

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

68

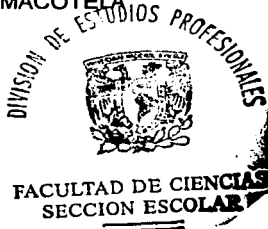
Determinación de la sensibilidad de los trofozoítos de *Giardia duodenalis*, obtenidos de humanos y animales, a la Nitazoxanida

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:
JOSEFINA GÓMEZ GARDUÑO



DIRECTORA:
DRA. MARTHA PONCE MACOTELA

2003



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

A



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.

PAGINACION

DISCONTINUA

Fe de erratas de la Pag. 41.

Párrafo	Dice	Debe decir
3	Citrato férrico de amonio.0.03 g	Citrato férrico de amonio 3 mg
4	Acido ascórbico. 0.2 g	Ácido ascórbico.20 mg.
5	Bills bovina. 0.5 g	Bills bovina. 100 mg
6	Fosfato de potasio monobásico. 0.6g	Fosfato de potasio monobásico. 60 mg
7	Fosfato de potasio dibásico. 0.1g	Fosfato de potasio dibásico. 100 mg
8	Cloruro de cisteína. 0.3g	Cloruro de cisteína. 200 mg
9	Cloruro de sodio. 0.3g	Cloruro de sodio. 200 mg
10	Glucosa. 1.5g	Glucosa. 1 g
11	Extracto de levadura. 1.5g	Extracto de levadura. 1 g
12	Triptona. 3.0g	Triptona. 2 g

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: José Juan González Garduño
FECHA: 16/01/03
FIRMA: [Firma]



M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
"Determinación de la sensibilidad de los trofozoitos de Giardia duodenalis,
obtenidos de humanos y animales, a la Nitazoxanida".

realizado por Josefina Gómez Garduño

con número de cuenta 8624866-6, quien cubrió los créditos de la carrera de biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dra. Martha Ponco Macotela

Propietario M. en C. Vicente Anislado Tolentino

Propietario Biol. Mario Noe Martínez Gordillo

Suplente Dr. Ignacio Camacho Arrollo

Suplente Biol. Yadira Rufino González

Consejo Departamental de biología

DRA. PATRICIA RAMOS NORALES

FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Indice

RESUMEN	3
ANTECEDENTES	5
MORFOLOGÍA.....	5
CICLO BIOLÓGICO.....	6
POSICIÓN TAXONÓMICA Y DIAGNOSIS.....	8
EPIDEMIOLOGÍA.....	9
MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	9
PATOLOGÍA.....	10
DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....	10
TRATAMIENTO.....	11
QUINACRINA.....	11
FURAZOLIDONA.....	12
NITROIMIDAZOLES.....	12
METRONIDAZOL.....	12
TINIDAZOL.....	14
BENZIMIDAZOLES.....	14
NITAZOXANIDA.....	14
JUSTIFICACIÓN.....	16
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVO.....	16
MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
MATERIAL BIOLÓGICO.....	17
TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	17
CULTIVO Y CUANTIFICACIÓN DE LOS TROFOZOITOS.....	18
SENSIBILIDAD DE LOS TROFOZOITOS A LA NITAZOXANIDA.....	19
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	21
RESULTADOS.....	26
DISCUSIÓN.....	37
CONCLUSIONES.....	40
APÉNDICE.....	41
MEDIO DE CULTIVO TYI- S-33.....	41
SOLUCIÓN SALINA DE FOSFATOS.....	42
SALES DE TETRAZOLIO.....	42
ISOPROPANOL ÁCIDO.....	42
FÁRMACOS.....	43
REFERENCIAS.....	44

Resumen

El protozoo flagelado *Giardia duodenalis* (*G. lamblia*, *G. intestinalis*) es el agente causal de la giardiosis, que se adquiere al ingerir los quistes viables, provenientes de un hospedero de la misma o de diferente especie.^{9,15} El mecanismo de transmisión es por fecalismo fundamentalmente por vía hídrica aunque, el ciclo directo (ano-mano-boca) favorece su rápida propagación.¹⁵⁻²³

Los estudios epidemiológicos realizados en la última década han proporcionado información sobre el incremento de esta parasitosis, que daña principalmente a los niños, aunque puede afectar a individuos de todas las edades y estatus económicos. La giardiosis puede producir diarrea, síndrome de mala absorción, desnutrición y en la población infantil puede dejar secuelas como: baja estatura, pérdida de peso y bajo rendimiento escolar.²⁴⁻²⁸

Esta protozoosis intestinal es difícil de erradicar, probablemente, porque los pacientes se reinfectan o porque los tratamientos no tienen un 100% de efectividad o quizá se deba a que están surgiendo cepas resistentes a los fármacos actuales.^{37,40,42-48}

Aunque no hay un fármaco específico contra este protozoo, los antiparasitarios que tienen efecto anti-giardiasico van desde la Quinacrina, Nitroimidazoles, nitrofuranos hasta los Benzimidazoles. Estos producen efectos adversos y pueden ser teratogénicos y mutagénicos.³⁵⁻³⁹

El presente trabajo tiene como propósito evaluar *in vitro* el efecto anti-giardiasico de la Nitazoxanida (Ntz) y compararlo con el Tinidazol (Tnz), fármaco de primera elección en el tratamiento de la giardiosis, mediante el ensayo

colorimétrico que tiene como fundamento la reducción del MTT a formazán por la acción de las deshidrogenasas de las células vivas.

Los resultados mostraron que el aislado INP231087MM (paciente pediátrico) fue el más resistente, el 100% de sensibilidad se obtuvo con 7 $\mu\text{g/mL}$ de Ntz y 5 $\mu\text{g/mL}$ de Tnz. Mientras que el aislado de INP170693HG8 (gato) fue el más sensible, el 100% de sensibilidad fue con 3 $\mu\text{g/mL}$ de ambos fármacos. La velocidad de acción, fue el otro parámetro que marcó una diferencia significativa en la respuesta de los fármacos, misma que colocó al Tnz como el fármaco de mayor velocidad de acción.

ANTECEDENTES

Morfología

G. duodenalis es un protozooario sarcostigóforo que presenta un disco suctor con el que se adhiere al sustrato, un cuerpo medio en forma de clava de martillo, dos núcleos, cuatro flagelos y su citoesqueleto se compone de giardinas, α y β tubulina.^{1,2}

Este parásito tiene dos estadios: el quiste y el trofozoíto. El quiste es la estructura de resistencia y propagación del parásito en el medio ambiente, el trofozoíto es el estadio vegetativo y tiene la función de reproducción y establecimiento de la infección en el huésped.³⁻⁷ (Tabla 1; Figura 1)

Tabla. 1.- Morfología del trofozoíto y quiste de *G. duodenalis*.

Características	Trofozoítos	Quistes
Función	Reproducción y establecimiento de la infección	Fase infectante, resistencia y propagación
Forma	Piriforme	Ovoide
Tamaño	10-20 μm X 5-15 μm	8-12 μm X 7-10 μm
Disco suctor	Presente	Ausente
Número de núcleos	2	2 a 4
Número de flagelos	8	Ausentes
Pared celular	Ausente	Presente
Complejo de Golgi	Ausente	Presente solamente cuando se inicia su formación.

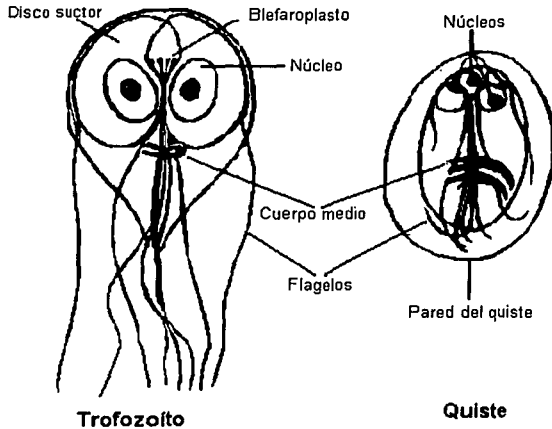


Figura 1. Trofozoito y quiste de *G. duodenalis*.

Ciclo biológico

La infección se inicia después de que el hospedero ingiere quistes viables, de los cuales eclosionan dos trofozoitos que se dividen por fisión binaria en los primeros 5 minutos, la infección se establece en el intestino delgado. El enquistamiento se inicia a partir del yeyuno y finaliza con la salida de los quistes maduros en las heces. (Figura 2).⁸ Este ciclo se caracteriza por tener una rápida y eficiente propagación de la giardiasis principalmente, por la vía fecal-oral la cual, puede dar origen a la autoinfección externa en niños.⁹

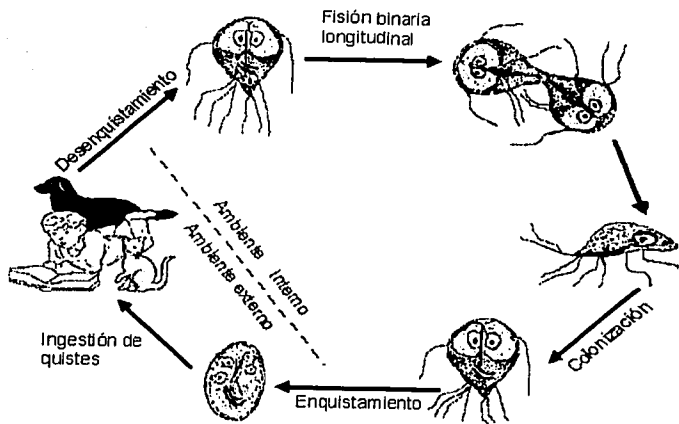


Figura 2. Representación del ciclo de vida de *G. duodenalis*.

Posición taxonómica y diagnóstico

La taxonomía es la propuesta por Levine (1980) ¹⁰

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Sarcocistophora Honigberg y Balamuth, 1963.

Subphylum: Mastigophora. Diesing, 1966.

Clase: Zoomastigophora Calkis, 1909.

Orden: Diplomonadida.

