.152 μM), en tanto que Cedillo y Muñoz (1992) observaron en sus estudios una dosis 2 veces superior (0.203 μM) a la reportada en esta tesis. Morgan *et al.* (1993b) encontraron que esta droga es más eficiente que el albendazol con una IC_{50} de 0.25 μM (2.5 veces superior a la DL_{50} calculada), siendo el único que ha reportado esto. Katiyar *et al.* (1994) por su parte reportaron una IC_{50} de 0.06 μM (la mitad que en esta tesis). Las condiciones de trabajo para cada uno de ellos ya han sido mencionadas anteriormente.

El oxibendazol, al igual que el bencimidazol, únicamente ha sido evaluado en *Giardia* por Katiyar *et al.* (1994) quienes encontraron una IC_{50} de 0.128 μM (la mitad de la que se observó en esta tesis) y mayor a 25.39 μM respectivamente para los fármacos mencionados, en tanto que el tiabendazol fue empleado tanto por Edlind *et al.* (1990) como por Katiyar *et al.* (1994) y se reportaron IC_{50} de 19.37 y 10.93 μM (casi idéntica y 0.33 veces inferior) respectivamente.

En los resultados obtenidos por los diferentes grupos para los distintos fármacos empleados, destaca el hecho de que las dosis calculadas no difieren tanto como sería de esperar debido a las diferencias metodológicas mencionadas e incluso a otras como son la cepa empleada, el inóculo inicial, el volumen de cultivo, etc. En cuanto a las cepas empleadas, aunque en algunos trabajos se utilizaron cepas diferentes, los resultados mencionados corresponden a WB, P1 o clonas obtenidas de éstas, aunque si bien en la presente tesis no se encontraron diferencias significativas entre las dos cepas de referencia probadas, se puede considerar que es un factor de poca discrepancia debido probablemente a que tanto WB como P1 han sido mantenidas en cultivo por un tiempo tan prolongado que puede ser que hayan perdido sus características iniciales de tolerancia a fármacos, al menos parcialmente.

Entre otros fármacos del grupo que han sido probados en *Giardia* se encuentran: el flubendazol, fenbendazol, parbendazol, ciclobendazol, cambendazol, oxfendazol, carbendazim y benomyl (Morgan *et al.*, 1993b; Katiyar *et al.*, 1994), mismos que se mencionan en el orden de efectividad reportado y que en conjunto con los otros permiten reconocer su efectividad giardicida.



En reportes donde la relación estructura-actividad ha sido inicialmente evaluada en *Giardia* (Katiyar *et al.*, 1994), al igual que en esta tesis, la mayoría de los fármacos probados tienen un grupo carbamato en la posición 2 (R-2 de la fig. 7b) y varían en el radical localizado en la posición 5 (R-1). Dicho reporte coincide con los resultados obtenidos en relación a que los fármacos que carecen de un radical en posición 5 (tiabendazol y bencimidazol empleados en esta tesis, así como carbendazim y benomyl) tienen muy poca actividad giardicida. Por lo demás existe poca información a este respecto en dicho parásito, ya que los bencimidazoles han sido empleados como antihelmínticos más que contra cualquier otro tipo de organismos, es por ello que todos los estudios en relación a la evaluación de la estructura del fármaco y su vínculo con la actividad parasiticida que muestra han sido realizados en parásitos tales como *Hymenolepis diminuta*. A partir de tales evaluaciones se ha llegado a algunas conclusiones en este aspecto (McCracken y Lipkowitz, 1990a, 1990b; Lipkowitz y McCracken, 1991, 1993).

Así, se han obtenido resultados de efectividad en ratas inoculadas con *H. diminuta* ante el empleo de fármacos del grupo de los bencimidazoles a dosis únicas. Gracias a estos resultados así como a los resultados teóricos y computacionales se ha llegado a una serie de conclusiones. Existen parámetros de la estructura química del fármaco que pueden ser evaluados experimentalmente, como la estructura química tridimensional y características electrónicas de distribución de cargas, las cuales se han determinado empleando combinaciones de mecánica cuántica, gráficas moleculares por computadora y técnicas de modelamiento molecular en algunos fármacos del grupo como son: el albendazol, albendazol-sulfóxido, oxibendazol, tiabendazol, triclabendazol, triclabendazol-sulfóxido, triclabendazol-sulfona, oxfendazol, cambendazol y tioxidazol (McCracken y Lipkowitz, 1990a, 1990b; Lipkowitz y McCracken, 1991, 1993). Dichos resultados han correlacionado con la efectividad *in vivo* de los fármacos probados.

A partir del empleo de las herramientas mencionadas se ha determinado que la efectividad de éstos fármacos depende de: la distribución de cargas en la molécula, el área de la molécula accesible a solventes; las energías HOMO y LUMO y la forma de la molécula.

a) La distribución de cargas en la molécula. Los bencimidazoles se comportan como moléculas neutras pues la suma algebraica de sus cargas parciales es cero. No obstante, para facilitar la interpretación se ha dividido a la molécula en tres regiones, la primera corresponde al radical localizado en posición 5 ([R-1], usualmente 2-metil carbamato o bien 2-tiazolyl), la segunda es el



bencimidazol, y la tercera corresponde al radical en posición 2 ([R-2] es altamente variable). La carga de cada región corresponde a la suma de las cargas parciales de cada átomo presente en la misma. Siguiendo este criterio se ha llegado a concluir los que fármacos con un R-1 muy negativos (en especial por el carbamato) y R-2 muy positivos son los que muestran una mayor efectividad *in vivo*.

b) El área de la molécula accesible a solventes. Este parámetro define a la cantidad de fuerzas de van der Waals que están accesibles a moléculas de solvente y tiene mucha relación con la solubilidad en agua, así como a la capacidad del fármaco de ser transportado en ambientes acuosos, de modo que mientras más sitios accesibles al agua se presenten en la molécula (mayor polaridad), el transporte de la misma será mayor. Este parámetro es de mayor importancia en tanto la accesibilidad al sitio blanco o al parásito sea menor. Para el caso de *Giardia*, a diferencia de *H. diminuta*, es de los elementos menos relevantes por tratarse de un parásito intestinal únicamente cubierto por su membrana celular, puesto que el fármaco no requiere atravesar la serie de barreras que se requieren para tener acceso a otro tipo de helmintos (McCracken y Lipkowitz, 1990a, 1990b; Lipkowitz y McCracken, 1991, 1993).

c) Las energías HOMO (highest occupied molecular orbitals) y LUMO (lowest unoccupied molecular orbitals). Los altos valores de estos parámetros indican una tendencia en la molécula a sufrir procesos de oxidación o reducción respectivamente. Estos valores tienen relación con la metabolización del fármaco y las posibles reacciones con intermediarios reactivos, los cuales pueden propiciar una mayor actividad de la droga o facilitar su excreción. Cabe destacar que el albendazol es uno de los bencimidazoles que sufren procesos de oxidación por un citocromo p450, dando lugar al albendazol-sulfóxido; este último es reconocido como la forma activa del fármaco para diversas helmintosis pero no para giardiosis. Ello tiene relación con el hecho de que el albendazol-sulfóxido es más soluble en agua lo cual favorece su transporte, como se mencionó anteriormente (McCracken y Lipkowitz, 1990a, 1990b; Lipkowitz y McCracken, 1991, 1993).

d) La forma de la molécula. Para los bencimidazoles la forma está determinada por la capacidad de rotación de tres ángulos principales, así como de la energía libre que tiene la misma al modificarse la posición de dichos ángulos. En este aspecto se ha encontrado que los bencimidazoles que muestran una forma L debida a la rotación estable (de baja energía libre) del R-1 son más efectivos.



Sin embargo, hay también fármacos muy efectivos con forma U (McCracken y Lipkowitz, 1990a, 1990b; Lipkowitz y McCracken, 1991, 1993).

Las conclusiones obtenidas en esta serie de publicaciones concuerdan con la efectividad observada para los distintos fármacos del grupo al emplear trofozoítos de *Giardia*, con sólo una excepción. Esta consistió en la efectividad del albendazol-sulfóxido la cual fue mucho menor a la del albendazol por sí solo, al contrario de lo que sus cálculos y observaciones predicen (McCracken y Lipkowitz, 1990a); esto indica que para el tratamiento de la giardiasis la solubilidad del fármaco no es trascendental para la efectividad del mismo. Por lo demás, los parámetros importantes a ser considerados como determinantes en la efectividad de los bencimidazoles para esta parasitosis son: la distribución de cargas en la molécula y la forma tridimensional típica de la misma.

Puesto que el sitio blanco reconocido para los bencimidazoles en diferentes sistemas celulares es el mismo (la β -tubulina), cabría esperar un posible efecto antagónico entre los distintos miembros de este grupo empleados en esta evaluación. Esto era de esperarse particularmente al combinar nocodazol con bencimidazol puesto que, por la concentración a la cual se encuentra el segundo para dar un efecto letal, podría estar desplazando de la molécula blanco al primero, aún a pesar de la efectividad mostrada por este. Es por ello que se decidió emplear la MIC para evaluar las interacciones desarrolladas por los bencimidazoles y algunas de sus combinaciones. En los resultados obtenidos se observaron interacciones de tipo indiferente cuando los fármacos empleados son efectivos al ser usados de modo independiente, tal fue el caso de las combinaciones Nocodazol- Albendazol y Nocodazol- Oxibendazol; sin embargo, para las combinaciones donde fueron empleados fármacos poco efectivos la interacción resultó en un antagonismo moderado, puesto que los valores de CFI fueron muy cercanos al valor de corte de 2. tal fue el caso de las combinaciones Nocodazol- Bencimidazol, Bencimidazol- Oxibendazol y Bencimidazol- Tiabendazol. Por su parte la interacción de drogas con efectividad media como es el caso de la combinación Oxibendazol- Mebendazol también presentó la misma interacción antagónica moderada.

A este respecto no existe literatura reportada para este grupo de fármacos. No obstante esto, otras drogas sí han sido evaluadas para verificar las interacciones que pueden desarrollar en sistemas *in vitro*. Entre ellos destaca el método reportado por Pendland *et al.* (1994), en el que se

emplearon curvas dosis-respuesta completas para cada fármaco evaluado de manera individual, así como para cada combinación empleada. De esta manera les fue posible calcular para cada combinación tres diferentes dosis MIC (dos correspondientes a los fármacos individuales y una de la combinación). Cabe señalar que en estos experimentos no se pretendió proponer la combinación de bencimidazoles como posible terapia en sistemas vivos, porque si bien puede ser una alternativa mejorar la efectividad de las terapias combinando tratamientos, la combinación de fármacos debe ser preferentemente con drogas diferentes en su mecanismo de acción y estructura.

Al evaluar la sensibilidad de cada cepa o aislado y sus clonas en estudios de tipo transversal se observó que la variación presente fue más evidente entre las cepas WB y P1 y sus clonas que entre el resto de los aislados observados y sus clonas. Esto puede ser debido al tiempo que se han mantenido en cultivo, de manera que en ausencia de una presión de selección, todas las clonas con diferentes fenotipos están en posibilidad de replicarse de igual manera, en tanto que aislados obtenidos en fechas más recientes y que se han mantenido en cultivo por menos tiempo aún pueden reflejar un fenotipo más cercano al que probablemente mostraron originalmente antes de ser axenizados. El orden de variación observado considerando el tratamiento con ambos fármacos en los aislados, cepas y su conjunto de clonas fue el siguiente: WB > P1 > IMSS-2 > IMSS-3 > CIEA-52 > CIEA-10.

Una explicación al fenómeno observado consiste en considerar una posible exposición previa a un factor de selección en los individuos de quienes se aislaron los cultivos, de tal manera que se favoreciera en algún momento la presencia de clonas tolerantes pero sin eliminar del todo las sensibles. Esto propiciaría que existiera una heterogeneidad dentro de los cultivos y que el azar fuese el elemento determinante que favorezca la propagación de unos trofozoítos más que otros. Algunos factores de selección probables que pudieron haberse presentado en alguna ocasión son:

a) El peristaltismo intestinal. Puesto que la capacidad de adhesión del parásito es trascendental en su permanencia en el intestino *in vivo* (Hernández, 1992) y esta característica está vinculada con proteínas como tubulinas y giardinas, mismas que pueden ser el sitio blanco de los bencimidazoles. Es posible que elementos en estas proteínas que determinen una adecuada capacidad de adhesión tengan efecto a nivel de la sensibilidad a drogas. Este tipo de factor en algún momento habría favorecido a aquellos trofozoítos con una dinámica de polimerización de microtúbulos más eficiente, así como a aquellos que presentaran mayor funcionalidad de sus proteínas contráctiles.



b) Exposición previa a miembros del grupo de los bencimidazoles. Este grupo de fármacos ha sido empleado con diferentes fines como son el tratamiento veterinario de algunas parasitosis, así como plaguicidas y herbicidas (Lacey, 1988). Como la posibilidad de zoonosis no ha sido descartada para el caso de giardiosis, ésta continúa siendo una posible vía de infección de manera que se favorezca que animales tratados con bencimidazoles (particularmente mebendazol) pueden presentar una parasitosis sintomática o asintomática por trofozoítos de *Giardia* resistentes a los tratamientos. Así mismo, la presencia de restos de herbicidas y plaguicidas (que incluyan miembros de este grupo de fármacos) en alimentos mal lavados pudiera ser una vía de consumo involuntario de bencimidazoles, aunque las cantidades consumidas probablemente serían muy bajas como para propiciar una selección de trofozoítos resistentes. El tratamiento con los bencimidazoles de uso más frecuente aún es escaso en México, de manera que es poco probable que haya existido una exposición previa. Sin embargo no se descarta esta posibilidad.

c) El tratamiento previo con otras drogas. Otros tratamientos empleados en los individuos pueden tener efecto en la selección de tolerantes por mecanismos de amplio espectro como es la presencia de PgP o proteínas relacionadas. La presencia de esta proteína en *Giardia* aún no ha sido demostrada, pero existen ya algunas evidencias que indican que este puede ser un factor de resistencia en este parásito (Upcroft *et al.*, 1993c). El tratamiento de mayor uso en esta y otras parasitosis es el metronidazol, mismo que ha sido reportado con actividad mutagénica en diversos sistemas biológicos.

