



UNIVERSIDAD NACIONAL
DE MEXICO

11661
6
AUTONOMA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

"ANALISIS DE LA EXPRESION DEL GEN *pfor* EN
CULTIVOS DE *G. duodenalis* SENSIBLES Y
RESISTENTES *in vitro* A METRONIDAZOL'."

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS MICROBIOLOGIA
P R E S E N T A :
LYDIA ROMERO MONTOYA

DIRECTORES: DRA: GUADALUPE ORTEGA PIERRES
M. en C. RAUL ARGÜELLO GARCIA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

2003

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.

PAGINACIÓN DISCONTINUA



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARTA DE VOTOS APROBATORIOS

Coordinación General de Estudios de Posgrado
FES-Cuautitlán
P r e s e n t e.

Por medio de este conducto nos permitimos comunicar a usted que revisamos la tesis titulada "Análisis de la expresión del gene *pfor* en cultivos de *Giardia duodenalis* sensibles y resistentes *in vitro* a Metronidazol" que presenta la alumna LYDIA ROMERO MONTOYA con número de cuenta 8958886-4 y número de expediente 100971022 para obtener el grado de Maestra en Microbiología. Consideramos que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el Examen de Grado correspondiente, otorgamos el voto aprobatorio.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli a 24 de Mayo del 2002

NOMBRE DE LOS SINODALES

Presidente: DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO,

Vocal: DR. FELIPE CRUZ GARCIA

Secretario: DR. FERNANDO ALBA HURTADO

Primer Suplente: M.C. RAUL ARGÜELLO GARCIA

Segundo Suplente: DR. ANDRES ROMERO ROJAS

[Firma de Juan Antonio Montaraz Crespo]
[Firma de Felipe Cruz Garcia]
[Firma de Fernando Alba Hurtado]

[Firma de M.C. Raul Argüello Garcia]
[Firma de Dr. Andres Romero Rojas]

3

Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio 2 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV - IPN), bajo la dirección de la Dra. Ma. Guadalupe Ortega Pierres Profesora Titular de tiempo completo y Jefa del mismo Departamento y del M. en C. Raúl Argüello García Auxiliar de Investigación de dicho centro. Durante la realización de sus estudios de Maestría en Ciencias con especialidad en Microbiología, la autora fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de registro 112616, institución a la cual hace patente su agradecimiento.

DEDICATORIAS

Mi mayor agradecimiento a mis padres Enrique y Guadalupe, por su apoyo total en todas mis desiciones, por su paciencia y tolerancia que me han proporcionado en cada momento de mi vida.

A mis hermanos Ivon y Cos por consecuentarme y quererme tanto, aunado con la alegría que me transmiten en todas nuestras vivencias día con día, gracias.

A mis tíos Ofelia y Ramón por su apoyo y comprensión.

D

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Guadalupe Ortega Pierres, por su apoyo incondicional proporcionado en mi trayectoria académica.

Al Auxiliar de Investigador Jesús Pablo Gómez Islas, por tu valioso apoyo técnico incondicional y oportuno en el desarrollo del presente trabajo.

Al honorable jurado por su buena disposición para la revisión del presente trabajo, asimismo por las aportaciones realizadas que contribuyeron al mejoramiento del mismo.

A Raúl Argüello y Raquel Romo, matrimonio inseparable por haber contribuido en mi formación académica.

A la p. Dra. en C. Maricela Cruz Soto por tú enorme apoyo recibido en el desarrollo del presente trabajo, destacando tú inigualable calidad humana que te destaca, porque no existen palabras con que agradecerte todo tu apoyo como amiga y profesionista ¡muchísimas gracias!.

A Blanca Herrera Ramírez y René López Bolaños por su apoyo técnico en mi tesis, ya que sin su colaboración simplemente mis Giardias habrían muerto ó dicha tesis no existiría.

A las secretarias Leticia Juárez Salas, Guadalupe Ruíz Granados y Verónica por su apoyo proporcionado en la realización de la presente tesis.

Al Biólogo Arturo Pérez Taylor por ahorrarme tantas horas de desvelo en el presente trabajo, aunado a su paciencia y tolerancia que lo hace soportarme tantas veces.

A los integrantes del laboratorio 2 Lupita, Lety, Nancy, Rocío, Alonso, Luis, y Alberto por compartir tantos momentos agradables y difíciles en este lugar, y demás personas que he encontrado en una variedad de lugares que me han enseñado a ver la sencillez y complejidad de la vida.

E

INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	IV
ABREVIATURAS.....	VI
RESUMEN.....	IX
Capítulo I. Introducción.....	1
1.1. Generalidades de <i>Giardia duodenalis</i>	1
1.2. Manifestaciones clínicas.....	4
1.3. Diagnóstico de giardiosis.....	10
1.4. Régimen terapéutico de la giardiosis.....	13
1.5. Antecedentes generales.....	23
1.6. Mecanismos generales de resistencia a drogas.....	24
1.7. Antecedentes particulares.....	27
Capítulo II. Justificación.....	37
Capítulo III. Hipótesis.....	38
Capítulo IV: Objetivos.....	39
Objetivo general.....	39
Objetivos particulares.....	39
Capítulo V. Material y métodos.....	40
5.1. Cepas.....	40
5.2. Agentes quimioterápicos.....	40
5.3. Obtención de cultivos resistentes al metronidazol.....	40
5.4. Cultivo de trofozoitos de <i>G. duodenalis</i>	40
5.5. Clonación de cepa resistente al metronidazol.....	41
5.6. Diseño de iniciadores para glutamato deshidrogenasa (<i>gdh</i>), y piruvato ferredoxina oxidoreductasa (<i>pfor</i>).....	42
5.7. Extracción de DNA en <i>G. duodenalis</i>	42
a) Extracción con proteasas (proteínasa K).....	42
b) Extracción con solventes orgánicos.....	43
5.8. Extracción de RNA.....	44
5.9. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	45
5.10. Electroforesis de DNA y RNA en geles de agarosa.....	45
5.11. Reacción en cadena de la polimerasa para <i>gdh</i> y <i>pfor</i>	45
5.12. Cinética enzimática con endonucleasas de restricción.....	46
5.13. Perfil de restricción para el producto obtenido por la PCR para <i>gdh</i> y <i>pfor</i>	47
5.14. Secuenciación.....	47
5.15. Obtención y purificación de sondas.....	48
a) Freeze - Squeeze.....	48
b) Protocolo para extracción de DNA a partir de gel (Gibco BRL, kit comercial).....	49
5.16. Marcaje de sondas.....	49
5.17. Eficiencia del marcaje de sonda.....	50

5.18. Southern blot.....	50
5.19. Remoción de sondas alcalinas de Southern Blot.....	53
5.20. Transferencia de RNA (Northern Blot).....	54
5.21. Remoción de sondas de RNA.....	55
5.22. RT - PCR.....	55
Capítulo VI. Resultados.....	57
6.1. Cultivo de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	57
6.2. Generación de cultivos resistentes al metronidazol.....	57
6.3. Clonación del cultivo Ste 21.....	58
6.4. Obtención de DNA a partir de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	59
6.5. Obtención de RNA a partir de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	61
6.6. Diseño de iniciadores para <i>gdh</i> y <i>pfor</i>	63
6.7. Estandarización de PCRs para <i>gdh</i> y <i>pfor</i>	63
6.8. Cinética con endonucleasas de restricción.....	67
6.9. Análisis del perfil de restricción para el producto obtenido por la PCR para <i>gdh</i> y <i>pfor</i>	71
6.10. Homología de sitios catalíticos tipo ferredoxina 3Fe-4S y 4Fe-4S del gen <i>pfor</i> en clones de <i>G. duodenalis</i> con diferente sensibilidad al metronidazol.....	71
6.11. Obtención de sondas.....	74
6.12. Eficiencia del marcaje de sondas.....	74
6.13. Similitud en el número de genes <i>pfor</i> de <i>G. duodenalis</i>	78
6.14. Variación en la expresión del gen <i>pfor</i>	82
Capítulo VII. Discusión y perspectivas.....	88
Capítulo VIII. Conclusiones.....	99
Apéndice	
Apéndice I. Reactivos y soluciones complementarias.....	100
Medio TYI-S-33 suplementado con bilis (ATCC) #1404.....	100
Acetato de amonio 7.5 M.....	101
Acetato de sodio 3 M.....	101
Agua tratada con DEPC al 0.1%.....	101
Amortiguador de fosfatos-salina (PBS) stock 10 X.....	101
Bromuro de etidio (10 mg/ml).....	102
Buffer A.....	102
Buffer B (reactivo de bloqueo al 10%).....	102
Buffer de detección.....	102
Buffer de desnaturalización.....	102
Buffer de digestión.....	103
Buffer de lavado I.....	103
Buffer de lavado II.....	103
Buffer MOPS 10 X.....	104

Buffer de neutralización	104
Buffer SSC 20X.....	104
Buffer TBE 20X.....	105
Buffer TE (Tris/EDTA).....	105
Cloruro de sodio 100 mM.....	105
Cloruro de magnesio (MgCl ₂) 1 M.....	106
Colorante para electroforesis.....	106
EDTA (ácido etilendiamino tetracético, sal disódica) 0.5 M.....	106
EDTA 200 mM pH 8.2.....	107
Etanol al 75%.....	107
Fenol buferado.....	107
Hidróxido de sodio 1M.....	107
Hidróxido de sodio 0.4 M.....	108
Preparación de escalera de 100 pb.....	108
Preparación de medio Luria para prueba de esterilidad.....	108
Proteinasa K (10 mg/ml).....	109
RNasa A (1.0 mg/ml).....	109
SDS al 10%.....	109
Solución de cloruro de sodio 5M.....	109
Solución de HCl 0.25M.....	110
Solución de denudamiento (Remoción de sondas alcalinas).....	110
Tiocianato de guanidina 4M.....	110
Tris-HCl 10 mM pH 9.5.....	110
Xilen cianol al 10%.....	111
Apéndice II: Técnicas complementarias.....	112
Criopreservación de trofozoitos de <i>G. duodenalis</i> en N ₂ líquido.....	112
Descongelación de trofozoitos de <i>G. duodenalis</i>	112
Cristalería empleada en extracción de RNA.....	112
Capítulo IX. Referencias.....	113

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1	Tratamiento utilizado contra la giardiosis.....	14
Tabla 2	Usos clínicos del metronidazol.....	15
Tabla 3	Iniciadores y condiciones para la PCR.....	46
Tabla 4	Protocolo de RT-PCR.....	56
Tabla 5	Clonación de cultivos de <i>G. duodenalis</i> resistentes a metronidazol por dilución limitante.....	59
Tabla 6	Condiciones para la PCR.....	67
Figura 1	Entidades morfológicas de <i>Giardia duodenalis</i>	3
Figura 2	Esquema representativo del ciclo biológico de <i>Giardia duodenalis</i>	5
Figura 3	Mecanismo de acción del metronidazol.....	17
Figura 4	Mecanismos generales de resistencia a fármacos.....	26
Figura 5	Aparato de transferencia de ácidos nucleicos por vacío (Posi - Blot).....	52
Figura 6	Análisis electroforético de DNA a partir de trofozoitos de <i>G. duodenalis</i>	60
Figura 7	Análisis electroforético de RNA total obtenido a partir de preparaciones de trofozoitos con diferente densidad celular.....	62
Figura 8	Comparación de secuencias nucleotídicas de las regiones flanqueadas por el juego de iniciadores 59SGDH y 242AGDH para el gen <i>gdh</i> de <i>G. duodenalis</i> con respecto a la misma reportada en el banco de datos.....	64
Figura 9	Secuencia de aminoácidos y nucleótidos de las regiones flanqueadas por el juego de primers SPFOR-G y APFOR-G para el gen <i>pfor</i> de <i>G. duodenalis</i>	65
Figura 10	Efecto de saturación del producto de PCR para el gen <i>gdh</i> en función del uso de distintas concentraciones de DNA de <i>G. duodenalis</i>	66
Figura 11	Efecto de diferentes concentraciones de DNA sobre la amplificación del producto del gen <i>pfor</i>	68
Figura 12	Cinética enzimática con la endonucleasa de restricción Kpn I.....	69
Figura 13	Efecto de diferentes concentraciones de la enzima Kpn I sobre el perfil de restricción de DNA de trofozoitos de <i>G. duodenalis</i>	70
Figura 14	Análisis del perfil de restricción y secuencias nucleotídicas con sitios de corte para las enzimas de restricción indicadas para los genes <i>gdh</i> y <i>pfor</i> obtenidos a partir del producto de PCR de DNA genómico de <i>G. duodenalis</i>	72
Figura 15	Espectroferograma de la clona resistente al metronidazol de <i>G. duodenalis</i> (WBRM23).....	73
Figura 16	Comparación de secuencias nucleotídicas de sitios catalíticos tipo ferredoxina 3Fe-4S y 4Fe-4S obtenidos por secuenciación del producto de PCR para el gen <i>pfor</i>	75

Figura 17	Análisis comparativo de la eficiencia de recuperación del producto de PCR a partir de gel mediante protocolo comercial (Concert).....	76
Figura 18	Estimación de la eficiencia del marcaje con DIG de las sondas para el gen <i>pfor</i>	77
Figura 19	Análisis de restricción enzimática de DNA de <i>G. duodenalis</i> digeridos con BamHI.....	79
Figura 20	Autorradiograma de la hibridación tipo Southern Blot para las sondas <i>pfor</i> y <i>gdh</i> con DNA genómico de <i>G. duodenalis</i>	80
Figura 21	Autorradiograma de la hibridación tipo Southern Blot para las sondas <i>pfor</i> y <i>gdh</i> con DNA genómico de <i>G. duodenalis</i>	81
Figura 22	Autorradiograma de hibridación tipo Southern Blot para la sonda <i>pfor</i> con DNA genómico de cultivos de <i>G. duodenalis</i> con diferente sensibilidad al metronidazol.....	83
Figura 23	Efecto del número de ciclos para el gen <i>pfor</i> sobre la amplificación de RNAm.....	84
Figura 24	Análisis comparativo del nivel de expresión de RNAm para el gen <i>pfor</i> mediante RT - PCR, en clonas de <i>G. duodenalis</i> con diferente nivel de tolerancia al metronidazol.....	85
Figura 25	Análisis tipo Northern blot a partir de RNA total de <i>G. duodenalis</i>	87

ABREVIATURAS

α
A₂₆₀/A₂₈₀

% (p/v) ó (v/v)

% GC; G-C

Abs

Ác.

A+T

β

b

(B)

°C

% CFE

CLAR

cm

CSPD

dATP

dCTP

DEPC

dGTP

DIG

DL₅₀

DNA

DTT

cDNA

dNTP

dTTP

EtOH

E°

Fd, FDXN

FDA-PI

Fe

gdh

gr

GSH

HCl

hrs

Kb

Alfa

Razón de absorbancias a longitudes de onda de 260 y 280 nanómetros

Concentración peso a volumen ó volumen a volumen

Contenido de guanina y citosina

Absorbancia

Acido

Contenido de adenina-timina

Beta

Número de bases del iniciador

Bacteria

Grados centígrados

Porcentaje de eficiencia de formación de colonias

Cromatografía de líquidos de alta resolución

Centímetros

Disodio3-(4-metoxiespiro{1,2-dioctano-3,2'-(5'-cloro) triciclo [3.3.1.1]decan}-4-il) fenil fosfato

2'-Deoxiadenosina-5'-trifosfato, sal sódica

2'-Deoxicitidina-5'-trifosfato, sal sódica

Diethylpirocarbonato

2'-deoxiguanosina-5'-trifosfato

Digoxigenina

Dosis letal 50

Acido desoxirribonucleótido

Ditiotreitol

Acido desoxirribonucleótido complementario

Trifosfato de deoxinucleósidos

Timidina-5'-trifosfato, sal de sodio

Etanol

Potencial de reducción

Ferredoxina

Diacetato de fluoresceína- yoduro de propidium

Fierro

Glutamato deshidrogenasa

Gramos

Glutatin

Acido clorhídrico

Horas

Kilobases

kDa
 lt
 λ
 μg
 $\mu\text{g/mL}$
 μJ
 μl
 μM
 μm
 MDR
 mg
 mg/ml
 mg/L
 Mg^{2+}
 min
 ml
 mmHg
 mM
 mV
 M
 MDR
 MPM
 Mtz
 ng
 5-NI
 N
 ng
 ng/ μl
 nm
 Nt
 N_2
 O/N
 (P)
 pb
 PBS
 PCR
 p. ej.
 p(dT)_{15}
 pfor
 pg
 pg/ μl
 P-gp
 pH
 pmol
 RNA
 RNAm

Kilodaltones
 Litros
 Longitud de onda
 Microgramos
 Microgramos por mililitro
 Microjoules
 Microlitros
 Micromolar, concentración
 Micrómetros
 Multiresistencia a drogas
 Miligramos
 Miligramos por mililitro
 Miligramos por litro
 Magnesio
 Minutos
 Mililitros
 Milímetros de mercurio, unidades de presión.
 Milimolar, concentración
 Millivolts, unidades de corriente
 Molar, concentración
 Multiresistencia a drogas.
 Marcadores de peso molecular
 Metronidazol
 Nanogramos, unidades de peso
 5-Nitroimidazoles
 Normal, concentración
 Nanogramos
 Nanogramos por microlitro
 Nanómetros
 Nucleótidos
 Nitrógeno líquido
 Toda la noche (over night)
 Parásito
 Pares de bases
 Amortiguador de fosfatos salina
 Reacción en cadena de la polimerasa
 Por ejemplo
 Oligo de timidina
 Piruvato ferredoxina oxidoreductasa
 Picogramo
 Picogramos por microlitro
 P-glicoproteína
 Potencial de hidrógeno
 Picomol, concentración
 Acido ribonucleótido
 Acido ribonucleótido mensajero

RNAr
RT – PCR

18S, 28S

S

SDS

seg

TA

TBE

TE

TYI – S – 33

U

U/μl

U.I./L

U.V.

V

x g

Acido ribonucleótido ribosomal

Reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa

RNA ribosomal 18S y 28S

Azufre

Duodecil sulfato de sodio

Segundos

Temperatura ambiente

Tris boratos EDTA

Tris - EDTA

Medio de cultivo conteniendo tripticasa (T), extracto de levadura (Y), hierro (I) y suero (S)

Unidades

Unidades por microlitro

Unidades internacionales por litro

Ultravioleta, radiación

Volts, unidades de corriente

Gravedades

RESUMEN

La giardiosis es una infección intestinal causada por el protozoo *Giardia duodenalis*. Dicho parásito afecta principalmente a la población pediátrica, causando retardamiento en su crecimiento, entre sus síntomas clínicos prominentes resalta la pérdida del apetito, diarreas agudas y crónicas, hasta síndrome de malabsorción. El principal mecanismo de control de dicha parasitosis incluye el uso de agentes antiprotozoarios entre los cuales destacan el metronidazol, furazolidona, albendazol y mebendazol.

Se ha reportado que existen casos refractarios al tratamiento con metronidazol tanto clínicamente como *in vitro* (Brown, 1996). Por ello en este trabajo se propuso efectuar estudios moleculares, a nivel del gen *pfor*, ya que investigaciones precedentes sugerían la posibilidad de un deterioro dramático en la actividad de la enzima activadora del metronidazol, la piruvato ferredoxina oxidoreductasa en cultivos de *G. duodenalis* resistentes a metronidazol (Smith y col. 1988).

En forma inicial, se obtuvieron líneas y clones de *G. duodenalis* con diferente sensibilidad al metronidazol mediante crecimiento del parásito en concentraciones ascendentes del fármaco. Una vez obtenidos éstos, se estandarizaron los ensayos de la PCR para regiones altamente conservadas de los genes *gdh* y *pfor*, de los cuales se amplificaron selectivamente fragmentos de 570 pb, y 342 pb respectivamente. Se realizó el análisis comparativo de la secuencia nucleotídica de los sitios catalíticos 3Fe-4S y 4Fe-4S del gen *pfor* entre una clona sensible (WB-1) y una resistente al metronidazol (WBRM23), no encontrándose algún tipo de modificación en este nivel. Asimismo se establecieron las condiciones óptimas para estudios de hibridación tipo southern blot, northern blot y RT-PCR, encontrándose en el primer ensayo un bajo número de copias del gen *pfor* tanto en cultivos sensibles como resistentes al metronidazol, lo cual sugirió que no había amplificación de este gen.

Por otra parte, con respecto al nivel de expresión del gen *pfor* empleando la técnica RT-PCR, se encontró un incremento de 142.13 % del nivel de RNAm en la clona resistente (WBRM23) a diferencia de la cepa sensible (WB-1). Como alternativa metodológica, el Northern Blot resultó un ensayo altamente reproducible y se observó un resultado semejante a la técnica antes mencionada. En este contexto, el incremento en el transcrito del gen *pfor* se asoció con el fenotipo de resistencia al metronidazol, por lo que de existir una actividad de la enzima PFOR, esta podría deberse a modificaciones a nivel traduccional o post-traduccional.

CAPITULO I. INTRODUCCION

1.1. GENERALIDADES DE *Giardia duodenalis*

Los organismos del género *Giardia* han sido clasificados en el phylum Sarcomastigophora y clase Zoomastigophorea junto con otros parásitos flagelados tales como: *Leishmania*, *Trichomonas*, *Trypanosoma*, y *Dientamoeba*, en el orden Diplomonadida. Considerando la secuencia del RNAr de la subunidad menor de estos organismos se ha propuesto a *G. duodenalis* como el eucarionte más primitivo (Sogin y col. 1988). *Giardia* pertenece a un grupo filogenéticamente primitivo de protozoarios anaerobios, los cuales aparentemente provienen de ancestros relacionados con Archeobacterias que no presentan mitocondrias (Cavalier, 1987; Edlind y Chakraborty, 1987).

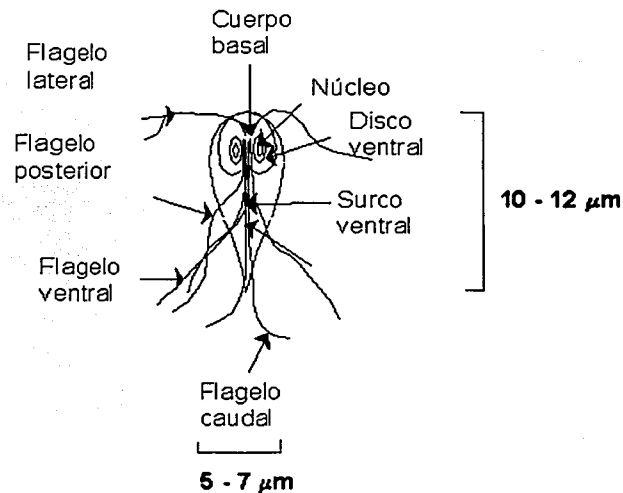
Se han descrito varias especies de *Giardia* considerando algunos criterios que ayudan a diferenciar a este parásito. Entre estos se encuentran la especificidad del hospedero, las dimensiones del cuerpo y las variaciones en la estructura. Así se distinguen las siguientes especies *G. agilis* que infecta a anfibios, *G. muris* que infecta a roedores, aves y reptiles, y *G. duodenalis* que infecta a una variedad de mamíferos incluyendo humanos, así como aves y reptiles (Filice, 1952). En este contexto es importante mencionar que la denominación de *G. duodenalis* en lugar de *G. lamblia* se da por el lugar en el que parasita a sus hospederos, esto es, en el duodeno; y la segunda porque no es adecuado que la especie lleve el nombre de un investigador. Recientemente se ha propuesto anexar dos especies a este género una de ellas se ha encontrado en aves de la especie *Melopsittacus undulatus*, y recibió el nombre de *G. psittaci* (Erlandsen y Bemrick, 1987). Descrita también por Erlandsen y col. (1990 b) la otra especie *G. ardeae* presente en garzas (*Ardea herodias*) la cual había sido incluida en el grupo "*muris*" por Filice (1952).

Giardia presenta dos entidades morfológicas en su ciclo biológico. La fase vegetativa es el trofozoíto, que es un organismo binucleado con forma de pera, mide de 10-12 μm de largo y de 5-7 μm de ancho, su superficie dorsal es

convexa y la ventral cóncava, tiene un disco adherente anterior, cuenta con cuatro pares de flagelos dispuestos en posiciones anterior, lateral, posterior y caudal. El disco no es simétrico, tiene microtúbulos rígidos ordenados en espiral, con una muesca posterior que sirve para que al moverse, los flagelos expulsen el líquido del disco, facilitando la adherencia del parásito sobre las microvellosidades intestinales. Los flagelos se originan en los axonemas citoplásmicos constituidos por nueve hileras periféricas de microtúbulos pareados, que rodean a dos microtúbulos centrales y están revestidos por la unidad de membrana superficial. Los flagelos anteriores y posterolaterales facilitan el desplazamiento del protozooario en el líquido duodenal. El cuerpo mediano, de morfología variable, es un agregado ovalado de microtúbulos curvos que se extienden hasta los axonemas caudales, reforzando su capacidad motriz (Carrada, 1984). En el citoplasma se encuentran presentes gránulos ribosomales y de glucógeno, pero no han sido identificados organelos propios de eucariontes como mitocondria, glicosomas, hidrogenosomas, peroxisomas y nucléolos (Adam, 1991., Thompson y col. 1993 b). (Figura 1).

La entidad infectante es el quiste, mide de 8-12 μm de largo y de 5-10 μm de ancho y está rodeado por una pared compuesta por proteínas y carbohidratos formando una malla cuyo espesor es de aproximadamente 0.3-0.5 μm (Erlandsen y col. 1990 a). Dentro del quiste son visibles de 2 a 4 núcleos (dependiendo si la división nuclear fue completa), cuerpos basales, cuerpos medianos y elementos estructurales del flagelo y disco ventral (Figura 1). El quiste es relativamente resistente al pH gástrico y la desecación ambiental. Los quistes de *G. duodenalis* sobreviven bien a bajas temperaturas, reportándose que duran más de dos meses a 4°C y menos de 4 días a 37°C (Bingham y col. 1979; Knight, 1980). Asimismo éstos resisten concentraciones altas de desinfectantes químicos de uso rutinario, principalmente el cloruro o el dióxido de cloruro, por lo que actualmente se deben contemplar alternativas para la purificación de agua de consumo humano (Karanis y col. 1991).