Suborden: Diplomonadina

Familia: Hexamitidae. Kent, 1980

Género: *Giardia*. Kunstler, 1882.

Especie: *Giardia duodenalis*. Filice, 1952.

Sinonimias: *G. lamblia*.

G. intestinalis.

Epidemiología

La giardiosis es una parasitosis cosmopolita y su prevalencia depende de las condiciones de sanidad de cada región, afecta tanto a países en desarrollo como a los desarrollados.¹¹ En México la frecuencia oscila del 14 al 68.5 % y la población infantil es la más afectada, principalmente niños preescolares.^{12,13}

Los estudios epidemiológicos han demostrado que el fecalismo es el mecanismo de infección, la vía más importante es mediante el agua de beber, debido a que los ríos y mantos acuíferos se contaminan con heces de humanos y/o animales parasitados, favoreciéndose también a la transmisión cruzada, (flujo de parásitos entre dos o más hospederos de diferente especie), está última apoya, la hipótesis de que la giardiosis es una zoonosis.¹⁴⁻¹⁹

Otras vías de contagio importantes son: el contacto directo de persona-persona, el cual se favorece con la convivencia en centros recreativos y de trabajo,²⁰⁻²² malos hábitos higiénicos, así como también la sodomía y felación.²³

Manifestaciones clínicas

La giardiosis puede ser asintomática o producir: diarrea, dolor abdominal, vómito, mala absorción de: calcio, fósforo, grasas, glucosa, D-Xilosa, lactosa, glucosa, ácido fólico y vitaminas (Vitamina A y B₁₂). La baja estatura, anemia y debilidad se presentan cuando estos nutrientes faltan.²⁴⁻²⁷

Patología

La mala absorción intestinal, fue una de las primeras manifestaciones patológicas que se relacionaron con la giardiosis, se atribuye al daño que causa la adherencia de los trofozoítos al epitelio intestinal; éstos provocan aplanamiento y acortamiento de las vellosidades e incremento de las células inflamatorias, polimorfonucleares, hiper celularidad en la lámina propia e inflamación aguda de la mucosa.^{24,28} Aunque se desconoce la existencia de toxinas en *Giardia*, se ha observado un pequeño gen que tiene 57% de homología con la sarafotoxinas presente en el veneno de serpientes del género *Atractaspis*, esta toxina causa cólicos, náuseas, vómito y diarrea, síntomas que también se presentan en la giardiosis.^{2,29-30}

Diagnóstico clínico

En los laboratorios clínicos, el método que más se usa para el diagnóstico de la giardiosis es el coproparasitológico (CPS) de concentración por flotación con sulfato de Zinc (Faust).³¹ Sin embargo, debido a la irregularidad con la que se excretan los quistes,^{8,16} se deben considerar otros métodos que permitan complementar el examen microscópico: inmunológicos,³² sondeo duodenal y cápsula de gelatina,³³ la biopsia es una alternativa que deberá considerarse como última opción.²⁹ La biología molecular es una herramienta que probablemente en el futuro permita el diagnóstico, sin tener la necesidad de utilizar métodos invasivos.³⁴

Tratamiento

La terapia contra la giardiosis se inició en pacientes que presentaron esta parasitosis asociada al síndrome de mala absorción. El fracaso en el tratamiento y el aislamiento de cepas resistentes ha obligado a los médicos e investigadores a evaluar el efecto anti-giardiasico de los desparasitantes que se encuentran en el mercado farmacéutico.^{24,35-37}

Quinacrina

La Quinacrina (Atabrine o Mepacrina) se utilizó en el tratamiento contra la malaria desde hace más de 70 años. La absorción de la Quinacrina se realiza rápidamente en el tracto intestinal y es ampliamente distribuida a todos los tejidos. Se usa como anti-giardiasico desde 1939, su eficacia es del 90-95%; sin embargo, el fracaso del tratamiento siempre se ha observado en pacientes giardiasicos. Además debido a su alta toxicidad, se prescribe como última alternativa o cuando los Nitroimidazoles fracasan en el tratamiento. Los efectos colaterales que pueden presentarse son: náuseas, vómito, dolor de cabeza, fiebre, prurito, edema corneal, pigmentación amarilla en uñas y pelo, también puede provocar dermatitis exfoliativa, psicosis tóxica y hemólisis en personas con disminución de la glucosa 6 fosfato. La dosis prescrita es de 2 mg/Kg/día en tres dosis diarias por 7-10 días o 100 mg una vez al día durante 5-7 días.^{24,33,38-41,44-5}

El mecanismo de acción contra *Giardia* se desconoce; sin embargo, debido a que esta droga se intercala en el DNA, probablemente, se inhibe la síntesis de ácidos nucleicos, la polimerización del RNA y la síntesis de proteínas;⁹ aunque los trabajos de Upcroft y col. muestran que el mecanismo de acción es sobre la membrana citoplasmática del parásito.⁴²

Los estudios de sensibilidad *in vitro* han mostrado que hay cepas resistentes a la Quinacrina;⁴³⁻⁴ además, la resistencia se ha inducido en el laboratorio.⁴⁶

Furazolidona

La Furazolidona (Furoxone) es un nitrofurano. Se descubrió en 1940 y se usa como anti-giardíaco desde 1950. En pacientes pediátricos, es el desparasitante de primer orden debido, a que su actividad anti-giardíaca se optimiza al absorberse poco en el tracto digestivo.^{47,46} Se desconoce el mecanismo de acción. Los efectos colaterales que causa son: náuseas, vómito, diarrea, prurito, urticaria, reacciones de hipersensibilidad y carcinogénesis.⁴⁸ Su efectividad es del 70-80%.^{38-40,49}

La dosis es de 8-16 mg/kg de peso en cuatro dosis diarias por 7-10 días.^{38-41,59}

Nitroimidazoles

En la familia de los Nitroimidazoles están el Metronidazol, Tinidazol, Ornidazol y Secnidazol, entre otros. Los Nitroimidazoles presentan en su molécula un grupo nitro con actividad reductora.

Metronidazol

El Metronidazol (Flagyl), se sintetizó en 1961. Este fármaco reemplazó a la Quinacrina en el tratamiento de giardiosis y entamoebosis.⁵⁵⁻⁸ Se reporta una eficiencia del 86%-95%.^{39,54} La dosis recomendada es de 500 mg tres veces al día o 250 mg en tres dosis diarias por 5-7 días,^{39,41,47} la vida media del Metronidazol (Mtz) es de 7 hr y se absorbe completamente en el intestino. Los efectos colaterales pueden ser: náuseas, vómito, diarrea, dolor abdominal, vértigo y cuando se ingiere Mtz con bebidas alcohólicas se produce el efecto antabuse, que consiste en la inhibición de la enzima acetaldehído deshidrogenasa y causa intoxicación por acumulación de acetaldehído.^{60-2,97} Estudios en linfocitos humanos han mostrado que es genotóxico y que produce

daños irreversibles. Se ha reportado actividad teratogénica en pacientes que se exponen a concentraciones altas y por períodos prolongados, en roedores es carcinogénico.⁵¹⁻³

La respuesta heterogénea a los fármacos se ha reportado en aislados y clones de *G. duodenalis*,⁶⁶⁻⁸ además en cepas de laboratorio se ha inducido resistencia mediante exposición intermitente de concentraciones subletales del fármaco y exposición a la luz ultravioleta.⁵⁴ Estos estudios pueden explicar porqué los pacientes generan resistencia cuando son tratados con dosis subletales de fármaco o cuando interrumpen el tratamiento.⁶⁹

El Metronidazol es el fármaco que más se ha estudiado como modelo para explicar el mecanismo de acción del radical nitro tóxico de los Nitroimidazoles, éste llega al citoplasma celular por difusión simple y se activa al ser reducido en la ruta metabólica de la fermentación oxidativa del piruvato.⁵⁰ En el flujo de electrones que realizan las proteínas Piruvato Ferredoxin Oxido Reductasa (PFOR) y Ferredoxina (Fd) se activa el radical tóxico del Mtz, éste inhibe la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos al intercalarse en el DNA.^{48,51-4, 55, 56}

La resistencia al Mtz en *Giardia* y otros protozoarios anaerobios como *Trichomonas vaginalis*, se presenta cuando decrece la actividad de las enzimas (PFOR) (Fd), debido a que disminuye el flujo de electrones que activan al Mtz.^{48,54-56} Además, se ha encontrado que la resistencia al Mtz en *Trichomonas vaginalis* involucra también la disminución del gen que codifica para la ferredoxina (Fd) disminuyendo su expresión fenotípica hasta en un 50%.^{42, 55, 56}

Tinidazol

El Tinidazol (Fasigyne) sustituye cada vez más al Mtz, algunos autores, lo consideran como el tratamiento idóneo en el tratamiento de la giardiosis por su alta eficacia. Cuando a los adultos se les administra de 1-2 g por día durante 2-3 días y a los niños 300 mg distribuidas en dos dosis diarias durante 7 días, su eficiencia es de 85%-100%.^{38-9,70} Los efectos secundarios que pueden llegar a presentarse son semejantes a los que se presentan en el tratamiento con Mtz, estudios recientes lo catalogan como genotóxico y citotóxico.^{41,71}

Benzimidazoles

Los Benzimidazoles se introdujeron en 1970, como drogas antihelmínticas, incluyen al Mebendazol (Vermox), Albendazol (Zentel), Oxfendazol (Benzelmin), Fenbendazol (Meltra) todos tienen actividad antigiardíasis; sin embargo, el Mebendazol y Albendazol son los Benzimidazoles que tienen mayor efectividad contra este parásito.^{9,72-3} La dosis de Albendazol es de 400 mg/día (distribuidos en tres dosis) por 5-7 días y la del Mebendazol es de 300-400 mg/día (en tres dosis) por 5-7 días.³⁹ Estos fármacos causan pocos y/o ningún efecto colateral.⁵⁰ El mecanismo de acción de los Benzimidazoles es inhibiendo la polimerización de las proteínas del citoesqueleto de los trofozoítos de *Giardia*.^{9,73}

Nitazoxanida

Rossignol y Cavie sintetizaron en 1975, a la Nitazoxanida (Ntz) 5-nitrotiazol [2-(acetiloxo)-N-(5-nitro-2-tiazolil) benzamida (Daxon).⁸⁴ Este fármaco es de amplio espectro, compuesto de dos grupos, el radical nitro de los Nitroimidazoles y el tiazol de los Benzimidazoles. Su metabolito principal es la Tizoxanida.⁷⁴ Tiene buena actividad contra cestodos: *Hymenolepis nana*, *Taenia solium*.