Considerando lo anterior, de estar presente algún mecanismo de tolerancia o resistencia habría correlación entre los resultados de sensibilidad obtenidos ante los dos bencimidazoles probados, lo cual no ocurrió así. Esto indica que existe algún elemento extra vinculado con las diferentes sensibilidades desarrolladas por los trofozoítos, o bien que el azar con el que se presenta la predominancia de ciertas clonas en un cultivo enmascara en parte las características de sensibilidad o tolerancia a fármacos. En virtud de que aún dentro de cultivos clonados existió una variación tan amplia como la de los cultivos de los cuales se originaron dichas clonas, cabe suponer un mecanismo de variabilidad intrínseco de cada trofozoíto o incluso la posibilidad de recombinación genética debida a la reproducción sexual que se ha sugerido presenta *Giardia* (Baker, 1989; Thompson y Reynoldson, 1993). Sin embargo, si este es el caso, el fármaco también debe jugar un papel importante pues se ha observado que en los mismos cultivos bajo iguales



condiciones la variación observada ante metronidazol o tinidazol (Romero-Montoya, 1996) es mayor que la desarrollada ante albendazol o mebendazol. También existe la posibilidad de que, por el mecanismo de acción de los bencimidazoles, la inadecuada función de los microtúbulos durante la mitosis pudiera propiciar una migración de cromosomas atípica que favoreciera la recombinación en un trofozoíto mientras que en otro determinase su muerte. Esto además explicaría parcialmente la presencia de parejas mitóticas con sensibilidad diferente que se observó en este trabajo.

Resultados semejantes fueron obtenidos al realizar las evaluaciones longitudinales de sensibilidad donde se encontró una amplia variación de la viabilidad observada en los diferentes días probados. Tomados en conjunto los resultados obtenidos de las evaluaciones longitudinales para el caso de tratamientos con albendazol se observó que el orden de variación es semejante al observado en la evaluación transversal. Además, los resultados muestran que hay una variabilidad de la respuesta a través del tiempo para todas las cepas, aislados y clonas empleados, de manera que no hay diferencias significativas entre ellos. La variabilidad observada a través del tiempo aparentó en algunos casos un comportamiento cíclico con frecuencias independientes para cada clona, cepa o aislado utilizado. No obstante, no se puede ser concluyente a este respecto, pues para ello hace falta aplicar un sistema estadístico apropiado, mismo que requiere un conjunto mayor de datos. Sin embargo, los resultados obtenidos no mostraron un espectro de variabilidad tan amplio como el que se observó en el caso de evaluaciones semejantes con metronidazol y tinidazol (Romero-Montoya, 1996). Así mismo, en los resultados del trabajo mencionado no existieron indicios de variabilidad cíclica. Sin embargo, anteriormente ya se había sugerido la posibilidad de presentarse este fenómeno en publicaciones previas (McIntyre *et al.*, 1986).

Los resultados obtenidos indican que la sensibilidad a los distintos fármacos es independiente para cada caso, de manera que un incremento o decremento en la tolerancia a alguno de ellos no tiene relación con la viabilidad observada para el otro. Cabe destacar que la DL_{50} empleada no se comportó como tal y los casos en que la viabilidad fue menor al 50% fueron escasos, lo cual hace pensar en un posible decaimiento de la actividad de los fármacos, particularmente mebendazol. Otra posible explicación a este fenómeno es la presencia de modificaciones en los trofozoítos a lo largo del experimento. Como se mencionó anteriormente, modificaciones postraduccionales como la acetilación de la tubulina (Torres y Delgado, 1989), reduce el proceso de despolimerización normalmente observado a bajas temperaturas y, del mismo



modo, favorecer la tolerancia a bencimidazoles por incrementar la estabilidad de los microtúbulos. Es importante indicar que en esta fase experimental las condiciones de enfriamiento en ocasiones llegaron a ser extremas pues la adhesión de los trofozoítos a los recipientes de cultivo se incrementó notoriamente. Es importante en un futuro tratar de verificar la presencia de acetilaciones en los microtúbulos de *Giardia* y su relación con la resistencia a fármacos como los bencimidazoles, así como otras modificaciones que pueden repercutir en un fenotipo resistente como podrían ser la presencia de proteínas de estrés del tipo PgP o bien proteínas de choque térmico.

Farbey *et al.* (1995) reportaron la susceptibilidad *in vitro* de 28 aislados de *Giardia* obtenidos de individuos caucásicos y aborígenes australianos,. En dicho reporte se observó una variación amplia entre la sensibilidad de los aislados expuestos a albendazol (IC_{50} entre 1.1 y 9.6 μM), la cual fue inferior a la que observaron para metronidazol (IC_{50} entre 9.4×10^{-3} y 1.54×10^2 μM). Estos resultados concuerdan con los obtenidos, puesto que en el análisis transversal la viabilidad observada varió aproximadamente un 65% entre la clona más baja observada [IMSS-2 (7) con 30.5] y la clona más alta [CIEA-10 (5) con 94.0] para los aislados tratados con mebendazol y de 85% [el más bajo la clona IMSS-3 (3) con 7.0 y el más alto la clona CIEA-10 (1) con 93.0] para albendazol. En el análisis transversal, mientras tanto, se encontró que al promediar los resultado de los diferentes días hubo una variación para albendazol menor del 20 % [entre CIEA-52 (5) 85.3 ± 7.2 e IMSS-3 (7) 65.0 ± 24.0] y para mebendazol del 7 % [entre IMSS-3 (3) 90.6 ± 2.9 , e IMSS-2 (7) 83.9 ± 16.4]. Sin embargo para metronidazol y tinidazol ha sido reportada una variabilidad mayor de la que observamos para los bencimidazoles en aislados mexicanos (Romero-Montoya, 1996).

Por otra parte, en el mismo trabajo De Farbey *et al.* se observó que existen diferencias significativas entre los aislados de población aborígen ($3.6 \mu M \pm 2.1$) y la caucásica ($2.3 \mu M \pm 0.8$) ante el tratamiento con albendazol. Dichas concentraciones fueron calculadas empleando medio BI-S-33 con 4×10^5 trofozoítos expuestos por 4 hrs al fármaco, después de lo cual se subcultivaron en medio líquido por 20 hrs para luego evaluarse considerando su capacidad de adhesión como método de evaluación. Estos datos son indicativos de la variación de sensibilidad que puede existir entre cepas.



Otros casos de heterogeneidad en la sensibilidad a diferentes fármacos han sido reportados anteriormente, sobre todo para el caso de metronidazol (Boreham *et al.*, 1987; Majewska *et al.*, 1991). Otro aspecto de gran importancia donde este parásito ha mostrado una amplia variación es a nivel de antígenos (Adam *et al.*, 1988; Aggarwal y Nash, 1988; Nash *et al.*, 1988; Aggarwal *et al.*, 1989; Nash *et al.*, 1990; Hopkins *et al.*, 1993b). Se ha reportado que existen en la cepa WB subpoblaciones que se caracterizan por presentar siempre una clase de antígeno pero varían en otras, en tanto que existen otras poblaciones a las cuales no se les ha identificado un antígeno típico o más frecuente. En dichos estudios se ha determinado el tiempo que se requiere *in vitro* para que un antígeno determinado se exprese y es de entre 10 y 13 generaciones, también se ha calculado el número de antígenos promedio presente en la cepa WB, y se ha determinado un rango entre 20.5 y 184 antígenos (Nash *et al.*, 1990). Cabe la posibilidad de que alguno de dichos antígenos variantes tenga relación con la entrada, metabolización o expulsión del fármaco, de manera que debido a esto se hayan observado las variaciones cíclicas encontradas en esta tesis.

La presencia de casos de tratamientos fallidos en la población humana parasitada por *Giardia* ha ido en aumento y aunque no todos los casos son debidos a tolerancia del parásito, es necesario tener modelos para el estudio de este fenómeno. Otras razones por las cuales un tratamiento puede fallar son: el incumplimiento o cumplimiento, inexacto del régimen prescrito, la reinfección constante en zonas endémicas y grupos familiares parasitados, cambios en la farmacocinética de la droga, el escape de los organismos a sitios de difícil acceso para el fármaco, deficiencias en el sistema inmune del hospedero, inactivación de la droga por parte de bacterias presentes en el intestino (Boreham *et al.*, 1988b; Edwards *et al.*, 1979).

Se han hecho intentos de selección de cultivos de *Giardia* resistentes o tolerantes a bencimidazoles por distintos grupos y métodos. Para albendazol Morgan *et al.* (1993b) reportó haber utilizado concentraciones subletales de entre 0.08 y 0.64 μM para crecer una clona de la cepa P1; sin embargo, después de un tratamiento por un tiempo máximo de 96 hrs el cultivo muere. Por su parte Farbey *et al.* (1995) reportaron haber encontrado un aislado de un individuo aborigen que muestra una IC_{50} de 9.6 μM en condiciones en las que la población caucásica promedio tiene un IC_{50} de 2.3 μM . En este reporte no se indicó haber cultivado a alguna concentración de droga los trofozoítos de ese individuo de manera que sea capaz de observar replicación celular. En el presente trabajo no hemos determinado la DL_{50} de las cepas tolerantes,



además de que las condiciones metodológicas empleadas dificultan comparar la resistencia de las cepas obtenidas en esta tesis con las reportadas en otros estudios.

Posteriormente se encontró un reporte de Gene Bank con una secuencia parcial del gene de β -tubulina de la cepa WB1B-M3 alb (número de acceso L77219). La cepa WB1-B-M3 originalmente se obtuvo por procedimientos de mutagénesis con luz UV, con la cual se indujo resistencia a metronidazol (Townson *et al.*, 1992) y, aunque no existen más datos, el nombre de la nueva clona es sugerente de haber sido seleccionada por una sensibilidad diferencial a este fármaco (tal vez más tolerante o sensible). Sin embargo, la secuencia parcial mostrada no presenta diferencias con respecto a la presente en la cepa WB (número de acceso de Entrez X06748). Recientemente fue publicada la existencia de esta clona y su capacidad de crecimiento en $2\mu\text{M}$ de albendazol así como un arreglo distinto de la tubulina en esta clona, particularmente en el cuerpo medio lo cual se evidenció por inmunofluorescencia indirecta empleando un anticuerpo que reconoce tubulina (Upcroft *et al.*, 1996b).

Para el mebendazol, Edlind *et al.* (1990) reportaron haber probado concentraciones de entre 0.101 y $0.338 \mu\text{M}$ pero en ningún caso fue capaz de recuperar trofozoítos viables. Las cepas tolerantes obtenidas en el presente trabajo, en cambio crecen entre dosis de 0.18 y $0.2 \mu\text{M}$ de estos dos fármacos, pero desconocemos actualmente sus DL_{50} o si revierten o no su fenotipo al ser cultivadas en ausencia del fármaco.

La selección de trofozoítos resistentes a otros fármacos por mutágenos ha sido posible, particularmente para metronidazol y furazolidona, donde procedimientos de mutagénesis por luz UV han permitido obtener cepas resistentes con relativa facilidad. En este sentido cabe tomar en cuenta que el metronidazol, al igual que la furazolidona, por sí mismos pueden considerarse mutágenos de potencia media y, por lo mismo, no presenta mucha dificultad utilizarlos como agente selectivo y mutágenos a la vez, facilitando la obtención de cultivos resistentes (Speck *et al.*, 1976; Voogd, 1981; Townson *et al.*, 1992). Esto resulta importante al considerar que naturalmente suelen exponerse trofozoítos y quistes a estos dos procesos, al metronidazol debido a su sobreutilización farmacológica y a la luz UV empleada como potabilizante de agua para consumo, la cual con frecuencia está contaminada por quistes.

Ambos mutágenos son totalmente inespecíficos, por lo cual se requiere de un gran número de trofozoítos (o en su caso quistes) expuestos al mismo para que alguno presente la mutación



deseada. Debido a que la mayoría de las mutaciones suelen ser letales, se espera que en un proceso de mutagénesis eficiente la cantidad de organismos sobrevivientes sea muy baja. El caso de la mutagénesis por luz UV requiere además de la ausencia total de luz para evitar la activación de enzimas que reparen el daño como son las DNA fotoliasas o enzimas fotorreactivantes (Espinoza *et al.*, 1993).

Cuadro 13. Mutaciones en el gene de la β -tubulina relacionadas con cambios en la sensibilidad a bencimidazoles en diferentes organismos.

ORGANISMO	MUTACIÓN			AMINOACIDO	
	UBICACIÓN*	SENSIBLE*	TOLERANTE*	EN GIARDIA	REFERENCIA
<i>H. contortus</i>	200	Phe	Tyr	Phe	Geary <i>et al.</i> , 1992; Kwa <i>et al.</i> ; 1994 y 1995
	76	Phe	Val	Val	
	38	Ile	Val	Ile	
<i>C. elegans</i>	31	Gln	Asp	Asp	Driscoll <i>et al.</i> , 1989.
	33	Asp	Thy	Ser	
	35	Lys	nc	Glu	
	287	Ala	Pro	Pro	
<i>N. crasa</i>	167	Phe	Tyr	Phe	Orbach <i>et al.</i> , 1985.
<i>E. hellem</i>	200	Phe	nc	Phe	Edlind <i>et al.</i> , 1994.
	198	Glu	nc	Glu	
<i>C. parvum</i>	200	nc	Gln	Phe	Katiyar y Edlind, 1994.
	198	nc	Ala	Glu	
<i>C. parvum</i>	198	Glu	Ala	Glu	Machin <i>et al.</i> , 1995.
<i>T. viridae</i>	6	His	Tyr	His	Goldman, 1993.
<i>S. cerevisiae</i>	241	Arg	His	Arg	Thomas <i>et al.</i> , 1986; Driscoll <i>et al.</i> , 1989; Machin <i>et al.</i> , 1995; Reijo, 1994.
	238	Thr	Ala	Ser	
	198	Glu	Ala	Phe	

Se indican los aminoácidos que experimentalmente han mostrado efecto sobre el fenotipo de los organismos indicados. * Sitio en que se localiza el aminoácido relacionado con el cambio en el fenotipo; " aminoácido relacionado con el fenotipo sensible; † aminoácido relacionado con el fenotipo resistente.

Los mecanismos de resistencia a bencimidazoles, en otros modelos, básicamente se enfocan a modificaciones en las proteínas tubulinas y particularmente son mutaciones en el gen de la β -tubulina, pero también modificaciones postraduccionales de la α -tubulina pueden tener efecto (Torres y Delgado, 1989). Las mutaciones más frecuentemente reportadas son sobre la fenilalanina

localizada en el aminoácido número 200, la cual en organismos resistentes es substituida por una glicina o tirosina, aunque existen otras mutaciones que se han encontrado relacionadas con este fenotipo (cuadro 10).

En los resultados obtenidos resalta el hecho de que los procedimientos de mutagénesis empleados no fueron eficientes, pero el procedimiento que se acercó más al límite de rechazo de la hipótesis nula (para mostrar diferencias significativas con la cepa parental) fue la cepa WB tratada con DMFM. Esto puede ser indicativo de que este solvente, al igual que el DMSO, puede estabilizar los microtúbulos.