TROFOZOITO



QUISTE

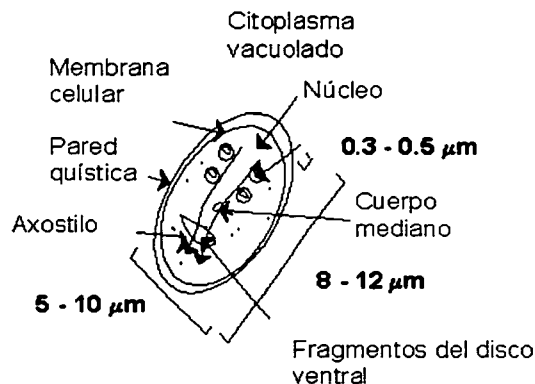


FIGURA 1. Entidades morfológicas de *Giardia duodenalis*.
Reproducido de E.A. Meyer, Microorganisms and human disease, N.Y.,
Appleton-Century-Crofts, 1974.

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

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

1.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

Los síntomas de la giardiosis se presentan en gran medida por la colonización de la pared intestinal por el parásito y, como consecuencia de esto, se observa atrofia en las vellosidades intestinales. Las infecciones por *Giardia* suelen ser asintomáticas o asociadas a una variedad de síntomas prominentes

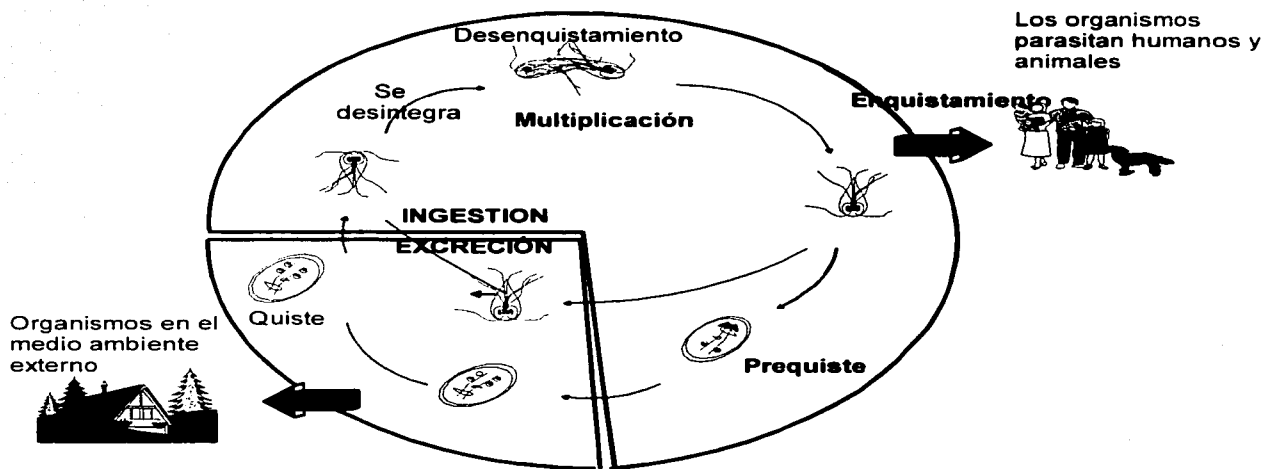


FIGURA 2. Esquema representativo del ciclo biológico de *Giardia duodenalis*. Reproducido de E.A. Meyer; Microorganisms and human disease, N.Y., Appleton-Century-Crofts, 1974.

como una diarrea prolongada, la cual se presenta en forma leve y produce heces semisólidas, o bien ser intensa y debilitante cuando las heces llegan a ser acuosas y voluminosas. Las infecciones crónicas se caracterizan por presentar esteatorrea que acompaña un síndrome de malabsorción con pérdida de peso substancial, debilidad general y la consecuente fatiga. El período prepatente de esta parasitosis es de 6 a 15 días, y el periodo de incubación frecuentemente oscila entre 7 y 21 días (Knight, 1980). El espectro de la respuesta clínica puede ser atribuido a la variación en la virulencia de los aislados de *Giardia*, a factores del hospedero tales como la respuesta inmune o bien una combinación de ambos. Actualmente se tienen evidencias de que los aislados de *Giardia* obtenidos de humanos, idénticos morfológicamente, varían con respecto a sus antígenos de superficie (Smith y col. 1982; Nash y col. 1990 b), perfiles de isoenzimas (Andrews y col. 1989), susceptibilidad a proteasas (Nash y col. 1991), y se ha observado a nivel genético por análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y de huellas digitales del DNA ó DNA fingerprinting (Upcroft y col. 1990 a; Carnaby y col. 1991). Un sistema inmune intacto es importante para erradicar la infección y para desarrollar una inmunidad protectora (Farthing, 1990). *Giardia* es esencialmente un parásito luminal y por lo tanto el estudio de los mecanismos inmunes se han enfocado a la producción de anticuerpos IgA secretorios. Recientemente se han reportado estudios que sugieren fallas en el desarrollo de una respuesta del tipo de IgA hacia un antígeno del parásito de 57 kDa, que se ha descrito como una proteína de choque térmico que está asociada con la infección persistente. Esto último en contraste con la producción de una respuesta de IgG hacia este antígeno y la respuesta de IgA a otros polipéptidos de este parásito en infecciones de larga evolución. (Char y col. 1991, 1992).

Giardia provoca alrededor de un 7 % de casos de diarrea aguda y del 11-45 % de casos de diarrea crónica, y cerca del 50 % de pacientes sintomáticos presentan evidencias bioquímicas de mala absorción de carbohidratos, grasas y micronutrientes, aunque la giardiosis suele ser responsable del desarrollo y crecimiento retardado en niños (Farthing y col. 1986a; Sullivan y col. 1991). El

mayor impacto clínico de este parásito es en recién nacidos y niños, durante los primeros 3 años de vida, en estados de desnutrición y en pacientes inmunocomprometidos.

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

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

Se ha mostrado por microscopia electrónica que los trofozoítos de *Giardia*, al adherirse al epitelio, provocan ruptura y distorsión de las microvellosidades en el sitio donde el disco adhesivo ventral interactúa con la membrana de la microvellosidad (Erlandsen y Chase, 1974). *Giardia* produce, y posiblemente libera, sustancias citopáticas hacia el lumen intestinal (Samra y col. 1988), además de contener un número de cisteína proteinasas las cuales podrían adherirse a las glucoproteínas de la superficie y romper la integridad de

la membrana de la microvellosidad (Hare y col. 1989; Parenti, 1989; North y col. 1990). También se ha mostrado que este flagelado expresa en su superficie una lectina que se une a residuos de manosa (Farthing y col. 1986b). Esta lectina sufre una ruptura mediada por tripsina de una molécula precursora citoplásmica (Lev y col. 1986), y esta proteólisis puede mediar la adhesión a los enterocitos (Inge y col. 1988), inflamación mucosal asociada con la activación de células T y liberación de citocinas (MacDonald y Spencer, 1988).

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

En cuanto a la prevalencia de las infecciones por *G. duodenalis*, en estudios realizados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez se reportó la siguiente distribución por edad de los niños con giardiosis: 21.4 % en lactantes, 41.7 % en preescolares, 27.9 % en escolares y 9 % en adolescentes (Bernal y col. 1995). Recientemente, investigaciones efectuadas en la República Mexicana enfocados al análisis de la prevalencia de la giardiosis se encuentra la siguiente distribución: La Trinidad, Guanajuato 45 %, Ixtlahuaca, Edo. de México 18.4 %, Cacaxtla, Tlaxcala 22.0%, Iztapalapa, D.F. 8.2 %, Sonora 34.6 %.

En países en vías de desarrollo, las tasas de incidencia oscilan entre un 8 y un 25 % como ocurre en regiones de Latinoamérica (Figueroa y col. 1981), África (Hason y Patterson, 1987) y Asia (Hossain y col. 1983). El principal factor de riesgo para la transmisión de la giardiosis es a través de agua. Existen dos causas por las cuales puede surgir este problema como son: la fuente de agua y

el método de tratamiento usado para la purificación de ésta. Por otro lado, la transmisión a través de alimentos contaminados ocurre porque los quistes de *Giardia* sobreviven en la mayoría de los alimentos que no necesitan ser cocinados antes de consumirse, propiciados por la inadecuada limpieza de verduras y frutas. Al respecto Carosi y col. (1994) reportaron que tan sólo 10 quistes viables de *G. duodenalis* son suficientes para causar la infección en humanos, siendo ésta una de las razones principales de la alta prevalencia de la giardiosis en comparación con otras parasitosis intestinales. Asimismo, se consideran como factores importantes en la transmisión de esta infección el contacto directo con fuentes de infección como son la transmisión de persona a persona debida a la transferencia de quistes en heces de un individuo infectado a otra persona, la contaminación de los alimentos que se expenden en la vía pública por los manipuladores de los mismos y el nulo control de las autoridades sanitarias sobre éstas personas que representan una fuente de infección para la clase trabajadora o cualquier persona que consuma alimentos que se expenden en la vía pública. Aquí se incluyen factores como la densidad poblacional, las condiciones higiénicas, la proporción de individuos susceptibles en una población (Harley, 1988), la cantidad de niños en las guarderías (Keystone y col. 1978) y hombres homosexuales promiscuos (Schmerin y col. 1978).

En Estados Unidos las fuentes y modos de transmisión de la giardiosis, de acuerdo al Center for Disease Control and Prevention (CDC) estiman que el 90 % de infecciones por *Giardia* son adquiridas por beber agua no filtrada o por el contacto con la población en edad pediátrica, el 10 % restante la adquiere por beber agua no tratada de superficie, viajes internacionales o a través de prácticas sexuales (Kappus y Juranek, 1988).

La proporción de casos para la transmisión de persona a persona, y a través de alimentos y agua varía de acuerdo a la región geográfica. En estudios epidemiológicos estacionales se ha encontrado un pico en enero en el noreste de España (García y col. 1989), aunque la estacionalidad de la giardiosis en Wisconsin es similar a la que ha sido reportada en Vermont (Birkhead y Vogt, 1989), Colorado (Wright y col. 1977), Minnesota (Ayala y Hermida, 1987),

Arkansas (Pasley y col. 1989), Oklahoma, México (Hermida y col. 1990), y el Reino Unido, notándose los picos entre los meses de julio y octubre. Se reporta que esta incidencia estacional puede ser mediada por la contaminación de agua de superficie durante el verano.

Las medidas preventivas, por su parte, incluyen campañas de educación a la población para concientizar sobre el riesgo que implica el beber agua de superficie no tratada, así como realizar una construcción adecuada de los pozos, promover su mantenimiento, la reparación ó el recambio de pozos poco profundos, y monitorear los sitios de natación públicos para minimizar la exposición a parásitos. Así mismo se incluyen el tratamiento de las personas con infecciones identificadas, el mejoramiento en la purificación del agua y el control de sanidad que se debe acompañar con programas de educación pública dirigidos a su uso e investigaciones en el desarrollo de una vacuna efectiva. Sin embargo, se deben continuar reforzando las campañas nacionales de vigilancia epidemiológica en México con la finalidad de detectar por una parte enfermedades parasitarias reemergentes, y por otro lado para monitorear la presencia y distribución de cepas resistentes para darnos un panorama general de la situación del problema. Aunque las campañas de desparasitación que realiza la Secretaría de Salud en nuestro país deben ser extensivas a la población en general para que disminuya la transmisión de las parasitosis que tienen como vehículo la contaminación por materia fecal, limitando el uso masivo y periódico de antiparasitarios. En general, la presencia de enfermedades de origen parasitario son un reflejo de las condiciones sanitarias del país.

1.3. DIAGNOSTICO DE GIARDIOSIS

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

1) Métodos tradicionales como son el exámen microscópico de muestras de heces el cual detecta quistes (coproparasitológico CPS). Sin embargo, dado que los quistes se eliminan intermitentemente, esta técnica resulta ser inadecuada en una proporción alta de casos (30-50 %) (Kamath y Murugasu, 1974). Así mismo influyen en esto otros factores tales como la administración de antibióticos, antiácidos, y productos de caolín que inhiben la excreción de quistes (Wolfe, 1984). Se han descrito en la literatura un gran número de técnicas coproparasitológicas derivadas de los fundamentos de concentración de elementos parasitarios por flotación y concentración de los mismos por sedimentación con todas sus variantes. Esta diversidad de técnicas no aseguran la observación de todas las formas parasitarias por lo que sería importante disponer de un método sensible que nos permita apreciar la frecuencia y prevalencia real de las parasitosis. En este sentido resalta la importancia de emplear y estandarizar técnicas CPS con mayor sensibilidad, reproducibilidad, facilidad de realización y bajos costos.

Otros métodos, como la aspiración duodenal y la biopsia, identifican principalmente trofozoitos (Gordts y col. 1985). Un método adicional consiste en la obtención de líquido y/o moco duodenal a través de un hilo en una cápsula y que, al ser extraído unas horas después, es exprimido y se hace un frotis de la muestra para la observación directa en el microscopio de luz (Entero-test ó Cap. Beal).

2) Técnicas inmunológicas que emplean reactivos biológicos para la detección de anticuerpos específicos contra *G. duodenalis* en suero y secreciones. Entre las pruebas serológicas más empleadas se encuentran la inmunodifusión (Vinayac y col. 1978, Jokipii y Jokipii, 1982), hemaglutinación indirecta (Ganguly y Mahajan, 1981), inmunofluorescencia indirecta y la inmunofluorescencia directa en la cual se han detectado anticuerpos específicos hacia *Giardia* en saliva (Osipova y col. 1984) y ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) en las cuales también se han empleado muestras como la leche materna (Miotti y col. 1986). Por otro lado la detección de IgG anti*giardia* específica en muestras sanguíneas conservadas en papel filtro presenta una sensibilidad del 91 % y especificidad

del 95 % (Al-Tukhi y col. 1993). Dicho ensayo también se emplea en la detección de antígenos del trofozoito y/o quiste en heces. Otra técnica usada es la contrainmunolectroforesis (CIE) la cual detecta antígenos de quiste en heces en la cual se usa comercialmente el ELISA (Janoff y col. 1989).

3) Técnicas moleculares, que son métodos basados en sondas de DNA (marcadas por quimioluminiscencia ó radioactivamente) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para secuencias específicas del DNA. La segunda prueba se ha empleado para detectar y diferenciar quistes viables y no-viables de *Giardia*, además de caracterizarse por ser una técnica específica y sensible dado que puede detectar hasta un solo quiste, lo cual la hace una herramienta muy útil para la detección ambiental del parásito (Abbaszadegan y col. 1991). Así mismo se ha empleado dicha técnica para diferenciar cepas patógenas de *Giardia* (Mahbubani y col. 1992). Los parásitos que han sido estudiados con estas técnicas incluyen *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosomas*, *Toxoplasma gondii*, *E. histolytica*, *T. vaginalis*, *Cryptosporidium parvum*, *Taenia*, *Echinococcus*, *Brugia malayi*, *Wuchereria bancrofti*, *Loa loa* y *Onchocerca volvulus* (Singh B., 1997). También se ha empleado las huellas digitales de DNA con la sonda de DNA del fago M13 la cual es capaz de mostrar diferencias genéticas entre cepas de *Giardia* (Archibald y col. 1991). Por otro lado, la electroforesis de enzimas (zimodemos) se usa para examinar la variación genética entre aislados de *G. duodenalis* de diferentes áreas geográficas y además proporciona información sobre la estructura genética, ploidía y taxonomía y compara aislados de diferentes especies de hospederos con el fin de demostrar si en realidad la transmisión es mediada por una zoonosis (Meloni y col. 1995). El RAPD (DNA polimórfico amplificado al azar) es otra técnica que detecta la variación genética entre aislados de *Giardia* (Morgan y col. 1993 a). Estos métodos probablemente no sustituirán los métodos tradicionales ampliamente utilizados en el diagnóstico rutinario de infecciones parasitarias en países subdesarrollados y en vías de desarrollo donde las enfermedades parasitarias son endémicas esto debido a los altos costos. Sin embargo, estas pruebas pueden ser extremadamente útiles para la genotipificación de cepas de parásitos y para la detección precisa del

parásito tanto en humanos como animales domésticos ó silvestres durante los estudios epidemiológicos.

1.4. REGIMEN TERAPEUTICO CONTRA LA GIARDIOSIS

Antiguamente los fármacos utilizados en el tratamiento de la giardiosis eran sustancias altamente tóxicas, como tetracloruro de carbono, mercurio y bismuto (Mendelson, 1980).

El tratamiento antiparasitario debe ser apropiado para cada infección y a la dosis correcta, vigilando los posibles efectos tóxicos. Los agentes quimioterápicos que se utilizan actualmente en el tratamiento de la giardiosis, incluyen principalmente fármacos que pertenecen a la familia de la acridina (quinacrína), aminoglicósidos (paromomicina), 5-nitrofuranos (furazolidona), bencimidazoles (albendazol y mebendazol) y 5-nitroimidazoles (metronidazol) (Tabla 1).

De los mencionados anteriormente, los más ampliamente utilizados son los dos últimos presentando un amplio espectro de actividad, es decir que tienen actividad contra bacterias y protozoarios anaerobios (Tabla 2).

Metronidazol (2-metil-5-nitroimidazol-1-etanol). El mecanismo de acción de este fármaco en el parásito *G. duodenalis* es desconocido; sin embargo, se sugiere postular como hipótesis, por un lado por analogía con estudios previos de activación del fármaco realizados en *Trichomonas* con resultados comparables al de otros organismos anaerobios y por otra parte a la acción de otros radicales libres, se propone inicialmente que el metronidazol se administra en una forma inactiva y entra a la célula por difusión pasiva, enseguida la enzima piruvato ferredoxina oxidoreductasa conocida también como piruvato sintasa (PFOR, enzima específica del metabolismo energético en protistas amitocondriales; Horner y col. 1999), la cual contiene grupos Fe-S de 200-300 kDa, el cual usa pirofosfato de tiamina (TPP) como un grupo prostético

TABLA 1. TRATAMIENTO UTILIZADO CONTRA LA GIARDIOSIS.

PRINCIPIO ACTIVO	NOMBRE COMERCIAL	REGIMEN	EFFECTIVIDAD	REFERENCIA
Albendazol	Valbazen	Dosis única 600 mg u 800 mg. 400 mg diariamente, 5 días.	62-75% 81 % 95 %	Hall y Nahar, 1993.
Furazolidona	Furoxona	8mg/kg/día (3 a 4 veces diariamente) 10 días	80 %	Davidson,1984
Mebendazol	Vermox	100 mg cada 12 hrs. Tres días	80.4 %	Rodríguez y col, 1999.
Metronidazol	Flagyl	15mg/kg/día (3 veces diariamente), 5 días	90 %	Davidson,1984
Paromomicina	Humatin	30mg/kg/día (3 a 4 veces diariamente), 10 días.	55 – 73%	Wolfe, 1984.
Quinacrina	Atabrina	6mg/kg/día (3 veces diariamente) 300 mg por día máximo, 5 días	90 %	Davidson,1984

TABLA 2. USOS CLINICOS DEL METRONIDAZOL

ENFERMEDAD	ORGANISMO	TIPO DE FARMACO
Tricomoniosis	<i>T. vaginalis</i> (P)	5-NI
Vaginitis inespecifica	<i>Gardnerella</i> (<i>Haemophilus</i>) <i>vaginalis</i> (B)	5-NI
Amibiosis intestinal	<i>Entamoeba histolytica</i> (P)	5-NI
Giardiosis	<i>Giardia duodenalis</i> (P)	5-NI
Sepsis posoperativa	<i>Bacteroides</i> sp (B)	5-NI
Sepsis postoperativa	<i>Clostridium</i> sp (B)	5-NI
Leishmaniosis	<i>Leishmania mexicana</i>	5-NI
Estomatitis de Vincent	La mayoría incluyendo <i>Bacteroides</i> (B), y <i>fusiformes</i> (B)	5-NI

RECIBO CON
FALLA DE CARGA

(Schönheit y Schäfer, 1995). La PFOR se encuentra unida a la membrana en *G. duodenalis* (Townson y col. 1996), genera electrones a partir de la descarboxilación del piruvato, los cuales son donados a la ferredoxina promoviéndose la formación de varios intermediarios tóxicos como el radical anión, el nitroso, la hidroxilamina y el amino. Algunos de estos posiblemente se pegan a proteínas, membranas (Johnson, 1993) ó al DNA para formar un complejo que no puede funcionar como iniciador para las DNA y RNA polimerasas inhibiendo la síntesis de DNA, el daño que sufre este ácido nucleico depende del contenido A + T (Edwards, 1980), y se generan finalmente dos metabolitos conocidos como acetamida y ác. oxámico (Ings y col. 1974) (Figura 3).

Algunos estudios enfocados a la caracterización de PFOR (Townson y col. 1996), ferredoxina (Townson y col. 1994), y NADH oxidasa (Brown y col. 1995) han revelado que los componentes del transporte de electrones en *Giardia* se encuentran en la membrana y/o en el citosol.

Giardia contiene tres ferredoxinas (Fd I, II y III) siendo exclusivamente la Fd I la que reduce al metronidazol *in vitro* (Townson y col. 1994, 1996), así esta proteína soluble monomérica de 5.7 KDa presenta una secuencia aminoacídica terminal que tiene un alto porcentaje de homología a otras ferredoxinas procarióticas indicando que la Fd I esta estrechamente relacionada a ferredoxinas de arqueobacterias y eubacterias anaeróbicas.

En este sentido, se han realizado diversos estudios en proteínas fierro-azufre cuya función principal es la transferencia de electrones en una amplia gama de reacciones metabólicas. Este tipo de proteínas se dividen en varios subgrupos, de acuerdo a la naturaleza de sus centros Fe-S y la similitud de su secuencia, presentando en general potenciales redox bajos (Yoch y Carithers, 1979). Entre los diferentes tipos de ferredoxinas, se encuentran 2Fe-2S que son proteínas ó dominios de cerca de 100 residuos de aminoácidos en esa región que se encuentran en organismos fotosintéticos propiamente plantas y algas, arqueobacterias (*Halobium*), *Rhodobacter capsulatus*, y *Pseudomonas putida*.,

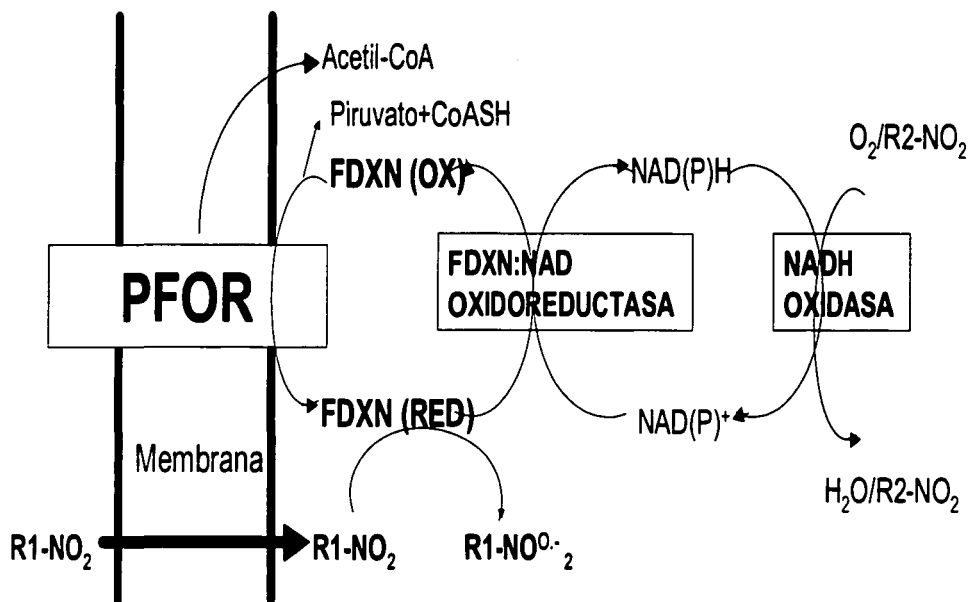


FIGURA 3. Mecanismo de acción del metronidazol. Inicialmente se promueve la reducción de grupo 5-nitro mediante la enzima PFOR, generando intermediarios reactivos, los cuales posiblemente se pegan al DNA, RNA, proteínas y/o membranas promoviendo la muerte celular. Reproducido de Boreham y col. 1988.

del tipo 4Fe-4S se localizan en bacterias por lo cual se les conoce como "ferredoxinas tipo bacteriano" encontrándose ampliamente distribuidas en anaerobios fermentativos y fotosintéticos como sería el caso de termoacidófilos y metanógenos (Kerscher y Oesterhelt, 1982).

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

Los efectos adversos del metronidazol generalmente están relacionados con la dosis, y los más comunes son: molestias gastrointestinales, especialmente náusea y desagradable sabor metálico, se acompaña algunas veces por dolor de cabeza, anorexia y vómito. Algunos estudios han mostrado que es mutagénico en bacterias (Rosenkranz y Speck, 1975 ; Lindmark y Muller, 1976) y carcinogénico en varias especies de roedores (Legator y col. 1975; Rustia y ShubiK, 1979). Con lo que respecta a sus reacciones adversas, cuando es administrado junto con alcohol provoca una reacción parecida al disulfiram. La cimetidina eleva las concentraciones séricas de metronidazol incrementando el riesgo de efectos neurológicos. Este fármaco no está aprobado por la Food and Drug Administration en los Estados Unidos para el tratamiento de la giardiasis, aunque es ampliamente usado por los médicos para este propósito en éste y otros países en vías de desarrollo. Sin embargo suelen presentarse fallas

en el tratamiento con derivados del 5-nitroimidazol (Mendelson,1980).