Nematodos: *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis* y *Enterobius vermicularis*. Trematodos: *Dicrocoelium dentriticum* y Protozoarios: *Blastocystis hominis*. También actúa contra bacterias como *Bacteroides sp.*^{84-6,74-80}. Aunque algunas cepas de *Cryptosporidium parvum*, *Neospora caninum* y *Entamoeba histolytica* han mostrado menor sensibilidad a la Ntz que a Paromomicina, Pirimetamina (Daraprim), Trimetopim/Sulfametaxazol (Bactrin) y Quinfamida (Amefin).⁷⁷⁻⁹

La Ntz causa pocos efectos colaterales: dolor epigástrico, náuseas y diarrea.⁸⁴ El mecanismo de acción se desconoce, sin embargo, debido a que tiene un grupo nitro y un tiazol su mecanismo de acción, podría parecerse al de los Nitroimidazoles y/o Benzimidazoles.

Hasta el momento, no hay reportes de sensibilidad *in vitro* de los trofozoitos de *Giardia* a este fármaco, por lo que es importante determinar el efecto anti $giardi$ ásico de este fármaco para contar con otra alternativa en el tratamiento de esta parásitosis.

Justificación

En México se está distribuyendo la Ntz. Sin embargo, no hay estudios *in vitro* de susceptibilidad de los trofozoítos de *Giardia* a este fármaco, de ahí la importancia de analizar su efecto anti*giardiásico*.

Hipótesis

- Ho: Si los trofozoítos de *Giardia duodenalis* obtenidos de diferentes hospederos, tienen la misma susceptibilidad a la Nitazoxanida, entonces la dosis letal será la misma para todos los aislados.
- H1: Si los trofozoítos de *Giardia duodenalis* obtenidos de diferentes hospederos, no tienen la misma susceptibilidad a la Nitazoxanida, entonces la dosis letal será diferente para cada uno de los aislados.

Objetivo

Determinar la susceptibilidad de los trofozoítos de *G. duodenalis* obtenidos de diferentes huéspedes, a la Ntz y compararla con el Tnz.

Material y métodos

Material biológico

Los aislados de *G. duodenalis* que se incluyeron en el estudio se describen en la (Tabla 2). El acrónimo de cada aislado tiene las iniciales del Instituto Nacional de Pediatría (INP), la fecha en que se obtuvo el aislado (día, mes, año) y las letras mayúsculas fueron determinadas arbitrariamente.

Tabla 2. Aislados seleccionados para este trabajo.

Acrónimo	Hospedero	Método de obtención
INP231087MM	Niño	Desenquistamiento
INP210897AXA-1	Adulto	Desenquistamiento
INP300695CP5	Perro	Desenquistamiento
INP170693HG8	Gato	Resección intestinal (trofozoítos)

Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra, se calculó con la formula siguiente: basándose en el número de veces que era necesario repetir el ensayo, para obtener un error α de 0.005,⁸⁰ para cada una de las concentraciones en las que se obtuviera la mortalidad de los trofozoítos. El número calculado fue de seis repeticiones, pero éstas se realizaron por duplicado con el objeto de aumentar la confiabilidad de los resultados.

A partir de aquí, en este trabajo, se deberá de entender que ensayo y repetición se refiere a un mismo evento.

$$n = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 (p_1 q_1 + p_2 q_2)}{(p_2 - p_1)^2}$$

En donde:

n = Número de repeticiones

Z_{α} = (desviación normal correspondiente al nivel de significancia).

Z_{β} = (desviación normal correspondiente a la probabilidad de β en una curva de 2 colas).

p=95% (probabilidad de eventos positivos de Ntz).

q=5% (Probabilidad para aceptar el error tipo II).

$\beta = 2(1-P')$

Confiabilidad estadística al 95% y un $\alpha=0.005$.⁸⁴

Cultivo y cuantificación de los trofozoítos

Los trofozoítos de *G. duodenalis* se cultivaron axénicamente en el medio, TYI-S-33 (Apéndice 1), en tubos de vidrio con tapón de rosca (100 x 75 mm). Estos se incubaron por 48 horas a 37 °C, solamente se utilizaron los trofozoítos adheridos, por lo que, a los tubos con monocapa se les decantó el medio de cultivo y se les adicionó PBS. Para desadherir a los trofozoítos de la pared de los tubos, se enfriaron en un baño de hielo por diez minutos, se centrifugaron a 3700 r.p.m., durante 10 minutos y el paquete celular se lavó tres veces con PBS a 4°C. El concentrado de células se llevó a un volumen final de 1 mL con PBS, los trofozoítos se contaron en una cámara de Newbauer y para conocer el número total se utilizó la siguiente fórmula:

Número de células por mL = No. Células contadas / número de cuadrantes contados en la cámara X 10,000 X dilución. (protocolo de Sigma).

Sensibilidad de los trofozoítos a la Nitazoxanida

La determinación de la sensibilidad (susceptibilidad) de los trofozoítos a la Ntz y al Tnz se llevó a cabo en tubos Eppendorff que contenían: diferentes concentraciones (0.5, 1, 2.....10 µg/mL) de Ntz y Tnz, medio de cultivo TYI-S-33 y 5×10^5 trofozoítos, en un volumen final de 1.0 mL. los controles fueron trofozoítos sin tratamiento y trofozoítos muertos.⁸¹⁻² Por congelación/descongelación. El solvente que se utilizó para disolver los fármacos fue menor del 0.5% (Apéndice 1) y se preparó el día que se desarrollo el experimental.

Los tubos se incubaron a 37 °C durante 24 h; al otro día, se centrifugaron a 3700 r.p.m., durante 10 min., el sobrenadante se decantó y el precipitado celular se lavó 3 veces con PBS. Un lote de tubos con trofozoítos se sometió a lisis, mediante cuatro ciclos de congelación-descongelación en N₂ líquido y H₂O en ebullición respectivamente.⁸²⁻⁸⁸ La síntesis de se llevó a cabo, agregando a cada uno de los tubos, 700 µL de PBS, 8µL (40 µg/mL) de MTT y 8µL (20 µg/mL) de PMS (Apéndice 1) los tubos se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Después, el formazán sintetizado se extrajo de las células con 700 µL de isopropanol acidulado (Apéndice 1) las concentraciones se leyeron en un espectrofotómetro a 570 nm.

La lectura obtenida del espectrofotómetro fue transformada a susceptibilidad con la siguiente fórmula:

$$S = (DO_{\text{células vivas}} - DO_{\text{células experimentales}}) / (DO_{\text{células vivas}} - DO_{\text{células muertas}}) \times 100. \quad 85,87-8$$

En donde: S = sensibilidad y DO = Densidad óptica

Análisis estadístico

La respuesta de los aislados (MM, AXA-1, CP5, HG8) expuestos a la Ntz y Tnz se analizó con curvas asintóticas o curvas de reacción de primer orden.^{84,89} En donde se obtiene el coeficiente de susceptibilidad de los trofozoítos expuestos a la Ntz y Tnz y la pendiente que representa la velocidad de acción de los fármacos. Los datos fueron ajustados con ayuda del programa Curve Expert versión 1.34 y las gráficas se realizaron con el programa Grapher versión 2.01 de Golden Software, Inc, ambos para ambiente Windows.

La función asintótica ajustada fue la siguiente.

$$S = 100 (1 - e^{-Kc})$$

En donde:

S = % de susceptibilidad.

K = Tasa de susceptibilidad.

C= Microgramos de fármaco.

La efectividad al 100% de los fármacos sobre los trofozoítos de cada uno de los aislados se evaluó por medio del Análisis de Varianza (ANOVA) de un criterio, la cual se resume en las tablas 3, 4 y 5. La diferencia crítica de Bonferroni⁸⁹ permitió puntualizar estadísticamente la discrepancia existente en cada uno de los aislados tratados. La secuencia del análisis se realizó con el programa EXCEL, versión 97 de Windows Microsoft.

Tabla 3. Esquema del arreglo de los datos que se usaron en la ANOVA de un criterio.

Tratamientos			
	A	B	C
	X_{A1}	X_{B1}	X_{C1}
	X_{A2}	X_{B2}	X_{C2}
	X_{A3}	X_{B3}	X_{C3}
	X_{A4}		X_{C4}
			X_{C5}
C_i	C_A	C_B	C_C
n_i	n_A	n_B	n_C
μ_i	μ_A	μ_B	μ_C

En donde:

X= Concentración en que se alcanzó el 100% de susceptibilidad en cada una de las repeticiones.

A, B, C= Son los tratamientos (aislado-fármaco)

C_i = suma de los datos del tratamiento i

n_i = número de tratamientos i

μ_i = valor promedio de los tratamientos i

Otros algoritmos necesarios para este análisis fueron:

Suma total de los cuadrados: $SS_T = \sum X_{ij}^2 - (\sum X_{ij}^2 / N)$.

Suma de cuadrados entre grupos: $SS_A = \sum (\sum n_j \bar{X}_j^2 - (\sum X_{ij}^2 / N))$

Suma de cuadrados del error: $SS_E = SST - SS_A$

Grados de libertad entre los tratamientos: = $K - 1$, donde K es el número de tratamientos o niveles de factores.

Grados de libertad del error: = $N - K$

Grados de libertad totales: $N - 1$

Tabla 4. Esquema de los valores considerados para realizar el análisis de ANOVA.