Considerando los resultados mencionados, los mecanismos generales de resistencia presentes en *Giardia* que consideramos pudieran estar actuando en los cultivos resistentes obtenidos son:

◊ Respuesta de proteínas de choque térmico (HSP70). Estas proteínas han sido reportadas previamente en *Giardia* (Lindley *et al.*, 1988; Gupta *et al.*, 1994a) donde además existen otras proteínas expresadas en respuesta a estrés calórico con pesos moleculares de 30, 83 y 100 kDa (Lindley *et al.*, 1988; Aggarwal *et al.*, 1990). Particularmente la HSP70 se encuentra altamente difundida en toda clase de organismos, lo cual ha permitido emplearla para estudios filogenéticos (Gupta *et al.*, 1994a; Gupta *et al.*, 1994b; Rensing y Maier 1994). En varios estudios se han observado incrementos de esta proteína en respuesta a diferentes tipos de estrés, de los cuales el más caracterizado es la respuesta a incrementos de temperatura. Durante la fisiología normal de una célula esta proteína también se encuentran presentes en bajas cantidades y resulta particularmente interesante que haya sido localizada en sitios de ensamble de microtúbulos en flagelos de algas (Bloch y Johnson, 1995) donde su presencia es sugerente de una posible participación en esta función. Esto ha sido corroborado por otros trabajos en diferentes modelos (Gao *et al.*, 1993; Melki *et al.*, 1993; Lewis *et al.*, 1996). Los resultados obtenidos pueden ser indicativos de la relevancia de esta proteína en el estrés provocado por albendazol, es el hecho de que este tipo de respuesta se caracteriza por incremento en la síntesis de ciertas proteínas con decremento de otras, de manera que la síntesis global tiende a no variar. Lo anterior se ha visto principalmente en sistemas bacterianos, pero también en protozoarios como *Trypanosoma cruzi* (Requena *et al.*, 1992).

◊ Decremento de la concentración intracelular del fármaco. Esta puede ser debida a proteínas semejantes a PgP y en este punto existen trabajos referidos a la secuenciación de un gen de tipo *mdr* en *Giardia* (Upcroft *et al.*, 1993c; referencia obtenida de Farbey *et al.*, 1995); así como la presencia de una secuencia semejante a una proteína relacionada con PgP llamada CFTR/MRP (Regulador de Conductancia Transmembranal de Fibrosis Quística/Proteína Relacionada con Multirresistencia). Esta proteína se ha relacionado con multirresistencia en células de cáncer pulmonar (Cole *et al.*, 1992; Cole *et al.*, 1994) y ha sido confundida por el fenotipo que confiere con PgP en *Leishmania* (*ltppgA*) donde se ha relacionado con resistencia a metales pesados, arseniato, arsenato y antimoniales (Callahan y Beverley, 1991). La secuencia correspondiente a esta proteína aún no ha sido publicada pero fue referida por Dean y Allikments en 1995. Es importante destacar que en cultivos seleccionados en laboratorio como resistentes a metronidazol, muestran también tolerancia a otros 5-nitroimidazoles, y además se ha observado que presentan una menor acumulación intracelular de fármaco (Boreham *et al.*, 1988a). Estas características son sugerentes de la participación de proteínas tipo PgP en el proceso; no obstante, no existe resistencia a fármacos no relacionados como furazolidona y quinacrina en la publicación mencionada, por lo que dicha posibilidad pudiese ser relacionada más con resistencia cruzada que con PgP y multirresistencia. De igual manera cultivos inducidos a resistencia a quinacrina (Upcroft *et al.*, 1996a) y albendazol (Upcroft *et al.*, 1996b) fueron previamente inducidos a resistencia a metronidazol o furazolidona por mutagénesis y posteriormente reinducidos a resistencia a los fármacos mencionados por cultivo en presencia del fármaco, lo cual favorece la selección de múltiples mecanismos de resistencia en el mismo cultivo más que la presencia de un mecanismo único de multirresistencia. En cambio, resultados recientemente obtenidos demuestran que en los trofozoítos inducidos a resistencia por cultivo en concentración subletal creciente (a 1.35 μM de albendazol) presentan también resistencia a fármacos no relacionados como furazolidona, paromomicina, metronidazol y praziquantel sin requerir de exposición previa a éstos fármacos ni tampoco sufrir procesos de mutagénesis de ninguna clase (datos no mostrados). Así, estas observaciones sugieren que es factible la participación de proteínas de tipo PgP.

Con la finalidad de observar el mecanismo adaptativo de la cepa inducida a resistencia, así como la respuesta que se desarrolla ante la presencia del fármaco, se realizó una evaluación cinética de la incorporación de precursores radiomarcados de procesos celulares fundamentales. Se observó que, al comparar la cepa resistente WB-RA con la cepa sensible WB sin ser tratadas con albendazol, el metabolismo basal observado indicó que entre las adaptaciones sufridas por la WB-RA se encontraron un decremento significativo en la síntesis de DNA, moderado en la de RNA e imperceptible en la de proteínas. Al ser expuestas a albendazol, ambas cepas redujeron su capacidad replicativa proporcionalmente y no sufrieron cambios importantes en la síntesis de proteínas, pero la tasa de transcripción se incrementó de modo importante en la RA en tanto que en la WB ésta se redujo.

A la fecha no se tienen reportes en este aspecto para *Giardia*. No obstante cabe resaltar la importancia de los procesos metabólicos evaluados, así como las características de incorporación que tienen los precursores empleados.

Numerosos estudios han demostrado que *Giardia* es incapaz de sintetizar purinas y pirimidinas de novo (Lindmark y Jarroll, 1982; Wang *et al.*, 1983; Aldritt *et al.*, 1985; Vitti *et al.*, 1987; Jarroll *et al.*, 1989b; Baum *et al.*, 1993) y se ha buscado estudiar el proceso de incorporación y toma de nucleótidos, nucleósidos y bases. En este sentido resultan de interés los avances en relación a las características de toma e incorporación de la timidina y el uracilo. La timidina es incorporada a un nivel bajo de 0.2 pmol/minuto/ 10^6 trofozoítos (correspondiente a 0.025 nmol/minuto/mg de proteína) por una enzima llamada timidina fosfotransferasa. Esta misma enzima al igual que la timidín-cinasa (con una actividad de 0.0123-0.0142 nmol/minuto/mg) se encargan de convertir rápidamente este substrato en timidín-monofosfato, difosfato y trifosfato (TMP, TDP, TTP) según reportaron Aldritt *et al.* (1985). La conversión a TTP asegura una rápida incorporación al DNA de la marca radioactiva.

Se ha empleado un sistema de incorporación a 0°C para eliminar el efecto de la acumulación de metabolitos de timidina y estudiar así realmente la toma del substrato. En el caso de timidina se ha determinado que la incorporación es llevada a cabo con alta afinidad (80% de la incorporación total de timidina a 0°C, $K_m = 50 \mu M$) y de modo específico y saturable por un transportador llamado Tipo 1, mismo que puede ser inhibido por timina ($K_i = 30 \mu M$), uracilo ($K_i = 45 \mu M$), timidina, deoxiuridina y uridina ($K_i = 64-96 \mu M$). Estos datos sugieren que el mismo



transportador funciona en la toma de uracilo, uridina y timidina, reconociendo al oxígeno en posición 4 del anillo de pirimidina (Davey *et al.*, 1991).

Empleando un sistema semejante se reportó posteriormente la presencia de un transportador de nucleósidos de amplio espectro llamado Tipo 2, el cual muestra afinidad por ribonucleósidos y 2'-deoxirribonucleósidos con una ligera preferencia por los purina-ribonucleósidos (el transportador reconoce al anillo β -furanosil, particularmente los nitrógenos 1 y 3 del anillo pirimídico, y 9 y 7 del púrico), de manera que su actividad sólo favorece entre un 12 y 26 % del influjo total de timidina a 0°C, ya que grandes cantidades de esta ($K_i = 205 \pm 90 \mu\text{M}$) son requeridas para inhibir la toma de deoxicitidina (Davey *et al.*, 1992).

Otro transportador llamado transportador Tipo 3 fue detectado usando estrategias similares, este último transportador muestra una constante de afinidad sumamente baja para la toma de bases y además es incapaz de transportar nucleósidos; para el caso de timidina se encarga del transporte de menos de 10 % de la timidina total que entra al trofozoíto. Este transportador, por su baja afinidad, se ha sugerido que se encarga de la excreción de bases como la timina, pues esta no es utilizable por trofozoítos de *Giardia* y se genera del metabolismo de timidina y uridina, se ha sugerido que el mismo metabolismo genera un gradiente alto de concentración mismo que favorece la expulsión (Ey *et al.*, 1992)

Para los tres transportadores se lleva a cabo una difusión facilitada puesto que existe una saturación en el estado-estable (a concentración idéntica dentro y fuera del trofozoíto) de manera que nunca se observa transporte a contragradiante; además el transporte activo virtualmente cesa a 0°C.

Para el caso de la uridina Aldritt *et al.* en 1985 observaron que a 37°C trofozoítos de *Giardia* incorporan altos niveles de uridina y uracilo a rangos de 2.25 pmol/minuto/ 1×10^6 células, en tanto que la timidina se incorpora en menor proporción (0.2 pmol/minuto/ 1×10^6 células), además se encontró una alta conversión entre los nucleósidos de uridina y nucleótidos de citidina. En el mismo reporte también se observó la actividad citosólica de la enzima uracil fosforribosil-transferasa, la cual es responsable del salvamento y conversión de uracilo a UMP. También se encontró actividad de uridina fosfotransferasa misma que también da lugar a la formación de UMP, pero no hay uridín- o citidín-cinasas. La presencia e importancia de la enzima uracil fosforribosil transferasa se corroboró más tarde por Vitti *et al.* (1987) y Jiménez y O'sullivan (1994). Así



mismo, la cantidad de uridina y uracilo puede verse afectada por la actividad del transportador Tipo I previamente comentado.

A la luz de los resultados y de la evidencia reportada, las diferencias observadas en la incorporación de timidina y uridina no fueron del todo debidas a diferencias en la toma de nucleótidos (pues no existe aparentemente razón para que este se vea alterado), sino al metabolismo intracelular de los mismos y a la alteración e interconversiones que éstos sufren aún de modo independiente del fármaco, de modo que enmascaran mucho los efectos del mismo.

En relación a la toma de cisteína, el empleo de un sistema donde la adición de sulfato de bactocuproína previene la autooxidación de la cisteína ha permitido el crecimiento de trofozoítos de *Giardia* en concentraciones bajas de este aminoácido. En estas condiciones la toma de cisteína se lleva a cabo por dos sistemas de transporte que dan lugar a un comportamiento no saturable con una capacidad de 3.7 pmoles/ trofozoíto/ minuto/ μ M de cisteína. En dicho transporte aparentemente predomina la actividad de difusión pasiva; sin embargo, el transporte es ligeramente inhibido por metionina, cisteína y homocisteína de manera que se indica la posibilidad de un transportador que reconoce aminoácidos con azufre como parte de la molécula (Luján y Nash, 1994). Por otra parte los experimentos realizados en esta tesis en cuanto a la incorporación de este aminoácido fueron hechos en presencia de bajas cantidades de cisteína no radiomarcada, la cual es indispensable para el adecuado crecimiento del parásito y que, no puede ser substituida totalmente por la forma radioactiva y esto posiblemente inhibiría también la incorporación de dicha marca. No obstante, al tratarse de un sistema donde predomina la difusión pasiva, ambas formas fueron incorporadas en las proteínas recién sintetizadas y la ausencia de diferencias observadas es debida a que la síntesis general de proteínas no se ve afectada por el fármaco.

En cuanto a las perspectivas de trabajo que se desarrollaron con base a los resultados obtenidos en la presente tesis, se presentó la necesidad de clonar la cepa WB inducida a resistencia y contar así con un modelo más homogéneo de estudio para posteriormente analizar la sensibilidad a fármacos de uso frecuente en el tratamiento de giardiosis no relacionados químicamente con el fármaco con el cual se indujo la resistencia (albendazol), con el fin de obtener datos referentes a una posible resistencia cruzada o multirresistencia. En este sentido ha sido observado un fenotipo multirresistente en resultados preliminares (datos no mostrados). Así mismo, se observó la citolocalización de fármacos autofluorescentes en trofozoítos de las cepas y clonas tanto sensibles

como resistentes. Además, se pretende realizar transferencias a papel de nitrocelulosa de corrimientos electroforéticos en una y dos dimensiones, las cuales serán empleadas para realizar inmunotransferencias con anticuerpos contra α - tubulina, α -tubulina acetilada, β -tubulina y PgP. Las inmunotransferencias serán realizadas en más de una cepa resistente y en las clonas seleccionadas.

Una vez obtenidos resultados de los experimentos antes mencionados, éstos ofrecerán bases para proponer estrategias que permitan estudiar el mecanismo o mecanismos de resistencia presentes en *Giardia*, así como elegir (si es que hay más de uno) aquel que sea de mayor relevancia. De dicha proteína se iniciará el proceso de diseño de oligonucleótidos específicos para posteriores experimentos de hibridación tipo Northern blot y Southern blot. Del mismo modo se pretende realizar la clonación del gen de la β -tubulina y posiblemente de genes emparentados con *mdr* que codifican para PgP u otras proteínas similares.



CONCLUSIONES

- ◇ El cultivo, criopreservación y clonación realizados permitieron un manejo adecuado de las cepas, aislados y clonas obtenidas bajo las condiciones empleadas. Así mismo, las clonas obtenidas mostraron estadísticamente que el número obtenido es apropiado para ser consideradas como tales.
- ◇ La solubilidad de los fármacos únicamente fue posible en sustancias no polares como el DMSO y la DMFM. Esta última fue empleada como solvente del fármaco a partir del cual se hicieron las soluciones patrón y de trabajo, para finalmente ajustarse en el medio de cultivo a la concentración necesaria.
- ◇ Los métodos de viabilidad evaluados mostraron patrones dosis-respuesta característicos para cada uno de ellos. La única excepción fue la formación de colonias en medio semisólido de agarosa. Dicho método mostró una reproducibilidad muy baja, posiblemente debido a la posibilidad de que se presenten diferentes capacidades en cada trofozoíto para formar o no colonias en el medio semisólido de agarosa.
- ◇ No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos para las cepas P1 y WB ante cada método probado, con excepción de la reducción de MTT que fue el menos sensible de los evaluados.
- ◇ Los métodos bioquímicos evaluados fueron reproducibles, aunque menos sensibles que el método de subcultivo en medio líquido y la evaluación de la alteración morfológica que se encontró que fueron más apropiados para evaluar el efecto de los fármacos empleados.
- ◇ Los datos obtenidos muestran indicios de la importancia que tiene el mecanismo de acción del fármaco para la elección del método de evaluación de viabilidad a emplear, ya que el mecanismo de acción de los bencimidazoles tiene lugar a nivel de microtúbulos (β -tubulina). Los resultados indican que, aunque los trofozoítos se encuentren aún vivos después del tratamiento con



albendazol a las concentraciones probadas, ya no resultan viables puesto que carecen de la capacidad de replicarse y dar lugar a una nueva población.