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

Quinacrina (N4-(6-cloro-2-metoxi-9-acridinil)-N1,N1-dietil-1,4-pentanediamina dihidrocloruro). Es un compuesto antimalárico que actúa inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos, y es considerado por varios investigadores como el agente de selección. Sus efectos colaterales son: psicosis tóxica y hemólisis en pacientes deficientes en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Furazolidona (3-[(5-nitro-2-furanil) metileno]-amino)-2-oxazolidinona). Presenta actividad antiprotozoaria y antibacteriana. Actúa dañando el DNA directamente o por vía radicales de oxígeno (Thompson y col. 1993 b). Los nitrofuranos pueden ser reducidos por enzimas citosólicas tales como NADH y NADPH oxidasa, así como también por la PFOR (Moreno y col. 1984). Se ha observado que en *Giardia* la sensibilidad a este tipo de fármacos está

correlacionada con un aumento en la actividad enzimática de peroxidasa y reductasa dependiente del tiol, siendo esta una posible explicación del mecanismo de resistencia, lo cual en parte puede indicar que un adecuado funcionamiento del ciclo tiol genera el fenotipo de resistencia (Smith y col., 1988). Los efectos adversos más comunes de la administración de furazolidona involucran el tracto gastrointestinal e incluyen náusea y vómito, es hepatotóxica, produciendo anemia hemolítica en pacientes con deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La Food and Drug Administration de los E.U.(1991) la reportó como carcinogénica y mutagénica, y no se comercializa para uso humano en Australia (Townson y col. 1992).

Paromomicina (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-D-estreptamina. Tiene actividad antibacteriana, antihelmíntica y antiprotozoaria. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis proteica, al unirse al RNAr (tipo 16 S) la subunidad ribosomal menor (Adam, 1991). Estudios realizados por Boreham y col. (1986) con ratones neonatales revelaron que este fármaco es de 4 a 5 veces más activo que el metronidazol y la quinacrina, y dado que es poco absorbida en el intestino se reduce el riesgo de toxicidad sistémica, lo cual permite que sea recomendado durante el embarazo (Davidson, 1984). Se ha reportado que el par de bases específica C-1409/G-1491 del RNAr está implicado en la susceptibilidad de *Giardia* a dicho fármaco, mientras que todos los procariontes tienen este par de bases, se encuentra ausente en la mayoría de eucariontes (incluyendo mamíferos) y varios protozoarios (Edlind, 1989).

Bencimidazoles: En este grupo de fármacos se encuentran el albendazol, mebendazol, fenbendazol y nocodazol, cuyo mecanismo de acción propuesto es la unión a tubulina (proteína dimérica compuesta de subunidades α y β de aproximadamente 50 kDa cada una) y giardinas (que sólo son encontradas en el disco ventral de *Giardia*), viéndose en estudios *in vitro* que el tratamiento con estos fármacos deteriora la adhesión de los trofozoítos a substratos biológicos (cél. epiteliales) ó inertes (vidrio, plástico) y ocasiona

cambios dramáticos en la morfología del parásito (Meloni y col. 1990; Chávez y col. 1992). El albendazol, mebendazol y oxfendazol producen embriotoxicidad y teratogénesis en animales de laboratorio; además no deben administrarse a mujeres embarazadas (Botero, 1986). Ha sido incorporado al Cuadro Básico de Medicamentos del Sector Salud de México el albendazol como antihelmíntico de amplio espectro para uso en medicina veterinaria y humana, y según el perfil metabólico del organismo humano existen nueve metabolitos, encontrándose en mayor proporción el sulfóxido y la sulfona de albendazol (Fuentes y col. 1992).

La investigación de agentes anti $Giardia$ alternativos ha hecho necesaria la evaluación de los derivados del nitrotiazol específicamente la nitazoxanida, cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos provocando una alteración en la estructura de la doble hélice del DNA (protozoarios), e interfiere en el metabolismo de la glucosa creando una acidosis láctica (helminths), es un antiparasitario de amplio espectro, pruebas clínicas realizadas en Coacalco, Edo. de México han mostrado que tiene una efectividad del 87.6 % (Díaz y col. 1999).

Existen una serie de fármacos anti $Giardia$ cuyo estudio se encuentra en fase experimental. Por ejemplo, el fármaco antidepresor clorimipramina inhibe el crecimiento de *Giardia in vitro*, posiblemente a través de su capacidad para inhibir la ATPasa asociada con la membrana (Weinbach y col. 1985). El D-propanolol, al ser un fármaco estabilizante de la membrana inhibe tanto la motilidad como el crecimiento de *Giardia in vitro* y hay un reporte clínico de un caso en que al presentarse una falla al tratamiento con metronidazol se le administró posteriormente DL-propanolol, asociándosele con una rápida erradicación del parásito (Popovic, 1990). Por otro lado Crouch y col. (1986), han evaluado la sensibilidad *in vitro* de *G. duodenalis* ante varios agentes quimioterapéuticos que no han sido usados previamente en el tratamiento de la giardiosis, entre los cuales se encuentran la mefloquina, doxiciclina, y rifampina, observando una fuerte actividad de éstos contra el protozooario, por lo que se ha propuesto su evaluación clínica como potenciales fármacos de tratamiento alternativo. Se ha evaluado *in vivo* la eficacia del zinc de bacitracina

encontrándose que es efectivo en el tratamiento de la giardiosis, lo cual es debido a que el zinc forma un complejo con la bacitracina que incrementa la estabilidad de la molécula asegurando su actividad farmacológica, de esta forma resulta ser un candidato alternativo para el tratamiento de dicha infección (Andrews y col. 1995). Actualmente se ha evaluado la actividad de nuevos 5-nitroimidazoles contra parásitos sensibles y resistentes (*E. histolytica*, *G. duodenalis* y *T. vaginalis*) al metronidazol encontrando que son más potentes y efectivos que el metronidazol por lo cual representan una alternativa útil al tratamiento de dicha parasitosis (Upcroft y col. 1999).

1.5. ANTECEDENTES GENERALES

La resistencia a diversos agentes quimioterápicos empleados en el tratamiento de infecciones intestinales debidas a protozoarios, entre ellos *G. duodenalis* tiene un gran impacto en la selección de los fármacos a utilizarse, ya sea con fines terapéuticos o profilácticos, por lo que el entendimiento de los mecanismos de resistencia es crítico para efectuar una selección adecuada de una terapia parasitocida.

Actualmente dada la existencia de casos refractarios al tratamiento con metronidazol, se han efectuado estudios utilizando la combinación de fármacos que pertenezcan a la misma familia o a otros que tengan diferente estructura química y mecanismo de acción con la finalidad de evitar la resistencia cruzada (Crouch y col. 1990), en este sentido muchos estudios han reportado diferencias en el patrón de sensibilidad a diversos agentes quimioterápicos, entre ellos metronidazol, furazolidona relacionados con aislados de diferentes áreas geográficas, a nivel de clonas obtenidas a partir de éstas, y cepas de referencia (WB y P-1). Lo anterior con la finalidad de erradicar al parásito, sin embargo sobresale la necesidad de estudiar aspectos bioquímicos, genéticos y fisiológicos con el propósito de entender y conocer los mecanismos relacionados con la resistencia para diseñar fármacos más selectivos, que actúen en sitios específicos de las diversas rutas metabólicas, involucrados en procesos celulares fundamentales útiles en la sobrevivencia del microorganismo.

Tomando en su conjunto esta información, sobresale la importancia de tener un modelo animal y métodos de evaluación de viabilidad adecuados en términos de sensibilidad, reproducibilidad y costos, que permitan monitorear la sensibilidad de *G. duodenalis* ante diferentes agentes farmacológicos, lo anterior permitirá determinar de una manera óptima la concentración que puede tolerar la línea resistente. En este aspecto se han descrito diversos métodos que permiten obtener cultivos resistentes *in vitro* al metronidazol con la finalidad de tener material suficiente para estudiar el fenotipo de resistencia, destacando el cultivo de los trofozoítos bajo exposición intermitente al fármaco, exposición constante del

fármaco en el cultivo y la mutagenésis inducida con luz U.V. (Townson y col. 1992).

Recientemente uno de los principales problemas que conlleva el uso indiscriminado de agentes quimioterápicos es la presencia de cepas resistentes las cuales han sido reportadas en *G. duodenalis* tanto clínicamente como *in vitro* (Brown, 1995 a,b), propiciando la existencia de casos refractarios al tratamiento tradicional. Esto puede ser debido en parte a la limitación de éstos en el Cuadro Básico de Medicamentos (en humanos) y Prontuario de Veterinaria (en animales) para enfermedades de origen bacteriano, viral, micótico y parasitario. Así mismo se han sugerido como otras posibles causas de fallas al tratamiento inconformidad del paciente con el régimen de fármacos prescritos (Boreham y col. 1986), la reinfección del paciente, cambios en la farmacocinética del fármaco, escape de organismos a sitios privilegiados donde las drogas anti-giardia son incapaces de llegar, alteraciones en el sistema inmunológico del paciente (Boreham y col. 1988 a), e inactivación del fármaco por infecciones bacterianas concomitantes (Edwards y col. 1979).

Tomando en cuenta la información anterior, resalta la importancia de realizar estudios moleculares con la finalidad de discernir parcialmente los mecanismos involucrados con la resistencia a drogas, por lo que en el presente trabajo se evaluó la resistencia al metronidazol en clonas, cepas, y líneas de *G. duodenalis* analizando aspectos genéticos de la enzima involucrada en la biotransformación del metronidazol conocida como piruvato ferredoxina oxidoreductasa.

1.6. MECANISMOS GENERALES DE RESISTENCIA A DROGAS

Una de las principales formas para interferir con la replicación del parásito, es mediante la utilización de fármacos, los cuales deben interactuar directamente con su sitio blanco dentro de los parásitos. Generalmente para que esto ocurra, la droga tiene que atravesar la membrana del parásito y ser activado en el interior. Una vez que la droga se encuentra en la biofase, el parásito debe estar lo

suficientemente incapacitado para ser eliminado y morir. Sin embargo, cada una de estas etapas le proporciona al microorganismo la oportunidad de interferir con la acción del fármaco generando un fenotipo de resistencia.

Considerando lo anterior, se ha definido la resistencia como un cambio en la farmacodinamia de un fármaco (a nivel de absorción, distribución, biotransformación, eliminación y sitio de acción) (Lacey, 1990).

Los mecanismos generales de resistencia a drogas (Figura 4) incluyen inicialmente aspectos fisiológicos sobresaliendo una disminución en la acumulación del fármaco debido posiblemente a una pérdida en el transportador requerido para la incorporación intracelular de la droga en el microorganismo, lo cual ha sido reportado en *Trypanosomas* con fármacos tales como arsénicos basados en melaminas (melarsoprol, utilizado en el tratamiento de casos avanzados en la tripanosomiasis cuando está afectado el SNC) y diamidinas (pentamidina). En estudios realizados en *T. brucei* con cepas silvestres se encontraron dos sistemas de transporte de alta afinidad para adenosina, estando involucrado uno en el transporte de arsénicos basados en melamina conocido como tipo P-2. Carter y Faerlamb (1993) observaron que trypanosomas resistentes carecían de este sistema de transporte, sugiriendo que el fenotipo de resistencia a arsénicos está mediado por una disminución en la incorporación de este tipo de sustancias.

Por otra parte, el exporte de drogas hacia el medio extracelular del parásito puede estar mediado por la presencia de proteínas transmembranales que funcionan como bombas de eflujo como ATPasas y P-glicoproteínas (P-gp), promoviendo un decremento en la acumulación del fármaco. Este tipo de proteínas han estado involucradas en la resistencia a emetina en *Entamoeba histolytica* presentando varias características semejantes al fenotipo MDR encontradas en células cancerígenas, entre éstas resistencia a drogas hidrofóbicas, incremento en el eflujo de emetina y reversión de resistencia mediante la administración de verapamil (Descoteaux y col. 1992), con respecto a la mefloquina y cloroquina en éste último se han encontrado dos genes *mdr* (*pfmdr1* y *pfmdr2*) que codifican para homólogos de PgP identificados en

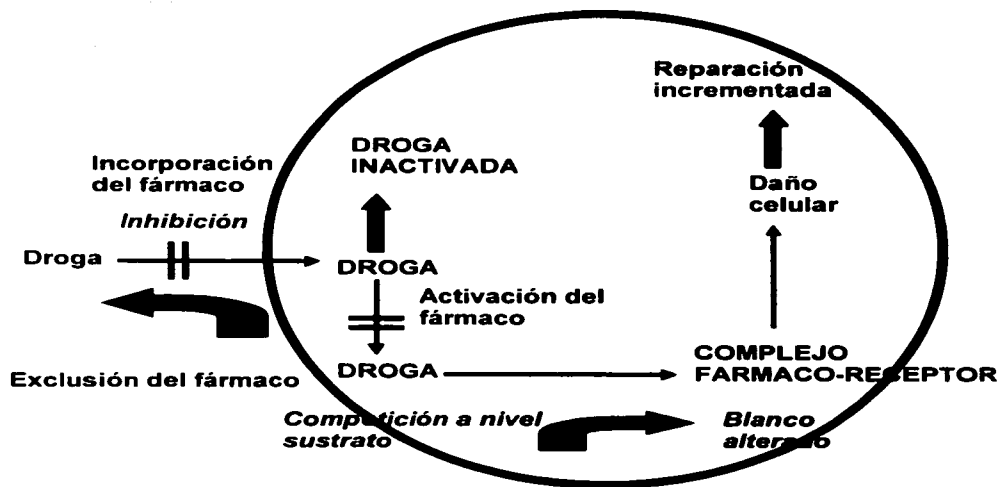
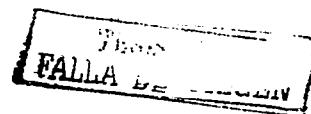


FIGURA 4. Mecanismos generales de resistencia a fármacos.

Reproducido de Borst y Oullette (1995).



Plasmodium spp (Cowman, 1991), y a fármacos de tipo antimoniacal en *Leishmania* spp estando involucradas una elevada biosíntesis de glutatión (GSH), aunada con una alta actividad de GST y un incremento en el exporte de complejos formados entre arsénico (As) y GSH $[\text{As}(\text{SG})_3]$ los cuales sirven de sustrato a la bomba GS-X que promueve la eliminación de éstos. Por otra parte, con respecto a los mecanismos genéticos se ha observado que la alteración en los sitios blancos de la droga conduce al surgimiento de resistencia, tal es el caso del *Plasmodium*. En este organismo se han encontrado substituciones nucleotídicas en el gen de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) -timidilato sintasa (TS) propiciando mutaciones puntuales en el sitio activo de esta enzima. En este caso la primera enzima realiza la reducción de drogas antifolato a tetrahidrofolato como la pirimetamina y cicloguanil. Con respecto al primer fármaco se ha encontrado un cambio en la posición 108 del aminoácido serina por arginina (Cowman y col. 1988, Wellems, 1991); ésta mutación se ha encontrado en aislados de campo refractarios al tratamiento (Peterson y col. 1991). También se ha observado que parásitos del género *Plasmodium* resistentes a pirimetamina no presentan resistencia cruzada con cicloguanil. Por otro lado, con respecto al fenotipo de resistencia con este agente quimioterápico se ha observado sobreproducción de la enzima DHFR lo cual es propiciado por la duplicación de genes (Inselburg y col. 1987). Los fármacos anti-DHFR también se les conoce como drogas antifolato y son ampliamente usadas en infecciones parasitarias causadas por *P. falciparum* y *Toxoplasma gondii* en humanos.

1.7. ANTECEDENTES PARTICULARES

En México, el metronidazol es el fármaco de primera elección en el tratamiento de enfermedades cuyo agente etiológico sea un parásito, siendo los más importantes en nuestro país *G. duodenalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*, aunada con otras características propias del agente quimioterápico como una buena biodisponibilidad, bajos costos y amplio espectro de actividad; sin embargo,

en ocasiones al usarse dicho fármaco en otras infecciones provocan un uso ilimitado del metronidazol llegándose a presentar casos refractarios al tratamiento.

La resistencia al metronidazol ha sido reportada en bacterias como *E. coli* la cual es propiciada por la proteína MET que reduce la ruptura de la doble cadena del DNA (Dachs y col. 1995). En bacterias anaeróbicas la resistencia a 5-nitroimidazoles es causada por la disminución en la incorporación del antibiótico y baja actividad de la nitroreductasa (Rasmussen y col. 1997). En *Bacteroides spp* la resistencia es generada por un decremento en la incorporación de antibióticos, disminuida actividad de nitroreductasa, baja actividad de PFOR acompañada de un incremento en la actividad de lactato deshidrogenasa (Rasmussen y col. 1993), y se encontró al gen *nim* como un marcador general de resistencia a todos los fármacos pertenecientes a la familia de los 5-nitroimidazoles. En este contexto se ha desarrollado un método de la PCR en el que se ha logrado la obtención de un producto de amplificación para dicho gen de 458 bp útil en investigaciones a nivel epidemiológico (Trinh y Reyssset, 1996).

Con respecto a *Helicobacter pylori* Moore y col. (1995), Smith y Edwards (1995) encontraron diferencias en la incorporación del metronidazol al utilizar cepas sensibles y resistentes, siendo mayor en las cepas sensibles, incrementándose esto bajo condiciones anaeróbicas. Al mismo tiempo se hicieron pruebas de competencia con la finalidad de determinar si la incorporación del metronidazol era inhibida por compuestos relacionados estructuralmente a la familia de los 5-nitroimidazoles o a otros diferentes a éstos. Así se encontró que había un sistema de transporte común para esta familia de fármacos y empleando estudios de cromatografía en capa fina evaluaron si el metronidazol se biotransformaba similarmente entre cepas sensibles y resistente hallando productos del metabolismo en éstas. Sin embargo, se desconoce el metabolito responsable de la acción del metronidazol. Por otro lado, se analizó el efecto de fármacos nitroheterocíclicos, como 2-nitroimidazoles y 5-nitroimidazoles en cepas sensibles y resistentes al metronidazol, cultivadas bajo distintas condiciones ambientales. En estos estudios se encontró que altas y bajas tensiones de oxígeno no tenían efecto en la actividad de los fármacos; sin embargo, cepas

resistentes incubadas anaerobicamente presentaban una mayor susceptibilidad a los 5-nitroimidazoles. Esto último se sugiere se debe a que la activación del fármaco es a través de vías metabólicas anaeróbicas, las cuales pueden funcionar poco o no completamente en condiciones microaerofilicas. Así mismo se observó que células resistentes al metronidazol reducían lentamente este 5-nitroimidazol por lo que concluyeron que la resistencia era debido a una inhibición ó disminución en la reducción del fármaco (Jorgensen y col. 1998). Estudios recientes realizados con la cepa tipo NCTC 11637 de *H. pylori* mostraron que la resistencia al metronidazol se debía a mutaciones sin sentido, cambios en el marco de lectura y deleciones del gen *rdxA* que codifica para una NADPH nitroreductasa, siendo su expresión necesaria para la activación del fármaco (Debets y col. 1999, Tankovik y col. 2000, Goodwin y col. 1998; Jenks, 1999).

Con respecto a *Entamoeba histolytica* han correlacionado la resistencia al metronidazol con enzimas responsables del manejo del estrés oxidativo. Entre estos se mencionan a la superóxido dismutasa que contiene fierro (Fe-SOD), peroxiredoxina, alta actividad de la superóxido dismutasa (SOD) la cual se ha asociado con situaciones de estrés en otros organismos, baja actividad de la PFOR (Samarawickrema y col. 1997), y una baja expresión de la flavinreductasa y ferredoxina 1 (Wassmann y col. 1999).

También se ha estudiado ampliamente el mecanismo responsable de la resistencia al metronidazol en *T. vaginalis* y se ha postulado que el fenotipo es multifactorial. Debido quizá a una disminución y pérdida eventual de la enzima piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR). Asimismo, estudios con este parásito evaluaron el mecanismo catalítico de PFOR al utilizar sustratos analógicos estructurales al piruvato como 3-bromopiruvato, hidroxipiruvato y analógicos de TTP. Esto con la finalidad de estudiar el sitio activo de la molécula, encontrando con el piruvato una inhibición en la actividad de la enzima en concentraciones desde 10 hasta 400 μM del sustrato, y a concentraciones mayores (hasta 5000 μM) se restauró la actividad. Esto último se observó también con la adición de agentes reductores como DTT ó simplemente con el uso de amortiguadores de incubación degasificados. Lo anterior se explicó asumiendo que en

concentraciones elevadas de piruvato se evitó la inactivación de la enzima. Esto debido a que los intermediarios al reaccionar con una segunda molécula de piruvato producen ácido acetoláctico y acetoína, y cuando el piruvato se pega al TPP sobre la enzima la descarboxilación se presenta en una forma normal. Sin embargo en bajas concentraciones de piruvato se sugieren reacciones colaterales que generan la inactivación de la enzima. Khailova y col. (1985) propusieron que la inactivación se debía a que el intermediario hidroxietil-TPP que reaccionaba con grupos tioles funcionales generaba una forma acetilada en la enzima, y el DTT evitaba la inactivación al actuar como un aceptor alternativo de grupos acetilos. Williams y col. (1990) sugieren que el DTT evita la oxidación del hidroxietil-TPP o simplemente reacciona con las especies reactivas oxidadas. En el caso del bromopiruvato, se propone que éste se une al sitio activo y reacciona *in situ* con CoA para formar un aducto, siendo una razón de su efecto inhibitorio. Con hidroxipiruvato se consideró que la protonación del grupo hidroxilo del intermediario dihidroxietil-TPP por un grupo que se encontraba pegado a la proteína lo hacía un grupo saliente adecuado, generándose un sitio susceptible al ataque por un nucleófilo de la enzima resultando en la inactivación, también se cree que se forma un aducto que se encuentra fuertemente unido al hidroxietil-TPP en el sitio activo, y dado que la eliminación de hidroxilos es lenta, el aducto resulta ser estable.

En este contexto se han identificado dos oxidoreductasas 2-cetoácidas alternas que se encuentran completamente activas en cepas de *T. vaginalis* resistentes al metronidazol (BRIS/92/STD/L/F1623 [1 mM], y BRIS/92/STD/L/B7708 [170 mM]), conocidas como KOR 1 localizada en las fracciones membranales pero predominantemente en la fracción hidrogenosomal, y KOR 2 ubicada en fracciones membranales. Estos proporcionan una vía alterna de producción de energía a parásitos resistentes al metronidazol evitando la activación del fármaco (Brown y col. 1999), aunada con una disminución en la transcripción de la ferredoxina hasta del 65 % en parásitos resistentes a bajas concentraciones de metronidazol (1.6 – 16 µg/ml) (Quon y col. 1992). En este aspecto, se ha encontrado que el crecimiento de *T. vaginalis* en medio enriquecido con hierro

incrementa la concentración de proteínas fierro-azufre, específicamente ferredoxina y PFOR, lo cual se traduce en un incremento del metabolismo hidrogenosomal *in vivo* (Gorrel, 1985). Asimismo, estudios realizados en *C. pasteurianum* han mostrado que en cultivos creciendo a una concentración de 10 μM de fierro encuentran activa la síntesis de ferredoxina, sin embargo cuando disminuyen las concentraciones de fierro exógeno se suspende la síntesis de esta enzima, disparando la síntesis de otras proteínas. Tal es el caso de la piruvato sintasa (PFOR) que incrementa su actividad cuando el cultivo se encuentra en ausencia de fierro. Asimismo, Vaňáčová y col. (2001) han descrito cambios relacionados con decrementos en la expresión de proteínas hidrogenosomales como la enzima málica, la hidrogenasa y la PFOR cuando *T. foetus* crece en medio restringido con fierro, compensando así su función deteriorada al activar como vía alterna enzimas citosólicas cuyo producto final es el etanol. Dichos cambios fueron reversibles al adicionar fierro, por lo que concluyen que hay un control a nivel de transcripción de genes que son dependientes de fierro. Otra función del fierro ha sido propuesta por Keyer e Imlay (1996), que postulan que el anión superóxido (O_2^-) daña al DNA al liberar fierro de proteínas deshidratasa que contienen grupos (4Fe-4S), ya que anteriormente se creía que era liberado de proteínas de almacenamiento como bacterioferritina y ferritina, hipótesis que ha sido refutada. El mecanismo por el cual se produce daño al DNA es debido a que el superóxido reduce fierro, y una parte de éste se pega al DNA donde es oxidado por el peróxido de hidrógeno, generando radicales hidroxilos oxidantes que atacan el DNA deteriorándolo, mientras que otra porción del fierro se deposita en la bicapa lipídica promoviendo la peroxidación de los lípidos (Miller y col. 1992).

En estudios con *T. vaginalis* enfocados al análisis de la P-gP llamada también Tvpgp no se ha correlacionado con el fenotipo de resistencia al metronidazol (Johnson y col. 1994). En otras investigaciones se ha sugerido que la P-gP en protozoarios puede estar involucrada en una respuesta de estrés que permite que el organismo sobreviva cuando se monta una respuesta específica (Ouellette y Borst, 1991 b) mientras que en *T. foetus* éste se debe exclusivamente a una actividad deficiente de la PFOR (Kulda, 1999). Estudios realizados en *T.*

vaginalis han encontrado que los fármacos pertenecientes a la familia de los 5-nitroimidazoles, para ser activados, deben contener valores de potenciales de reducción (E°) entre -425 a -500 mV para que la reducción del fármaco sea un proceso dependiente de ferredoxina, mientras que para los 2-nitroimidazoles con E° de -200 a -425 mV su reducción se presenta en ausencia de ferredoxina, y compuestos con E° mayores a -425 se presenta exclusivamente por la interacción entre la ferredoxina y la PFOR (Yarlett y col. 1986 b).

Por otra parte, no pueden descartarse algunas modificaciones conformacionales que pudiesen llegar a presentarse en PFOR por cambios en sus estados de oxidación y reducción, tal como sucede en la ferredoxina humana (Xia y col. 1998). Por otro lado, también podría estar implicada una dependencia en la velocidad de reacción sobre la fuerza iónica. Esto último reflejaría la importancia de la electrostática sobre la reactividad de las proteínas ó bien modificaciones a nivel postranscripcional de la misma, así como alteraciones en reacciones del tipo óxido-reducción de la enzima promovido probablemente por el microambiente reductor del parásito. En este contexto, Romero (1996) al utilizar un cultivo resistente obtenido *in vitro* en condiciones anaeróbicas y en concentraciones ascendentes de Mtz, encontró en patrones cinéticos de incorporación de ^{35}S -cisteína una baja tasa de incorporación del aminoácido reductor, a diferencia de una cepa sensible (WB). Esto quizá provocaría variaciones en las condiciones redox del compartimento intracelular del parásito, promoviendo alteraciones en la activación del Mtz.