Origen de la variación	Suma de cuadrados	SS_A	Medias al cuadrado	F
Entre los tratamientos	SS_A	K-1.	$MS_A = SS_A / K-1 .$	$F = MS_A / MS_E$
Error	SS_E	N-K	$MS_E = SS_E / N-K$	
Total	SST	N-1		

Diferencia crítica positiva de Bonferroni (DCP)

$$DC = t_{(\alpha/2m)} [MS_E (1/n_1 + \dots + 1/n_j)]^{0.5}$$

En donde:

MS_E = Cuadrado del error de la media.

$t_{(\alpha/2m)}$ es el valor de tablas de m contra grados de libertad del número de tratamientos

$$m = (K(K-1))/2$$

K es el número de aislado-tratamiento

El grado de significancia de la prueba es ($\alpha/2m$)

El valor obtenido de este análisis es el parámetro por el cual se excluyó del grupo a los tratamientos que no fueron estadísticamente homogéneos al superar el valor crítico de t (en tablas).

Tabla 5. Arreglo de la matriz con la que se analizaron las diferencias positivas entre los promedios de la ANOVA.

		A	B	C
		μ_A	μ_B	μ_C
A	μ_A	$\mu_A - \mu_A$	$\mu_A - \mu_B$	$\mu_A - \mu_C$
B	μ_B	$\mu_B - \mu_A$	$\mu_B - \mu_B$	$\mu_B - \mu_C$
C	μ_C	$\mu_C - \mu_A$	$\mu_C - \mu_B$	$\mu_C - \mu_C$

En donde μ_i es el valor promedio de los tratamientos i. (Aislado-Fármaco)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resultados

La sensibilidad al 100% del aislado INP231087MM a la Ntz y al Tnz se muestra en la fig. 3. Los valores iniciales con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Ntz se presentó en 1 de 12 ensayos, y el 100% de susceptibilidad de los trofozoítos se alcanzó con 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para todos los ensayos. Con el Tnz la susceptibilidad al 100% se inició con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (en 3 de 12 ensayos) y con 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en todos los ensayos.

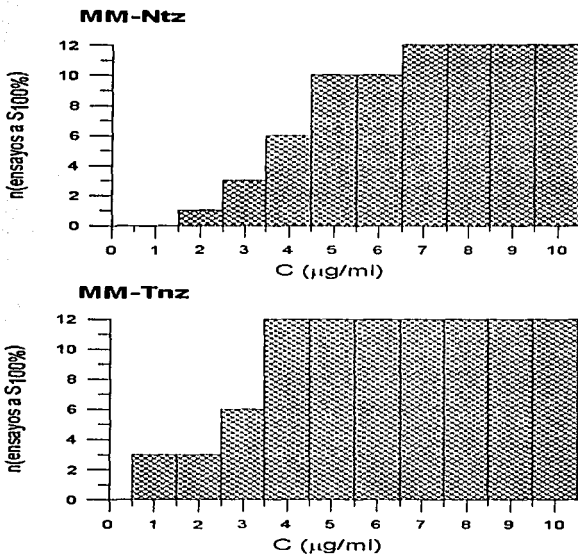


Figura 3: Histogramas que muestran el número de veces en que se presenta la sensibilidad al 100% del aislado INP231087MM expuesto a Ntz y Tnz.

La velocidad de acción de los fármacos se infirió de la pendiente (K), que se obtuvo en curvas asintóticas, mismas que caracterizaron a la Ntz como el fármaco más lento en su actividad contra los trofozoítos del aislado INP231087MM. Las funciones que representan lo anterior son:

A) MM con Ntz: $S=100(1-e^{-0.897 \cdot C})$ E.S = 9.79, $r = 0.927$, $n=132$

B) MM con Tnz: $S=100(1-e^{-1.365 \cdot C})$ E.S = 19.37, $r = 0.73$, $n=132$

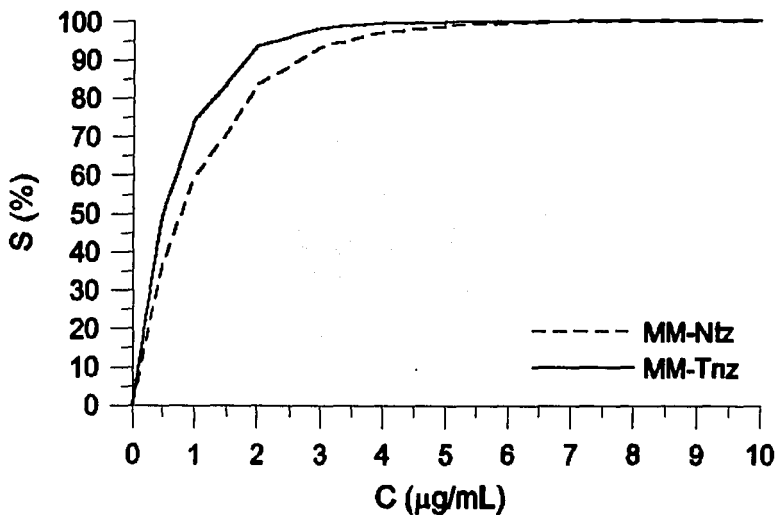


Figura 4: Curvas de sensibilidad de los trofozoítos de *G. duodenalis* del aislado INP231087MM a la Ntz y al Tnz. S= sensibilidad (%); C= concentración (µg/mL).

La sensibilidad al 100% del aislado INP210897AXA-1 a la Ntz en todos los ensayos fue con 5 $\mu\text{g/mL}$. Aunque en tres de los 12 ensayos fue con 3 $\mu\text{g/mL}$. A diferencia del Tnz que con 3 $\mu\text{g/mL}$ alcanzó el 100% de susceptibilidad en todos los ensayos (Fig. 5).

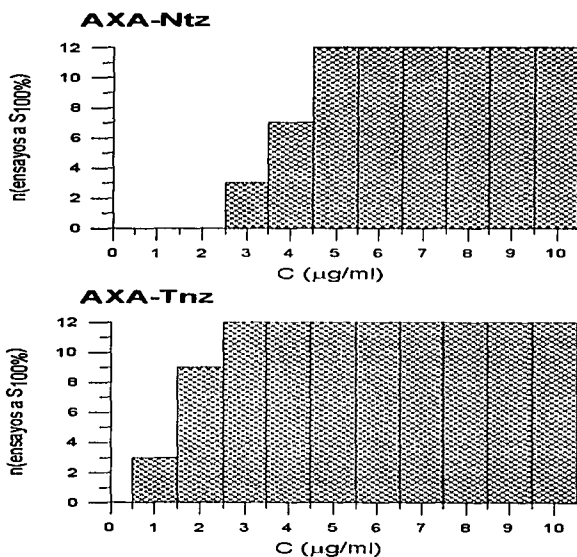


Figura 5: Histograma que muestra el número de veces en que se presenta la sensibilidad al 100% del aislado INP210897AXA-1 expuesto a Ntz y Tnz.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para el aislado INP210897AXA-1 la pendiente de la Ntz fue 50% menor que el Tnz, característica que coloca al Tnz como el fármaco de mayor actividad anti-giardiasica con este aislado. (Fig. 6) Las funciones que representan lo anterior son:

$$\text{AXA con Ntz: } S=100(1-e^{-0.619 \cdot C}) \quad \text{E.S.} = 8.52, \quad r = 0.954, \quad n=132$$

$$\text{AXA con Tnz: } S=100(1-e^{-1.16 \cdot C}) \quad \text{E.S.} = 10.058, \quad r = 0.89, \quad n=132$$

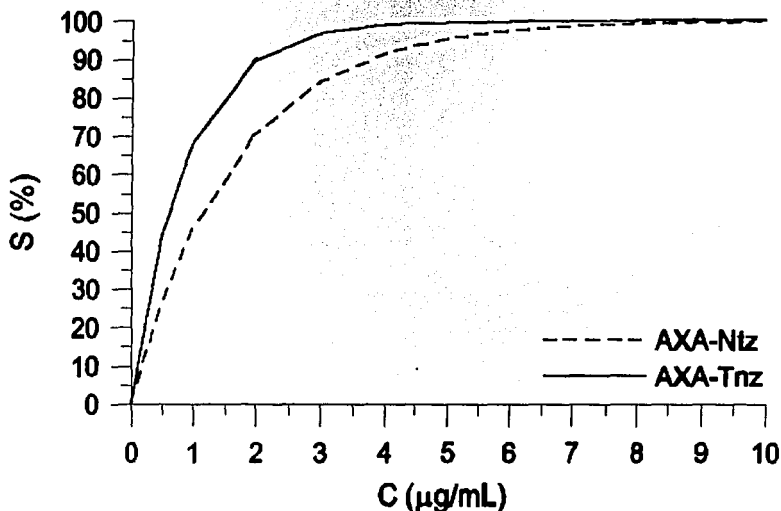


Figura 6: Curvas de sensibilidad para el aislado INP210897AXA-1 con Ntz y con TNZ. S= sensibilidad (%); C= concentración (µg/mL).

En la figura 7: Se presenta el porcentaje de susceptibilidad del aislado INP300695CP5 a la Ntz y al Tnz. El 100 % de sensibilidad de los trofozoitos a la Ntz se presentó con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en un ensayo de 12. Pero fue con 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en los 12 ensayos. También con Tnz el 100% de susceptibilidad fue con 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (Fig. 7)

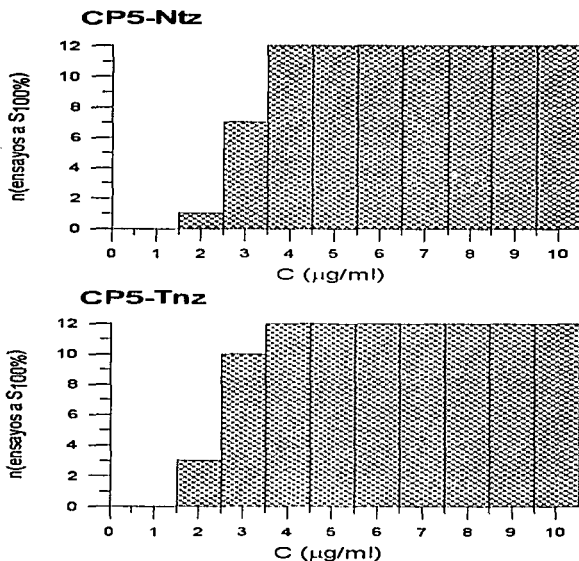


Figura 7: Histogramas que muestran el número de veces en que se presenta la sensibilidad al 100% del aislado INP300695CP5 expuesto a Ntz y Tnz.