- ◇ Tanto el método de subcultivo como la evaluación de la alteración morfológica resultaron ser económicos, sencillos, reproducibles, sensibles y eficientes. Sin embargo, al ser evaluados en forma paralela se observó que el subcultivo en medio líquido fue ligeramente menos sensible que la evaluación de la alteración morfológica.
- ◇ El empleo de los diferentes bencimidazoles permitió la obtención de curvas dosis-respuesta para trofozoítos de la cepa WB por el método de evaluación de la alteración morfológica, encontrándose diferentes niveles de toxicidad para cada uno de ellos, de manera que el orden de efectividad observado fue el siguiente: Nocodazol > Albendazol > Mebendazol > Oxibendazol >> Tiabendazol >> Bencimidazol (las DL_{50} calculadas fueron: 0.048, 0.078, 0.111, 0.24, 18.0 y 5830.0 μ M, respectivamente). La mayoría de los fármacos evaluados corresponden al grupo de los bencimidazol carbamatos por contener este grupo como substituyente en la posición del segundo radical (R-2) y las únicas excepciones son el tiabendazol y bencimidazol, mismos que resultaron ser los menos efectivos en las condiciones evaluadas. Esto sugiere la gran importancia giardicida atribuible al grupo carbamato en esa posición.
- ◇ Al emplear combinaciones de MIC y fracciones de estas de distintos fármacos del grupo de los bencimidazoles se observó para las combinaciones de Nocodazol- Albendazol y Nocodazol- Oxibendazol una interacción de tipo indiferente, en tanto que para el resto de las combinaciones se observó un antagonismo moderado.
- ◇ Las evaluaciones transversales de sensibilidad a DL_{50} de albendazol y mebendazol permitieron identificar algunas clonas con sensibilidad diferencial respecto al cultivo parental en el momento de la evaluación. En las condiciones empleadas se pudieron observar diferencias de sensibilidad dentro de un rango reducido de viabilidad. El orden de variabilidad observado entre las diferentes cepas y aislados considerando su conjunto de clonas fue el siguiente: WB > P1 > IMSS-2 > IMSS-3 > CIEA-52 > CIEA-10.



- ◊ En las evaluaciones longitudinales de sensibilidad a DL_{50} de albendazol y mebendazol se observó una variación recurrente en la viabilidad observada tanto en las clonas como en las cepas y aislados. El tratamiento con mebendazol desarrolló una variabilidad menor de la que se observó ante albendazol, y no pareció existir una relación entre el estado de sensibilidad o tolerancia a los dos diferentes fármacos. El orden de variabilidad observado entre las diferentes cepas y aislados considerando su conjunto de clonas fue el mismo que el observado para el análisis transversal.
- ◊ El método de selección de trofozoítos resistentes que permitió obtener cultivos con diferencias significativas de sensibilidad ante albendazol y mebendazol fue el cultivo permanente en concentración subletal creciente. Por este procedimiento se obtuvieron cultivos de las cepas WB y P1 resistentes a dosis entre 0.18 y 0.2 μM de albendazol y mebendazol. Los resultados obtenidos muestran resistencia cruzada por parte de la cepa sensible a mebendazol a la misma dosis de albendazol.
- ◊ Trofozoítos seleccionados como deficientes en adhesión por mutagénesis con nitrosoguanidina y cultivo en colchicina (CIEA-C7) también mostraron diferencias con respecto a la cepa parental, pero no tan amplias como las de las cepas antes mencionadas. Esta resistencia puede ser debida a modificaciones a nivel de microtúbulos, pues este es el sitio de unión tanto de los bencimidazoles como de la colchicina.
- ◊ Los procedimientos de mutagénesis por exposición a colchicina y a luz UV no fueron lo suficientemente eficientes para permitir la obtención de trofozoítos con diferente sensibilidad a la observada por la cepa parental.
- ◊ La replicación de DNA en condiciones basales (en ausencia de fármaco) fue observada como alta para la cepa WB y disminuida para la WB-RA, lo cual es un indicio de la menor capacidad replicativa que muestra esta última como modificación en su condición de resistencia. En presencia de albendazol, la incorporación del precursor timidina se vio reducida.



- ◊ La transcripción de RNA (medida en función de la incorporación de uridina) en condiciones basales en la cepa WB mostró una mayor incorporación que la WB-RA. Por su parte, la cepa WB-RA en presencia de fármaco incrementó significativamente la incorporación de este precursor, lo cual hace suponer una posible respuesta a nivel de RNA, sugerentemente de mensajeros específicos inducidos por esta condición de estrés a la cual la cepa se encuentra adaptada.

- ◊ La incorporación de cisteína no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las cepas sensible y resistente en condiciones con o sin fármaco.



APÉNDICE

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

Bilis bovina bacteriológica (Sigma)	0.5 g
Tripticasa (casein digest peptone BBL)	20.0 g
Extracto de levadura (BBL)	10.0 g
Dextrosa (Baker)	10.0 g
Cloruro de sodio	2.0 g
Cisteína - monoclóhidrato	2.0 g
Acido ascórbico (Merck)	0.1 g
Fosfato de potasio monobásico (Baker)	0.6 g
Fosfato de potasio dibásico (Baker)	1.0 g
Citrato férrico de amonio (Baker)	23.0 mg

- ◇ Se disolvió en agua bidestilada estéril hasta 800 ml.
- ◇ Se ajustó el pH de 6.8 - 6.9 y se aforó a 900 ml.
- ◇ Se filtró en membrana de 0.22 mm de diámetro de poro (Whatmann).
- ◇ Se realizó la prueba de esterilidad por incubación del volumen total a 37°C por 8-14 hrs.
- ◇ Pudo ser o no almacenado en este estado hasta por dos semanas a 4°C.
- ◇ Se completó con 100 ml de suero bovino descomplementado (HyClone) y 1 ml de stock de penicilina (50,000 U. I.), estreptomina (50 mg).
- ◇ Se almacenó a 4°C hasta su uso.

Se mantiene estable hasta por dos semanas una vez completado.

Para su uso en el marcaje con cisteína se adicionó al medio de cultivo únicamente 0.6 g de cisteína monohidrato fría, más la marcada radioactivamente.



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
ó dodecahidratado	28.98 g
Fosfato de potasio monobásico	2.0 g

- ◇ Se disolvieron los ingredientes en agua destilada hasta 800 ml.
- ◇ Se ajustó el pH a 7.2 y se aforó a 1 litro.
- ◇ Para su uso a 1 X se disolvió 1:10 en agua destilada
- ◇ Tanto la solución 10X como 1X se esterilizaron en autoclave antes de su uso.

Es estable varias semanas.

PREPARACIÓN DE COLORANTES FLUOROGENICOS (FDA - PI)

SOLUCIÓN STOCK DE FDA (Diacetato de fluoresceína).

FDA	10 mg
Acetona (CH_3COCH_3)	1 ml

- ◇ Se almacenó a 0°C protegido de la luz.

SOLUCIÓN DE TRABAJO DE FDA (40 $\mu\text{g/ml}$).

Solución stock de FDA	40 ml
PBS	10 ml

- ◇ Se almacena a 4°C en oscuridad.



SOLUCIÓN STOCK DE PI (Yoduro de propidio, 30 mg/ml).

PI	1.5 mg
PBS	50 ml

- ◇ Se almacena a -4 °C en oscuridad.
- ◇ La solución de trabajo de PI es la misma solución stock (30 mg/ml).

PREPARACIÓN DE BROMURO DE DIFENIL TETRAZOLIO (MTT)

PMS (Metasulfato de fenazina)	5 mg/ml de PBS
MTT (Bromuro de difenil tetrazolio)	0.05 % en PBS

SOLUCIÓN PARA EMISIÓN DE CENTELLEO

Para preparar 1 litro:

Obnifluor : tolueno 0.4 % p/v	40 g / 700 ml
Tritón X 100 a alcanzar 30 % del total	300 ml



PREPARACIÓN DE ÁCIDO TRICLOROACÉTICO AL 10 % (V/V)

Para preparar 100 ml:

Ácido tricloroacético	10 ml.
Agua bidestilada estéril	90 ml.

- ◇ Una vez preparado se filtró para eliminar impurezas.

CRIOPRESERVACIÓN DE TROFOZOITOS DE *G. duodenalis* EN N₂ LIQUIDO

- ◇ Se cultivaron los trofozoitos en medio TYI-S-33 hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento.
- ◇ Se enfriaron los tubos de cultivo en un baño de hielo-agua.
- ◇ Se centrifugó el medio con trofozoitos a 210 x g durante 10 minutos a 4°C dentro de tubos Falcon® de 15ml
- ◇ Se retiró el sobrenadante.
- ◇ Se agregó medio con DMSO al 10 %, un mililitro por cada 5×10^6 trofozoitos aproximadamente y fueron resuspendidos cuidadosamente.
- ◇ Se transfirió el contenido a criotubos Nunc® de 2 ml. y se enfriaron en baño de hielo agua.
- ◇ Se almacenó los criotubos en ultracongelador a -70°C aproximadamente 24 hrs.
- ◇ Se transfirieron los criotubos a inmersión en nitrógeno líquido donde se almacenaron hasta su descongelación.

Son viables por varios años



DESCONGELACIÓN

- ◇ Los criotubos fueron descongelados a TA o en baño hielo-agua.
- ◇ Se transfirió el contenido del criotubo a un tubo cónico de 15 ml conteniendo 14 ml de medio TYI-S-33 fresco
- ◇ Se centrifugó a $210 \times g$ durante 5 minutos a 4°C o en ocasiones a TA
- ◇ Se decantó el sobrenadante llenándose nuevamente el tubo de cultivo con 15 ml de medio fresco.
- ◇ Se revisó los trofozoítos al microscopio óptico para verificar la adhesión celular y la motilidad del cultivo.
- ◇ Se incubó a 37°C por 4-24 hrs.
- ◇ Se cambió el medio de cultivo para eliminar las células muertas y los residuos finales de DMSO.

PREPARACIÓN DE MEDIO LURIA

Para asegurar la esterilidad de los cultivos y fármacos empleados se incubaron alícuotas de $15 \mu\text{l}$ de los mismos por al menos 24 hrs en Medio Agar Luria preparado como sigue (preparado en la Cocina del Departamento de Genética):

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
Bactoagar	15 g

- ◇ Se disolvió en 800 ml de agua bidestilada y se ajustó el pH a 7.5 con NaOH.
- ◇ El medio fue aforado a un litro y esterilizado en autoclave.
- ◇ Se decantó aún caliente y líquido sobre cajas petri de plástico estériles donde el agar solidificó, para finalmente almacenarse a 4°C hasta su uso
- ◇ Previamente a ser empleadas se preincubaban a 37°C para asegurar su esterilidad.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abaza, SM; Sullivan, JJ; Visvesvara, GS. 1991. Isoenzyme profiles of four strains of *Giardia lamblia* and their infectivity to jirds. *Am J Trop Med Hyg* 44 (1): 63-8.
- Abbaszadegan, M; Gerba, CP; Rose, JB 1991. Detection of *Giardia* cysts with a cDNA probe and applications to water samples. *Appl Environ Microbiol* 57 (4): 927-31.
- Ackers, JP 1980. Giardiasis: basic parasitology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74 (4): 427-8.
- Adam, RD; Aggarwal, A; Lal, AA; de la Cruz, VF; McCutchan, T; Nash, TE. 1988. Antigenic variation of a cysteine-rich protein in *Giardia lamblia*. *J Exp Med* 167: 109-18.
- Adam, RD. 1991. The biology of *Giardia spp.* *Microb Rev* 55 (5): 706-32.
- Adam, RD. 1992. Chromosome-size variation in *Giardia lamblia*: the role of rDNA repeats. *Nucleic Acids Res* 20 (12): 3057-61.
- Adam, RD; Nash, TE; Wellems, TE 1991. Telomeric location of *Giardia* rDNA genes. *Mol Cell Biol* 11 (6): 3326-30.
- Addiss, DG.; Mathews, HM; Stewart, JM; Wahlquist, SP; Williams, RM; Finton, RJ; Spencer, HC; Juraneck, DD. 1991. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for *Giardia lamblia* antigen in stool. *J Clin Microbiol* 29 (6): 1137-42.
- Aggarwal, A; Nash, TE. 1988. Antigenic variation of *Giardia lamblia* *in vivo*. *Infect Immun* 56: 1420-3.
- Aggarwal, A; Merritt, JW; Nash, TE. 1989. Cysteine-rich variant surface proteins of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* 32: 39-48.
- Aggarwal, A; de la Cruz, VF; Nash, TE. 1990. A heat shock gene in *Giardia lamblia* unrelated to HSP70. *Nucl Acids Res* 18 (11): 3409.
- Alamillo, HT; Cortez, CA; Flores, LA; Gómez, BD; Medina, SR; Flisser, A; Jiménez, CJM; Jiménez, CE. 1995. Estudio piloto acción farmacológica de praziquantel *in vivo* en la giardiosis y amibiosis. En: *Memorias del Primer Encuentro Nacional de Giardiosis*. Coords: Bernal, RR y Ortega, PMG pp 18.
- Aldritt, SM; Tien, P; Wang, CC. 1985. Pyrimidine salvage in *Giardia lamblia*. *J Exp Med* 161: 437-45.
- Allen, MD; Cady, FB. 1982. *Analyzing Experimental Data by Regression*. Lifetime Learning Publications. California, EEUU 394 p.
- Al-Tukhi, MH; Ackers, JP; Al-Ahdal, MN; Peters, W. 1993. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of anti-*Giardia* specific immunoglobulin G in filter paper blood samples. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 87: 36-8.
- Al-Waili, NS; Al-Waili, BH; Meloni, BP. 1988. Therapeutic use of mebendazole in giardial infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82: 438.
- Al-Waili, NSD; Hasan, NV. 1992. Mebendazole in giardial infection: A comparative study with metronidazole *J Infect Dis* 165 (6): 1170-1.
- Andrews, BJ; Mylvaganam, H; Yule, A. 1994. Sensitivity of *Trichomonas vaginalis*, *Tritrichomonas foetus* and *Giardia intestinalis* to bacitracin and its zinc salt *in vitro*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88 (6): 704-6.
- Andrews, BJ; Panitescu, D; Jipa, GH; Vasile, BAC; Vasiliu, RP; Ronnevig, JR. 1995. Chemotherapy for giardiasis: randomized clinical trial of bacitracin, bacitracin zinc, and a combination of bacitracin zinc with neomycin. *Am J Trop Med Hyg* 52 (4): 318-21.
- Archibald, SC; Mitchell, RW; Upcroft, JA; Boreham, PFL; Upcroft, P. 1991. Variation between human and animal isolates of *Giardia* as demonstrated by DNA fingerprinting. *Int J Parasitology*, 21 (1), 123-124.
- Awadalla, HN; el-Gowhary, SH; Sadaka, HA; Khalifa, AM. 1995. Aminosidine sulphate in experimental giardiasis. *J Egypt Soc Parasitol* 25 (1): 53-61.