Al respecto, Argüello-García (comunicación personal, 2000) analizó el efecto de la concentración de cisteína en el medio extracelular sobre la sensibilidad al Mtz *in vitro*. Así se encontró que cuando trofozoítos de la cepa WB se cultivaban en una concentración normal de cisteína en medio TYI-S-33 (0.2 %) y se exponían a concentraciones ascendentes del Mtz (desde 0 hasta 25 μM) su viabilidad se afectaba dramáticamente en 10 μM de Mtz. Esto último a diferencia de un cultivo conteniendo 100 veces menor concentración de cisteína (0.002 %) donde la viabilidad se afectó hasta una concentración de 20 μM . Lo anterior permite especular por una parte, que al haber un incremento en la pO_2 se

decrementa notoriamente la activación del Mtz, ya que se presenta una competencia por los electrones entre el 5-nitroimidazol y el oxígeno, aunado posiblemente a modificaciones en las propiedades redox, viéndose afectada dramáticamente la actividad de PFOR. Es decir, la enzima PFOR cuyo papel primordial es la descarboxilación del piruvato para obtener electrones y transferirlos a la ferredoxina I, no ejercería su función adecuadamente por tener condiciones reductoras intracelulares desfavorables. También se podría sugerir que al propiciar condiciones aeróbicas de crecimiento del parásito, es decir, al disminuir dramáticamente la concentración de cisteína, los grupos Fe-S de la enzima pueden presentar cierta vulnerabilidad a la oxidación y permanecer en una forma inactiva estable por largos periodos en estas condiciones, y posteriormente activarse al encontrarse en condiciones anaeróbicas, tal como sucede con el *Bacteroides thetaiotaomicron* (Pan e Imlay, 2001). Por otra parte, podría sugerirse en que el fármaco al estar en presencia de oxígeno, el mismo ó alguno de sus intermediarios reactivos (anión, nitroso, hidroxilamina ó amino) que son altamente dañinos para el parásito, pueden reoxidarse propiciando una falta de actividad tóxica por parte del Mtz. Esto significaría que la eficiencia en la activación disminuiría significativamente, sin embargo los parásitos aún tendrían la capacidad de activar el fármaco.

Tomados en su conjunto, estos resultados demuestran que la cisteína puede ser esencial para la activación del fármaco, paso crítico del proceso, sin restar importancia a las bases metabólicas de la activación para determinar la especificidad y selectividad de los 5-nitroimidazoles.

Los mecanismos de resistencia al metronidazol estudiados en *G. duodenalis* se han enfocado principalmente al análisis de la incorporación de fármaco radiomarcado con C¹⁴. Así se han reportado diferencias entre aislados sensibles y un cultivo resistente obtenido en el laboratorio (BRIS/83/HEPU-106-2ID₁₀), encontrándose más afectada la incorporación en éste último. Esto quizá es debido a alteraciones en el mecanismo de transporte a través de la membrana celular, o bien una disminución y/o inhibición en la activación del fármaco debido posiblemente a la enzima PFOR. Por una parte, esto suprimiría la formación de

intermediarios reactivos o bien éstos no podrían tener la capacidad de interactuar directamente con su sitio blanco (Boreham y col. 1988 a,b; Upcroft y col. 1990). En ensayos recientes de nuestro grupo (Romero, datos no mostrados) se cuantificó la concentración extracelular del Mtz en medio de cultivo entre clonas sensibles (WB-1) y resistentes (WBRM23) mediante ensayos de cromatografía de líquidos de alta resolución (utilizándose una columna Supelcosil LC-18-DB; 25 cm x 4.6 mm, 5µm) en condiciones anaeróbicas, encontrándose una disminución significativa en la concentración del 5-nitroimidazol a la sexta hora de exposición a Mtz en la clona sensible, no sucediendo así con la clona resistente, la cual mantuvo constante su concentración conforme transcurrió el tiempo. Lo anterior sugiere diferencias en la incorporación del fármaco, aunado posiblemente con cambios y/o alteraciones en la permeabilidad membranal y procesos farmacocinéticos en los cuales se contempla la activación del fármaco (Land y Johnson, 1999), estando así involucrada directamente la enzima PFOR.

Por consiguiente, se podrían realizar estudios para cuantificar intracelularmente el Mtz en los diferentes cultivos tolerantes crecidos en medio TYI-S-33, además de la detección de los principales metabolitos biotransformados por el parásito, empleando herramientas como la espectrofotometría de masas o en su defecto espectrofotometría de infrarrojo para la completa dilucidación de la estructura química que presentan éstos. Sin embargo, se desconoce el mecanismo de transporte membranal de este 5-nitroimidazol en *Giardia*, aunque se ha sugerido que éste es pasivo (Muller, 1981). Aún así, se requiere esclarecer si el ingreso del fármaco a través de membrana es mediante difusión simple, proteínas membranales, por canales de proteínas o bien mediante el reconocimiento específico de un sitio receptor.

Hoyne y col. (1989) evaluaron el efecto del metronidazol sobre el ciclo celular en trofozoítos de *Giardia duodenalis* con diferente sensibilidad al agente antiparasitario. En estos estudios se encontró que la línea sensible al fármaco BRIS-83-HEPU/106 expuesta 24 horas con metronidazol (5 µM) presentaba un arresto en el ciclo celular en la fase G2+M debido posiblemente al daño provocado al DNA, el cual interfiere en el proceso mitótico normal. Sin embargo la cepa

resistente BRIS/83/HEPU-106-2ID₁₀ no tiene ningún efecto sobre el ciclo celular, lo cual sugiere que la enzima PFOR no esta biotransformando al metronidazol y al haber una carencia ó bajo número de intermediarios reactivos éstos no interactúan con su sitio blanco evitando el efecto farmacológico.

En la línea resistente al metronidazol WB1B-M3 (cultivo obtenido por mutagénesis con luz U.V.) se encontró aumentada la expresión de una proteína rica en cisteína conocida como CRP136, la cual presenta homología con toxinas de víbora conocidas como sarafotoxinas (Chen y col. 1995).

Al evaluarse posteriormente la actividad de la enzima PFOR se observó una disminución de aproximadamente la mitad en la línea BRIS/83/HEPU-106-2ID₁₀ respecto a la cepa sensible. Así mismo se identificó otra oxidoreductasa 2-oxoácida llamada (BOR) que utiliza sustratos alternos al piruvato como el α -cetobutirato, junto con un incremento en las actividades de la peroxidasa y reductasa dependiente del tiol en la cepa resistente al metronidazol BRIS/83/HEPU-106-2ID₁₀. En este caso las reacciones anteriores tendrían un papel secundario en la defensa o protección contra el metronidazol (Smith y col. 1988, Townson y col. 1996). En la misma línea resistente al metronidazol se han encontrado cambios en los cromosomas al compararse con la cepa sensible (Upcroft y col. 1989).

Upcroft y col. (1992) evaluaron en una cepa con deficiencias en adhesión que había una asociación entre el daño a nivel de ciclo celular, en el núcleo aunado con una falta de sensibilidad al metronidazol, debido a la ausencia de la secuencia que codifica para una proteína llamada G6/1 la cual se encuentra ausente en el cromosoma 4 pero no en el 3, de acuerdo al tipo de cepa de *G. duodenalis*, lo anterior lo justifican con los continuos rearrreglos cromosomales que sufre el parásito.

Por otra parte, se evaluó la capacidad de eliminación del oxígeno (O₂) en aislados provenientes de casos refractarios al tratamiento con metronidazol (Ad 113 y BRIS/83/HEPU/120), y cepas sensibles no encontrando diferencias significativas en éstas. Sin embargo se encontró aumentada la actividad de la enzima NADPH-oxidasa en los aislados de pacientes que no respondieron al

metronidazol. En estas circunstancias al parecer la NADPH en condiciones anaeróbicas participa en las condiciones redox de *G. duodenalis* (Lloyd y col. 1989) y se sugiere que actúe mediante una inhibición competitiva con el metronidazol promoviendo la inadecuada o falta de activación del mismo (Ellis y col. 1993).

Actualmente Liu y col. (2000) postularon que la resistencia al metronidazol en *G. duodenalis* esta asociada con una disminución en el nivel y actividad de la ferredoxina I en tres líneas resistentes al metronidazol obtenidas en el laboratorio mediante crecimiento continuo en presencia del fármaco (BRIS/83/HEPU/106-2ID₁₀) y mutagénesis con luz U.V. (BRIS/87/HEPU/713-M3, WB1B-M3).

Recientemente Dan y col. (2000) utilizaron un vector de RNA viral para reducir la expresión del gen *pfor* analizando el nivel de expresión del RNAm de dicho gen y la actividad enzimática. Así se observó en células transfectadas una disminución de un 46-60 % con la ribozima (PRzS) flanqueada con 20 nucleótidos de RNA antisentido para PFOR en cada brazo, y del 69-80 % con la ribozima flanqueada con 600 y 1500 nucleótidos de RNA antisentido del PFOR. Dichas células mostraron una elevada tolerancia al metronidazol en concentraciones de 1.28, 7.71 y 18.43 μ M respectivamente. El valor de DL₅₀ fue definido como la concentración del metronidazol requerido para inhibir el crecimiento celular al 50 % después de 48 horas de cultivar los trofozoítos *in vitro*. Cuando estas células se cultivaron en distintas condiciones ambientales (aeróbicas y anaeróbicas) crecían igualmente bien, siendo lo contrario con la cepa sensible WB-1, la cual únicamente creció de una forma adecuada en condiciones anaeróbicas. Así cuando se consideran en su conjunto estos resultados sugieren el papel importante de dicho gen en la participación del desarrollo de resistencia al metronidazol.

CAPITULO II. JUSTIFICACION

La giardiosis es una infección intestinal, en la cual se han presentado casos refractarios al tratamiento con los fármacos antiparasitarios comúnmente utilizados en nuestro país. Esto puede deberse a una terapia administrada inadecuadamente, o bien porque los pacientes son infectados con una cepa resistente.

Actualmente se desconocen los mecanismos moleculares involucrados con la resistencia a drogas en *Giardia duodenalis*; sin embargo, hay algunos reportes que describen que la enzima responsable de la biotransformación del metronidazol es la PFOR en este parásito. Esta última se encarga de transferir los electrones a la ferredoxina para reducir el grupo nitro del metronidazol con la generación de compuestos nitrosos y radicales libres, y de esta forma se genera un efecto farmacológico. Considerando estos hechos resulta necesario efectuar estudios a nivel molecular con la finalidad de conocer si existen diferencias en el nivel de expresión del RNAm del gen *pfor* entre cepas sensibles y resistentes al metronidazol. Esto se puede abordar empleando la técnica de RT-PCR la cual puede ser utilizada para detectar y diferenciar cepas con distinto grado de resistencia al fármaco en estudio. Así mismo, dicha técnica puede ser una herramienta útil en la detección de aislados mexicanos que presentan este fenotipo, lo que permitiría dar un tratamiento alternativo en pacientes refractarios al régimen de fármacos prescritos.

Por otra parte, el monitoreo de la resistencia al metronidazol podrá darnos un panorama general del problema sobre resistencia a drogas y eventualmente puede tener aplicabilidad como un programa de vigilancia de susceptibilidad a metronidazol.

CAPITULO III. HIPOTESIS

Si se conoce que la enzima involucrada en la biotransformación del metronidazol es la piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) entonces en caso de existir un fenotipo de resistencia con dicho agente quimioterápico, se podrían encontrar diferencias en los niveles de expresión del RNAm para el gen *pfor*, o bien a nivel de su secuencia en sitios catalíticos 3Fe-4S y 4Fe-4S.

Con la finalidad de conocer parcialmente los mecanismos moleculares involucrados con el fenotipo de resistencia al metronidazol en cultivos de *G. duodenalis* con diferente patrón de sensibilidad *in vitro* a dicho agente farmacológico se plantearon los siguientes objetivos:

CAPITULO IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Detectar el gen *pfor* y analizar su expresión en cepas de *G. duodenalis* con distinto grado de resistencia *in vitro* a metronidazol.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Seleccionar cepas de *G. duodenalis* resistentes a metronidazol.
2. Diseñar y sintetizar oligonucleótidos de secuencias complementarias a regiones conservadas de los genes *gdh* y *pfor*.
3. Amplificar por PCR secuencias específicas del gen *pfor* de *G. duodenalis*, analizar sus secuencias y caracterizarlo parcialmente a nivel genómico.

CAPITULO V. MATERIAL Y METODOS

5.1. Cepas: La cepa de *G. duodenalis* utilizada en este trabajo fue la WB aislada por la Dra. F. Gillin en el NIH a partir de fluido duodenal de un paciente de sexo masculino de 27 años de edad con giardiosis sintomática con una duración de 2.5 años, la cual adquirió en Afganistán. El tratamiento con metronidazol no fue efectivo en este paciente, el cual recibió cuatro terapias de metronidazol y tres regímenes de quinacrina (Smith y col. 1982) ésta cepa fue proporcionada por el Dr. E. Weinbach del National Institutes of Health en Bethesda, Md. (E.U.A.).

5.2. Agentes quimioterápicos: El agente químico utilizado en este trabajo fue el metronidazol (2-metil-5-nitroimidazol-1-etanol), dicho fármaco fue disuelto en agua desionizada estéril a una concentración de 10 μ M, se pasó a través de filtros millipore (tamaño de poro 0.22 μ m, Millipore S.A.). Posteriormente se almacenó en alicuotas pequeñas a temperatura ambiente protegido de la luz.

5.3. Obtención de cultivos resistentes al metronidazol: La cepa WB fue cultivada en concentraciones ascendentes de metronidazol en condiciones axénicas en medio TYI-S-33 (anexo 1) suplementado con suero bovino al 10 % y antibióticos (estreptomicina 50,000 UI/L – penicilina 50 mg/L). En cada incremento de dosis, se evaluó la morfología, viabilidad y la velocidad de crecimiento del parásito para establecer la adaptación de los organismos a la droga. Además, se realizaron continuamente pruebas de esterilidad con la finalidad de detectar alguna contaminación que pudiese interferir en los ensayos moleculares y dar falsos positivos.

5.4. Cultivo de trofozoítos de *G. duodenalis*: Los trofozoítos de la cepa, la clona y la línea de cultivos con distinto grado de resistencia al metronidazol fueron cultivados axénicamente (subcultivándose tres veces semanalmente) en tubos de plástico de fondo cónico de 15 ml a 37°C [incubadora Precisión modelo 4EG], hasta fase logarítmica en medio TYI-S-33 (desarrollado por Diamond y col. (1978)

y modificado por Keister, 1983). Los trofozoítos se cosecharon por enfriamiento de los tubos de cultivo en un baño agua – hielo durante 100 minutos, invirtiéndose varias veces y resuspendiéndose en el mismo medio. Para los ensayos en que se requirió un número de trofozoítos mayor, se efectuó la propagación de la cepa, clona ó línea en botellas de plástico de 60 ml a partir de un tubo stock de parásitos.

5.5. Clonación de cepa resistente al metronidazol: Se empleó el método de diluciones limitantes reportado por Baum y *col.* (1988), para lo cual se cultivaron los trofozoítos hasta fase logarítmica de crecimiento de la línea Ste 21 se eliminó el medio que contenía las células no adheridas, se adicionaron 15 ml de medio TYI-S-33 y se enfriaron los recipientes de cultivo en un baño agua – hielo por aproximadamente 90 minutos. Se hizo un recuento celular en un hemocitómetro de Neubauer (Reichter Sci. Instruments), haciéndose diluciones progresivas hasta obtener 7.5 trofozoítos/ml. Estos fueron inoculados en razón de 0.5 células/vial en 15 viales de borosilicato con tapa de rosca de 4.5 ml sin fármaco, y otra serie bajo las mismas condiciones experimentales adicionándosele una concentración de 10 μ M de metronidazol incubándose a 37°C (incubadora Precision modelo 4EG) durante una semana. Posteriormente se revisó el crecimiento celular en microscopio óptico con sistema invertido (Olympus). Una vez que se observó proliferación celular de cada clona generada se procedió por un lado a criopreservar los cultivos en nitrógeno líquido y por otro se realizó un aumento progresivo del fármaco para aumentar así la resistencia al mismo a partir del cual se realizó la clonación, así se inició con una concentración de 10 μ M con la finalidad de obtener un cultivo que soportara la mayor concentración del fármaco utilizado asegurando así una mayor resistencia por parte de éste. La forma en la que se evaluó la eficiencia de la clonación fue dividiendo el número de viales con crecimiento celular entre el número de viales esperados de acuerdo al inóculo y el número total de viales inoculados (Hernández, 1992).

5.6. Diseño de iniciadores para glutamato deshidrogenasa (*gdh*), y piruvato ferredoxina oxidorreductasa (*pfor*): Se hicieron búsquedas de secuencias aminoácidas para el gen de la *pfor*, y *gdh* en microorganismos tales como protozoarios, bacterias, hongos y algas. Una vez obtenidas las secuencias se hizo una alineación en el programa BCM Search Launcher, Baylor College of Medicine HGSC [dirección electrónica: <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>] con el objeto de determinar secuencias conservadas dentro del gen de interés. Posteriormente se determinó el contenido de G-C de cada secuencia analizada para localizar regiones de ≈ 21 pb cuyo valor permisible fue alrededor de 40 a 60 % de éstos nucleótidos, enseguida se descartaron las secuencias que contenían en sus extremos terminales dos o más G o C contiguas, a fin de evitar la formación de estructuras secundarias al someterlos a una reacción de PCR. Posterior a esto, para verificar la homología específica de las secuencias propuestas como iniciadores se comparó éstas con la de los genes correspondientes en otros microorganismos empleando el programa computacional FASTA Homology Search [dirección electrónica: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology.html>]. Por otra parte, para la obtención de los iniciadores, una vez diseñados los juegos correspondientes para cada uno de los genes mencionados anteriormente, se mandaron a sintetizar al Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos en la Unidad de Ácidos Nucleicos del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN. Los iniciadores se utilizaron en una reacción de la PCR y el producto resultante de amplificación se marcó con digoxigenina empleando el kit comercial DIG-High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II (Boehringer Mannheim) descrito en la sección 5.16 del presente capítulo.

5.7. Extracción de DNA en *G. duodenalis*: Se estandarizaron dos protocolos de extracción para la obtención de DNA,

a) Extracción con proteasas (proteínasa K): Las cepas y clones de *G. duodenalis* con diferente grado de sensibilidad al metronidazol se cultivaron en tubos de 15 ml y se lavaron una vez en PBS 1X a 2,000xg en una centrífuga

Sorval® RT7 con sistema de refrigeración acoplado durante 12 min. Posteriormente se efectuó un recuento celular y 60×10^6 trofozoitos se centrifugaron durante 1 min a $14,000 \times g$ en tubo eppendorff, la pastilla resultante se resuspendió en 200 μ l de agua destilada desionizada ésteril. Los tubos se calentaron a 90°C por 5 minutos y se enfriaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 66.6 μ l de buffer de digestión (100 mM de NaCl, 10 mM de tris HCl pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8, SDS 0.5 %) y 10 μ l de proteinasa K (10 mg/ml), se mezclaron los tubos manualmente y se incubaron en un baño maría a 65°C durante 18 hrs. Se adicionaron 266 μ l de cloroformo mezclando suavemente con la finalidad de eliminar restos de oligopéptidos, centrifugando a $14,000 \times g$ durante 30 min. Se adicionaron 116 μ l de RNasa A (1mg/ml de buffer TBE 0.5 X) y se incubó 1 hora a 65°C , después se adicionaron 224 μ l de acetato de amonio 7.5 M y 1 ml de etanol al 100 %. Posteriormente los tubos se transfirieron al ultracongelador (Cryostat 88 Queue) a -74°C durante una hora, enseguida se centrifugó a $12,000 \times g$ durante 16 min y después se realizó un lavado con etanol al 75 % centrifugando a $7,500 \times g$ por un espacio de 6 min, para finalmente resuspender la pastilla en agua inyectable, Argüello-García (comunicación personal).

b) Extracción con solventes orgánicos: Las diferentes cepas se expandieron mediante el crecimiento de los parásitos en botellas de plástico de 40 ml, las cuales se enfriaron y posteriormente se realizó un conteo. Enseguida los parásitos se precipitaron en tubos eppendorff de 1.5 ml a una concentración de 60×10^6 , luego se lavaron una vez con PBS 1X centrifugando a $14,000 \times g$ durante 5 min, enseguida se eliminó el sobrenadante y se adicionó proteinasa K en una concentración final de 1 mg/ml y 500 μ l de buffer de lisis o digestión. Esta suspensión se incubó toda la noche a 49°C , al día siguiente se adicionó 500 μ l de fenol - tris HCl pH 8. Posteriormente se mezcló suavemente 42 veces en forma vertical y se centrifugó a $12,000 \times g$ durante 5 min. La fase acuosa se transfirió a tubos nuevos tratando de colectar aproximadamente 500 μ l, luego se adicionó 1

volumen de fenol – cloroformo - alcohol isoamílico (25:24:1) se centrifugó a 12,000 x g por 5 min. Posteriormente se transfirió la fase acuosa a tubos nuevos y se agregó 1 volumen de la mezcla cloroformo:alcohol isoamílico. Este volumen es semejante al del buffer de lisis adicionado al inicio del protocolo y el cual se centrifugó a 12,000 x g por 5 min, y la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, adicionando 1 ml de etanol absoluto frío virtiéndolo lentamente gota a gota, enseguida se agitó suavemente en forma horizontal hasta no ver la presencia de dos fases. Los tubos se transfirieron a Revco durante 2 hrs se centrifugó a 12,000 x g durante 10 min, se eliminó el sobrenadante, se adicionó 1 ml de etanol al 75 %, se centrifugó a 12,000 x g durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se secó la pastilla de DNA a TA, la cual se resuspendió en agua inyectable a 65°C durante 10 min. Finalmente se adicionó RNasa A con una concentración final de 0.01 mg incubándolos a 37°C durante 1 hr.

5.8. Extracción de RNA: A 10×10^6 trofozoítos de *G. duodenalis* contenidos en un tubo eppendorf se le adicionaron 0.75 ml de TRIzol® y se dejaron reposar durante 5 min a temperatura ambiente, enseguida se adicionaron 0.2 ml de cloroformo la suspensión se mezcló en vortex por 15 segundos y los tubos se dejaron reposar durante 15 min a TA. La muestra se centrifugó a 12,000 x g durante 16 min a 4°C en centrifuga Sorval RT7 con sistema de refrigeración, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se adicionaron 0.5 ml de isopropanol, se mezcló la suspensión y se incubó 10 minutos a TA. Después la mezcla se centrifugo a 12,000 x g a 4°C durante 11 min y se eliminó el sobrenadante. Se lavó la pastilla de RNA con 1 ml de etanol al 75 %, se centrifugó a 7,500 x g durante 6 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante, se secó la pastilla y se resuspendió en agua inyectable. Luego se adicionó 10 U/μl de DNasa I (Roche No. de catálogo 776785) y se incubó a 37°C durante 1 hr en thermomixer 5436 y calentando a 75°C durante 5 min para inactivar a la DNasa I., Cruz-Soto (comunicación personal).

5.9. Cuantificación de ácidos nucleicos: Se hicieron diluciones 1:100 con agua desionizada estéril se adiciono 1.0 μ l de DNA se mezcló por vortex y se hicieron lecturas en el espectrofotómetro Smart Spec™ 3000 (BIO-RAD) en intervalos de longitudes de onda de 325, 280, 260, y 235 nm, enseguida con el objeto de evaluar la pureza de los ácidos nucleicos obtenidos, se calculó el cociente de absorbancias A_{260}/A_{280} . La lectura de absorbancia obtenida a λ de 260 nm se multiplicó por el factor de dilución de 100 y el resultado obtenido se expresó en unidades de μ g/ml de DNA.

5.10. Electroforesis de DNA y RNA en geles de agarosa: Para evaluar cualitativamente la calidad de los ácidos nucleicos obtenidos, se preparó un gel de agarosa al 1.2 % en buffer TBE 0.5 X, el cual contenía bromuro de etidio (0.5 mg/ml). Las muestras se corrieron a 80 V durante aproximadamente 45 minutos. Después se colocó el gel en una cámara transiluminadora de luz UV donde los ácidos nucleicos se observaron como bandas cuya caracterización se hizo en base al tamaño o longitud del ácido nucleico extraído. La mayoría de los RNAm eucarióticos se localizan en un rango de tamaños de 400-2000 bases. Las bandas habían sido caracterizadas por Montañez y col. (1989) en base al tamaño en unidades Svedberg observadas de ~5 Kb para la subunidad mayor 28S, y para la subunidad menor 18S ~2 Kb en tamaño.

5.11. Reacción en cadena de la polimerasa para *gdh* y *pfor*: Inicialmente se evaluaron como variables en la PCR, la concentración final de magnesio la cual incluyó un intervalo desde 1 hasta 5 μ M, y la temperatura de alineamiento teórica de los iniciadores (tabla 3) fue obtenida mediante la fórmula proporcionada por GibcoBRL Custom Primers, considerando que se trataba de un iniciador de más de 10 bases con una concentración de sales de 0.05M, $T_m = 59.9 + 41 (\% \text{ GC}) - (675/\text{longitud del iniciador})$, donde el % GC en el cálculo de T_m se expresó en valor decimal.

Para estandarizar cada uno de los iniciadores, primero se trabajó en cada reacción con una concentración constante de DNA siendo ésta de 100 ng así

también como el número de ciclos que consistió de 30 para cada una de las reacciones respectivas, y una vez obtenido el tamaño del producto amplificado se variaron las concentraciones de ácido nucleico abarcando diferentes intervalos.