En la Fig. 8: Se presenta las curvas de susceptibilidad del aislado INP300695CP5 (perro) a la Ntz y Tnz. Para este aislado el Tnz mantuvo alta su velocidad de acción. Las funciones que expresan esto son:

CP5 con Ntz: $S=100(1-e^{-0.65 \cdot C})$ E.S = 14.57, $r=0.91$, $n=132$

CP5 con Tnz: $S=100(1-e^{-1.16 \cdot C})$ E.S = 11.16, $r=0.905$, $n=132$

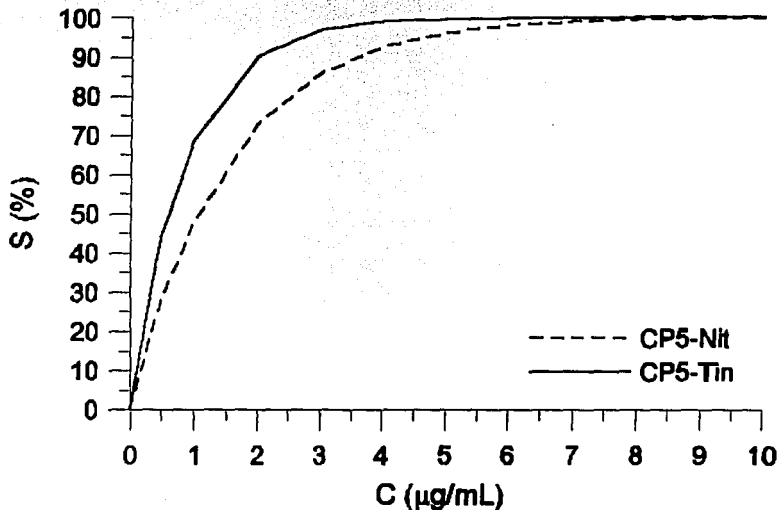


Figura 8: Curva de la sensibilidad para el aislado INP300695CP5. A la Ntz y al TNZ. S= sensibilidad (%); C= concentración (µg/mL).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El 100% de sensibilidad del aislado INP170693HG8 se muestra en la Figura 9. La mortalidad de los trofozoítos se inició con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Ntz en dos ensayos. La sensibilidad al 100% en todos los ensayos fue con 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Ntz y Tnz.. Este aislado fue el que mostró mayor sensibilidad con ambos fármacos a diferencia de los aislados MM, AXA-1 y CP5.

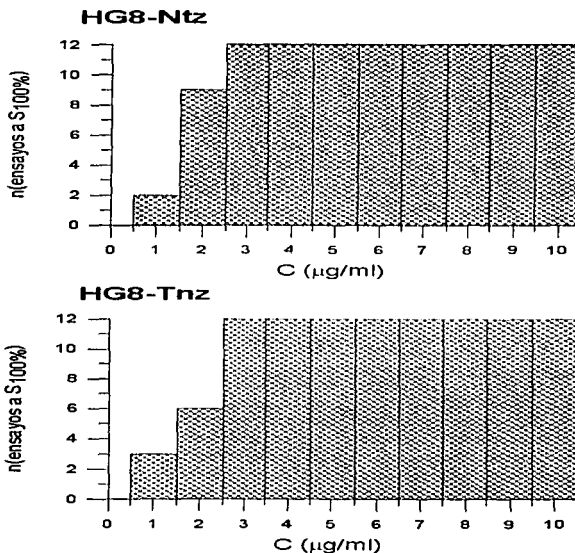


Figura 9: Histogramas que muestran el número de veces en que se presentó el 100% de sensibilidad de los trofozoítos a la Ntz y al Tnz.

El aislado INP170693HG8 (gato) a diferencia de los otros tres aislados no presentó diferencias significativas en la velocidad de acción del Tnz y la Ntz. (Figura 10). Las funciones que expresan lo anterior son:

A) HG8 con Ntz: $S=100(1-e^{-0.942 \cdot C})$ E.S = 9.79, $r = 0.927$, $n=132$

B) HG8 con Tnz: $S=100(1-e^{-1.162 \cdot C})$ E.S = 19.37, $r = 0.73$, $n=132$

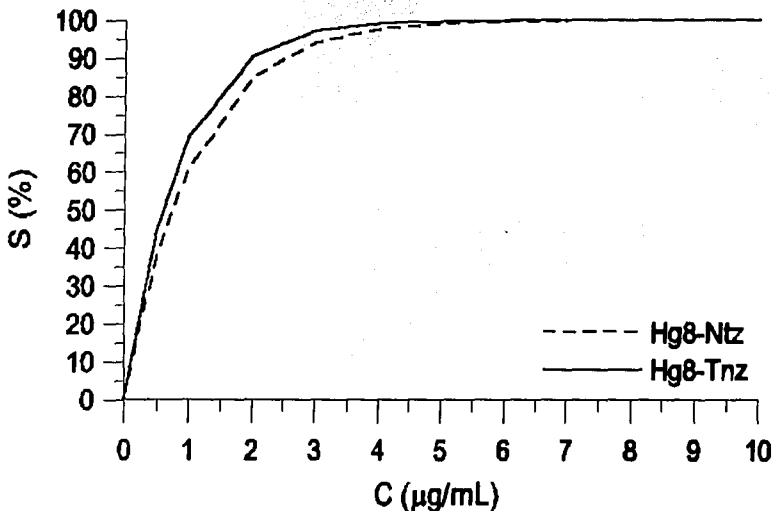


Figura 10: Curva de la sensibilidad del aislado INP170693HG8 con Ntz y con TNZ. S= sensibilidad (%); C= concentración (µg/mL).

Las diferencias que se observaron en las gráficas asintóticas, se confirmaron con el análisis de Varianza (ANOVA) de un criterio. Esta prueba permitió reafirmar la heterogeneidad que se presentó en la susceptibilidad de los cuatro aislados, tratados con diferentes concentraciones de Ntz y Tnz, en donde las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p > 0.005$).

Los análisis anteriores mostraron y confirmaron las diferencias obtenidas en la respuesta de los aislados expuestos a diferentes concentraciones de Ntz y Tnz. Adicionalmente, el análisis de Bonferroni, permitió delimitar las diferencias críticas presentes en las concentraciones letales, mediante la comparación de todas las diferencias pareadas existentes en las medias aritméticas de las concentraciones letales de cada fármaco.

La (tabla 6), muestra las diferencias de los promedios de las medias, obtenidos en los cuatro aislados, con los dos fármacos, los valores subrayados sobrepasan la diferencia crítica de Bonferroni ($D.C=0.59$).

Tabla 6. Diferencias críticas obtenidas con Bonferroni.

A/F	$\mu\text{g/mL}$	AXA	HG8	HG8	MM	CP5	CP5	AXA	MM
		Tnz	Tnz	Ntz	Tnz	Tnz	Ntz	Ntz	Ntz
		2.38	2.40	2.43	3.13	3.36	3.55	4.41	5.41
AXA-Tnz	2.38	0							
HG8-Tnz	2.40	0.02							
HG8-Ntz	2.43	0.06	0.03						
MM-Tnz	3.13	<u>0.75</u>	<u>0.73</u>	<u>0.69</u>					
CP5-Tnz	3.36	<u>0.99</u>	<u>0.96</u>	<u>0.93</u>	0.24				
CP5-Ntz	3.55	<u>1.18</u>	<u>1.15</u>	<u>1.12</u>	0.43	0.19			
AXA-Ntz	4.41	<u>2.03</u>	<u>2.01</u>	<u>1.97</u>	<u>1.28</u>	1.05	<u>0.86</u>		
MM-Ntz	5.41	<u>3.04</u>	<u>3.01</u>	<u>2.98</u>	<u>2.29</u>	<u>2.05</u>	<u>1.86</u>	<u>1.01</u>	0

A= Aislado; F= Fármaco.

El análisis de los resultados obtenidos de Bonferroni permitió cotejar las diferencias críticas (D.C.) de los parámetros obtenidos con las concentraciones reales, en las que se obtuvo la dosis letal de los trofozoitos con cada fármaco y dividió a los aislados en dos grupos. (Tabla 7). El grupo A se subdividió en dos bloques, en el primero se encuentran los aislados más sensibles, la D.L.₁₀₀ fue con 3 µg/mL., D.C de 0.02-0.06. En el segundo bloque los aislados presentaron una D. L₁₀₀ con 4 µg/mL, la D.C fue de 0.19-0.43. En el grupo B se formó un solo bloque, que incluyó a los aislados con mayor resistencia a la Ntz (5-7 µg/mL), su D.C. fue de 1.01, que es mayor a la calculada (0.59).

Tabla 7. Diferencias Críticas de Bonferroni (D.C.), cotejadas con las concentraciones letales para cada aislado.

A) D. C. < (0.59)		B) D.C > (0.59)
2.38- 2.43 µg/mL ^a (3 µg/mL) ^b	3.13 - 3.55µg/mL ^a (4 µg/mL) ^b	4.41 – 5.41 µg/mL ^a (5-7 µg/mL) ^b
AXA1-Tnz / HG8Tnz (D.C. = 0.02)	MM-Tnz / CP5-Tnz (D.C. = 0.24)	AXA1-Ntz / MM-Ntz (D. C. = 1.01)
AXA-Tnz / HG8Ntz (D.C = 0.06)	MM-Tnz / CP5-Ntz (D.C. = 0.43)	
HG8-Tnz / HG8-Ntz (D.C. = 0.03)	CP5-Tnz / CP5-Ntz (D. C. = 0.19)	

^a Rangos de las concentraciones letales de los fármacos. ^b Concentración real.