- Ayala, DE; Hermida, RC. 1987. Circannual variation in the incidence of Giardiasis: illustrative rationale for timing intervention for health education, *Chronobiol Int* 14: 149.
- Baker, JR. 1989. Sexual processes in parasitic protozoa. *Int J Parasitol* 19 (5): 465-72.
- Barr, SC; Bowman, DD; Erb, HN. 1992. Evaluation of two test procedures for diagnosis of giardiasis in dogs. *Am J Vet Res* 53 (11): 2028-31.
- Barr, CS; Bowman, DD; Heller, RL; Herb, HN 1993. Efficacy of albendazole against giardiasis in dogs. *Am J Vet Res* 54 (6): 926-928.
- Barr, SC; Bowman, DD; Heller, RL 1994. Efficacy of fenbendazole against giardiasis in dogs. *Am J Vet Res* 55 (7): 988-90.
- Baum, KF; Berens, RL; Jones, RH; Morr, U. 1988. A new method for cloning *Giardia lamblia*, with a discussion of the statistical considerations of limiting dilution. *J Parasitol* 74 (2): 267-9.
- Baum, KF; Berens, RL; Marr, JJ. 1993. Purine nucleoside and nucleobase cell membrane transport in *Giardia lamblia*. *J Euk Microbiol* 40 (5): 643-9.
- Baveja, UK; Bhatia, VN; Warhurst, DC. 1998. *Giardia lamblia*: in-vitro sensitivity to some chemotherapeutic agents. *J Commun Dis* 30 (2): 79-84.
- Bell, CA; Cory, M; Fairley, TA; Hall, JE; Tidwell, RR. 1991. Structure-activity relationships of pentamidine analogs against *Giardia lamblia* and correlation of anti-giardial activity with DNA-binding affinity. *Antimicrob Agents Chemother* 35 (6): 1099-107.
- Bell, CA; Dykstra, CC; Naiman, NA; Cory, M; Fairley, TA; Tidwell, RR. 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. *Antimicrob Agents Chemother* 37 (12): 2668-73.
- Bernal, RR; Hernández, SG; Gámez, AA; Ramírez, HE. 1995. Giardiosis infantil en un hospital de concentración. En: *Memorias del Primer Encuentro Nacional de Giardiosis*. Coords: Bernal, RR y Ortega, PMG pp 14.
- Bertram, MA; Meyer, EA; Lile, JD; Morse, SA. 1983. A comparison of isozymes of five axenic *Giardia* isolates. *J Parasitol* 69: 793-801.
- Bhopale, KK; Pradhan, KS; Phaltankar, PG; Masani, KB; Kaul, CL. 1993. Activity of a new oxadiazole compound, against experimental infections with *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* in animal models. *Ann Trop Med Parasitol* 87 (2): 169-78.
- Bier, JW. 1991. Isolation of parasites on fruits and vegetables. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 22 Suppl: 144-5.
- Bifulco, JM; Schaefer, FW III. 1993. Antibody-magnetite method for selective concentration of *Giardia lamblia* cysts from water samples. *Appl Environ Microbiol* 59 (3): 772-6.
- Bingham, AK; Jarroll, EL; Meyer, EA 1979. *Giardia sp.*: physical factors of excystation *in vitro*, and excystation vs. eosin exclusion as determinants of viability. *Exp parasitol* 47: 284-91.
- Bloch, MA; Johnson, KA; 1995. Identification of a molecular chaperone in the eukaryotic flagellum and its localization to the site of microtubule assembly. *J Cell Sci* 108: 3541-5.
- Boghdadi, AM; el-Sehly, A, el-D; Tadros, MB; Mansour, NS. 1988. Use and limitations of the enterotest in the diagnosis of *Giardia lamblia*. *J Egypt Soc Parasitol* 18 (1): 273-8.
- Boreham, PFL; Phillips, RE; Sheperd, RW 1984. The sensitivity of *Giardia intestinalis* to drugs *in vitro*. *J Antimicrob Chemother* 14: 449-61.
- Boreham, PFL; Phillips, RE; Sheperd, RW. 1987. Heterogeneity in the response of clones of *Giardia intestinalis* to anti-giardial drugs. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 406-407.
- Boreham, PFL, Phillips, RF; Sheperd, RW. 1988a. Altered uptake of metronidazole *in vitro* by stock of *Giardia intestinalis* with different drug sensitivities. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82: 104-6.
- Boreham, PFL, Smith, NC; Sheperd, RW. 1988b. Drug resistance and the treatment of giardiasis. En: *Advances in Giardia Research*. Ed. PM Willis and



- BR Hammond University of Calgary, Press Calgary 3-7.
- Boreham, PFL; Upcroft, JA; Upcroft, P. 1990. Changing approaches to the study of *Giardia* epidemiology: 1681-2000. *Int J Parasitol* 20 (4): 479-87.
- Boreham, PFL; Upcroft, JA. 1991. The activity of azitromycin against stocks of *Giardia intestinalis* *in vitro* and *in vivo*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85: 620-1.
- Boreham, PFL; Upcroft, JA; Upcroft, P. 1991. Biochemical and molecular mechanisms of resistance to nitroheterocyclic drugs in *Giardia intestinalis*. En: Coomb GH; North MJ (eds). *Biochemical Protozoology*. Taylor and Francis, London UK pp. 595-604.
- Bulinski, JCh; Richards, JE; Piperno, G. 1988. Posttranslational modifications of α -tubulin: detyrosination and acetylation differentiate populations of interphase microtubules in cultured cells. *J Cell Biol* 106: 1213-20.
- Buret, A; Hollander, N; Wallis, PM; Befus, D; Olson, ME. 1990. Zoonotic potential of *Giardiasis* in domestic ruminants. *J Inf Dis* 162: 231-7.
- Butcher, PD; Cevallos, AM; Carnaby, S; Alstead, EM; Swarbrick, ET; Farthing, MJ. 1994. Phenotypic and genotypic variation in *Giardia lamblia* isolates during chronic infection. *Gut* 35 (1): 51-4.
- Callahan, HL; Beverley, SM. 1991. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoprotein in *Leishmania*. *J Biol Chem* 266: 18427-30.
- Campbell SR; van Keulen, H; Erlandsen, SL; Senturia, JB; Jarroll, EL. 1990. *Giardia sp.*: Comparison of electrophoretic karyotypes. *Exp Parasitol* 71 (6): 470-82.
- Carrada BT. 1984. *Giardiasis* intestinal. *Epidemiología (Primera de dos partes)*. *Revista Mexicana de Pediatría*: 497-505.
- Carnaby, S; McHugh, TD; Farthing, MJG. 1991. DNA fingerprinting of *Giardia lamblia* with the M13 bacteriophage genome. *Gut* 32 (5): A596-7.
- Carter, CH; Bayles, A; Thompson, PE. 1962. Effects of paramomycin sulfate in man against *Entamoeba histolytica* and other intestinal protozoa. *Am J Trop Med Hyg* 84: 249-50.
- Castor, SB; Lindvist, KB 1990. Canine giardiasis in Sweden: no evidence of infectivity to man. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84: 249-50.
- Cavalier ST. 1987. Eukaryotes with no mitochondria. *Nature* 326: 332-3.
- Cedillo, RR; Enciso, MJA; Martínez, PA; Ortega, PMG. 1991. Isolation and axenization of *Giardia lamblia* isolates from symptomatic and asymptomatic patients in Mexico. *Arch Invest Med* 22: 79-85.
- Cedillo, RR; Muñoz, O. 1992. *In vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *J Med Microbiol* 37:221-4.
- Cedillo, RR; Hernández, CA; Tapia, CA; Sánchez, R; Castillo, R; Yépez, ML; Muñoz, O. 1995. Susceptibilidad *in vitro* de trofozoitos de *Giardia lamblia* a nuevos metil-bencimidazoles. En: *Memorias del Primer Encuentro Nacional de Giardiasis*. Coords: Bernal, RR y Ortega, PMG pp 20.
- Char, S; Farthing, MJG. 1992. Codon usage in *Giardia lamblia*. *J Protozool* 35 (9): 642-4.
- Chaudhuri, P; De, A; Bhattacharya, A; Pal, SC; Das, P 1991. Identification of heterogeneity in human isolates of *Giardia lamblia* by isoenzyme studies. *Int J Med Microbiol* 274 (4): 490-5.
- Chavez, B; Cedillo, RR; Martinez, PA. 1992. *Giardia lamblia*: Ultrastructural study of the *in vitro* effect of bencimidazoles. *J Protozool* 39 (4): 510-5.
- Coggins, JR; Shaefer, FWIII. 1986. *Giardia muris*: Ultrastructural analysis of *in vitro* excystation. *Exp Parasitol* 61: 219-28.
- Cole, SPC; Bhardwaj, G; Gerlach, JH; Mackie, JE; Grant, CE; Almquist, KC; Stewart, AJ; Duncan, AMV; Deeley, RG. 1992. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258: 1650-4.



- Cole, SPC; Sparks, KE; Fraser, K; Loe, DW; Grant, CE; Wilson, GM; Deeley, RG. 1994. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res* 54: 5902-10.
- Cox, FEG. 1981. A new classification of the parasitic protozoa. *Protozool Abstracts* 5: 9-14.
- Crouch, AA; Seow, WK; Thong, YH. 1986. Effect of twenty-three chemotherapeutic agents on the adherence and growth of *Giardia lamblia* *in vitro*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80: 893-6.
- Crouch, AA; Seow, WK; Whitman, LM; Thong, YH. 1990. Sensitivity *in vitro* of *G. intestinalis* to dyadic combinations of azitromycin, doxycycline, mefloquine tinidazole and furazolidone. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84:246-8.
- Crossley, R; Marshall, J; Clark, JT; Holberton, DV. 1986. Immunocytochemical differentiation of microtubules in the cytoskeleton of *Giardia lamblia* using monoclonal antibodies to α -tubulin and polyclonal antibodies to associated low molecular weight proteins. *J Cell Sci* 80: 233-52.
- Davey, RA; Ey, PL; Mayrhofer, G. 1991. Characteristics of thymidine transport in *Giardia intestinalis* trophozoites. *Mol Biochem Parasitol* 48: 163-71.
- Davey, RA; Mayrhofer, G; Ey, PL. 1992. Identification of a broad-specificity nucleoside transporter with affinity for the sugar moiety in *Giardia intestinalis* trophozoites. *Biochem Biophys Acta* 1109 (2): 172-8.
- Davidson, R A. 1984. Issues in clinical parasitology: the treatment of giardiasis. *Am J Gastroenterol* 79: 256-61.
- Davis, C; Gull K. 1983. Protofilament number in microtubules in cell of two parasitic nematodes. *J Parasitol* 69: 1094-9.
- Dean, M; Allikments, R. 1995. Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Biol* 5: 779-85.
- De Jonckheere, JF; Mejewska, AC; Kasprzak, W. 1990. *Giardia* isolates from primates and rodents display the same molecular polymorphism as human isolates. *Mol Biochem Parasitol* 39: 23-8.
- Delgado, PV; Brugerolle, G; Viscogliosi, E. 1996. Tubulin post-translational modifications in the primitive protist *Trichomona vaginalis*. *Cell Motil Cytoskeleton* 33: 288-97.
- Diamond, LS; Harlow, D; Cunnick, CC. 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 4: 431-2.
- Diamond, LS. 1995. Cryopreservation and storage of parasitic protozoa in liquid Nitrogen. *J Euk Microbiol* 42 (5): 585-90.
- Driscoll, M; Dean, E; Reilly, E; Bergholz, E; Chalfie, M. 1989. Genetic and molecular analysis of a *Caenorhabditis elegans* β -tubulin that conveys benzimidazole sensitivity. *J Cell Biol* 109 (6): 2993-3003.
- Drouin, G; Moniz, SM; Zuker, M. 1995. The *Giardia lamblia* actin gene and the phylogeny of eukaryotes. *J Mol Evol* 41 (6): 841-9.
- Dutt, P; Mehta, S; Vinayak, VK. 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay for copro-diagnosis of giardiasis and characterisation of a specific *Giardia lamblia* antigen in stools. *J Med Microbiol* 34 (5): 271-5.
- Edlind, TD. 1989a. Tetracyclines as antiparasitic agents: lipophilic derivatives are highly active against *Giardia lamblia* *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 33 (12): 2144-5.
- Edlind, TD. 1989b. Susceptibility of *Giardia lamblia* to aminoglycoside protein synthesis inhibitors: correlation with rRNA structure. *Antimicrob Agents Chemother* 33 (4): 484-8.
- Edlind, TD; Hang, TL; Chakraborty, PR. 1990. Activity of the anthelmintic benzimidazoles against *Giardia lamblia* *in vitro*. *J Infect Dis* 162: 1408-11.
- Edlind, T; Visvesvara, G; Li, Jing; Katiyar, S. 1994. *Cryptosporidium* and microsporidial β -tubulin sequences: predictions of benzimidazole sensitivity and phylogeny. *J Euk Microbiol* 41(5): 38S.