TABLA 3: INICIADORES Y CONDICIONES PARA LA PCR

Nombre del iniciador	Secuencia 5'-3'	Dirección	%GC	Tm Teórica
SPFOR-G 985	<i>TGC GGT TTC TGC</i> <i>TCT GTC CAG</i>	Iniciador sentido para <i>pfor</i>	57.14	51.18
APFOR-G 986	<i>GTT GCA GCT CTC</i> <i>CGT GTC GAT</i>	Iniciador antisentido para <i>pfor</i>	57.14	51.18
59SGDH (M7)	<i>ATC TTC CGC GTC</i> <i>CCC TGG ATG</i>	Iniciador sentido para <i>gdh</i>	61.90	53.13
242AGDH (M8)	<i>CAG TTC GCG TGC</i> <i>GAG AAG CTC</i>	Iniciador antisentido para <i>gdh</i>	61.90	53.13

5.12. Cinética enzimática con endonucleasas de restricción: Con el objetivo de tener una digestión completa, inicialmente se determinó el tiempo de incubación óptimo y la concentración de enzima de restricción para tener una adecuada eficiencia de cortes, se seleccionó la enzima Kpn I. Se adicionaron 10 µg de DNA de la cepa WB y la enzima, misma que se adiciono a tubos de PCR en cantidad constante (10 U), variando los tiempos de incubación que incluyeron 30 min, 1, 3, 6, y 21 hrs. Por otra parte se modificaron las concentraciones de enzima 5, 10, 20, 30, y 40 U manteniendo constante el tiempo de incubación de 21 hrs a 37°C. Al final se frenó la reacción al transferir los tubos al Revco durante 10 min, y

enseguida se adicionó colorante (azul de bromofenol y xilencianol) el cual contenía EDTA a una concentración final de 12.5 mM.

5.13. Perfil de restricción para el producto obtenido por la PCR para *gdh* y *pfor*: Con la finalidad de confirmar si la banda amplificada para los genes estudiados correspondía a la esperada, con la ayuda del programa computacional BCM Search Launcher query sequence [dirección electrónica: <http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/cgi-bin/seq-util/seq-util.pl>] se procesó la información que abarcaba la secuencia de los iniciadores así como la amplificada por éstos. Esto último con la finalidad de obtener un mapa de restricción, mismo que se utilizaría para la verificación en gel de agarosa de los productos de restricción correspondientes a los fragmentos amplificados.

5.14. Secuenciación: Se realizó la PCR para el gen *pfor* con DNA extraído de la clona 23 resistente al metronidazol (WBRM23) y la clona sensible al metronidazol (WB-1) bajo las condiciones antes descritas, se hizo una mezcla de 200 µl de dicho producto para cada clona analizada y se corrió electroforéticamente en gel de agarosa al 1.5 % adicionado con 10 µl de bromuro de etidio (0.5 mg/ml), se corrió a 70 V durante aproximadamente 90 minutos. Posteriormente se revisó que el tamaño del producto de PCR fuera de 342 pb lo cual se realizó empleando un transiluminador de luz UV. Posteriormente se cortó y pesó la banda para luego emplear el kit Concert™ Gel Extraction Systems (Gibco BRL), el cual consiste brevemente en purificar fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa mediante el empleo de cartuchos de centrifugación los cuales contienen un soporte de sílica que capturan el DNA, el gel de agarosa es disuelto por la acción de perclorato de sodio y el DNA queda adsorbido en la sílica, dicha adsorción depende de la temperatura y la composición de los buffers. Finalmente la agarosa, agentes inhibitorios y los buffers de electroforesis son eliminados con los buffers de lavado que contienen etanol.

Una vez purificado dicho material nuevamente se separó electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.2% para confirmar el tamaño del producto y enseguida se

procedió a realizar el marcaje del producto mediante una reacción de PCR empleando el kit Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing (ABI PRISM, PE Applied System). Esto se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones, un paso de desnaturalización a 96°C 1', seguido de 25 ciclos de 96°C 10"/50°C 5"/60°C 4' para finalmente mantenerse a 4°C hasta el momento de realizar la purificación de los productos de extensión y eliminar el exceso de dNTP's marcados sin reaccionar, para esto se utilizó el kit comercial centri-sep (Princeton Separations, Inc). Este consistió brevemente en hidratar una columna con 0.8 ml de agua inyectable y eliminando las burbujas del gel contenido en dicha columna mezclando con vortex suavemente. Posteriormente se eliminó el exceso de agua mediante gravedad al colocar dicho dispositivo en un tubo de desechos, se centrifugó a 750xg durante 2 min en una microcentrífuga Eppendorf Modelo 5415 C, se eliminó el líquido y se vertieron 20 µl de la reacción de secuenciación en el centro de la columna sin tocar las paredes ni el gel ya que esto ocasiona una contaminación con oligonucleótidos fluorescentes libres. Posteriormente se centrifugó a 750xg durante 2 minutos, y el producto purificado se secó con una centrifuga de vacío (Speed vac) durante aproximadamente 30 min. Finalmente se obtuvo la secuencia del producto deseado en el Servicio de Secuenciación Automática en la Unidad de Ácidos Nucleicos del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN.

5.15. Obtención y purificación de sondas: El producto obtenido después de haber realizado la PCR con el DNA de los distintos cultivos con distinto patrón de resistencia al metronidazol para los genes *gdh* y *pfor*, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio (10 mg/ml). A partir de éste se realizó la purificación del DNA amplificado, para lo cual se probaron dos protocolos que a continuación se describen:

a) Freeze-Squeeze: Se cortó con una espátula la banda deseada del gel de agarosa al 0.8 %, se colocó en una jeringa de tuberculina y se mantuvo una hora a -70°C. Después se extrajo el agar y se recolectó el líquido en un tubo de 1.8 ml

se agregaron 2 volúmenes de cloroformo y se mezcló vigorosamente en vortex. Se centrifugó 18 minutos a 14,000 x g y se retiró la fase acuosa colocándola en un tubo nuevo. A ésta se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto al 100 % y 266 µl de acetato de sodio 3 M se dejó una hora a -70°C, se centrifugó durante 16 min a 12,000x g , se eliminó el sobrenadante, se lavó con 1 ml de etanol al 75 % y se centrifugó de nuevo bajo las condiciones antes descritas, se secó la pastilla a TA y se resuspendió en agua inyectable.

b) Protocolo para extracción de DNA a partir de gel (Gibco BRL, Kit comercial): Se cortó el área que contenía el DNA a partir del gel de agarosa ultrapura de bajo punto de fusión (Gibco BRL) al 2 % usando una espátula limpia, se pesó el fragmento cortado del gel, se adicionaron 30 µl de buffer de solubilización del gel (L1, contiene perclorato de sodio concentrado, acetato de sodio y solubilizador de TBE) por cada 10 mg de gel. Enseguida se incubó a 50°C por un espacio de 15 min, mezclándose cada 3 min para asegurar la completa disolución, después de que el gel pareció disuelto se incubó 5 min más. Posteriormente se colocó el cartucho de centrifugación en tubo de lavado de 2 ml, se transfirió la mezcla anterior en el cartucho de centrifugación, los tubos que contenían la mezcla se centrifugaron a 12,000 x g durante 1 min. Se eliminó la fase acuosa, se colocó el cartucho de centrifugación en el tubo de lavado de 2 ml. Se adicionó 700 µl de buffer de lavado (L2, contiene NaCl, EDTA, y Tris-HCl) en un cartucho de centrifugación y se incubó 5 min a TA, la mezcla se centrifugo a 12,000 x g 1 min, se eliminó la fase acuosa, se centrifugó una vez más por 1 min para remover el buffer residual. Se colocó el cartucho de centrifugación en un tubo de recuperación de 1.5 ml. Se adicionó 50 µl de buffer TE [10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA] tibio directamente al centro del cartucho de centrifugación. Se incubó 1 min a TA y se centrifugó a 12,000 x g por 2 min.

5.16. Marcaje de sondas: Se realizó el marcaje de templados de DNA por el método de *random primer* con DIG-11-dUTP con el kit comercial conocido como DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, (Boehringer

Mannheim). Brevemente, se adicionó 1 µg del templado de DNA obtenido a partir de la PCR para *gdh* y *pfor*, y agua destilada estéril hasta obtener un volumen final de 16 µl por vial de reacción. Se desnaturalizó el DNA a 95.0°C durante 10 min, enseguida se incubó a 37°C, se adicionaron 4 µl de DIG- High Prime se mezcló y se mantuvo a 37°C durante 21 hrs, se frenó la reacción por calentamiento a 65°C durante 10 min.

5.17. Eficiencia del marcaje de sonda: Se diluyó 1 µl de la reacción del marcaje con 39 µl de buffer de dilución de DNA para obtener una concentración final de 1µg/ml, posteriormente se realizaron diluciones con la finalidad de obtener las siguientes concentraciones 300, 100, 30, 10 y 3 pg/µl; enseguida se adicionó 1 µl de cada una de las cinco diluciones en los cuadrados marcados de las tiras de prueba para la cuantificación DIG proporcionadas por el distribuidor. Se secaron al aire durante 2 min. Se enjuagaron las tiras de prueba en las soluciones descritas en el Kit. Se frenó la reacción colorida después de un máximo de 30 min y se enjuagaron las tiras de prueba en agua, se secaron al aire sobre un papel Whatman 3MM, protegidas de la luz. El tiempo máximo permisible en la reacción de coloración no fue mayor de 30 min ya que esto ocasionaría un incremento del fondo. La coloración se produce porque en el DNA marcado se incorporaron moléculas de digoxigenina las cuales van a ser reconocidas por el anticuerpo anti-DIG el cual tiene conjugado un fragmento proteico con actividad de fosfatasa alcalina, misma que da lugar a la defosforilación del BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato), el grupo hidroxilo sufre tautomerización formando una cetona la cual se oxida y dimeriza para producir azul insoluble 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo, en el proceso de dimerización, los iones hidrógeno son liberados y éstos reducen el NBT(nitroazul de tetrazolio) formando un precipitado púrpura intenso de diformazán en la membrana.

5.18. Southern blot: Este ensayo se dividió en varias etapas, primero se efectuó una digestión enzimática con las siguientes endonucleasas, para *pfor* BamHI, Spe

I y Xho I, las dos primeras no cortaban dentro de la secuencia del gen mientras que la última cortaba dentro de éste, los marcadores de peso molecular λ Hind III, y uno de bajo peso molecular distribuido por BQ fueron marcados de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y la sonda del gen *gdh* se utilizó como un control de carga para el primer gen. Primero a tubos de PCR se adicionaron 10 μ g de DNA, 5 U de la enzima seleccionada, buffer 1/10 y finalmente se aforaba al volumen deseado con agua inyectable incubándose a 37°C durante 18 hrs. Posteriormente se realizó una electroforesis, para lo cual se preparó un gel de agarosa al 0.9 % con 15 μ l bromuro de etidio (10 mg/ml) y se corrió éste a 21 V durante 12:30 hrs (O/N). Posteriormente el gel se expuso en luz U.V. durante 5 min, se le sacó una fotografía en el Fotodyne, enseguida se transfirió a una charola en la cual se adicionó 100 ml de una solución de HCl 0.25 M durante 10 min. Luego se lavó el gel rápidamente durante 10 segs con agua desionizada estéril dos veces, después se eliminó el agua y se adicionó buffer de desnaturalización (NaOH 0.4 N y NaCl 1.5 M) durante 40 minutos. Enseguida se volvió a lavar el gel dos veces en agua. Se adicionó buffer de neutralización (NaCl 3M, Tris-HCl 0.4 M pH 7.5) durante 20 min posteriormente el gel se transfirió al posi-blot., el montaje de este equipo consistió en mojar un papel wattman 3MM previamente esterilizado en horno de microondas con buffer 10X SSC y se colocó en el posiblot según se muestra en la figura 5, entonces se cortó la membrana de nylon cargada positivamente que se humedeció en agua desionizada estéril durante 5 min posteriormente con buffer 10 X SSC, la esponja se metió en agua desionizada estéril sólo cuando se usó por primera vez, se exprimó la esponja y se metió en buffer 10 X SSC se cerró el posiblot y se ajustó la presión a 75 mmHg durante 50 min. Se marcó la localización de los pozos con lápiz en la membrana y ésta se secó sobre un papel wattman a TA, enseguida la membrana de nylon se colocó en el crosslinker efectuando 2 pulsos (1200 μ Jx100) o se dejaba irradiar en el transiluminador de U.V. durante 3 minutos por el lado de la membrana que contenía el DNA. La segunda etapa consistió en la prehibridización en la cual se adicionaron 5 ml de buffer DIG Easy Hyb a la membrana la cual se incubó durante 1 hora a 39°C, al mismo tiempo se desnaturalizó la sonda en buffer DIG



FIGURA 5. Aparato de transferencia de ácidos nucleicos por vacío (Posi-blot). El montaje del equipo comprende inicialmente una cubierta de plástico rugosa, después la colocación de un papel filtro wattman 3 MM, seguida por una membrana de nylon cargada positivamente, a continuación una máscara cuadrículada de plástico distribuida por el fabricante, posteriormente el gel de agarosa al 0.9 %, luego otro papel filtro wattman de 3 MM, y finalmente una cubierta porosa de grosor aproximado de 3 cm la cual esta embebida de una solución de transferencia para southern blot y northern blot SSC 10X.

calentando en una bañó maría a 94°C durante 10 min, posteriormente se incubó la membrana con la sonda a 39° C durante toda la noche, al día siguiente se recuperó y almacenó la sonda y se agregaron 25 ml de buffer de lavado I 2X (SSC 2X/SDS 0.1 %) durante 10 min a TA dos veces, enseguida se lavó dos veces con 25 ml de buffer de lavado II 0.1X (SSC 0.1X/SDS 0.1 %) a 42° en agitación. La tercera fase consistió en la detección inmunológica, en la cual después de desechar el lavado de astringencia se agregaron 15 ml de buffer A (ácido maleico) y 60 µl de tween 20 durante 2 min a TA, se desechó la solución anterior y se agregó 15 ml de buffer B (bloqueo) a 42°C durante una hora. Una vez transcurrido este tiempo se tomaron 8 ml de buffer B y se agregaron 0.8 µl de antidigoxigenina incubándose 30 min a 37°C. Después de haber desechado el buffer B que contenía el anticuerpo, se agregaron nuevamente 10 ml de buffer A y se incubaron a TA durante 15 min dos veces, se eliminó la solución anterior y se agregaron 15 ml del buffer de detección (C), se incubó a TA durante 10 min dos veces. Luego se colocó la membrana sobre un acetato y se agregaron de 3 a 4 gotas del sustrato CSPD, esto funciona porque el DNA marcado con digoxigenina va a ser reconocido por el anticuerpo anti-DIG que tiene conjugado un fragmento proteico con actividad de fosfatasa alcalina misma que al entrar en contacto con el sustrato quimioluminiscente (CSPD) y dar lugar a la defosforilación de éste genera una señal luminosa que es detectada por una película autorradiográfica, y se cubrió con otro acetato, en este paso se evitó la formación de burbujas y el secado de la membrana, para lo cual se adicionaron 200 µl de buffer C incubándose a 37°C durante 30 min, finalmente se colocó este dispositivo en un cassette de revelado y se expuso durante 5, 10, 15, 30 y 120 min. La cuarta fase consistió del revelado, en la cual la película se colocó en solución reveladora durante 2 min, después se lavó en agua durante 3 min y finalmente se transfirió a la solución fijadora por un espacio de 3 min.

5.19. Remoción de sondas alcalinas de Southern Blot: Se lavó la membrana en agua desionizada estéril por 1 min a TA, posteriormente se incubó dos veces durante 10 min cada vez en una solución de denudamiento de sonda alcalina a

37°C en agitación continua (horno de hibridación). Esta incubación eliminó la sonda marcada con DIG lábil a álcalis. Enseguida se enjuagó la membrana vigorosamente en SSC 2X, y después del denudamiento de la sonda presente en la membrana se comenzó a resondear en el paso de prehibridación de acuerdo a lo descrito en el inciso anterior.

5.20. Transferencia de RNA (Northern Blot): Se incubaron las muestras de RNA de cepas, líneas y clonas de *G. duodenalis* resistentes al metronidazol durante 10 minutos a 65°C, luego se transfirieron en un baño de hielo y se adicionó la siguiente solución 25 µl de formamida concentrada, 5 µl de buffer MOPS 10 X, y 8 µl de formaldehído al 37 % (12.3 M), enseguida se adicionaron 5 µl de glicerol al 50 % conteniendo 0.1 mg/ml de azul de bromofenol, posteriormente dichas muestras se corrieron electroforeticamente en un gel desnaturizante de agarosa al 1 % (buffer MOPS 10X, agua, y 18 ml de formaldehído al 37 %) a 90 V durante aproximadamente 40 min, siendo el buffer de corrida una solución buffer de MOPS 1X. Terminada la electroforesis, el gel se agitó con una solución de SSC 10 X durante 20 min, enseguida se transfiere el RNA en el posiblot de acuerdo a lo descrito en el apartado 5.18, utilizando como buffer de transferencia SSC 10X. Una vez obtenida la membrana de nylon se irradió por la parte que contenía el RNA en un transiluminador de UV durante 3 min, y se prehibrido en solución buffer DIG High Prime a 39°C para el gen *pfor* y 41°C para el gen *gdh* por un tiempo no menor a 1 hr, las temperaturas de hibridación referidas anteriormente fueron ajustadas considerando que el kit de solución de hibridación (DIG Easy Hyb) hacia referencia a que en situaciones en las que se tuviera una sonda con una homología al 100 % se recomendaba un rango de temperaturas de 37 - 42°C dependiendo del contenido de GC que tuviera la sonda, luego se hibridó con las sondas respectivas en las condiciones antes descritas de temperatura durante aproximadamente 12 hrs, después se incubó la membrana tres veces en 10 ml de buffer de lavado I durante 15 min cada vez a 39 ó 41 °C dependiendo de la sonda utilizada. Se eliminó la solución anterior y se adicionó buffer de lavado II durante 10 min dos veces, se desechó la solución y se

agregó buffer A (de ácido maleico) durante 1 minuto una vez a TA, posteriormente la membrana se enjuagó dos veces en buffer C (detección) a TA durante 10 min cada vez. La membrana se colocó sobre un acetato y se adicionó sustrato (CSPD) evitando que se secase mediante la adición de 200 µl de la última solución en la que se incubó la membrana, enseguida se colocó otro acetato, luego ésta se transfirió a una incubadora a 37°C durante 30 min. Finalmente se expuso la membrana en una película autorradiográfica durante 10, 15, 30, 60 min hasta ver la aparición de bandas.

5.21. Remoción de sondas de RNA: Inicialmente se lavó la membrana en agua durante 1 min, enseguida se adicionaron 10 ml de una solución de denudamiento (ver anexo) a 37°C durante 10 min en agitación dos veces, posteriormente se adicionaron 10 ml de buffer SSC 2X y finalmente se continuó en el paso de prehibridación de acuerdo a lo descrito en el apartado anterior.

5.22. RT-PCR: Con la finalidad de analizar la presencia o bien la ausencia de un transcrito del gen *pfor*, inicialmente se realizó la estandarización de dicha técnica analizando primero el efecto de diferentes concentraciones de cDNA para los dos genes bajo estudio, así como el número de ciclos para evaluar el efecto de saturación del sistema. En la síntesis del cDNA se adicionaron 1 µg de RNA total para obtener un volumen final de 4 µl con agua inyectable, el cual se desnaturizó a 94°C durante 5 min posteriormente se preparó una mezcla de reacción que consistió en agregar como concentraciones finales 1X de buffer de síntesis de la primera cadena, 1mM de solución de dNTP's, 10 ng/µl del primer oligo(dT)₁₅, 0.5 µl/10 µl de reacción de transcriptasa reversa M-MLV (20 U) y 1.0 µl/5 µl de reacción de inhibidor de RNasa. Enseguida se adicionaron 6 µl de la mezcla anterior al RNA desnaturizado mezclando suavemente, se incubó durante 120 min a 42° C dos ciclos, luego se desnaturizó la transcriptasa reversa por calentamiento durante 15 min a 95°C y se conservó a -20° C. Posteriormente se realizó la PCR para un fragmento conservado de *gdh* de 570 pb y la región correspondiente a sitios catalíticos de *pfor* de 342 pb (ver tabla 4), y finalmente al

producto amplificado se le efectuó un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.2 % para confirmar el tamaño del producto obtenido en base a la interpolación de la longitud determinada para cada gen bajo estudio, con un marcador de peso molecular de DNA de 100 pb. Se realizó un análisis densitométrico a partir de corrimientos obtenidos para lo cual se consideró como control de carga al gen constitutivo *gdh* con la finalidad de poder apreciar diferencias en el nivel de expresión del gen *pfor*.

TABLA 4. PROTOCOLO DE RT-PCR

Síntesis de DNAc y pre-desnaturalización



2 ciclos



94°C por 5 min



42°C por 120 min



95°C por 15 min

PCR para pfor

Desnaturalización 94°C por 5 min



25 ciclos



Desnaturalización 94 °C por 30 seg

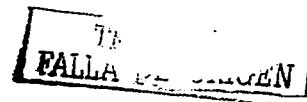
Alineamiento 69.6 °C por 1 min

Extensión 72 °C por 1 min



Extensión final

72°C por 10 min



CAPITULO VI. RESULTADOS

6.1. Cultivo de trofozoítos de *G. duodenalis*: La cepa de referencia (WB), la clona sensible al metronidazol (WB-1), la clona resistente al metronidazol (WBRM23) y la línea de cultivos resistentes a dicho fármaco (Ste 10, Ste 11, Ste 13, Ste 14, Ste 17 y Ste 21) fueron cultivados axénicamente en medio TYI-S-33 tal y como se describió en material y métodos. Generalmente la fase logarítmica de crecimiento fue el momento elegido para realizar la resiembra de cada cultivo, ésta se llevó al cabo cada 72 horas.

No se detectaron diferencias relevantes con respecto a la velocidad de replicación del parásito entre los distintos cultivos descritos anteriormente. Esto último se confirmó mediante observaciones directas de cada cultivo en microscopio invertido; sin embargo, sobresalió la capacidad de adhesión que presentaron específicamente las clonas WB-1 y WBRM23, ya que dichos cultivos en ocasiones necesitaban enfriarse hasta por períodos mayores a 5 hrs para lograr despegar los trofozoítos de *G. duodenalis* de las paredes del recipiente de cultivo, aún con la adición de un baño agua-hielo-etanol.

Es importante señalar que en todos los cultivos se realizaron continuamente pruebas de esterilidad con medio luria (ver anexo), esto con la finalidad de asegurar en forma precisa la tolerancia que tenía cada cultivo resistente hacia el metronidazol y eliminar cualquier interferencia propiciada por la existencia de microorganismos contaminantes.

6.2. Generación de cultivos resistentes al metronidazol: De acuerdo a investigaciones anteriores (Romero, 1996) se estableció que uno de los mejores métodos para la obtención de cultivos resistentes al metronidazol era la selección inducida por fármaco mediante el cultivo continuo en concentraciones ascendentes del agente quimioterápico; con base en estos antecedentes se decidió utilizar esta estrategia nuevamente. Durante el desarrollo de la obtención de cultivos resistentes al metronidazol se apreció que este proceso consistió de múltiples etapas, observándose diferencias en la susceptibilidad al fármaco. Así,

sobresalió inicialmente una dramática pérdida de viabilidad aunada con una lenta velocidad de replicación del parásito. Sin embargo, conforme se establecía una adaptación hacia el metronidazol los trofozoítos de *G. duodenalis* presentaron un comportamiento normal, esto con base a criterios evaluados durante cada incremento de concentración como fueron morfología, viabilidad y velocidad de replicación celular.

La concentración del fármaco generalmente se incrementó en el momento que los cultivos presentaban velocidades de replicación similares al cultivo sensible, y había confluencia en los cultivos. Una de las formas de aumentar la concentración del fármaco consistió en emplear una cantidad de trofozoítos constante y aumentar la concentración del fármaco, iniciando a partir de la concentración en la cual se encontraba creciendo el cultivo, hasta la máxima concentración en la cual aún crecían los trofozoítos. Aún en casos extremos en los cuales los cultivos presentaban hasta un 30 % de confluencia, éstos seguían manteniéndose en presencia continua de fármaco, y una vez que éstos se adaptaron a las mismas condiciones de concentración del fármaco alcanzaban una confluencia del 100 %. Los cultivos resistentes se obtuvieron ya sea por mantenimiento de los trofozoítos en cultivo axénico, o bien por criopreservación sin fármaco, adicionando metronidazol al momento de descongelar los cultivos.

6.3. Clonación del cultivo Ste 21: Uno de los principales parámetros considerados para evaluar la eficiencia de la clonación fue mediante la determinación del porcentaje de eficiencia de formación de colonias (% CFE), en cuyo experimento se obtuvo en las dos clonaciones realizadas con o sin metronidazol, el mismo % CFE teniendo un valor de 2. Ambas clonas fueron capaces de soportar una concentración máxima de 23 μM según se indica en la tabla 5. Las clonas mostraron diferencias en la velocidad de replicación después de la clonación; sin embargo, conforme transcurrió el tiempo se observaron tiempos de replicación similares por adaptación de los cultivos a la presión ejercida por el fármaco. Si bien los resultados obtenidos mostraron que la clonación se encontraba por debajo del límite inferior para ser considerada clona,

se debe tomar en cuenta la baja probabilidad que presenta una célula para sobrevivir en un microambiente con una concentración elevada de fármaco, aunado al efecto probabilístico que representa la misma metodología de clonación al inocular un trofozoito en cada dos viales.

TABLA 5. CLONACION DE CULTIVOS DE *G. duodenalis* RESISTENTES A METRONIDAZOL POR DILUCION LIMITANTE.