Discusión

En este estudio se encontró que el efecto antigidiásico *in vitro* de la Nitazoxanida en los cuatro aislados de *G. duodenalis* presentaron una respuesta heterogénea; el aislado INP170693GH8 (de gato) fue el más sensible (3 µg/mL) en tanto que el aislado INP231087MM (de un paciente pediátrico) fue el más resistente (7 µg/mL). Respuesta que es semejante a lo que se reporta con otros aislados y con otros antigidiásicos: Quinacrina, Metronidazol, Tinidazol y Furazolidona^{42-4,67-8}

Los estudios de Thompson y Majewska, sugieren que la heterogeneidad en las respuestas de *Giardia*, pueden reflejar la variabilidad genética y fenotípica propia de este parásito^{14, 67}, aunque el incremento en la concentración de Ntz (7 µg/mL) requerida, para obtener el 100% de sensibilidad en el aislado INP231087MM probablemente sea consecuencia de la resistencia cruzada ya que, este aislado se obtuvo de una paciente que cursó con giardiasis crónica, con tres meses de evolución, además de un cuadro clínico de base. La resistencia a fármacos también se ha documentado en otros microorganismos, cuando el DNA receptor se combina con plásmidos inductores de resistencia como el pMT₁₀₀.⁵⁴

Por otro lado, la disminución de la susceptibilidad de los trofozoitos del aislado INP231087MM a la Ntz, podría relacionarse también con la disminución de las enzimas PFOR y la PF, ya que la ausencia de estas favorece la resistencia de los parásitos debido, a que no se activa el nitroradical tóxico de los Nitroimidazoles.^{42,54} El mismo fenómeno se ha observado en *Trichomonas vaginalis* la cual, disminuye la concentración de (PF) e inhibe la expresión fenotípica de su gen hasta en un 50%.^{48,55}

Es importante señalar que los aislados obtenidos de animales INP300695-CP5 (perro) y INP170693GH8 (gato) fueron más sensibles a los dos fármacos a diferencia de los aislados obtenidos de humanos (niño) y INP210897AXA-1 (adulto). El incremento de la susceptibilidad de los aislados obtenidos de animales, probablemente, se deba a que no tuvieron contacto con ningún fármaco, debido a que en nuestro país no existe la costumbre ni los recursos económicos para desparasitar a las mascotas. A diferencia de los aislados obtenidos de humanos y especialmente el INP231087MM que se obtuvo de un paciente con una enfermedad de base, circunstancia que probablemente favoreció la resistencia cruzada, por el contacto de los protozoarios con antiparasitarios y/o antimicrobianos.^{40,48}

El corto tiempo de estabilidad que tiene la Ntz y su principal metabolito tizoxanide (4-6 hrs),^{74,96} es otra propiedad que pudo haber empobrecido su actividad anti $giardiásica$, principalmente porque en este trabajo se avaluó su efectividad a 24 horas.

En este estudio, para determinar la susceptibilidad de los trofozoitos expuestos a los dos fármacos se utilizó el método enzimático colorimétrico de la reducción de las sales de tetrazolio a formazán. Método cuantitativo que es fácil de realizar y además puede tener la reproducibilidad del método radioactivo con timidina tritiada H^3 pero, sin el riesgo que conlleva el manejo de la radiactividad.^{82,92} Otros métodos, como la evaluación morfológica,⁹³ crecimiento clonal en medio de cultivo semisólido,⁹⁴ subcultivo en medio líquido y adherencia de trofozoitos⁹⁵⁻⁶ son semicuantitativos y poco objetivos.

Otros estudios reportan concentraciones menores a $7\mu g/mL$ de (Mtz, Tnz, Ntz e.t.c.), para las concentraciones inhibitorias (CI) de 50%, 90%, 95%.^{77,90,43,68,70}

Sin embargo en los estudios preliminares de este trabajo se encontró que el aislado INP231087MM (niño) expuesto a la concentración mínima inhibitoria con 4 $\mu\text{g/mL}$ de Ntz por 24 horas se recuperó y repobló el tubo después, de tres días de incubación. Además está reportado que la $CI_{90\%}$ del Tnz se obtiene con 1 a 3 $\mu\text{g/mL}$ ^{37,45,92}, motivo por el cual se determinó trabajar con una susceptibilidad al 100% y no concentraciones subletales.

Actualmente existen pocos reportes de susceptibilidad *in vitro* de protozoarios a la Ntz, con *Cryptosporidium parvum* se tuvo una $CI_{90\%}$ con 10 $\mu\text{g/mL}$.⁷⁷ En nuestro caso encontramos que el aislado más resistente (INP231087MM) necesitó 7.0 $\mu\text{g/mL}$ de Ntz para una sensibilidad del 100%.

En pacientes giardiásicos tratados con Nitazoxanida, se ha reportado una eficiencia del 70 y 100%,^{76,79} esta variabilidad puede estar relacionada con las diferencias encontradas en estos aislados. Sin embargo, se necesitan más estudios *in vitro* y clínicos para tener una mejor perspectiva de su eficacia.

La concentración requerida para alcanzar el 100% de susceptibilidad, así como la velocidad de acción fueron los principales parámetros que marcaron las diferencias en la actividad anti-giardiasica de la Ntz y Tnz, mismas que caracterizaron al tinidazol como el fármaco de mayor actividad anti-giardiasica *in vitro*.

Conclusiones

- En este trabajo se encontró una respuesta heterogénea para los cuatro aislados de *Giardia* expuestos a la Ntz.
- Los aislados de *Giardia* provenientes de humanos fueron menos susceptibles a los dos fármacos que los aislados provenientes de animales.
- La velocidad de acción de los cuatro aislados fue mayor con el Tnz.
- Los resultados sugieren que es necesario realizar más estudios de susceptibilidad en modelos vivos.
- Debido a la respuesta heterogénea de los aislados analizados en este estudio, es recomendable que los médicos no utilicen dosis subletales.

Apéndice

Medio de cultivo TYI- S-33

Reactivos	Cantidades
Citrato férrico de amonio	0.03 g.
Acido ascórbico	0.2 g
Bilis bovina	0.5 g
Fosfato de potasio monobásico	0.6 g
Fosfato de potasio dibásico	0.1 g
Cloruro de cisteína	0.3 g
Cloruro de sodio	0.3 g
Glucosa	1.5 g
Extracto de levadura	1.5 g
Triptona	3.0 g

Los reactivos se hidrataron con agua desionizada, el pH se ajustó a 7.18 y se aforó a 100 mL. Se prefiltró y posteriormente se esterilizó por filtración con membranas de 0.2 μ M de poro.

El medio de cultivo se complementó con 10% de suero bovino.

Solución salina de fosfatos

Amortiguador de fosfatos

Cloruro de sodio 6.5 g.

Fosfato dibásico 2.8 g

Fosfato monobásico 0.4 g

Se aforó a un litro con agua desionizada pH 7.2

Sales de Tetrazolio

MTT: Bromuro de (3[4,5 dimetil tiazol-2-il]) 2,5 difenil tetrazolio. Se disolvieron 100 mg de MTT en 20 mL de agua desionizada.

PMS: Fenazin Metosulfato. N-Metildibenzopirazina. Se disolvieron 50 mg de PMS en 20 mL de agua destilada y se almacenó en un frasco ámbar a 4°C.

Isopropanol ácido

Isopropanol ácido. Se preparó con 0.173 mL de ácido clorhídrico aforado a 100 mL de isopropanol y se tuvo una solución final de 0.04 M.

Fármacos

Nitazoxanida base. Lote 56659 la obsequió por el Laboratorio Columbia. Se preparó una solución concentrada con 10 mg de fármaco en 6 ml de dimetil sulfóxido de metilo (DMSO) y se esterilizó por filtración con una membrana de fluoroporo de 0.22 μm .⁴⁸

Tinidazol base: Lo donó el laboratorio Grossman. La solución saturada se preparó con 5 mg de la sal disuelta en 4 mL de etanol al 25% y se esterilizó con membranas de fluoroporo de 0.22 μm .

Referencias

- ¹ Crossley R., Holbenton D. V. Characterization of protein from the cytoskeleton of *Giardia lamblia*. J cell Sci. 1983; 59: 81-103.
- ² Adam R. D. The Biology of *Giardia* Spp. Microbiological Reviews. 1991; 55(4): 706-32.
- ³ Nematic P.C., Owen R. L., Stevens D. P. and Mueller C. J. Ultrastructural Observations on Giardiasis in Mouse Model, II. Endosymbiosis and Organelle Distribution in *Giardia muris* and *Giardia lamblia*. J. Infectious Diseases. 1979; 140(2): 222-8.
- ⁴ Owen R. L. The Ultrastructural basis of *Giardia* Function. Trans. Royal Soc Trop. Med. and Hyg. 1980; 74(4): 429-33.
- ⁵ Sheffield H. G. and B. B. Ultrastructure of the cyst of *Giardia lamblia*. Am. J Trop Med and Hyg. 1977; 26(1): 23-30.
- ⁶ Gillin F. D., Reiner D.S. and McCaffery M. Organelles of Protein Transport in *Giardia lamblia*. Parasitol Today. 1991; 7(5): 113-16.
- ⁷ Atias A y Noemi I. Parasitología clínica. 1994. Ed. Mediterraneo. pp. 618.
- ⁸ Belosevic M., Faubert G. M., MacLean J.D., Law.C. and Croll N. A. *Giardia lamblia* Infections in Mongolian Gerbils: Ann Animal Model. J. Infectious of diseases. 1983; 147(2): 222-6

⁹ Thompson R. C. A., Reynoldson J. A., Lymbery A., J. *Giardia*. Ed. CAB INTERNATIONAL. 1994: Impreso Great Britain. pp. 391.

¹⁰ Levine N. D., Corliss J. O., Cox F. E., Deroux G., Grain J., Honigberg B. M., Leedale G. F., Loeblich A. R., Lom J., Lym D., Merinfeld E. G., Page E. C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J. and Wallace F. G. A newly revised classification of the protozoa J Protozool. 1980; 27(1): 37-58. Traducción. Ma. Antonieta Aladro Lubel

¹¹ Lengerich E. J., Addis D. G. and Juranek D. D. Severe Giardiasis in the United States. Clinical Infectious Diseases. 1994; 18: 760-3.