- Edwards, DI; Thompson, EJ; Tomusange, J; Shanson, D. 1979. Inactivation of metronidazole by aerobic organisms. *J Antimicrobiol Chemother* 5: 315-6.
- Enos, A; Coles, GC. 1990. Effect of benzimidazole drugs on tubulin in benzimidazole resistant and susceptible strains of *Caenorhabditid elegans*. *Int J Parasitol* 20 (2): 161-167.
- Erlandsen, SL; Bemrick, WJ. 1987. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. *J Parasitol* 73: 623-9.
- Erlandsen, SL; Bemrick, WJ; Wells, CL; Feely, DE; Knudson, L; Campell, SR; Keulen, H; Jarroll, EL. 1990. Axenic culture and characterization of *Giardia ardae* from the Great Blue Heron (*Ardea herodias*). *J Parasitol* 76 (5): 717-24.
- Espinosa, LA; Maldonado, RR; Espinoza, LM. 1993. Mecanismos de reparación de daños a la molecula del ácido desoxirribonucleico. *Rev Lat-Amer Microbiol* 35: 117-36.
- Ey, PL; Davey, RA; Duffield, GA. 1992. A low-affinity nucleobase transporter in the protozoan parasite *Giardia intestinalis*. *Biochem Biophys Acta* 1109 (2): 179-86.
- Ey, PL; Darvey, JM; Andrews, RH; Mayrhofer, G. 1993. *Giardia intestinalis*: Detection of major genotypes by restriction analysis of gene amplification products. *Int J Parasitol* 23 (5): 591-600.
- Farbey, MD; Reynoldson, JA; Thompson, RCA. 1995. *In vitro* drug susceptibility of 29 isolates of *Giardia duodenalis* from human as assessed by an adhesion assay. *Int J Parasitol* 25 (5): 293-9.
- Farthing, MJG. 1993. Diarrhoeal disease: current concepts and future challenges. *Pathogenesis of giardiasis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87 (supp 3): 17-21.
- Farthing, MJG. 1996. Giardiasis. *Gastroenterol Clinics North Am* 25: 493-515.
- Feely, DE; Schollmeyer, JV; Erlandsen, SL. 1982. *Giardia*: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Exp Parasitol* 53: 145-54.
- Ferguson, A; Gillon, J; Thamery, D. 1980. Intestinal abnormalities in murine giardiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74 (4): 443-5.
- Filice FP, 1952, Studies on the citology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *Univ Calif Publ Zool*, 57, 53-143.
- Foote, SJ; Thompson, JK; Cowman, AF; Kemp, DJ. 1989. Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine resistant isolates of *P. falciparum*. *Cell* 57: 921-30.
- Gao, Y; Vainberg, IE; Chow, RL; Cowan, NJ. 1993. Two cofactors and cytoplasmic chaperonin are required for the folding of α - and β -tubulin. *Mol Cell Biol* 13: 2478-85.
- García, L; Hermida RC; Ayala, DE; Arroyave, RJ. 1989. Geographic differences in the circannual incidence of Giardiasis. *J Interdis Cycle Res* 20: 185-6.
- Gault, MJ; Reiner, DS; Gillin, FD. 1985. Tolerance of axenically cultured *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to a variety of antimicrobial agents. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79: 60-2.
- Geary, TG; Nulf, SC; Favreau, MA; Tang, L; Pichard, RK; Hatzenbuehler, NT; Shea, MH; Alexander, SJ; Klein, RD. 1992. Three β -tubulin cDNAs from the parasitic nematode *Hemaonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 50: 295-306.
- Guerreiro, NM; Herrera, PM; de-Escalona, L; de-Kolster, CE; de-Yanes, VG; de-Febres, O; Naveda, O; de-Naveda, M. 1991. *Giardia lamblia*: comparison of two diagnostic methods and evaluation of response to treatment with metronidazole. *G E N* 45 (2): 105-10.
- Gill, JN; Lacey, E. 1992. The kinetics of mebendazole binding to *Haemonchus contortus* tubulin. *Int J Parasitol* 22 (7): 939-46.
- Gillin, FD; Diamond, LS. 1980. Clonal growth of *Giardia lamblia* trophozoites in a semisolid agarose medium. *J Parasitol* 66 (2): 350-2.
- Gillin, FD; Diamond, LS. 1981 Inhibition of clonal growth in *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* by metronidazol, quinacrine, and other anticicrobial agents. *J Antimicrob Chemother* 8: 305-16.



- Gillin, FD; Reiner, DS; McCaffery, M. 1991. Organelles of protein transport in *Giardia lamblia*. *Parasitol Today* 7 (5): 113-6.
- Gillin, FD; Reiner, DS; McCaffery, JM. 1996. Cell biology of the primitive eukariote *Giardia lamblia*. *Annu Rev Microbiol* 50:679-705.
- Goka AK; Rolston, DD; Mathan, VI; Farthing, MJ. 1990. The relative merits of faecal and duodenal juice microscopy in the diagnosis of giardiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84 (1): 66-7.
- Goldin, AJ; Apt, W; Aguilera, X; Zulantay, I; Warhurst, DC; Miles, MA. 1992. A capture ELISA detects *Giardia lamblia* antigens in formalin-treated faecal samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86 (2): 164-5.
- Goldin, AJ; Hall, A; Sarker, RN; Warhurst, DC; Miles, MA. 1993. Diagnosis of *Giardia duodenalis* infection in Bangladeshi infants: faecal antigen capture ELISA. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87 (4): 428-32.
- Goldman, GH; Temmerman, W; Jacobs, D; Contreras, R; Montagu, V; Herrera-Estrella, A. 1993. A nucleotide substitution in one of the β -tubulin genes of *Trichoderma viride* confers resistance to the antimetabolic drug methyl benzimidazole-2-yl-carbamate. *Mol Gen Genet* 240: 73-80.
- Gómez, TJR; Montañéz, DME; Ríos, HL. 1995. *Giardia lamblia* (Breve descripción). En: *Memorias del Primer Encuentro Nacional de Giardiosis*. Coords: Bernal, RR y Ortega, PMG pp 13.
- González, NMC; Belém, LC. 1995. *Giardia lamblia* en niños escolares de la ciudad de Mérida, Yucatán (Estudio preliminar). En: *Memorias del Primer Encuentro Nacional de Giardiosis*. Coords: Bernal, RR y Ortega, PMG pp 12.
- Gordts, B; Hemelhof, W; Asselman, Ch; Buztler, JP. 1985. *In vitro* susceptibility of 25 *Giardia lamblia* isolates of human origin to six commonly used antiprotozoal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 28 (3): 378-80.
- Green, E; Warhurst, D; Williams, J; Dickens, T; Miles, M. 1990. Application of a capture enzyme immunoassay in an outbreak of waterborne giardiasis in the United Kingdom. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9 (6): 424-8.
- Gupta, RS; Aitken, K; Falah, M; Singh, B. 1994a. Cloning of *Giardia lamblia* heat shock protein HSP70 homologs: Implications regarding origin of eukaryotic cells and of endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2895-9.
- Gupta, RS; Golding, GB; Singh, B. 1994b. HSP70 phylogeny and the relationship between Archaeobacteria, Eubacteria, and Eukaryotes. *J Mol Evol* 39 (5): 537-40.
- Hall, A; Nahar, Q. 1993. Albendazole as a treatment for infections with *Giardia duodenalis* in children of Bangladesh. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87: 84-6.
- Hashimoto, T; Nakamura, Y; Kamaishi, T; Nakamura, F; Adachi, J; Okamoto, K; Hasegawa, M. 1995. Phylogenetic place of mitochondrion-lacking protozoan, *Giardia lamblia*, inferred from amino acid sequences of elongation factor 2. *Mol Biol Evol* 12 (5): 782-93.
- Henry, KW; Cruz, MC; Katiyar, SK; Edlind, TD. 1999. Antagonism of azole activity against *Candida albicans* following of multidrug resistance genes by selected antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 43 (8): 1968-74.
- Hermida, RC; Ayala, DE; Arroyave, RJ. 1990. Circannual incidence of *Giardia lamblia* in Mexico. *Chronobiol Int* 7: 329-40.
- Hernández SJ. 1992. Identificación de una molécula de superficie de *Giardia lamblia* de ≈ 200 kDa y su participación en el fenómeno de adherencia. Tesis de Doctorado. Depto de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN México.
- Hill, DR; Pohl, R; Peaterson, RD. 1986. *Giardia lamblia*: A culture method for determining parasite viability. *Am J Trop Med Hyg* 36 (6): 1129-33.
- Homan, WL; van Enckevort FHJ; Limper, L; van Eys, GJJM; Schoone, GJ; Kasprzak, W; Majewska, AC; van Knapen, F. 1992. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. *Parasitol Res* 78: 316-23.



- Hopkins, RM; Deplazes, P; Meloni, BP; Reynoldson, JA; Thompson, RC. 1993a. A field and laboratory evaluation of a commercial ELISA for the detection of *Giardia* coproantigens in humans and dogs. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87 (1): 39-41.
- Hopkins, RM; Thompson, RC; Hobbs, RP; Lymbery, AJ; Villa, N; Smithyman, TM. 1993b. Differences in antigen expression within and between 10 isolates of *Giardia duodenalis*. *Acta Trop* 54 (2): 117-24.
- Hoyne, GF; Boreham, PFL; Parsons, CW; Biggs, B. 1989. The effect of drugs on the cell cycle of *Giardia intestinalis*. *Parasitol* 88: 333-9.
- Inge, PMG; Farthing, MJG. 1987. A radiometric assay for anti-giardial drugs. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 345-7.
- Ikerd, TR; Koletar, SL. 1993. *In vitro* activity of ciprofloxacin, temafloxacin, azithromycin, clarithromycin and metronidazole against *Giardia lamblia*. *J Antimicrob Chemother* 31 (4): 615-7.
- Isaac-Renton, JL. 1991. Laboratory diagnosis of giardiasis. *Clin Lab Med* 11 (4): 811-27.
- Jarroll, EL; Manning, P; Lindmark, DG; Coggins, JR; Erlandsen, SL. 1989a. *Giardia* Cyst wall-specific carbohydrate: evidence for the presence of galactosamina. *Mol Biochem Parasitol* 32: 121-32.
- Jarroll, EL; Manning, P; Berrada, A; Hare, D; Lindmark, DG. 1989b. Biochemistry and metabolism of *Giardia*. *J Protozool* 36 (2): 190-7.
- Jiménez, BM; O'Sullivan, WJ. 1994. CTP synthetase and enzymes of pyrimidine ribonucleotide metabolism in *Giardia intestinalis*. *Int J Parasitol* 24 (5): 713-8.
- Jiménez, JC; Rodríguez, N; Di Prisco, MC; Lynch, NR; Costa, V. 1999. Haemoglobin concentrations and infection by *Giardia intestinalis* in children: effect of treatment with secnidazole. *Ann Trop Med Parasitol* 93 (8) 823-7.
- Jokipii, L; Jokipii, AMM. 1979. Single-dose metronidazole and tinidazole as therapy for giardiasis: success rates, sides effects, and drug absorption and elimination. *J Infect Disease* 140 (6): 984-988.
- Justel, A; Alvarez, AI; Alonso, ML; del-Estal, JL; Villaverde, C; Barrio, JP; Prieto, JG. 1994. Influence of ethanol on gastric absorption and metabolism of albendazole and mebendazole. *Drug Alcohol Depend* 36 (1): 49-55.
- Kabnick K S; Peattie DA. 1991. *Giardia*: a missing link between prokaryotes and eukaryotes. *Amer Sci* 79: 34-43.
- Kang, EW; Clinch, K; Furneaux, RH; Harvey, JE; Schofield, PJ; Gero, AM. 1998. A novel and simple colorimetric method for screening *Giardia intestinalis* and anti-giardial activity *in vitro*. *Parasitology* 117 (Pt3): 229-43.
- Katellaris, PH; Farthing, MJG. 1992. Diarrhoeal and malabsorption in Giardiasis: a multifactorial process? *Gut* 33: 295-7.
- Katiyar, SK; Edlind, TD. 1991. Enhanced antiparasitic activity of lipophilic tetracyclines: role of uptake. *Antimicrob Agents Chemother* 35 (11): 2190-202.
- Katiyar, SK; Gordon, VR; McLaughlin, GL; Edlind, TD. 1994. Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with β -tubulin sequence. *Antimicrob Agent Chemother* 38 (9): 2086-90.
- Keister, DB. 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 487-8.
- Kini, GD; Henry, EM; Robins, RK; Larson, SB; Marr, JJ; Berens, RL; Bacchi, CJ; Nathan, HC; Keithly, JS. 1990. Synthesis, structure, and antiparasitic activity of sulfamoyl derivatives of ribavirin. *J Med Chem* 33 (1): 44-8.
- Knight, R. 1980. Epidemiology and transmission of giardiasis. *Trans R Soc Top Med Hyg* 74 (4): 433-6.
- Korman, SH; Hais, E; Spira, DT. 1990. Routine *in vitro* cultivation of *Giardia lamblia* by using the string test. *J Clin Microbiol* 28 (2): 368-9.
- Kwa, MSG; Veenstra, JG; van Dijk, M; Roos, MH. 1994. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in β -tubulin isotype 1. *Mol Biochem Parasitol* 63: 199.303.