CULTIVO	CONDICIONES DE LA CLONACION	No. DE CLONAS OBTENIDAS	% CFE	CONC. MAXIMA DE METRONIDAZOL SOPORTADA (μ M)
Ste 21	S/ Fármaco	1	2	23
Ste 21	C/10 μ M de metronidazol	1	2	23

6.4. Obtención de DNA a partir de trofozoitos de *G. duodenalis*: Una vez realizados los protocolos de extracción del DNA del parásito, se evaluó la calidad de los ácidos nucleicos por separación electroforética en geles de agarosa al 1.2 % (figura 6). En esta se observa el DNA como una banda alrededor de 9 Kpb. En ocasiones en la parte terminal del gel se localizaba un barrido que correspondía a RNA degradado, en cuyos casos se adicionaba RNasa A y se hacía nuevamente una extracción clorofórmica hasta resuspender el DNA en agua inyectable. Otra forma de valorar cuantitativamente la pureza del DNA fue determinando la razón de absorbancias $A_{260}/_{280}$ cuyos valores oscilaron entre 1.18 hasta 2.95. El primer valor sugiere la presencia de proteínas, ya que éstas al tener un pico de absorbancia en 280 nm ocasionaban una disminución en el valor del cociente. Por lo anterior, se decidió no utilizar dichas muestras, y aquellas que presentaron valores altos se consideraron adecuadas tomando como referencia que la literatura reporta valores de 1.8 a 1.9 para DNA. En este contexto, investigaciones realizadas por Wilfinger y col. (1997) han determinado que el pH y la fuerza iónica de la solución en la que se realizan las lecturas espectrofotométricas influyen en la

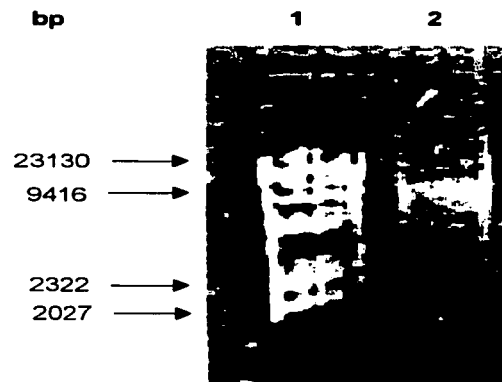


Figura 6. Análisis electroforético de DNA a partir de trofozoítos de *G. duodenalis*. DNA de 60×10^6 trofozoítos de *Giardia* fueron extraídos por el método descrito en el apartado 7 de material y métodos. Carril 1 Marcador λ digerido con Hind III, carril 2 DNA de la cepa WB-1.

razón $A_{260}/_{280}$. Por otra parte, en la cuantificación de este ácido nucleico se obtuvo un rendimiento de 0.096 pg de DNA/ trofozoito de *G. duodenalis* .

6.5. Obtención de RNA a partir de trofozoitos de *G. duodenalis*: Se realizó el protocolo de extracción de RNA de acuerdo a lo indicado en el capítulo 5.8., para lo cual se utilizó el reactivo TRIzol® que es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. Este reactivo mejora el método de aislamiento del RNA de un solo paso desarrollado por Chomczynski y Sacchi (1987). La optimización de esta técnica requirió inicialmente estandarizar el inóculo celular, probando para ello diferentes números de trofozoitos (5×10^6 , 10×10^6 , 20×10^6 , 30×10^6 , y 40×10^6) y efectuando el protocolo ya descrito. Los resultados de la figura 7 mostraron que no hay una correlación entre el número de trofozoitos de *Giardia* y la eficiencia de obtención de RNA, lo anterior al considerar el valor de la razón de absorbancias que refleja la pureza de dicho material el cual disminuyó dramáticamente a partir de 20×10^6 trofozoitos, debido a lo anterior el inóculo óptimo fue 10×10^6 trofozoitos según se aprecia en la figura 7. Lo anterior sugiere que al haber un incremento del número celular se deteriora la eficiencia de recuperación del RNA posiblemente al no reaccionar adecuadamente en cantidades estequiométricas el reactivo TRIzol® en base al número celular, o bien se satura la capacidad del reactivo. Una vez estandarizadas las condiciones óptimas de extracción de RNA de cada muestra se evaluó la integridad del RNA cualitativamente y cuantitativamente. En esta se determinó la migración de RNA ribosomal 18S y 28S por el corrimiento electroforético en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes (formaldehído al 1.2 %), apreciándose bandas definidas. Por otra parte, en las evaluaciones cuantitativas del valor de la razón de absorbancias descrito en material y métodos, se obtuvieron valores desde 1.29 hasta 1.85, siendo óptimos los últimos ya que la literatura reporta como intervalo aceptable de 1.9 a 2 para RNA. Se obtuvo así un rendimiento de 0.08 pg de RNA / trofozoito de *G. duodenalis*.

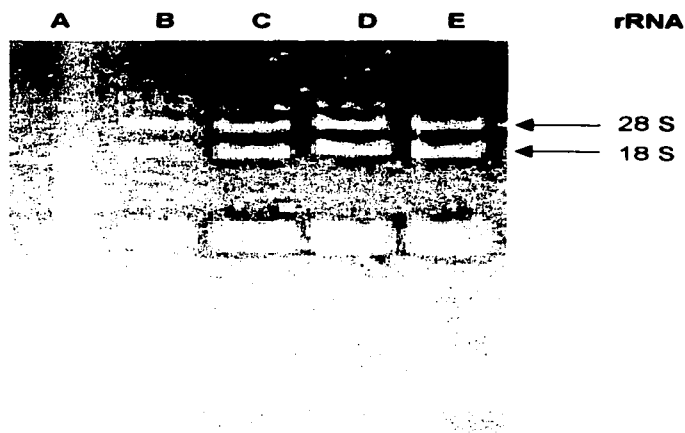


Figura 7. Análisis electroforético de RNA total obtenido a partir de preparaciones de trofozoitos con diferente densidad celular. Se extrajo RNA según lo descrito en material y métodos. Carril A 5×10^6 , carril B 10×10^6 , carril C 20×10^6 , carril D 30×10^6 , carril E 40×10^6 de trofozoitos de *Giardia*.

6.6. Diseño de iniciadores para *gdh* y *pfor*: Tomando en consideración las búsquedas nucleotídicas y/o aminoácídicas realizadas en NCBI Entrez nucleotide query o NCBI Entrez protein query, se seleccionaron los iniciadores en base a los criterios ya establecidos en el apartado 5.6 de material y métodos. Las siete secuencias encontradas para el gen *gdh* en *G. duodenalis* se procesaron en Match Box Server 1.2, con la finalidad de determinar secuencias altamente conservadas. Una vez realizado esto, se seleccionaron iniciadores que funcionaron para cadena sentido y antisentido, cada una de ellas se mandaron analizar en DDBJ FASTA e-Mail server Version 1.50 (Pearson y Lipman, 1988) con la finalidad de determinar la homología que ellas presentaban con secuencias reportadas. En este caso la homología fue de 100.000 % con respecto al gen glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP de *G. duodenalis* como se aprecia en la figura 8.

Con el gen *pfor* se decidió utilizar la secuencia reportada de *Giardia* cuyo número de acceso fue L27221. Se muestra en la figura 9 la secuencia nucleotídica y aminoácídica de los iniciadores utilizados para *pfor* con una longitud de 21 nucleótidos, los cuales flanquearon las regiones catalíticas 3Fe-4S y 4Fe-4S del producto de dicho gen del tipo ferredoxina.

6.7. Estandarización de PCRs para *gdh* y *pfor*: Inicialmente se efectuaron las PCR con una cantidad constante de DNA, siendo ésta de 100 ng, y posteriormente se evaluó el efecto de la concentración de magnesio, así como la temperatura de alineamiento teórica del iniciador la cual fue ajustada de acuerdo al valor obtenido en la tabla 3. Con el gen de la *gdh* se observó que en concentraciones de magnesio de 1 y 2 mM se produjo una banda de 570 pb siendo óptima la última concentración, a diferencia de las concentraciones de 3 hasta 5 mM en las cuales aparecían dos posibles bandas inespecíficas (datos no mostrados). Una vez establecidas las condiciones óptimas con respecto al tiempo, temperatura de alineamiento y extensión de los iniciadores mostrados en la tabla 6, se analizaron diferentes concentraciones de DNA (10, 25, 50, 75 y 100 ng) observándose una banda bien definida de 570 pb con tan solo 10 ng (figura 10).

```

                                10      20      30
                                ATCTTCCGCGTGCCTGGATGGATGACGCT
                                .....
M84604 GAGAGGATGCTTGAGCCGGAGCGCGTCATCATCTTCCGCGTGCCTGGATGGATGACGCT
      370      380      390      400      410      420
      40      50      60      70      80      90
      GGACGCATCAACGTCAACCGCGGCTTCCGTGTCCAGTACAACCTCTGCTCTCGGCCCTAC
      .....
M84604 GGACGCATCAACGTCAACCGCGGCTTCCGTGTCCAGTACAACCTCTGCTCTCGGCCCTAC
      430      440      450      460      470      480
      100      110      120      130      140      150
      AAGGGTGGCCTCCGCTTCCACCCCTCTGTCAATCTTTGATTCTCAAGTTCTCGGTTTC
      .....
M84604 AAGGGTGGCCTCCGCTTCCACCCCTCTGTCAATCTTTGATTCTCAAGTTCTCGGTTTC
      490      500      510      520      530      540
      160      170      180      190      200      210
      GAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACACGCTCCCGATGGGCGGCGGCAAGGGCGGCTCC
      .....
M84604 GAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACACGCTCCCGATGGGCGGCGGCAAGGGCGGCTCC
      550      560      570      580      590      600
      220      230      240      250      260      270
      GACTTTGACCCAAAGGGGCAAGTCCGACAACGAGGTTCATGCGCTTCTGCCAGTCCTTCATG
      .....
M84604 GACTTTGACCCAAAGGGGCAAGTCCGACAACGAGGTTCATGCGCTTCTGCCAGTCCTTCATG
      610      620      630      640      650      660
      280      290      300      310      320      330
      ACCGAGCTCCAGAGGCACGTCCGGCGCGGACACTGACGTTCTGCGGCGCATCGGCGTC
      .....
M84604 ACCGAGCTCCAGAGGCACGTCCGGCGCGGACACTGACGTTCTGCGGCGCATCGGCGTC
      670      680      690      700      710      720
      340      350      360      370      380      390
      GGCGCCCGCGAGATCGGGTACCTGTACGGACAGTACAAGCGCCTGAGGAACGAGTTCACA
      .....
M84604 GGCGCCCGCGAGATCGGGTACCTGTACGGACAGTACAAGCGCCTGAGGAACGAGTTCACA
      730      740      750      760      770      780
      400      410      420      430      440      450
      GGCCTCCTCACAGGCAAGAACGTCAAGTGGGGCGGGTCTTTCATCAGGCCGGAGGCCACG
      .....
M84604 GGCCTCCTCACAGGCAAGAACGTCAAGTGGGGCGGGTCTTTCATCAGGCCGGAGGCCACG
      790      800      810      820      830      840
      460      470      480      490      500      510
      GGCTATGGCGCTGTCTACTTCCTGGAGGAGATGTGCAAGGACAACAACACTGTGATCAGG
      .....
M84604 GGCTATGGCGCTGTCTACTTCCTGGAGGAGATGTGCAAGGACAACAACACTGTGATCAGG
      850      860      870      880      890      900
      520      530      540      550      560
      GGTAAAGACGTCCTTCTTTCTGGCTCCGGCAACGTTGCCAGTTTGCTTGGCAGAACTC
      .....
M84604 GGTAAAGACGTCCTTCTTTCTGGCTCCGGCAACGTTGCCAGTTTGCTTGGCAGAACTC
      910      920      930      940      950      960
      970      980      990      1000      1010      1020
      ATTCAGCTCGGCGCAAAGGTCTCACCTTCTCAGACTCCAACGGGACCATTGTGACAAG

```

Figura 8. Comparación de secuencias nucleotídicas de las regiones flanqueadas por el juego de iniciadores 59SGDH y 242AGDH para el gen *gdh* de *G. duodenalis* con respecto a la misma reportada en el banco de datos. El programa utilizado para determinar la homología entre secuencias fue FASTA, el número de acceso de la secuencia de *Giardia* es M84604.

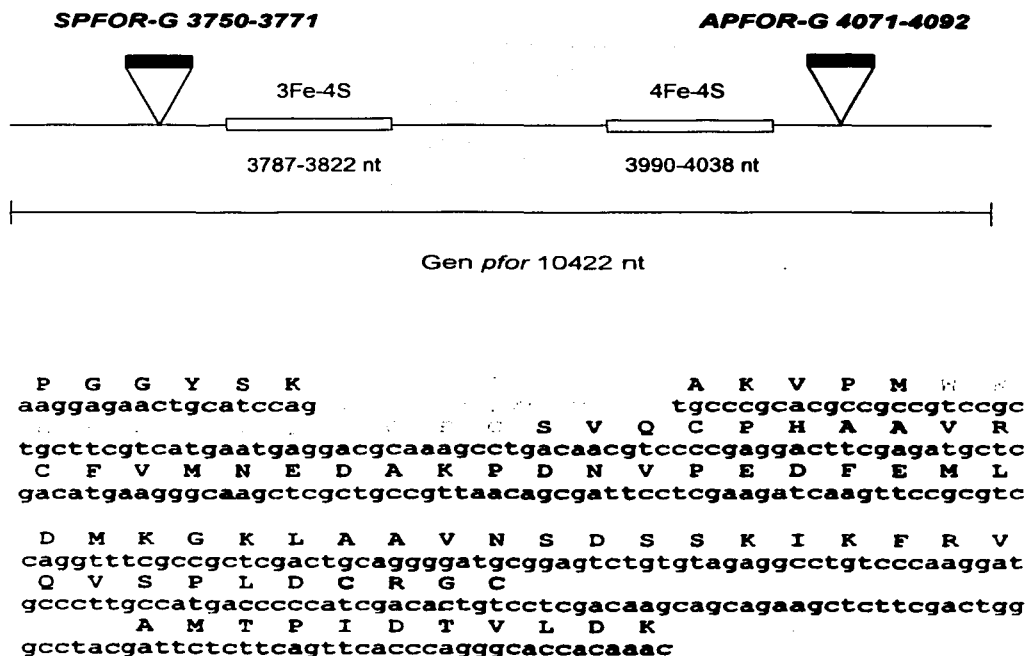


Figura 9. Secuencia de aminoácidos y nucleótidos de las regiones flanqueadas por el juego de iniciadores SPFOR-G y APFOR-G para el gen *pfor* de *G. duodenalis*. La secuencia nucleotídica marcada con letras verdes corresponde al sitio catalítico 3Fe-4S; las letras azules representan el sitio 4Fe-4S; y las letras anaranjadas muestran las secuencias flanqueadas por los iniciadores.

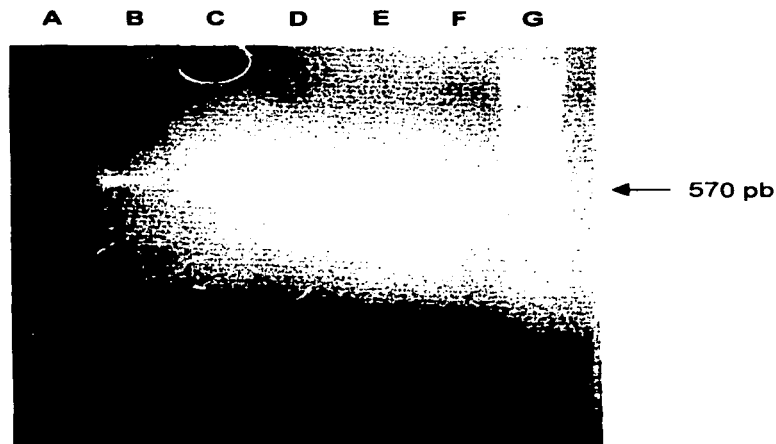


Figura 10. Efecto de saturación del producto de PCR para el gen *gdh* en función del uso de distintas concentraciones de DNA de *G. duodenalis*. La PCR se realizó de acuerdo a lo descrito en material y métodos, carril A control de PCR, carril B 10 ng, carril C 25 ng, carril D 50 ng, carril E 75 ng, carril F 100 ng de DNA de la cepa WB, y carril G marcadores de 100 pb.

Por otro lado, con el gen *pfor* inicialmente se estandarizó la temperatura de alineamiento del iniciador debido a que la T_m teórica generaba bandas no deseadas por debajo del producto amplificado esperado, posteriormente se fue incrementando gradualmente la temperatura hasta lograr las condiciones óptimas, luego se encontró que a partir de 2 hasta 5 mM de magnesio hubo amplificación, apreciándose una banda de 342 pb utilizando como concentración óptima 3 mM. Asimismo, se corrieron simultáneamente diferentes concentraciones de DNA (50, 100, 150, 200 y 250 ng) observándose un efecto de saturación a partir de 100 ng (Figura 11). Los tiempos y temperaturas de desnaturalización, alineamiento y extensión para este gen se esquematizan en la tabla 6.

TABLA 6. CONDICIONES PARA LA PCR

Gen	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Ciclos	Longitud del producto (pb)
<i>pfor</i>	94 °C/30 seg	69.6 °C/1 min	72 °C/1 min	30	342
<i>gdh</i>	94 °C/30 seg	53.1 °C/1 min	72 °C/1 min	30	570

6.8. Cinética con endonucleasas de restricción: Se realizó una cinética con la finalidad de determinar la concentración y el tiempo de incubación óptimo con las diferentes enzimas de restricción. Se empleó la enzima Kpn I con fines representativos, e inicialmente se utilizó una concentración constante de enzima de 10 U, combinada con diferentes tiempos de incubación a 37°C, observándose que a partir de 30 min hasta 21 hrs la enzima presentó actividad (Figura 12). El DNA utilizado en este ensayo era de buena calidad, ya que funcionó adecuadamente como sustrato para la enzima. Por otra parte, se observó que a partir de 5 hasta 40 U se presentó el mismo patrón de digestión (Figura 13). Sin embargo, para estudios en los que se requirió efectuar digestiones enzimáticas se

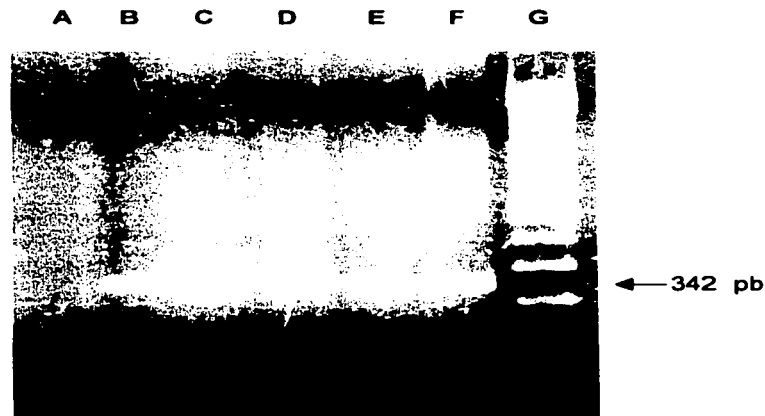


Figura 11. Efecto de diferentes concentraciones de DNA sobre la amplificación del producto del gen *pfor*. La PCR se llevo a cabo de acuerdo a lo descrito en material y métodos. En esta se adicionaron diferentes concentraciones de DNA, carril A control negativo de PCR, carril B 50 ng, carril C 100 ng, carril D 150 ng, carril E 200 ng, carril F 250 ng de DNA de *G. duodenalis*, y carril G Marcadores de 100 pb (Gibco BRL).

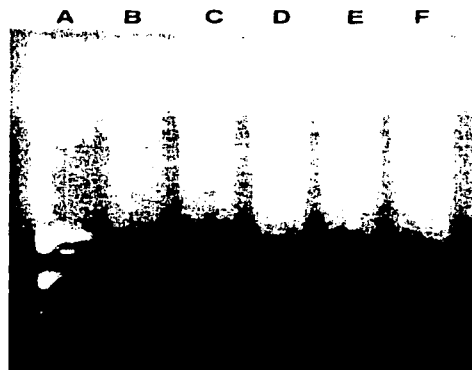


Figura 12. Cinética enzimática con la endonucleasa de restricción Kpn I. Se realizaron digestiones enzimáticas evaluando el efecto del tiempo de incubación con enzima sobre el perfil de restricción. Carril A marcadores λ digerido con Hind III, carril B 30 min, carril C 1 hr, carril D 3 hrs, carril E 6 hrs, y carril F 21 hrs.

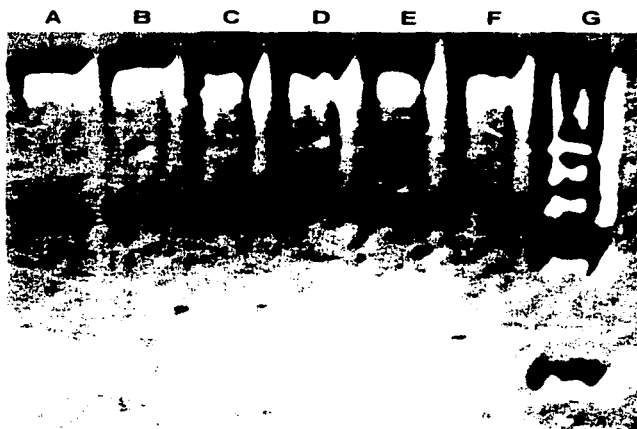


Figura 13. Efecto de diferentes concentraciones de la enzima Kpn I sobre el perfil de restricción de DNA de trofozoítos de *G. duodenalis*. Se emplearon como condiciones de digestión enzimática 3 hrs a 37°C. Carril A Control, DNA sin digerir, carril B 5 U, carril C 10 U, carril D 20 U, carril E 30 U, carril F 40 U, y carril G marcador λ digerido con Hind III. 10 μ g de DNA de la cepa WB de *G. duodenalis* fueron cargados por carril.

decidió realizarlas con 21 hrs de incubación, con el fin de garantizar la actividad completa de las distintas enzimas empleadas.

6.9. Análisis del perfil de restricción para el producto obtenido por la PCR para *gdh* y *pfor*: Con la finalidad de corroborar si el producto obtenido después de la amplificación de la PCR correspondía al esperado, se tomaron dos parámetros como criterios que confirmaron la identidad del producto para los genes estudiados. El primero fue el corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio para determinar aproximadamente su tamaño expresado en pb, y después se analizó el número de cortes con endonucleasas de restricción. Cabe mencionar que las enzimas seleccionadas (Kpn I y Pst I) cortaban dentro de la secuencia del gen amplificada por los iniciadores, así también se incluyó la región de éstos, para determinar con precisión el número de cortes. Dicha secuencia se analizó en BCM Search Launcher Baylor College of Medicine HGSC, para los fragmentos de *gdh* y *pfor* y se seleccionaron las endonucleasas que cortaran dentro o fuera de dichos fragmentos, efectuándose digestiones enzimáticas de acuerdo a lo descrito en material y métodos. Al analizar el perfil de restricción de fragmentos de *gdh* con la enzima Kpn I se observaron dos cortes (219 y 351 pb), mientras que el fragmento de *pfor* digerido con la endonucleasa Pst I generó cortes de 184 y 158 pb; esto se muestra en la figura 14. En cada digestión enzimática realizada, se corroboró que la digestión fuese completa al introducir controles que carecían de enzima.

6.10. Homología de sitios catalíticos tipo ferredoxina 3Fe-4S y 4Fe-4S del gen *pfor* en clones de *G. duodenalis* con diferente sensibilidad al metronidazol: Al usar la PCR e iniciadores de oligonucleótidos no degenerados para regiones altamente conservadas del gen *pfor*, y con el propósito de encontrar diferencias a nivel de sitios catalítico del tipo ferredoxina se secuenciaron dichos fragmentos. Lo anterior nos permitiría sugerir que, de encontrar diferencias en éstas, se tendría una asociación directa con el fenotipo de resistencia al metronidazol. El espectroferograma mostrado en la figura 15 representa la secuencia del sitio

Gen *pfor*

tgc	ggt	ttc	tgc	tct	gtc	cag	tgc	ccg	cac	gcc	gcc	gtc	cgc	tgc	ttc	gtc	atg	aat	gag	60
gac	qca	aag	cct	gac	aac	gtc	ccc	gag	gac	ttc	gag	atg	ctc	gac	atg	aag	ggc	aag	ctc	120
gcl	gcc	gtt	aac	agc	gat	tcc	tcc	aag	atc	aag	ttc	cgc	gtc	cag	gtt	tcc	ccg	ctc	gaa	180
	gg	gga	tgc	gga	gtc	tgt	gta	gag	gcc	tgt	ccc	aag	gat	gcc	ctt	gcc	atg	acc	ccc	240
atc	gac	act	gtc	ctc	gac	aag	cag	cag	aag	ctc	ttc	gac	tgg	gcc	tac	gat	tct	ctt	cag	300
ttc	acc	caq	ggc	acc	aca	aac	atc	gac	acg	gag	agc	tgc	aac							342

Gen *gdh*

atc	ttc	ccc	gtg	ccc	tgg	atq	gat	gac	gct	gga	cgc	atc	aac	gtc	aac	cgc	ggc	ttc	cgt	60
gtc	cag	tac	aac	tct	gct	ctc	ggc	ccc	tac	aag	ggg	ggc	ctc	cgc	ttc	cac	ctc	tct	gtc	120
aat	ctt	tcc	att	ctc	aag	ttc	ctc	ggg	ttc	gag	cag	atc	ctg	aag	aac	tcc	ctc	acc	acg	180
ctc	ccg	atg	ggc	ggc	ggc	ggc	ggc	ggc	tcc	gac	ttt	gac	cca	aag	ggc	aag	tcc	gac	aac	240
gag	gtc	atg	cgc	ttc	tgc	cag	tcc	ttc	atg	acc	gag	ctc	cag	agg	cag	gtc	ggc	gcc	gac	300
act	gac	gtt	ccc	ggc	ggc	gac	atc	ggc	gtc	ggc	ggc	cgc	gag	atc	ggt	ttt	ctg	tac	gga	360
cag	tac	aag	cgc	ctg	gag	gaa	cga	gtt	cac	agg	cgt	cct	cac	agg	caa	gaa	cgt	caa	gtg	420
ggg	cgg	gtc	ttt	cat	cag	ccc	gga	ggc	cac	ggg	cta	tgg	cgc	tgt	cta	ctt	cct	gga	gga	480
gat	gtg	caa	gga	caa	caa	cac	tgt	gat	cag	ggg	taa	gaa	cgt	cct	tct	ttc	tgg	ctc	cgg	540
caa	cgt	tgc	cca	gtt	tgc	ttg	cga	gaa	ctc											570

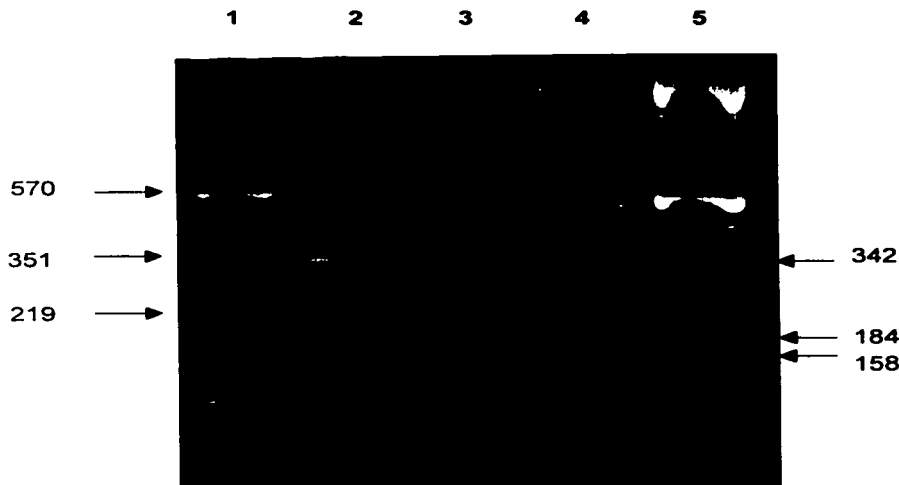


Figura 14. Análisis del perfil de restricción y secuencias nucleotídicas con sitios de corte para las enzimas de restricción indicadas para los genes *gdh* y *pfor* obtenidos a partir del producto de PCR de DNA genómico de *G. duodenalis*. Las digestiones enzimáticas se hicieron de acuerdo a lo descrito en el apartado 5.13 de material y métodos. Carril 1 producto de PCR sin digerir para el gen *gdh*, carril 2 producto de PCR de *gdh* digerido con Kpn I, carril 3 producto de PCR sin digerir para el gen *pfor*, carril 4 producto de PCR de *pfor* digerido con PstII, carril 5 escalera de DNA de 100 pb. Los tamaños se expresan en pb. La secuencia nucleotídica que se representa con letras color rojo corresponden a las regiones flanqueadas por cada juego de iniciadores, mientras que las letras color verde muestran los sitios de corte de la enzimas antes referidas.