¹² Tay J., Ruiz A., Schenone H., Robert L., Sanchez V. J. T., Uribarren Teresa., Becerril Marco A., Romero Raúl. Frecuencia de los protozoario intestinales en la República Mexicana. Bol Chil Parasitol. 1994; 49: 9-15.

¹³ Tay Z. J., Gutiérrez Q. M., Alvarez T., Sánchez V. J. T., García Y. Y., Fernández P. A. M. Frecuencia de las parasitosis intestinales en cuatro escuelas de Morelia, Michoacán. Rev Fac Med UNAM. 1996; 39(2): 41-3.

¹⁴ Thompson R. C. A., Hopkins R. M. and Homan W. L. Nomenclature and Genetic Groupings of *Giardia* Infecting Mammals. Parasitology Today. 2000;16(5): 210-3.

¹⁵ Berrick W. J and Erlandsen S. L. Giardiasis-is it really a zoonosis?. Parasitology Today. 1988; 4(3): 69-72.

¹⁶ Hewleft E. L., Andrews J. S., Ruffier J. and Schaefer III F. W. Experimental Infection of Mongrel Dogs with *Giardia lamblia* Cysts and Cultured Trophozoites. J. Infectious Diseases. 1982; 145(1): 89-93.

¹⁷ Smith H. V. and Ahmad R. Protozoan Parasites in the water. Parasitology Today. 1997; 13(1):3-4.

¹⁸ Xiao L. Giardia infection in Farm Animals. Parasitology Today 1994; 10(11): 436-8.

¹⁹ Georgi M. E., Carlisle M. S. and Smiley L. E. Giardiasis in a great blue heron (*Ardea herodias*) in New York state: Another potential source of waterborne giardiasis. Am. J. Epidemiology. 1986; 123(5): 916-7.

²⁰ Black R. E., Dykes A., Sinclair S. P. and Wells J. G. Giardiasis in Day-Care Centers: Evidence of Person-to-Person Transmission. Pediatrics. 1977; 60(4): 486-91.

²¹ Chute Ch. G., Smith R. P. and Baron J. A. Risk Factors for Endemic Giardiosis. Ame J. Public. Health. 1987, 77(5): 585-7

²² Pickering L. K., Evans D. G., DuPont H. L., Vollet III J. J. and Evans D. J. J. diarrhea caused dy Shigella, rotavirus, and Giardia in day-care centers: Prospective study. J. Pediatrics. 1981; 99(1): 51-6.

²³ Schmerin M. J., Jones T. C. and Klein Harvey. Giardiasis: Association with Homosexuality. Ann. Intern. Med. 1978; 88(6): 801-3.

- ²⁴ Véghely P. Cellac Disease Imitated by Giardiasis. Am J. Diseases of Children: 1939; 57: 894-99
- ²⁵ Anand B. S., Kumar M., Chakravarti R. N., Sehgal A. K. and Chhuttani P. N. Pathogenesis of malabsorption in Giardia infection: an experimental study in rats. Trans. Royal Soc. Trop. Med. and Hyg. 1980; 74 (5): 565-9.
- ²⁶ Tandon B. N., Tandon R.K., Satrathy B. K. and Shrinivas. Mechanism of malabsorption in giardiasis: a study of bacterial flora and bile salt deconjugation in upper jejunum. Gut. 1977; 18: 176-81.
- ²⁷ De Manueles J. J., Ruano M. A., Sanz M. A. J., Ruano M. J y Sanchez C. M. T. Antígenos de histocompatibilidad y parasitación por *Giardia lamblia*. Ann. Esp. Pediatr. 1992; 36(1): 41-4.
- ²⁸ Oberhuber G., Stolte M. Giardiasis: Analisis of histological Changes in Biopsy specimens of 80 patients. J. Clin. Pathol. 1990; 43: 641-3.
- ²⁹ Tay L., Velasco G. Parasitología Médica. Editores Mendez. México D.F. 1996;73-9.
- ³⁰ Chen N., Upcroft J. A., Upcroft P. A *Giardia duodenalis* encoding a protein with multiple repeats of a toxin homologue. Parasitology Today. 1995;111: 423-34.
- ³¹ Cruz L. A., Cortés R. R., Valerdi M. G., González E. Uso masivo de la coproparasitoscopia con FAF. Salud Pública de México. 1989; 31(4): 536-40.

³² Reiner D. S and Gillin F. D. Human Secretory and Serum Antibodies Recognize Environmentally Induced Antigen of *Giardia lamblia*. *Infection and Immunity*. 1992; 60(2):637-43.

³³ González R. J. B., Barbadillo I. F., Merino A. J. M., Sánchez M. J. Parasitosis intestinales. Protocolo diagnóstico-terapéutico. *Bol. Pediatr.* 1999; 39(168): 106-11.

³⁴ Baruch A. C., Renton J. I. and Adam R. D. The molecular Epidemiology of *Giardia lamblia*: A Sequence-Based Approach. *J. Infectious Diseases*. 1996; 174: 233-6.

³⁵ Jiménez C. E., Crisóstomo V. Ma. del Pilar., Medina S. Roberto. Efecto in vitro de Prazicuantel sobre la actividad de *Giardia Intestinalis*. *Revista Mexicana de Puericultura y Pediatría*. 1998; 6(27): 25-9.

³⁶ Pungpak S., Singhasivanon V., Bunnag D., Radomyos B., Nibaddhasopon P., Harinasuta K. T. Albendazole as a Treatment for *Giardia* infection. *Ann. Trop. Med. and Parasitol.* 1996; 90(5): 563-5.

³⁷ Cedillo R. R and Muñoz O. In-vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to Albendazole Mebendazole and other chemotherapeutic agents. *J. Med. Microbiol.* 1992; 37: 221-4.

³⁸ Mendelson R. M. The treatment of giardiasis. *Trans. Royal. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1980; 74(4): 438-9.

³⁹ Backer H. D. Giardiasis. *Physician and Sportsmedicine*. 2000; 28(7): 1-12

⁴⁰ Upcroft P. and Upcroft J. Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. Clin. Microbiol Rev. 2001; 14(1): 150-64.

⁴¹ Gardner T. B and Hill D. R. Treatment of Giardiasis. Clin. Microb. Rev. 2001; 14(1): 114-28.

⁴² Upcroft J. A., Campbell R. W and Upcroft P. Quinacrina-resistant *Giardia duodenalis*. Parasitol. 1996; 112: 309-13.

⁴³ Boreham P. F. L., Phillips R. E and Shepherd R. W. Heterogeneity in the Responses of Clones of *Giardis intestinalis* to anti-giardial Drugs. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 1987; 81: 406-7.

⁴⁴ Edlind T. D., Hang Tu L. and Chakraborty P. R. Activity of the Anthelmintic Benzimidazole against *Giardia lamblia* In vitro. J. Infectious Diseases. 1990; 162: 1408-11.

⁴⁵ McIntyre P., Boreham P., Phillips R. E. and Shepherd R. W. Chemotherapy in giardiasis: Clinical responses and *in vitro* drug sensitivity of human isolates in axenic culture. J. Pediatrics. 1986; 108(6): 1005-10.

⁴⁶ Alvarez Ch. R., Wang Ch M., Sosa C. C. E. Eficacia de la Furazolidona, Metronidazol y Secnidazol en el tratamiento de la giardiasis en niños. Publicado en Compendium Columbia. 1991;11(2):Sin pag.

⁴⁷ Meyer E. A. Human Parasitic Diseases. Vol.III-Giardiasis. Elsevier. 1990; New York. pp. 315-357.

⁴⁸ Townson S. M., Boreham P. F. L., Upcroft P., and Upcroft J. A. Resistance to the nitroheterocyclic drugs. *Acta Tropical.* 1994; 56: 173-94.

⁴⁹ Gordts B., Honckheere J., Kasprzak W., Majewska A. C., Butzler J. P. In *Vitro* Activity of Antiprotozoal Drugs against *Giardia intestinalis* of Human Origin. *Antimicrob. Agents and Chemot.* 1987; 34; 672-3.

⁵⁰ Frayha G. J., Smyth J. D., Gobert J. G. and Savel J. The Mechanisms of Action of Antiprotozoal and Anthelmintic Drugs in Man. *Gen. Pharmac.* 1997; 28(2): 273-99.

⁵¹ Zahoor A., Lafleur M. V. M., Knight R. C., Loman H and Edwards. DNA damage induced by reduced nitroimidazole drug. *Biochem Pharmacol.* 1989; 36(19): 3299-304.

⁵² Knight R. C., Skolimowski I. M and Edwaeds D. I. The interaction of reduced Metronidazole with DNA. *Biochem. Pharmacol.* 1978; 27: 2089-93.

⁵³ Sapora O., Paone A., Maggi A., Terry J. J. and O'Neill P. Induction of Mutation in V79-4 Mammalian Cells Under Hypoxic and Aerobic Conditions by the Cytotoxic 2-Nitroimidazole- Aziridines, RSU-1069 and RSU-1131. *Biochem. Pharmacol.* 1992; 44(7): 1341-7.

⁵⁴ Upcroft J. A and Upcroft P. Drug Resistance and *Giardia*. *Parasitology Today.* 1993; 9(5): 187-189.

⁵⁵ Johnson P. J. Metronidazole and Drug Resistance. *Parasitology Today.* 1993; 9(5): 183-6.

⁵⁶ Sue M. L., Brown D. M., O'Donoghue P., Upcroft P., Upcroft J. A. Ferredoxin involvement in Metronidazole resistance of *Giardia duodenalis*. Mol. Biochem. Parasitol. 2000; 108: 137-140.

⁵⁷ Upcroft J. and Upcroft P. My favorite cell: Giardia. BioEssays. 1998; 20(3): 256-63.