- Kwa, MSG; Veenstra, JG; van Dijk, M; Roos, MH. 1995. β -tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 246: 500-10.
- Lacey E. 1988. The role of the cytoskeletal protein, tubulin in the mode of action and mechanisms of drug resistance to benzimidazoles. *Int J Parasitol* 18 (7): 885-936.
- Lacey E. 1990. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol Today* 6 (4):112-115.
- Lanzer, M; Fischer, K; Le Blancq, SM. 1995. Parasitism and chromosome dynamics in protozoan parasites: is there a connection?. *Mol Biochem Parasitol* 70 (1): 1-8.
- Leahy, JG; Rubin, AJ; Sproul, OJ. 1987. Inactivation of *Giardia muris* cysts by free chlorine. *Appl Environ Microbiol* 53 (7): 1448-53.
- Le Blancq, SM; Korman, SH; Van der Ploeg LHT. 1991. Frequent rearrangements of rRNA-encoding chromosomes in *Giardia lamblia*. *Nucl Acids Res* 19: 4405-12.
- Le Blancq, SM; Korman, SH; Van der Ploeg, LH. 1992. Spontaneous chromosome rearrangements in the protozoan *Giardia lamblia*: estimation of mutation rates. *Nucleic Acids Res* 20 (17): 4539-45.
- Levi, GC; Avila, CA. 1977. Efficacy of various drugs for treatment of giardiasis. *Am J Trop Med Hyg* 26: 562-5.
- Levine, ND; Corliss, JO; Cox, FEG; Deroux, G; Grand, J; Honigberg, BM; Leedale, GF; Loeblich AR III; Lom, J; Lynn, D; Merinfeld, EG; Page, FC; Poljansky, G; Spregue, V; Vavra, J; Wallace FG. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool* 227: 37-58.
- Lewis, SA; Tian, G; Vainberg, IE; Cowan, NJ. 1996. Chaperonin-mediated folding of actin and tubulin. *J Cell Biol* 132 (1): 1-4.
- Lindmark, DG; Jarroll, EJ. 1982. Pyrimidine metabolism in *Giardia lamblia* trophozoites. *Mol Biochem Parasitol* 5: 291-6.
- Lindley, TA; Chakraborty, PR; Edlind, TD. 1988. Heat shock and stress response in *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* 28: 135-44.
- Lipkowitz, KB; McCracken, RO. 1991. A modeling approach to *in vivo* efficacy of triclabendazole. *J Parasitol* 77 (6): 998-1005.
- Lipkowitz, KB; McCracken, RO. 1993. Molecular modeling: a tool for predicting anthelmintic activity *in vivo*. *Parasitol Res* 79: 475-9.
- Liu, SM; Brown, DM; O'Donoghue, P; Upcroft, P; Upcroft, JA. 2000. Ferredoxin involvement in metronidazole resistance of *Giardia duodenalis*. *Mol Biochem Parasitol* 108(1):137-40.
- Lu, SQ; Wang, ZY; Zhang, YQ; Wen, Y. 1989. Detecting *Giardia lamblia* antigen in fecal matter with counterimmuno-electrophoresis in diagnosis of giardiasis. *Chin Med J Engl* 102 (9): 686-8.
- Lubenga, GA, Pichard, RK. 1990. Specific interaction of benzimidazole anthelmintics with tubulin: high affinities binding and benzimidazole-resistance in *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 38: 221-32.
- Luján, HD; Nash, TE. 1994. The uptake and metabolism of cysteine by *Giardia lamblia* trophozoites. *J Euk Microbiol* 41 (2): 169-75.
- Luján, HD; Marotta, A; Mowatt, MR; Sciaky, N; Lippincott, J; Nash, TE. 1995. Developmental induction of Golgi structure and function in the primitive eukariote *Giardia lamblia*. *J Biol Chem* 270 (9): 4612-8.
- Machin, NA; Lee, JM; Barnes, G. 1995. Microtubule stability in Budding yeast: Characterization and dosage suppression of a Benomyl-dependent tubulin mutant. *Mol Biol Cell* 6: 1241-59.
- Mahubani, MH; Bej, AK; Perlin, M; Schaefer, FW III; Jakubowski, W; Atlas, RM. 1991. Detection of *Giardia* cysts by using the polymerase chain reaction and distinguishing live from dead cysts. *Appl Environ Microbiol* 57 (12): 3456-61.
- Mahubani, MH; Bej, AK; Perlin, MH; Schaefer, FW III; Jakubowski, W; Atlas, RM. 1992. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia spp.* by using polymerase chain reaction and gene probes. *J Clin Microbiol* 30 (1): 74-8.
- Majewska, AC; Kasprzak, W; Jonckheere, JFD; Kaczmarek, E. 1991. Heterogeneity in the



- sensitivity of stocks and clones of *Giardia* to metronidazole and ornidazole. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85: 67-9.
- Majewska, AC. 1994. Successful experimental infections of a human volunteer and Mongolian gerbils with *Giardia* of animal origin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88 (3): 360-2.
- McCracken, RO; Lipkowitz, KB.; 1990a. Experimental and theoretical studies of albendazole, axibendazole, and tioxibendazole. *J Parasitol* 76 (2): 180-5.
- McCracken, RO; Lipkowitz, KB. 1990b. Structure-activity relationships of benzothiazole and benzimidazole anthelmintics: a molecular modeling approach to *in vivo* drug efficacy. *J Parasitol* 76 (6): 853-64.
- McIntyre, P; Boreham, PFL; Phillips, RE; Shepherd, RW. 1985. Chemotherapy in giardiasis: clinical responses and *in vitro* drug sensitivity of human isolates in axenic culture. *J Pediatr* 108 (6): 1005-10.
- McLaughlin, JC; Rasmussen, SK; Nims, LJ; Madar, DA; Yazzie, CR. 1993. Evaluation of reliability of pooling stool specimens from different patients and detection of *Giardia lamblia* antigen by microtiter enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 31 (10): 2807-8.
- Melki, R; Vainberg, IE; Chow, RL; Cowan, NJ. 1993. Chaperonin-mediated folding of vertebrate actin-related protein and γ -tubulin. *J Cell Biol* 122: 1301-10.
- Meloni, BP; Thompson, RCA. 1987. Comparative studies on the axenic *in vitro* cultivation of *Giardia* of human and canine origin: evidence for intraspecific variation. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 637-40.
- Meloni, BP; Thompson, RCA; Reynoldson, JA; Seville, D. 1990. Albendazole: a more effective anti-giardial agent *in vitro* than metronidazole or tinidazole. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84: 375-9.
- Meloni, BP; Lymbery, AJ; Thompson, RCA. 1995. Genetic characterization of isolates of *G. duodenalis* by enzyme electrophoresis: implications for reproductive biology, population structure, taxonomy, and epidemiology. *J Parasitol* 81 (3): 368-83.
- Mendelson, RM. 1980. The treatment of giardiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74 (4): 438-9.
- Meyer, EA. 1974. *Microorganisms and human disease*. Appleton Century-Crofts EEUU.
- Meyer, EA. 1976. *Giardia lamblia*: Isolation and axenic cultivation. *Exp Parasitol* 39: 101-5.
- Miotti, PG; Gilman, RH; Santosham, M; Ryder, RW; Yolken, RH. 1986. Age-related rate of seropositivity of antibody to *Giardia lamblia* in four diverse populations. *J Clin Microbiol* 24: 972-5.
- Monis, PT; Andrews, RH; Mayrhofer, G; Ey, PL. 1999. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol* 16 (9): 1135-1144.
- Moreno, SN; Mason, RP; Docampo, R. 1984. Distinct reduction of nitrofurans and metronidazole to free radical metabolites by *Trichomonas foetus* hydrogenosomal and cytosolic enzymes. *J Biol Chem* 259: 8252-9.
- Morgan, UM; Constantine, CC; Greene, WK; Thompson, RCA. 1993a. RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis of *Giardia* DNA and correlation with isoenzyme data. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87: 702-5.
- Morgan, UM; Reynoldson, JA; Thompson, RCA. 1993b. Activities of several benzimidazole and tubulin inhibitors against *Giardia spp. in vitro*. *Antimicrob Agent Chemother* 37: 328-31.
- Moroni, P; Buronfosse, T; Longin, SC; Delatour, P; Benoit, E. 1995. Chiral sulfoxidation of albendazole by the flavin adenine dinucleotide-containing and cytochrome P450-dependent monooxygenases from rat liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 23 (2): 160-5.
- Mowatt, MR; Luján, HD; Cotten, DB; Bowers, B; Yee, J; Nash, TE; Stibbs, HH. 1995. Developmentally regulated expression of *Giardia lamblia* cyst wall protein gene. *Mol Microbiol* 15 (5): 955-63.
- Narcisi, EM; Paulin, JJ; Fechheimer, M. 1994. Presence and localization of vinculin in *Giardia*. *J Parasitol* 80 (3): 468-3.
- Nare, B; Lui, Z; Pichard, RK; Georges, E. 1994. Benzimidazoles, potential antimitotic drugs:



- substrates for the poliglycoprotein transporter in multidrug-resistant cells. *Biochem Pharmacol* 48 (12): 2215-22.
- Nash, TE; McCutchan, T; Keister, D; Dame JB; Conrad, JT; Gillin, FD. 1985. Restriction-endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. *J Inf Dis* 152: 64-73.
- Nash, TE; Aggarwal, A; Adam, RD; Conrad, JT; Merritt, JW. 1988. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *J Immunol* 141: 636-41.
- Nash, TE; Herrington, DA; Levine, MM; Conrad, JT; Merritt, JW. 1990. Antigenic variation of *Giardia lamblia* in experimental human infections. *J Immunol* 144: 4362-9.
- Nash, TE; Merritt, JW; Conrad, JT. 1991. Isolate and epitope variability in susceptibility of *Giardia lamblia* to intestinal proteases. *Infect Immun* 59: 1334-40.
- Nash, TE; Rice, WG. 1998. Efficacies of zinc-finger-active drugs against *Giardia lamblia*. *Antimicrob Agent Chemother* 42 (6): 1488-92.
- Navarro AIA. 1993. Estudio *in vitro* del efecto anti-giardiasico de catorce especies de plantas mexicanas. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. UNAM, México. pp. 90.
- Orbach, MJ; Porro EB; Yanofsku, C. 1986. Cloning and characterization of the gene for β -tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker. *Mol Cell Biol* 6: 2452-61.
- Orozco, E; Hernández, F; Rodríguez, MA. 1985. Isolation and characterisation of *Entamoeba histolytica* mutants resistant to emetine. *Mol Biochem Parasitol* 15: 49-59.
- Ortega, BE; Ward, HD; Keusch, GT; Pereira, ME. 1994. Growth inhibition of the intestinal parasite *Giardia lamblia* by a dietary lectin is associated with arrest of the cell cycle. *J Clin Invest* 94 (6): 2283-8.
- Ortega, PMG. 1995. Ciclo celular de *Giardia duodenalis*. En: *Memorias del XXVI Congreso Nacional de Microbiología* pp 10.
- Osipova, SO; Giyasov, ZA; Dekhan, KNA; Shafer, NP. 1984. Detection of specific antibodies in saliva in lamblia infection. *Med Parazitol Parazit Bolezni* 5: 57-60.
- Ouellette, M; Hettema, E; Wüst, D; Fase-Fowler, F; Borst, P. 1991. Direct and inverted DNA repeats associated with P-glycoprotein gene amplification in drug resistant *Leishmania*. *EMBO J* 10 (4): 1009-16.
- Owen, RL. 1980a. The ultrastructural basis of *Giardia* function. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74 (4): 429-33.
- Owen, RL. 1980b. The immune response in clinical and experimental giardiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74 (4): 443-5.
- Oxberry, ME; Thompson, RCA; Reynoldson, JA. 1994. Evaluation of the effects of albendazole and metronidazole on the ultrastructure of *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Spironucleus muris* using transmission electron microscopy. *Int J Parasitol* 24 (5): 695-703.
- Paget, TA; Jarroll, EL; Manning, P; Lindmarck, DC. 1989. Respiration in the cysts and trophozoites of *Giardia muris*. *J Gen Microbiol* 135: 145-54.
- Paget, TA; Manning, P; Jarroll, EL. 1993. Oxygen uptake in cysts and trophozoites of *Giardia lamblia*. *J Eukaryot Microbiol* 40 (3): 246-50.
- Pasley, JN; Daly, JJ; McCullough, D; McChesney, T; Daly, EB; Tank, SK. 1989. Circannual incidence of *Giardia lamblia*. *Chronobiol Int* 6: 185-9.
- Pearce, DA; Reynoldson, JA; Thompson, RCA. 1996. A comparison of two methods for assessing drug sensitivity in *Giardia duodenalis*. *Appl Parasitol* 37: 111-6.
- Peattie, DA; Alonso, RA; Hein, A; Couldfield, JP. 1989. Ultrastructural localization of giardins to the edges of risk midroribbons of *Giardia lamblia* and nucleotide and deduced protein sequence of alpha giardin. *J Cell Biol* 109 (5): 2323-35.
- Pendland, SL; Piscitelli, SC; Schreckenberger, PC; Danziger, LH. 1994. *In vitro* activities of metronidazole and its hydroxy metabolite against



- Bacteroides spp. Antimicrob Agents Chemother 38 (9): 2106-10.
- Pérez-Serrano, J; Casado, N; Denegri, G; Rodríguez-Caabeiro, F. 1994. The effects of albendazole and albendazole sulfoxide combination-therapy on *Echinococcus granulosus in vitro*. Int J Parasitol 24: 219-24.
- Pérez-Serrano, J; Denegri, G; Casado, N; Bodega, F; Rodríguez-Caabeiro, F. 1995. Anti-tubulin immunohistochemistry study of *Echinococcus granulosus* protoscolices incubated with albendazole and albendazole sulphoxide *in vitro*. Parasitol Res 81: 438-40.
- Pérez-Taylor, RA; Argüello, GR; Ortega, PMG. 1995. Ciclo celular y subpoblaciones en cultivos axénicos de *Giardia duodenalis*. En: Memorias del Primer Encuentro Nacional de Giardiosis. Coords: Bernal, RR; Ortega, PMG pp 5.
- Pérez-Taylor, RA. 2000. Caracterización del ciclo celular de *Giardia duodenalis*. Identificación de subpoblaciones con características diferenciales en cultivos axénicos. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. UNAM México. En prensa.
- Ponce, MM; Navarro, AI; Martínez, GMN; Alvarez, ChR. 1994. In vitro effect against Giardia of 14 plant extracts. Rev Invest Clin 46 (5): 343-7.
- Popovic, O; Jojic, N; Milutinovic, DS; Djurdjevic, D; Milovic, V. 1991. Propranolol for metronidazole-resistant giardiasis. Ital J Gastroenterol 23 (6): 359.
- Proctor, EM; Isaac-Renton, JL; Boyd, J; Wong, Q; Bpwie, WR. 1989. Isoenzyme analysis of human and animal isolates of *G. duodenalis* from British Columbia, Canada. Am J Trop Med Hyg 41: 411-5.
- Que, X; Svard, SG; Meng, TC; Hetsko, ML; Aley, SV; Gillin, FD. 1996. Developmentally regulated transcripts and evidence of differential mRNA processing in *Giardia lamblia*. Mol Biochem Parasitol 81(1): 101-10.
- Rajeshwari, K; Jaggi, N; Aggarwall, V; Kalra, KK; Mittal, SK; Baveja, U. 1996. Determinants of symptomatic giardiasis in childhood. Trop Gastroenterol 17(2): 70-6.
- Reiner, DS; McCaffery, M; Gillin, FD. 1990. Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. Eur J Cell Biol 53 (1): 142-53.
- Reiner, DS; Hetsko, ML; Gillin, FD. 1995. A lipoprotein-cholesterol-albumin serum substitute stimulates *Giardia lamblia* encystation vesicle formation. J Euk Microbiol 42 (5): 622-7.
- Reijo, RA; Cooper, EM; Beagle, GJ; Huffaker, TC. 1994. Systematic mutational analysis of the yeast β -tubulin gene. Mol Biol Cell 5:29-43.
- Rensing, SA; Maier, UG. 1994. Phylogenetic analysis of the stress-70 protein family. J Mol Evol 39 (5): 80-6.
- Requena, JM; Jimenez-Ruiz, A; Soto, M; Assiego, R; Santarén, JF; Lopez, MC; Patarroyo, ME; Alonso, C. 1992. Regulation of hsp70 expression in *Trypanosoma cruzi* by temperature and growth phase. Mol Biochem Parasitol 53: 201-12.
- Reynoldson, JA; Thompson, RCA; Meloni, BP. 1991. In vivo efficacy of albendazole against *Giardia duodenalis* in mice. Parasitol Res 77: 325-8.
- Riscoe, MK; Ferro, AJ; Fitchen, JH. 1988. Analogs of 5-methylthioribose, a novel class of antiprotozoal agents. Antimicrob Agents Chemother 32 (12): 1904-6.
- Rodríguez, GR; Rodríguez, GLM; Cruz del Castillo, AH. 1999. Effectiveness and safety of mebendazole compared to nitazoxanide in the treatment of *Giardia lamblia* in children. Rev Gastroenterol Mex 64 (3): 122-6.
- Romero, CR; Guerrero, RL; Muñoz, GMR; Geyne, CA: 1997. Nitazoxanide for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in Mexico. Trans R Soc Trop Med Hyg 91 (6): 701-3.
- Romero, ML. 1996. 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 de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. UNAM México.
- Romia, SA; Abou, ZAA; Hegazy, MM. 1990a. Detection of *Giardia lamblia* copro-antigens by