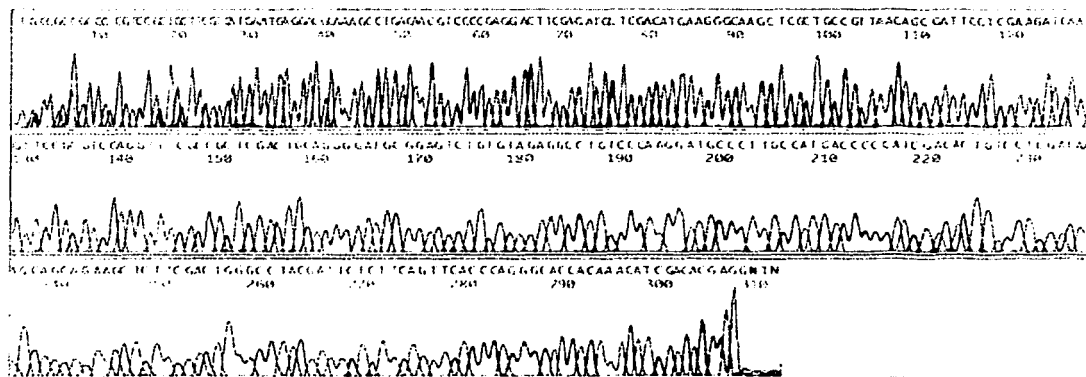


Figura 15. Espectroferograma de la clona resistente al metronidazol de *G. duodenalis* (WBRM23). Secuenciación parcial del gen *pfor* abarcando los sitios catalíticos 3Fe-4S y 4Fe-4S mediante el método de terminación de cadena dideoxi (Sanger y col, 1977), con el kit Big Dye™ (ABI PRISM PE Applied Biosystems).

catalítico del gen *pfor* de la clona resistente (WBRM23), mientras que la figura 16 esquematiza una comparación de secuencias nucleotídicas de dichos sitios entre la clona sensible y resistente empleando el programa FASTA. Así, no se encontraron diferencias, sino una homología del 100.000 % entre WB-1 y WBRM23 sin hallar ningún tipo de cambio genético debido a inserciones ó deleciones, aunque es importante mencionar que al inicio de la secuencia el equipo no leyó adecuadamente debido al traslapamiento de picos presentes en los espectroferogramas proporcionando la lectura del nucleótido que presento mayor área, asimismo como el ignorar la presencia de picos pequeños.

6.11. Obtención de sondas: Una vez obtenido el producto de PCR para los genes *gdh* y *pfor* , se realizó su purificación a partir de geles de agarosa al 2 % para lo cual se utilizaron dos protocolos. El primero es conocido como "freeze squeeze" que no funcionó debido a que el DNA quedaba retenido en la agarosa. Estas observaciones se realizaron cualitativamente mediante la visualización del gel de agarosa en el transiluminador de luz U.V. Por lo anterior, se recurrió a una segunda estrategia experimental, que fue el uso de un protocolo comercial (Concert TM) el cual permitió tener DNA adecuadamente con rendimiento aceptable. Como se muestra en el corrimiento electroforético de la figura 17, hubieron diferencias en la intensidad de bandas para el gen *pfor* con una longitud de 342 pb, lo cual se corroboró cuantitativamente al estimar el porcentaje de recuperación el cual tuvo un valor de 48.93 % al emplear este método.

6.12. Eficiencia del marcaje de sondas: La figura 18 representa la cuantificación de las sondas utilizadas en el presente trabajo mediante detección colorimétrica, observándose diferencias de intensidades en las gotas aplicadas en las tiras prueba las cuales se visualizan como manchas coloridas. De esta forma, se encontró para el gen *pfor* 0.01 pg/ μ l de moléculas marcadas con DIG.

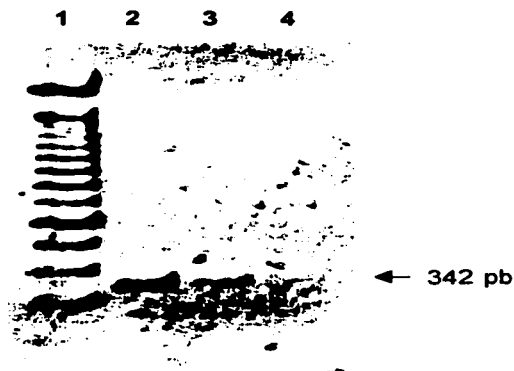


Figura 17. Análisis comparativo de la eficiencia de recuperación del producto de PCR a partir de gel mediante protocolo comercial (Concert). Carril 1 Escalera de DNA de 100 pb, carril 2 poza del producto de PCR del gen *pfor*, carril 3 y 4 producto purificado del mismo gen.

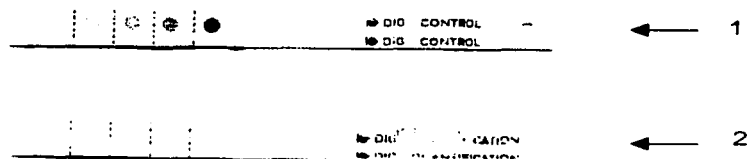


Figura 18. Estimación de la eficiencia del marcaje con DIG de las sondas para el gen *pfor*. En este marcaje se utilizaron tiras controles cargadas con cinco diluciones de DNA control (3, 10, 30, 100, y 300 pg/ml) establecidas por el distribuidor, y para los genes en estudio se aplicó DNA marcado con DIG el cual se distribuyó en los cuadrados de las tiras proporcionadas por el fabricante. Tira 1 control, tira 2 *pfor*.

6.13. Similitud en el número de genes *pfor* de *G. duodenalis*: Los niveles de expresión de un gen se pueden relacionar en forma parcial con el número de copias por célula, lo que podría involucrar que la amplificación de la cantidad de genes se utilice para sobreproducir proteínas que en este caso sería el responsable del fenotipo de resistencia al metronidazol. Debido a lo anterior, se examinó el número de copias genómicas del gen *pfor* en una clona sensible a droga (WB-1), cepas resistentes (Ste 14, Ste 17, y Ste 21) y una clona resistente (WBRM23) mediante análisis tipo Southern-Blot. Cantidades iguales de DNA total de *G. duodenalis* fue restringido con tres endonucleasas, siendo las primeras BamHI y Kpn I (que se caracterizaron por no cortar la secuencia dentro del gen *pfor*), y la tercera Xho I (que cortó dentro de la secuencia del gen estudiado), posteriormente, se separaron electroforéticamente los productos de las digestiones enzimáticas en gel de agarosa al 0.9 % y se transfirió el producto a una membrana de nylon cargada positivamente, la cual se hibridó con la sonda para el gen de la *pfor* marcada por random primer con DIG, utilizando como gen control *gdh*. Con el uso de la enzima BamHI el patrón de restricción al emplear DNA de las clonas y cepas antes mencionadas fue semejante, ya que se produjeron fragmentos definidos cuyo tamaño aproximado fue de (2730, 1973 y 1370bp) según se aprecia en la figura 19, y al hibridar la membrana con la sonda *pfor* se obtuvieron los resultados mostrados en la Fig. 20. Las cepas y clonas analizadas en el presente trabajo presentaron un número de copias igual, es decir dos bandas cuyos pesos moleculares fueron de aproximadamente 4871 y 4240 pb, mientras que con el gen *gdh* se presentó una banda de aproximadamente 4465 pb. El patrón de hibridación observado fue diferente al patrón de restricción obtenido cuando el DNA fue digerido con las distintas enzimas utilizadas en dicho estudio.

Con el empleo de la enzima Kpn I e hibridación con la sonda del gen *pfor* se observó una banda con un tamaño aproximado de 4112 pb (Figura 21), y cuando dicha membrana se denudó y rehibridó con la sonda del gen *gdh* se encontró una banda con una longitud de 2386 pb. En el caso de la enzima Xho I al hibridarse

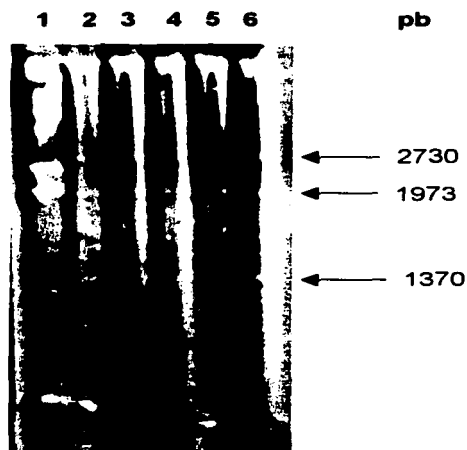


Figura 19. Análisis de restricción enzimática de DNA de *G. duodenalis* digeridos con BamHI. 10µg de DNA de *Giardia* fue digerido con la endonucleasa antes mencionada durante 21 hrs a 37°C y separada electroforéticamente en gel de agarosa al 0.9 %. Carril 1 Marcadores λ Hind III, carril 2 WB-1, carril 3 Ste 14, carril 4 Ste 17, carril 5 Ste 21 y carril 6 WBRM23.

TESIS CON
FALLA DE GEN

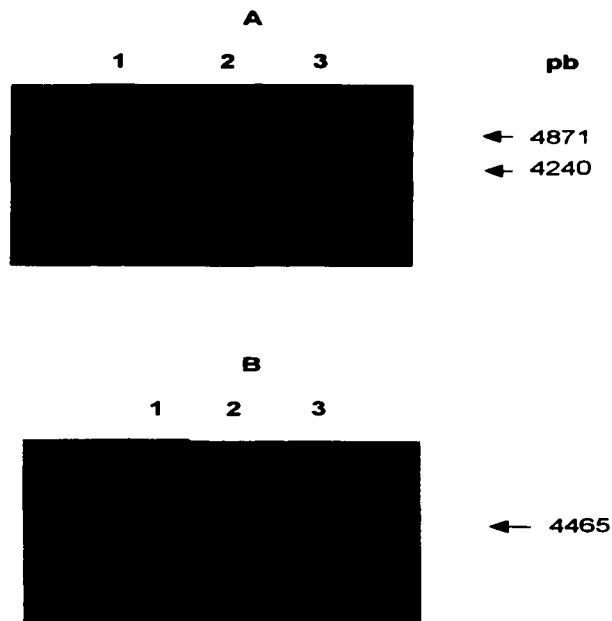


Figura 20. Autorradiograma de la hibridación tipo Southern Blot para las sondas *pfor* y *gdh* con DNA genómico de *G. duodenalis*. 10 µg de DNA de cepas y clones con diferente tolerancia al metronidazol fueron digeridos con Bam HI, posteriormente separado electroforéticamente en gel de agarosa al 0.9 %. El DNA fue transferido a membrana de nylon (Amersham, Hybond-N) (Southern, 1975) e hibridado con sonda *pfor* (A) y *gdh* (B), marcadas mediante random primer con DIG. Carril 1 WB-1, carril 2 Ste 21 y carril 3 WBRM23.

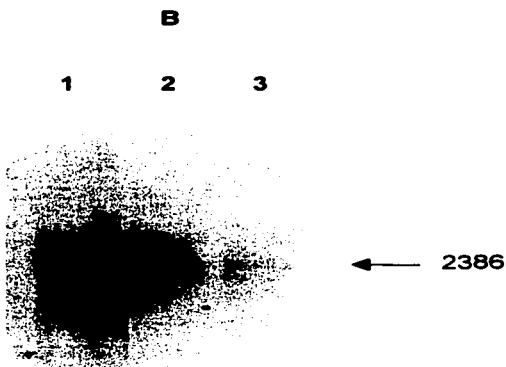
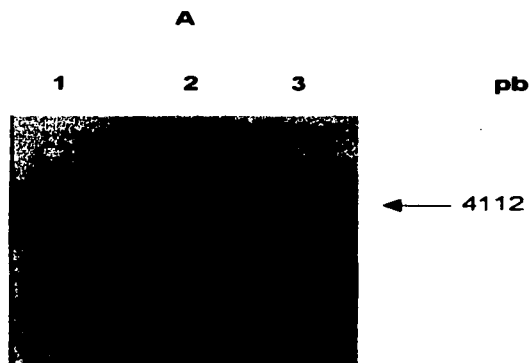


Figura 21. Autorradiograma de la hibridación tipo Southern Blot para las sondas *pfor* y *gdh* con DNA genómico de *G. duodenalis*. 10 µg de DNA de cepas y clones con diferente tolerancia al metronidazol fueron digeridos con Kpn I de acuerdo a las instrucciones del fabricante y separado electroforéticamente en gel de agarosa al 0.9 %. El DNA fue transferido a membrana de nylon (Amersham, Hybond-N) e hibridado con sonda *pfor* (A) y *gdh* (B), marcadas mediante random primed con DIG. Carril 1 WB-1, carril 2 Ste 21 y carril 3 WBRM23.

con la sonda *pfor* se observó una banda con una longitud de aproximadamente de 3068 pb (Figura 22).

Las cepas y clonas (WB-1, Ste 10, Ste 21 y WBRM23) presentaron el mismo patrón de hibridación, indicando que no había amplificación génica de *pfor* en las clonas resistentes con respecto a la sensible.

6.14. Variación en la expresión del gen *pfor*: Con la finalidad de evaluar diferencias en el nivel de expresión del gen *pfor*, se realizó el RT-PCR de acuerdo a lo descrito en material y métodos considerando como gen control *gdh*. Inicialmente se determinaron las condiciones óptimas de dicho ensayo (datos mostrados en la tabla 5). Se analizó enseguida el efecto de diferentes concentraciones de RNA total que sirvieron de templado para la síntesis de DNAC, encontrando como condición óptima 1 µg del templado (datos no mostrados). Después se evaluó la posible saturación que pudiese presentar el sistema al manejar distintos números de ciclos, encontrándose como ideal 25 ciclos para el gen *pfor* ya que, como se observa en la figura 23, a partir de 28 ciclos había una disminución en la amplificación para *pfor* debido quizás a la terminación, calidad y concentraciones de reactivos empleados como: iniciadores, templado de DNA, Taq polimerasa y dNTP's disponibles en la reacción, también al efecto acumulativo propiciado por el número repetido de desnaturalización de la muestra sobre la polimerasa. Con el gen *gdh* se obtuvieron como condiciones ideales para dicho ensayo 1 µg de templado y 30 ciclos (datos no mostrados). Posteriormente se analizaron distintas cepas, encontrándose diferencias en el nivel de expresión del gen estudiado (Figura 24). Sin embargo, no se tuvo reproducibilidad en dicho ensayo, debido a la aparición de productos inespecíficos de menor tamaño al esperado debido a que la eficiencia para pegarse de los oligos se ve afectada por la tendencia de los oligonucleótidos para formar horquillas ó bucles debido al autopegado de los mismos, además de no haber un decremento en el número de bandas aún modificando las condiciones experimentales establecidas en la tabla 4, incluyendo diferentes concentraciones de magnesio, o modificaciones en la temperatura de alineamiento de los iniciadores.

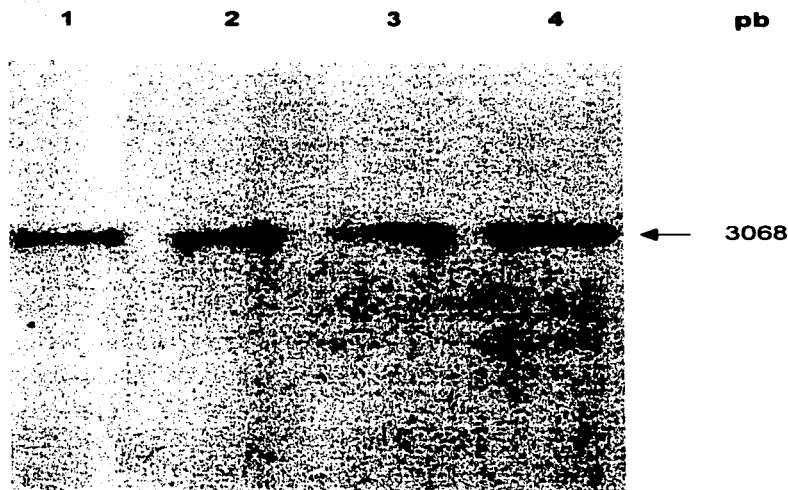
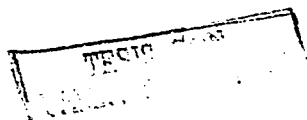


Figura 22. Autorradiograma de hibridación tipo Southern blot para la sonda *pfor* con DNA genómico de cultivos de *G. duodenalis* con diferente sensibilidad al metronidazol. El DNA fue digerido con *Xho* I y separado electroforéticamente en gel de agarosa al 0.9 %, la transferencia e hibridación fue realizada de acuerdo a lo descrito en el apartado de material y métodos. Carril 1 WB-1, carril 2 Ste 10, carril 3 Ste 11 y carril 4 WBRM23. Los tamaños se expresan en pb.



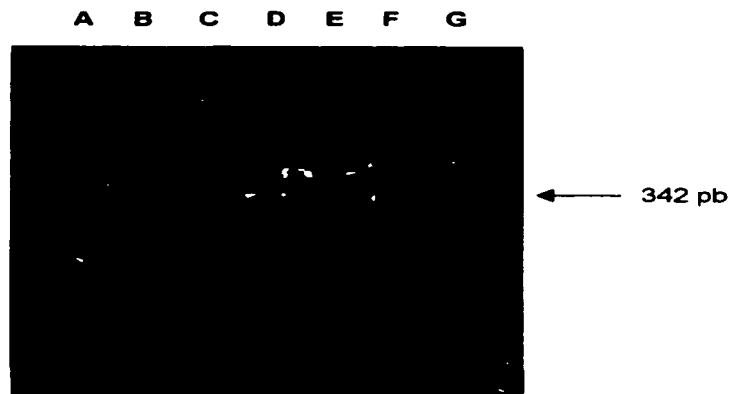


Figura 23. Efecto del número de ciclos para el gen *pfor* sobre la amplificación de RNAm. En este ensayo se cargó 1 μ g de templado de DNAc para la PCR que se llevó a cabo acorde a lo descrito en material y métodos. Carril A Marcadores de 100 pb, carril B 20 ciclos, carril C 25 ciclos, carril D 28 ciclos, carril E 30 ciclos, carril F 35 ciclos, carril G 40 ciclos.

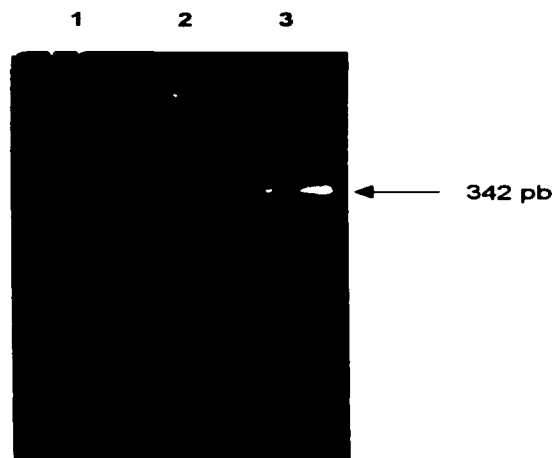


Figura 24. Análisis comparativo del nivel de expresión de RNAm para el gen *pfor* mediante RT-PCR, en clones de *G. duodenalis* con diferente nivel de tolerancia al metronidazol. Carril 1 MPM, carril 2 WB-1, y carril 3 WBRM23.

Debido a las dificultades obtenidas durante el ensayo RT-PCR, se decidió analizar la expresión del gen *pfor* *in vivo* a partir de RNA total, mediante análisis tipo Northern blot con la finalidad de determinar si dicho gen se encontraba sobreexpresado o subexpresado en clonas con diferente tolerancia al metronidazol. Inicialmente se usó como sonda control *gdh* de *Giardia*, mostrando que fueron cargadas cantidades semejantes de RNA en las muestras analizadas encontrándose un transcrito de 2.23 kb (Figura 25).

Cuando se utilizó la sonda *pfor* se detectó un transcrito de 4.62 kb en ambas clonas analizadas (WB-1 y WBRM23). Sin embargo, la clona resistente presentó un aumento en los niveles relativos de RNAm del gen estudiado con una media y desviación estándar de 142.13 % $\pm$ 42.5 de tres experimentos independientes realizados en días distintos, lo anterior se realizó con el empleo de un software del fotodyne el cual determinó diferencias en pixeles, es decir, en el número de puntos que integran una banda y que se ve reflejado en la diferencia de intensidades entre bandas analizadas, y mediante evaluaciones cualitativas, esto es, mediante simple observación directa de la película autorradiográfica notándose diferencias dramáticas en el grosor de la banda del transcrito del gen *pfor*, en ambas clonas analizadas, apreciándose un aumento en la clona resistente (Figura 25).

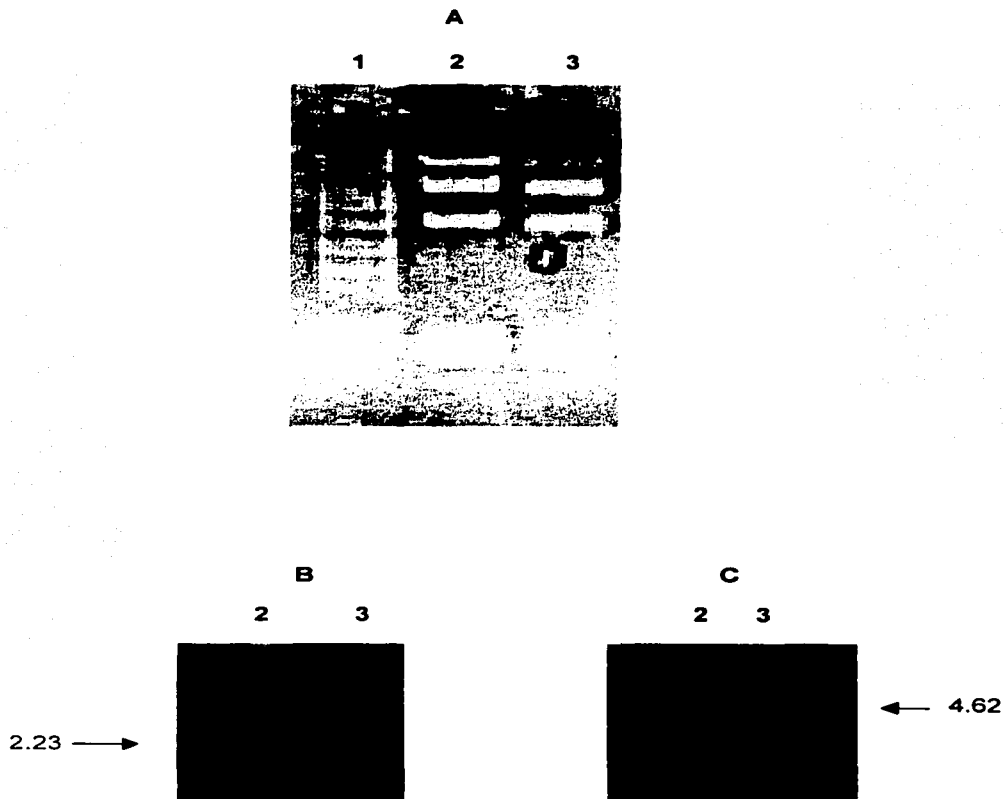


FIGURA 25. Análisis tipo Northern blot a partir de RNA total de *G. duodenalis*. 5 μ g de RNA total fue cargado por carril, el cual se corrió electroforéticamente en gel de agarosa formaldehído al 1 % (A), transferido a membrana nylon e hibridado con sonda *gdh* (B) y *pfor* (C). Carril 1 MPM, carril 2 WB-1 , y carril 3 WBRM23. Los tamaños se expresan en Kb.