⁵⁸ Upcroft J. A and Upcroft P. Future Therapeutic Alternatives for Combating Anaerobic Protozoa. Parasitol. Today. 1998; 14(6): 212-4.

⁵⁹ Levi G. C., De Ávila C., A. and Neto A. V. Efficacy of Various Drugs for Treatment of Giardiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1977; 26(3): 564-5.

⁶⁰ Figueroa Hernández J. L., Lorenzana J. Marte. Interacciones del alcohol etílico (etanol) con algunos medicamentos. Rev. Fac. Med. Mex. 1978; suplemento Investigación:147-50.

⁶¹ William G., Barsan. M. D., Michael S., Jastremski. M. D., Scott A., Syverud M. D. Emergency Drug Therapy. Ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia; 1991: 486-7.

⁶² Stewart C.P., Stolman A. Toxicology. Academic Press. New York; 1961: 98-101.

⁶³ Ré J. L., De Méo M.P., Laget M., Guiraud H., Castegnaro M., Vanelle P, Duménil G. Evaluation of the genotoxic activity of Metronidazole and dimetridazole in human lymphocytes by the comet assay. Mutation Research. 1997; 375: 147-55.

- ⁶⁴ Marvin S. L., Connor T. H., Stoeckerl M. Detection of Mutagenic of Metronidazole and Niridazole in Bodily Fluids of Humans and Mice. *Science*. 1975 ;188: 1118-9.
- ⁶⁵ Mitelman Felix., Hartley Beryl., Ursing Bo. Chromosome Aberrations and Metronidazole. *Lancet*. 1976; October 9.
- ⁶⁶ Thompson R. C. A., Lymbery A.J. Pearce D. A., Finn J. A., Reynoldson J.A and Meloni B. P. *Giardia duodenalis*: Exposure to Metronidazole inhibits comparative interaction between isolates of the parasite *in vitro*. *J. Parasitol.* 1996; 82(4): 679-83.
- ⁶⁷ Majewska A. C., Kasizak W., De Jonckheere J. F and Kaczmarek E. Heterogeneity in the sensitivity of stocks and clones of *Giardia* to Metronidazole and Ornidazole. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 1991; 85: 67-9.
- ⁶⁸ Farbey M.D., Reynoldson J., A and Thompson R. C. A. *In vitro* Drug Susceptibility of 29 Isolates of *Giardia duodenalis* from Human as Assessed by an Adhesion Assay. *Internat. J. Parasitol.* 1995; 25(5): 593-9.
- ⁶⁹ Upcroft J., A and Upcroft P. Drug susceptibility Testing of Anaerobic Protozoa. *Antimicrob. Agents Chemot.* 2001; 45(6): 1810-4.
- ⁷⁰ Jokipii L., and Jokipii A. M. In Vitro Susceptibility of *Giardia lamblia* Trophozoites to Metronidazole and Tinidazole. *J. Infect. Infect. Dis.* 1980; 141(3): 317-25.

- ⁷¹ Nigro L. M. M., Gadano A. B., Carballo M. A. Evaluation of genetic damage induced by a nitroimidazole derivative in human lymphocytes: Tinidazole (TNZ). *Toxicology in Vitro*. 2001; 16: 209-13.
- ⁷² Oxberry M. E., Thompson R. C. A. and Reynoldson J. A. Evaluation of the Effects of Albendazole and Metronidazole on the Ultrastructure of *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Spironucleus muris* Using Transmission Electron Microscopy. *Intern. J. Parasitol.* 1994; 24(5): 695-703.
- ⁷³ Noori S., Dawood A. W. and Noori U. H. Mebendazole in Giardia Infection: A Comparative Study with Metronidazole. *J. Infect. Dis.* 1992; 165: 1170-1.
- ⁷⁴ Dubreuil L., Houcke I., Mouton Y. and Rossignol J. F. In Vitro Evaluation of Activities of Nitazoxanide and Tizoxanide against Anaerobes and Aerobic Organisms. *Antim. Agen and Chemot.* 1996; 40(10): 2266-70.
- ⁷⁵ Blagburn B. L., Drain K. L., Land T. M., Kinard R. I G., Moore P. H., Lindsay D. S., Patrick D. A., Boykin D. W. and Tidwell R. R. Comparative Efficacy Evaluation of Dicationic Carbazole Compounds, Nitazoxanide and Paramomycin against *Cryptosporidium parvum* Infections in a Neonatal Mouse Model. *Antim. Agen and Chemot.* 1998; 42(11): 2877- 82.
- ⁷⁶ Boumbo O., Rossignol J. F., Pichard E., Traore H. A., Dembele M., Diakite M., Traore F. and Dialo D. A. Nitazoxanide in the Treatment of Cryptosporidial Diarrhea and other Intestinal Parasitic Infections Associated with Acquired Immunodeficiency Syndrome in Tropical Africa. *Am. J. Med. Hyg.* 1997; 56(6): 637-9.

⁷⁷ Theodos C. M., Griffiths J. K., D'Onfro J., Fairfield A. and Tzipori S. Efficacy of Nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in cell Culture and in Animal Models. *Antim. Agen. and Chemot.* 1998; 42(8): 1959-65.

⁷⁸ Cheadle M. A., Lindsay D.S., Rowe S., Dykstra C.C., Williams M.A., Spencer J. A., Toivio-K. M. A., Lenz S. D., Newton J.C., Rolsma M.D., Blagburn. Prevalence of antibodies to *Neospora Caninum* in dogs. *Int. J. Parasitology.* 1999; 29: 1537-43.

⁷⁹ Padilla R. N., Alarcón G. A., Figueroa F. R. C., Muños R. M. Comparación del efecto de la quinfamida y de la Nitazoxanida en el tratamiento de la amibiasis Intestinal no disintérica. *Rev. Mex. de Ped. .* 1998; 65-5: 196-99.

⁸⁰ Snedecor and Cochran. *Statistical Methods.* Iowa State University Press. 1967.. Weiner. *Estadística.C.E.S.A.* 1996. Mexico D.F. 595 pp.

⁸¹ Ponce M. M., Navarro A. I., Martínez G. M. N., Alvarez Ch. R. Efectos anti-giardiasico *in vitro* de 14 extractos de plantas. *Rev. Invest. Clin.* 1994; 46(5): 343-7.

⁸² Wright C W., Melwani S. I. J., Phillipson D. and Warhurst D. C. Determination of anti-giardial activity *in vitro* by means of soluble formazan production. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 1992; 86: 517-19.

⁸³ Levitz S. M. and Diamond R. D. A Rapid Colorimetric Assay of Fungal Viabilidad With the Tetrazolium Salt MTT. *J. of Inf. Dis.* 1985;152(5): 938-45.

⁸⁴ Roosignol J.F and Maisonneuve. Nitazoxanide in the treatment of *Taenia saginata* and *Hymenolepis nana* infections. Am Soc Trop Med Hyg 1984; 33(3): 511-3.

⁸⁵ Romero C. R., Robert G. L., Muñoz G M del R., and Geyne C. A. Nitazoxadide for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in Mexico. Trans Royal Soc Trop Med Hyg. 1997; 91: 701-3.

⁸⁶ Blagburn B. L., Drain K. L., Land T. M., Kinard R. G., Moore P. Hutton., Lindsay D. S., Patrick D. A., Boykin D. W and Tidwell R. R. Comparative Efficacy Evaluation of Dicationic Carbazole Compounds, Nitazoxanide and Paramomycin against *Cryptosporidium parvum* Infections in a Neonatal Mouse Model. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1998; 42(11): 2877- 82.

⁸⁷ Vdovenko A. A., Williams J. E. *Blastocystis hominis*: neutral red supravital staining and its application to in vitro drug sensitivity testing. Parasitol Res. 2000; 86: 573-81.

⁸⁸ Gree L. M., Reade J. L. and Ware C. F. Rapid Colorimetric Assay for Cell Viability Application to the Quantitation of Cytotoxic and Growth Inhibitory Lymphokines. J. Immun. Met. 1984; 70: 257-68.

⁸⁹ Weimer. Estadística. 1996; C.E.S.A México D.F. pp. 376.

⁹⁰ Majewska A. C., Kasizak W., De Jonckheere J. F. and Kaczmarek E. Heterogeneity in the sensitivity of stocks and clones of *Giardia* to Metronidazole and Ornidazole. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 1991; 85: 67-9.

- ⁹¹ Oxberry M. E., Thompson R. C. A., and Reynoldson J. A. 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.* 1994; 24(5): 695-703.
- ⁹² Inge P. M. G., and Farthing M. J. G. A radiometric assay for anti-giardial drug. *Trans. Royal Soc. Trop. Med Hyg.* 1987; 81: 345-347.
- ⁹³ Meloni B. P., Thompson R.C.A, Reynoldson J. A and Seville P. Alverndazole: a more effective anti-giardial agent *in vitro* than Metronidazole or Tinidazole. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 1990; 84: 375-379.
- ⁹⁴ Gillin F. and Diamond L.S. Inhibition of clonal growth of *Giardia duodenalis* and *Entamoeba histolytica* by Metronidazole, Quinacrina and other antimicrobial agents. *J. Ant. Chemot.* 1981; 8: 305-316.
- ⁹⁵ Favennec L., Chochillon C., Magne D., Meillet D., Raichvarg D., Savel J. and Gobert J..G. A new screening assay for anti-giardial compounds: effects of various drugs on the adherence of *Giardia duodenalis* to Caco2 cell. *Parasitol Res.* 1992; 78: 80-81.
- ⁹⁶ Stokis A., Deroubaix X., Lins R., Jeanbaptiste B., Calderon P. and Rossignol J.F. Pharmacokinetics of nitazoxanide after single oral dose administration in healthy volunteers. *J. Clin. Pharm. Ther.* 1996; 43(8): 349-51.
- ⁹⁷ Mays D.C., Bermudez O. P., Lam J. P., Tong I. K., Fauq A. H and Lipsky J. J. Inhibition of Recombinant Human Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase by Two Intermediate Metabolites of Disulfiram. *Biochemical Pharmacology.* 1998; 55:1099-1103.