- enzyme-linked immunosorbent assay and counterimmunoelectrophoresis. J Egypt Soc Parasitol 20 (2): 627-32.
- Romia, SA; Abou, ZAA; el-Kholy, ES. 1990b. Immunodiffusion, immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay in the serodiagnosis of giardiasis. J Egypt Soc Parasitol 20 (1): 209-14.
- Roos, MH 1990. The molecular nature of benzimidazoles resistance in helminths. Parasitol Today 6 (4): 125-6.
- Rossignol, JF; Cavalier, R. 1976. New derivatives of 2-benzamido-5-nitrothiazoles. United States Patent-No. 3,950,351. April 13.
- Rutberg, M; Billger, M; Moding, C; Wallin, M. 1995. Distribution of acetylated tubulin in cultured cells and tissues from the atlantic cod (*Gadus morhua*), role of acetylation in cold adaptation and drug stability. Cell Biol Int 19 (9): 749-58.
- Samuelson, J; Ayala, P; Orozco, E; Wirth, D. 1993. Emetine-resistant of *Entamoeba histolytica* overexpress mRNAs for multidrug resistance. Mol Biochem Parasitol 38: 281- 90.
- Sauch, JF; Berman, D. 1991. Immunofluorescence and morphology of *Giardia lamblia* cysts exposed to chlorine. Appl Environ Microbiol 57 (5): 1573-5.
- Sauch, JF; Flanigan, D; Galvin, ML; Berman, D; Jakubowski, W. 1991. Propidium iodide as an indicator of *Giardia* cyst viability. Appl Environ Microbiol 57 (11): 3243-7.
- Sarafis, K; Isaac-Renton, J. 1993. Pulsed-field gel electrophoresis as a method of biotyping of *G. duodenalis*. Am J Trop Med Hyg 48 (1): 134-44.
- Schantz, PM. 1991. Parasitic zoonosis in perspective. Int J Parasitol 21: 161-70.
- Schupp, DG; Erlandsen, SL. 1987. A new method to determine *Giardia* cyst viability: correlation of fluorescein diacetate and propidium iodide staining with animal infectivity. Appl Environ Microbiol 704-7.
- Schupp, WL. 1993. Ivermectin resistance. Parasitol Today 9 (5): 154-159.
- Shaio MF; Chen, JG; Chang, FY. 1987. A comparison of various methods for the determination of viability of parasitic flagellates. Southeast. Asian J Trop Med Public Health 18 (4): 539-46.
- Sheffield, HG; Bjorvatn, B. 1977. Ultrastructure of the cyst of *Giardia lamblia*. Am J Trop Med Hyg 26 (1): 23-30.
- Scheffler, EH; Van-Etta, LL. 1994. Evaluation of rapid commercial enzyme immunoassay for detection of *Giardia lamblia* in formalin-preserved stool specimens. J Clin Microbiol 32 (7): 1807-8.
- Siddall, ME; Hang, H; Desser, SS. 1992. Phylogenetic analyses of the Diplomonadida (Wenyon, 1926) Brugerolle, 1975: Evidence for heterocrony in protozoa and against *Giardia lamblia* as a "missing link". J Protozool 39 (3): 361-7.
- Sigeti, JS; Guiney, DG; Davis, CE. 1983. Mechanism of action of metronidazol on *Bacteroides fragilis*. J Infect Dis 148 (6): 1083-9.
- Smith, PD; Gillin, FD; Spira, WM; Nash, TE. 1982. Chronic giardiasis studies on drug sensitivity toxin production, and host immune response. Gastroenterol 83: 797-803.
- Smith, NC; Briant, C; Boreham, PFL. 1988. Possible role for pyruvate ferredoxine oxido-reductase and thiol dependent peroxidase and reductase activities in resistance to nitroheterocyclic drugs in *Giardia intestinalis*. Int J Parasitol 18 (7): 991-7.
- Sogin, LM; Gunderson, JH; Elwood, JH; Alonso, RA; Peattie, DA. 1989. Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. Science 243 (6): 75-7.
- Soltys, BJ; Gupta, RS. 1994. Immunoelectron microscopy of *Giardia lamblia* cytoskeleton using antibody to acetylated α -tubulin. J Euk Microbiol 41 (6): 625-32.
- Sousa, MC; Poiars-Da-Silva, J. 1999. A new method for assessing metronidazole susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites. Antimicrob Agents Chemother 43 (12): 2939-42.
- Speck, WT; Stein, AB; Rosenkranz, HS. 1976. Mutagenicity of metronidazole: presence of several



- active metabolites in human urine. *J Natl Cancer Inst* 56: 283-4.
- Stibbs, HH; Samadpour, M; Ongerth, JE. 1990. Identification of *Giardia lamblia*-specific antigens in infected human and gerbil feces by western immunoblotting. *J Clin Microbiol* 28 (10): 2340-6.
- Strandén, AN; Eckert, J; Köhler, P. 1990. Electrophoretic characterization of *Giardia* isolated from humans, cattle, sheep, and dog in Switzerland. *J Parasitol* 76 (5): 660-8.
- Takemura, R; Okabe, S; Umeyama, T; Kanai, Y; Cowan, NJ; Hirokawa, N. 1992. Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. *J Cell Sci* 103: 953-64.
- Tay, J; Ruiz, A; Schenone, H; Robert, L; Sanchez, VJT; Uribarren, T; Becerril, MA; Romero, R. 1994. Frequency of intestinal protozoosis in the Mexican Republic. *Bol Chil Parasitol* 49(1): 9-15.
- Theodorides, VJ; Gyuric, RJ; Kingsbury, WD; Parish, RC. 1976. Anthelmintic activity of albendazole against liver flukes, tapeworms, lung and gastrointestinal roundworms. *Experientia* 32 (6): 702-3.
- Thomas, J; Neff, N; Borstein, D. 1985. Isolation and characterization of mutations in the β -tubulin gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 112: 715-34.
- Thompson, RCA; Reynoldson, JA. 1993. *Giardia* and giardiasis. En: *Advances in parasitology*, vol 32: 71-160.
- Thomson, LB; Wise, DS. 1990. The synthesis chemistry of certain anthelmintics benzimidazoles. *Parasitol Today* 6 (4): 107-112.
- Torres, A; Delgado, P. 1989. Effects of cold and nocodazole treatments on the microtubular systems of *Paramecium* in Interphase. *J Parasitol* 36 (2): 113-9.
- Townson, SM; Laqua, H; Upcroft, P; Boreham, PFL; Upcroft, JA. 1992. Induction of metronidazole and furazolidone resistance in *Giardia*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86: 521-2.
- Townson SM; Upcroft, JA; Upcroft, P. 1996. Characterisation and purification of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from *Giardia duodenalis*. *Mol Biochem Parasitol* 79(2):183-93.
- Triglia, T; Foote, SM; Kemp, DJ; Cowman, AF. 1991. Amplification of the multidrug resistance gene *pfmdr1* in *Plasmodium falciparum* has arisen as multiple independent events. *Mol Cell Biol* 11 (10): 5244-50.
- Udezulu, IA; Visvesvara, GS; Moss, DM; Leitch, GJ. 1992. Isolation of two *Giardia lamblia* (WB strain) clones with distinct surface protein and antigenic profiles and differing infectivity and virulence. *Infect Immun* 60 (6): 2274-80.
- Upcroft, JA; Boreham, PFL; Upcroft, P. 1989. Geographic variation in *Giardia* karyotypes. *Int J Parasitol* 19 (5): 519-27.
- Upcroft, P; Mitchell, R; Boreham; PF. 1990a. DNA fingerprinting of the intestinal parasite *Giardia duodenalis* with the M13 phage genome. *Int J Parasitol* 20: 319-23.
- Upcroft, JA; Upcroft, P; Boreham, PFL. 1990b. Drug resistance in *Giardia intestinalis*. *Int J Parasitol* 20 (4): 489-96.
- Upcroft, JA; Healey, A; Murray, DG; Boreham, PFL; Upcroft, P. 1992. A gene associated with cell division and drug resistance in *Giardia duodenalis*. *Parasitol* 104: 397-405.
- Upcroft, JA; Healey, A; Upcroft, P. 1993a. Chromosomal duplication in *G. duodenalis*. *Int J Parasitol* 23 (5): 609-16.
- Upcroft, JA; Upcroft, P. 1993b. Drug resistance and *Giardia*. *Parasitol Today* 9 (5): 187-90.
- Upcroft, JA; Healey, A; Upcroft, P. 1993c. Genome mapping a candidate *mdr* gene from *G. duodenalis*. En: *Giardia: From molecules to disease*. Edited by: Thompson, RCA; Reynoldson, JA y Lymbery, AJ CAB Int Wallingford pp 378-9.
- Upcroft, JA; Campbell, RW; Upcroft, P. 1996a. Quinacrine-resistant *Giardia duodenalis*. *Parasitol* 112: 309-13.
- Upcroft, J; Mitchell, R; Chen, N; Upcroft, P. 1996b. Albendazole resistance in *Giardia* is correlated with



- cytoskeletal changes but not with a mutation at amino acid 200 in beta-tubulin. *Microb Drug Resist* 2:303-8.
- Valencia, ME; McNeill, G; Haggarty, P; Moya, SY; Pinelli, A; Quihui, L; Davalos, R. 1995. Energetic consequences of mild *Giardia intestinalis* infestation in Mexican children. *Am J Clin Nutr* 61 (4): 860-5.
- Vesey, CJ; Peterson, WL. 1999. Review article: the management of Giardiasis. *Aliment Pharmacol Ther* 13 (7): 843-50.
- Villaverde, C; Alvarez, AI; Redondo, P; Voces, J; Del-Estal, JL; Prieto, JG. 1995. Small intestinal sulphoxidation of albendazole. *Xenobiotica* 25 (5): 433-41.
- Van Belkum, A; Homan, W; Limper, L; Quint, WGV. 1993. Genotyping isolates and clones of *Giardia duodenalis* by polymerase chain reaction: implications for the detection of antigenic variation among protozoan parasite species. *Mol Biochem Parasitol* 61: 69-78.
- Van-Keulen, H; Gutell, RR; Gates, MA; Campbell, SR; Erlandsen, SL; Jarroll, EL; Kulda, J; Meyer, EA. 1993. Unique phylogenetic position of Diplomonadida based on the complete small subunit ribosomal RNA sequence of *Giardia ardeae*, *G. muris*, *G. duodenalis* and *Hexamita sp.* *FASEB J* 7 (1): 223-31.
- Van-Keulen H, Feely, D; Macechko P, Jarroll, E; Erlandsen, S. 1998. The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasitized by a unique species *Giardia microti*. *J Parasitol* 84: 294-300.
- Vinayak, VK; Dutt, P; Puri, M. 1991. An immunoenzymatic dot-ELISA for the detection of *Giardia lamblia* antigen in stool eluates of clinical cases of giardiasis. *J Immunol Methods* 137 (2): 245-51.
- Vitti, GF; O'Sullivan, WJ; Gero, AM. 1987. The biosynthesis of uridine 5'-monophosphate in *Giardia lamblia*. *Int J Parasitol* 17: 805-12.
- Voogd, CE. 1981. On the mutagenicity of nitroimidazoles. *Mutat Res* 86: 243-77.
- Ward, HD; Alrog, J; Lev, B; Keusch, G; Pereira, M. 1985. Identification of chitin as a structural component of *Giardia* cysts. *Infect Immunol* 49: 629-34.
- Wahl, SM; Gilman, RH; O'Hare, JP; Keister, DB; Spira, WM. 1988. A new miniculture technique for determining *in vitro* antimicrobial agent sensitivity of axenically cultured strains of *Giardia lamblia*. En: *Advances in Giardia Research*. Ed PM Willis and BR Hammond University of Calgary, Press Calgary pp 21-4.
- Wang, CC; Aldritt, S. 1983. Purine salvage networks in *Giardia lamblia*. *J Exp Med* 158: 1703-12.
- Webster, DR; Borisy, GG. 1989. Microtubules are acetylated in domains that turn over slowly. *J Cell Sci* 82: 57-65.
- Webster, LJ. 1990. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections. En: *Goldman and Gillman's, Pharmacological basis of therapeutics*. 8th edn (AG Gillman, TW Rall, AS Nies, y P Taylor eds) Pergamon Press, EEUU 978-1007.
- Weinbach, EC; Levenbook, L; Alling, DW. 1992. Binding of tricyclic antidepressant drugs to trophozoites of *Giardia lamblia*. *Comp Biochem Physiol C* 102 (3): 391-6.
- Weisberg, S. 1980. *Applied lineal regression*. John Wiley and Sons NY, EEUU 283 p.
- Weiss, JB; van Keulen, H; Nash, TE. 1992. Classification of subgroups of *Giardia lamblia* based upon ribosomal RNA gene sequence using the polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 54: 73-86.
- Wright, CW; Meloni, SF; Phillipson, JD; Warhurst, DC. 1992. Determination of anti-giardial activity: *in vitro* by means of soluble formazan production. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86: 517-519.
- Wright, CW; Anderson, MM; Allen, D; Phillipson, JD; Kirby, GC; Warhurst, DC; Chang, HR. 1993. Quassinoids exhibit greater selectivity against *Plasmodium falciparum* than against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* or *Toxoplasma gondii in vitro*. *Eukaryot Microbiol* 40 (3): 244-6.
- Yang, YM; Ortega, Y; Sterling, C; Adam, RD. 1994. *Giardia lamblia* trophozoites contain multiple alleles of a variant-specific surface protein gene with 105-base pair tandem repeats. *Mol Biochem Parasitol* 68 (2): 267-76.