CAPITULO VII. DISCUSION Y PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se evaluó parcialmente el mecanismo de resistencia al metronidazol (Mtz) en *G. duodenalis*. Debido a que la resistencia a drogas puede no presentarse exclusivamente en el sitio blanco, sino también en cualquier paso involucrado en la farmacocinética de la droga, se propuso evaluar la biotransformación del Mtz, destacando el papel de la enzima PFOR. Esta enzima participa en la transferencia de electrones a la ferredoxina para reducir el grupo nitro de este 5-nitroimidazol y formar una serie de intermediarios reactivos para ejercer un efecto farmacológico (Ings y col. 1974). Así, se evaluaron básicamente dos aspectos moleculares: a) el nivel de expresión del gen *pfor*, y b) el número de copias del mismo. Lo anterior se basó en el hecho de que se desconoce la regulación y el control de expresión de dicho gen en *G. duodenalis*.

Inicialmente, se procedió a realizar la obtención de cultivos resistentes al Mtz tomando en consideración que la literatura reporta tres formas para lograr dicho objetivo: mutagénesis por luz U.V., exposiciones intermitentes al fármaco y crecimiento de los parásitos en concentraciones subletales ascendentes del mismo (Towson y col. 1992). Sin embargo, en experiencia previa de nuestro grupo (Romero, 1996) se observó un mejor resultado en la obtención de cultivos resistentes al Mtz con el último método mencionado. Cabe mencionar que en nuestro grupo se obtuvieron resultados semejantes con fármacos de la familia de los bencimidazoles, obteniéndose cultivos resistentes a mebendazol y albendazol (Cruz y col. 1996, 2000). En este sentido, se han obtenido cultivos resistentes al Mtz mediante la selección de microorganismos bajo presión continua del fármaco en *Tritrichomonas foetus* (Kulda y col. 1984), *Trichomonas vaginalis* (Demes y col. 1985, Honigberg 1978, De Carneri 1966), *Bacteroides fragilis* (Britz y Wilkinson, 1979) y *Clostridium perfringens* (Sindar y col. 1982). Así, es notoria la importancia del último método para generar resistencia *in vitro* a fármacos que difieren en su estructura química y su mecanismo de acción; ésto con el objeto de tener material biológico suficiente y caracterizar el fenotipo de resistencia. Esto último refleja la capacidad de los trofozoitos para adaptarse a condiciones ambientales

desfavorables ejercidas por los fármacos con la única finalidad de sobrevivir, posiblemente al desarrollar vías o mecanismos bioquímicos alternos aunado con cambios genéticos para evitar el efecto citocida.

Así el parásito, al aumentar, disminuir ó bloquear ciertas funciones enzimáticas puede adquirir la capacidad de generar un mecanismo de resistencia cuyo origen puede ser genético o simplemente adaptativo a fin de eliminar ó soportar los efectos del fármaco (Kelly y Hall, 1979). En este sentido, es interesante resaltar la importancia del método de inducción de resistencia, ya que estudios realizados en *Trichomonas* a partir de cultivos resistentes al Mtz obtenidos mediante inducción anaeróbica (cultivos obtenidos en el laboratorio), el fenotipo presentó características tales como modificaciones en la regulación de la transcripción del gen de la ferredoxina (Quon y col. 1992) aunada a una disminución en los niveles intracelulares de la ferredoxina; alteraciones en las propiedades redox de la enzima (Yarlett y col. 1986 a,b); disminución en la actividad enzimática de esta hidrogenasa, así como niveles disminuidos ó falta total de actividad de la enzima PFOR; incremento en LDH (Gorrell, 1985; Kulda y col. 1993), y un decremento en la incorporación del Mtz en cultivos resistentes (Muller y Gorrell, 1983). Lo anterior sugiere una asociación entre la resistencia anaeróbica y la activación de vías metabólicas alternas asegurando la fermentación del piruvato a lactato; y la resistencia aeróbica se ha asociado con propiedades de deterioro en la eliminación de especies reactivas del oxígeno (Cerkasovova y col. 1984, Muller y col. 1988).

En la línea resistente WB1B-M3 (obtenida por mutagénesis con luz U.V.) se ha encontrado una duplicación parcial del cromosoma 3 con al menos una copia del gen *crp* 136, por lo que la duplicación de cromosomas se asoció con cambios en la expresión de CRP 136 y CRP 65, y en otros estudios se detectó la duplicación parcial del cromosoma 5 (Chen y col. 1995, 1996). Las proteínas ricas en cisteína (CRP) tienen una familia cuyos miembros incluyen CRP 65 y CRP 136 las cuales llevan varias unidades repetidas de motivos de aminoácidos CXXC dentro de un cassette altamente conservado. Algunas funciones biológicas de las CRP incluyen la resistencia a proteasas intestinales y sales biliares, por la

abundancia de residuos tipo cisteína (Gillin y col. 1990; Aley y Gillin, 1993), y la inhibición de enzimas intestinales dependientes de metales debido a la presunta capacidad de las CRPs para unir zinc (Nash y Mowatt, 1993). En su conjunto, estos resultados resaltan la importancia de tener modelos de selección de resistencia a Mtz lo más cercanos al fenómeno de infección natural sin introducir modificaciones genéticas por factores externos como sería la inducción de mutagénesis. Así, se pretende que la tolerancia *in vitro* sea inducida exclusivamente por el fármaco, esto con la finalidad de estudiar el fenotipo en condiciones que se parezcan más a una relación hospedero-parásito normal, aún y con la utilización de cepas resistentes obtenidas en el laboratorio. Sin embargo, no debe descartarse la idea de efectuar estudios *in vivo* infectando jerbos (*Meriones unguiculatus*) con clonas sensibles y resistentes al Mtz obtenidas *in vitro* con la finalidad de evaluar la severidad de la infección, y comparar la eficacia del metronidazol con otros agentes farmacológicos con distintas propiedades fisicoquímicas. Esto ayudaría a estudiar los mecanismos de resistencia en *G. duodenalis* y podría ser útil en la determinación de regímenes óptimos para la erradicación de cepas resistentes.

Durante el proceso de generación de cultivos resistentes sobresalió la ausencia de alteraciones fisiológicas como lo es la morfología del parásito, lo cual indicó que se completaba la citocinesis, promoviendo la capacidad de éstos para replicarse a velocidades equiparables a la cepa silvestre una vez que se encontraban los cultivos adaptados al fármaco. Asimismo también sobresalió la alta capacidad de adhesión que presentaron la clona sensible (WB-1) y resistente (WBRM23). Lo anterior podría tener justificación a nivel de antígenos de superficie, los cuales presentan altos niveles en el contenido de cisteína, aminoácido relacionado en la capacidad de adhesión, crecimiento y división celular de *Giardia* (Gillin y col. 1981). Las posibles alteraciones en la cubierta celular podrían traer como consecuencias modificaciones a nivel membranal. Esto último asociado quizás con variaciones de potencial en la bicapa lipídica, debidos por cambios en la transferencia de electrones y protones, promoviendo así alteraciones en la infiltración del fármaco hacia el ambiente intracelular del

parásito. En este contexto, estudios realizados en nuestro grupo han detectado diferencias en la expresión de antígenos de superficie marcados con ¹²⁵I entre cultivos de cepas sensibles y resistentes al metronidazol, furazolidona, albendazol y quinacrina. Lo anterior debido posiblemente a la activación de genes que codifican para proteínas específicas en *Giardia* relacionadas con el estrés ejercido por la droga (Velázquez-Delgado, 2001). Esto podría asociarse a su vez con cambios en los sacáridos que se encuentran en la superficie celular, tal como sucede en *T. vaginalis* en la cual han encontrado diferencias en D-GalN, D-Gal y residuos parecidos a manosa entre cepas sensibles y resistentes (Dias y col. 1992).

En el presente trabajo, se realizó la clonación de una línea resistente al metronidazol mediante el método convencional de dilución limitante propuesto por Baum y col. (1988), a fin de tener una población genéticamente homogénea a partir de una célula progenitora, a diferencia de una cepa silvestre la cual esta compuesta de una población heterogénea de parásitos. Esto ha sido corroborado al realizar la clonación a partir de estos cultivos, ya que los clones obtenidos han presentado diferencias en la susceptibilidad *in vitro* al Mtz y tinidazol evaluados por tinción con colorantes fluorogénicos FDA-PI en cepas de referencia y de origen mexicano obtenidas de pacientes pediátricos (Romero, 1996). Las clonas pueden presentar variación en su sensibilidad *in vitro* cuando éstos se cultivan en forma continua en ausencia del fármaco debido posiblemente a la plasticidad biológica del parásito (Romero, 1996). Si bien los diferentes estudios realizados sobre resistencia al Mtz en diversos microorganismos anaerobios han utilizado cultivos mantenidos en concentraciones ascendentes de Mtz ó cultivos mutagenizados, y tomando como antecedente los resultados precedentes de Boreham y col. (1987), Majewska y col. (1991), y Romero (1996) mostraron heterogenidad en la sensibilidad del parásito a fármacos además de diferencias fenotípicas y genotípicas aún en cultivos obtenidos a partir de pacientes refractarios al tratamiento (Butcher y col. 1994), nuestro grupo decidió enriquecer una población de parásitos mediante la clonación de la cepa Ste 21 la cual mostró un fenotipo inestable. Estos cultivos no presentaron reversión inmediata, ya que

los clones lograron soportar un incremento 4 veces mayor a la concentración letal mínima (5.84 μ M) obtenida experimentalmente para la cepa WB.

Con el fin de abordar el análisis de la expresión del gen *pfor*, en lo referente a la obtención de ácidos nucleicos del parásito (DNA y RNA) físicamente intactos, se estandarizaron protocolos para la purificación de cada uno de ellos. Con respecto al DNA, se probaron dos protocolos de extracción según se describió en la sección de material y métodos, que consistieron básicamente en la ruptura de membranas citoplásmicas y nucleares de los parásitos con la subsecuente remoción de proteínas: primero, la digestión usando proteasas (proteínasa K) en presencia de EDTA y un detergente (SDS), y segundo, la desnaturalización y extracción con solventes orgánicos (fenol y cloroformo). En estas circunstancias, el DNA aislado de *G. duodenalis* por los dos protocolos descritos, mostró un rendimiento semejante de 0.096 pg de DNA/trofozoito y de 0.048 pg DNA/núcleo, mientras que Erlandsen y Rasch, (1994) han descrito un contenido de $0.144\text{pg} \pm 0.018$ de DNA/célula, ó 0.072 pg DNA/núcleo, mediante ensayos de microespectrofotometría de absorción de Feulgen y microscopia confocal de rayo láser, mientras que Kabnick y Peattie (1990) reportaron un valor de 0.15 pg de DNA por organismo binucleado. En este contexto, las variaciones encontradas en el rendimiento del DNA obtenido por trofozoito puede depender básicamente de la sensibilidad del método usado.

Asimismo, para el aislamiento del RNA se utilizó el TRIzol el cual emplea agentes desnaturalizantes fuertes de proteínas que actúan lisando simultáneamente las células e inactivando las ribonucleasas celulares que pudieran dañar el RNA, siendo el isotiocianato de guanidina y fenol. El primer reactivo mencionado ha sido empleado para extraer RNA a partir de fuentes ricas en ribonucleasas como el páncreas (Chirgwin y col. 1979). Así, se encontró una eficiencia en la purificación de RNA de 0.08 pg RNA/trofozoito de *Giardia*. Este rendimiento fue inferior a los reportados por Montañez y col. (1989) quienes describieron eficiencias diferenciales en el rendimiento de RNA a partir de trofozoitos de *Giardia* obtenido mediante tres protocolos diferentes. En uno de ellos empleando la extracción fenol-cloroformo se obtuvo un rendimiento de 1.43

pg/trofozoito (Brawerman, 1974); en un segundo protocolo mediante extracción con isotiocianato de guanidina [0.21 pg/trofozoito] (Chirgwin y col. 1979), y en un tercero mediante cromatografía de hidroxilapatita el rendimiento fue de [0.51 pg/trofozoito] (Markov e Ivanov, 1974).

El estudio del nivel de expresión del gen *pfor* es importante en el modelo estudiado ya que en la vía glucolítica de *Giardia*, la única enzima involucrada en la descarboxilación del piruvato es la PFOR (situada en la membrana) la cual obtiene electrones y los transfiere a la ferredoxina I (localizada en la fracción citoplásmica) y reduce el grupo nitro de los 5-nitroimidazoles (Townson y col. 1994 a,b;1996). Si bien se sabe que en cultivos de *T. foetus* y *T. vaginalis* resistentes a Mtz la actividad de PFOR se ha encontrado disminuida y teniendo como antecedente que la actividad enzimática de esta molécula en cultivos de *Giardia* resistentes al Mtz se encontró muy reducida (Smith y col. 1988), se podría sugerir que existe un mecanismo multifactorial de resistencia.

Dada la importancia de la enzima PFOR en la activación del fármaco, se decidió analizar si habían diferencias a nivel de su secuencia nucleotídica en los sitios catalíticos que pudiesen relacionarse con el fenotipo de resistencia, lo anterior debido a que estudios realizados en *Clostridium pasteurianum* han encontrado que los residuos de prolina que se encuentran adyacentes a los ligandos de cisteína en la secuencia del sitio 4Fe-4S son importantes ya que estabilizan el sitio activo de la molécula (Quinkal y col. 1994), asimismo en *D. africanus* han observado que la secuencia de la PFOR difiere de otras en su extremo carboxilo la cual contiene 60 residuos adicionales en su cadena polipeptídica, los dos residuos de cisteína ubicados en la región adicional están involucrados con la formación de puentes disulfuro asociados con el proceso de activación de la vía catalítica, algunas mutaciones encontradas en el extremo carboxilo sugiere que las delecciones encontradas en ese lugar tienen un efecto serio en la estabilidad de la enzima hacia el oxígeno (Pieulle y col. 1997), otros estudios han demostrado que los complejos involucrados en la transferencia de electrones en las ferredoxinas son dirigidos por un complejo que se encarga de éste mecanismo, los cuales son dirigidos por una forma estable la cual requiere de

interacciones electrostáticas así también como de una geometría establecida para el reconocimiento y unión al piruvato (Coghlan y Vickery, 1992). Así, el diseño de iniciadores para el gen *pfor* incluyó la región que contenía los sitios catalíticos tipo 3Fe-4S y 4Fe-4S. La intención de abarcar ambas regiones se debió a reportes precedentes encontrados en bacterias reductoras de sulfito (SRB) específicamente del género *Desulfovibrio*, en la cual pueden presentarse interconversiones del grupo 3Fe-4S al 4Fe-4S. Esto significará que la incorporación o pérdida del grupo hierro en este sitio está relacionada con la concentración de hierro contenido en el medio de cultivo en presencia de un agente reductor (ditiotreitól) y del potencial redox. Por lo anterior, el hierro es un sensor relacionado con el estado redox de la célula (Thomson, 1991; Saito y Williams, 1991). Sin embargo, la ausencia de modificaciones en los sitios 3Fe-4S y 4Fe-4S de la enzima PFOR observada en el presente trabajo sugiere que el mecanismo de resistencia al Mtz en los cultivos de *Giardia* analizados no se presentó en este nivel.

Se ha observado que el medio de cultivo utilizado para crecer y propagar el parásito, (TYI-S-33) al estar envejecido, la mayoría de sus tioles se presentan como disulfuros (Brown y col. 1993). Las alteraciones en las propiedades redox propiciadas por compuestos tioles (como la cisteína) pueden afectar la estructura de las proteínas, la regulación de la actividad enzimática y el control de la transcripción. Lo anterior también demuestra que el efecto amortiguador redox promovido por los compuestos tioles depende de la concentración y de las condiciones redox de compartimentos extracelulares o intracelulares. Los compuestos tioles tienen propiedades antioxidantes tales como ser amortiguadores de radicales (DiMascio y col. 1991), siendo su función más importante *in vivo* la de ser amortiguadores redox celulares que regulan la composición tiol-disulfuro de proteínas. Los enlaces disulfuro son esenciales para mantener la estabilidad estructural de las proteínas solubles. La formación reversible de disulfuros está involucrada en muchos procesos enzimáticos y de transporte. La formación y ruptura de enlaces disulfuro depende de la disponibilidad de donadores y aceptores de electrones, los cuales determinan el

potencial redox del ambiente. En general la capacidad de los compuestos tioles (cisteína, glutatión, cisteamina, ác. dihidrolipoico) y disulfuros (cistina, disulfuro de glutatión, cistamina y ác. lipoico) para reaccionar con los disulfuros de las proteínas para formar tioles libres ó una mezcla de disulfuros, depende directamente de efectos termodinámicos y cinéticos, involucrando factores tales como los cambios conformacionales, pH, pKa, interacciones carga-carga y entropía. La reacción entre una proteína activa redox y otra proteína o molécula pequeña puede afectar el potencial tiol-disulfuro si la interacción es más favorable en uno de los estados de oxidación (Gilbert 1990, 1995).

Por otra parte, la hibridación de DNA genómico de *Giardia* con sondas gen-específicas identificó un número restringido de bandas, sugiriendo una copia para los genes *gdh* y *pfor* en el parásito estudiado. Los resultados del número de copias obtenidos en este estudio, son similares a los descritos por Yee y Dennis (1992) para el gen *gdh* de *G. duodenalis*, los cuales mostraron solamente una copia. En algunos protozoarios no hay variaciones en el número de copias del gen *gdh*, por ejemplo *P. falciparum* contiene exclusivamente una copia (Wagner y col. 1998). Con el gen *pfor* se encontró una copia, lo cual descarta la posible amplificación de este gen. Así, al no encontrarse diferencias en el número de copias de dicho gen entre clonas y cepas con diferente patrón de tolerancia al Mtz, se sugiere que éste no es un mecanismo utilizado por el protozoario para desarrollar un fenotipo de resistencia al fármaco.

El análisis del nivel del RNAm para PFOR reveló un incremento de 142.13 % en la clona WBRM23 con respecto a la clona sensible. Nuestros resultados difieren al esperado y al encontrado en otros protozoarios cercanos filogenéticamente, tal es el caso de cultivos de *T. foetus* resistentes al Mtz (Land y col. 2001) en los que hallaron una disminución en la expresión y traducción de los genes *pfor*, ferredoxina, enzima málica, e hidrogenasa debido probablemente a los siguientes mecanismos: 1) mutaciones en elementos iniciadores (Liston y Johnson, 1999) que controlan la iniciación transcripcional, y 2) posible pérdida de proteínas de unión al DNA las cuales regulan selectivamente la transcripción, o bien presentarse mutaciones en este nivel. Debido a lo expuesto anteriormente se

puede suponer que el incremento en la expresión del gen *pfor*, no puede ser considerado como un marcador único de resistencia al Mtz en *G. duodenalis*, por una parte por diferencias en la incorporación del fármaco entre clonas sensible (WB-1) y resistente (WBRM23) monitoreado por CLAR (Romero, datos no mostrados), y por otra parte por las alteraciones en las condiciones redox intracelulares del parásito promovidas por la presencia ó ausencia de cisteína en cultivos expuestos a metronidazol (Argüello, comunicación personal). Sin embargo, resultaría interesante producir un anticuerpo monoclonal y/o policlonal contra PFOR para efectuar estudios de Western blot y analizar su distribución subcelular en el parásito, así también como la comparación entre clonas sensibles y resistentes para determinar semejanzas o alteraciones en dicha proteína. Lo anterior indica que, de encontrarse diferencias en el nivel de expresión, el fenotipo de resistencia al Mtz posiblemente esté asociado con diferencias en la traducción de proteínas, faltando al análisis de actividad de la enzima PFOR. Por otra parte se requiere descartar el papel que tiene el tiempo de vida medio del transcrito, ya que de esto depende la síntesis de la proteína bajo estudio, lo cual en cierta medida podría reflejar diferencias en la cantidad de enzima. Así sobresalen aspectos como: 1) si se encuentra la enzima en cantidades más altas, se requiere conocer la funcionalidad enzimática de la misma, teniendo en mente que hay otros factores que pueden contribuir al completo funcionamiento de la PFOR, siendo quizás el más importante las condiciones redox del microambiente establecido por algunos factores externos, como bien pudieran ser la cisteína ó el hierro, y 2) si la enzima se encuentra en cantidades bajas, no ejercería completamente su papel funcional propiciando el fenotipo resistente.

Al respecto, algunos factores propuestos para tratar de explicar el mecanismo de resistencia al Mtz pueden incluir, en primer lugar, que la elevada expresión de PFOR podría desencadenar vías y/o mecanismos alternos para la detoxificación de intermediarios reactivos del Mtz. Esto ha sido postulado en trabajos realizados por Liu y col. (2000) empleando cultivos resistentes de *Giardia* al Mtz *in vitro* con dos métodos de inducción de tolerancia diferentes (concentraciones ascendentes del fármaco y mutagénesis), donde se observaron

decrementos en la cantidad de ferredoxina. Esto podría desencadenar una disminución en la expresión de ferredoxina como un mecanismo de retroalimentación metabólica, lo cual puede limitar la capacidad de la célula para activar al Mtz.

En este contexto, sería interesante analizar en los cultivos resistentes, el papel de otras enzimas (p. ej., malato deshidrogenasa, NADPH oxidoreductasa, acetil coenzima A sintetasa, y alcohol deshidrogenasa) involucradas en la vía glucolítica de *Giardia* que pudieran mantener la sobrevivencia del parásito, en un escenario de baja capacidad celular para reducir Mtz a su forma citotóxica. Por otra parte, se desconoce el sitio blanco de acción del Mtz. Si bien en otros protozoarios se ha descrito que es el DNA, sería interesante efectuar estudios de sedimentación de nucleoides con la finalidad de corroborar el daño al material nucleico, o bien con ensayos cometa para evaluar la severidad del deterioro causado por el fármaco (Cook y Brazell, 1975; Cook y col. 1976). No obstante, debe considerarse que el Mtz además de ejercer un efecto sobre el DNA, puede tener otros blancos ya que la literatura reporta *in vitro* una actividad sobre la formación de microtúbulos, aunada con la reducción en la velocidad de polimerización de la tubulina. En este contexto, sería interesante evaluar a nivel molecular mediante el empleo de sondas para α y β tubulina de zonas altamente conservadas, el número de copias y por secuenciación analizar los posibles cambios en la secuencia con la finalidad de detectar modificaciones provocadas por el Mtz. Por otra parte, no se puede descartar la idea de que exista una bomba que excluya el fármaco del ambiente intracelular del parásito (p.ej. PgP).

Debido a que el panorama general de resistencia en *G. duodenalis* se está incrementando día con día y debido a las dificultades del tratamiento en dicha parasitosis propiciado por el número limitado de fármacos en el Cuadro Básico de Medicamentos, cabe resaltar la importancia de efectuar estudios químicos con la finalidad de encontrar nuevas moléculas, mediante modelos computacionales, quizá al insertar nuevos radicales a farmacóforos con la finalidad de incrementar su actividad citotóxica. Lo anterior, se está empezando a utilizar actualmente en nuestro país, sin embargo, la evaluación de nuevas sustancias requiere de

tiempos prolongados hasta lograr la completa evaluación química-biológica del fármaco, Angeles-Angüiano (comunicación personal, 2001). Tomando en cuenta lo anterior, resalta la importancia del papel que tiene la industria farmacéutica en el desarrollo de nuevos fármacos que reemplacen a los obsoletos debido a la presencia de cepas resistentes, aunque cabe resaltar la adecuada responsabilidad que debe tener para promover un uso apropiado de los medicamentos distribuidos por éstos.

En la actualidad, aún se encuentran en fase experimental algunos compuestos de origen natural que tienen un papel importante en la profilaxis y tratamiento de enfermedades de origen bacteriano y parasitario. La resistencia a Mtz se ha revertido con: a) combinación Mtz-quinacrina en individuos normales (Smith y col. 1982, Nash y col. 2001), b) nitazoxanida en pacientes con HIV. (Abboud y col. 2001).

CAPITULO VIII. CONCLUSIONES

- ◆ No existen diferencias a nivel de nucleótidos entre los sitios catalíticos del gen *pfor* con motivos tipo 3Fe-4S y 4Fe-4S al comparar cultivos de *G. duodenalis* sensibles a metronidazol (WB-1) con aquellos capaces de crecer en presencia constante de una concentración de 23 μ M de esta droga (WBRM23).
- ◆ El nivel de resistencia al metronidazol en *G. duodenalis* no se correlacionó con una amplificación del gen *pfor*, ya que solo se detectó una sola copia del gen tanto en la cepa sensible (WB), resistente (Ste 21) y clona resistente (WBRM23).
- ◆ El fenotipo de resistencia al metronidazol en la clona resistente de *G. duodenalis* se asoció con la sobre-expresión del gen *pfor*.

APENDICE I: REACTIVOS Y SOLUCIONES COMPLEMENTARIAS

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

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

Se disolvió en agua destilada hasta 800 ml. Se ajustó el pH de 6.8 – 6.9 y aforó a 900 ml, se filtró en membrana de 0.22 mm de diámetro de poro, se realizó prueba de esterilidad a 37°C durante 18 hrs. Se completó con 100 ml de suero bovino descomplementado (HyClone) y 1 ml de stock de penicilina (50,000 U.I.), estreptomycin (50 mg). Se almacenó a 4°C hasta su uso. Fue estable sólo por una semana una vez completado.

ACETATO DE AMONIO 7.5 M

Se pesaron 144.52 gr de acetato de amonio y se transfirió a un matraz volumétrico de 200 ml, se adicionaron 100 ml de agua desionizada, se disolvió y se llevó al aforo. Se esterilizó por autoclave.

ACETATO DE SODIO 3 M

Se pesaron 40.8 gr de acetato de sodio. $3H_2O$ y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 ml, se adicionaron 80 ml de agua desionizada, se ajustó el pH a 7.0 con ácido acético, y se aforó con agua desionizada.

AGUA TRATADA CON DEPC AL 0.1 %

A 1 lt de agua desionizada se le adicionó 1 ml de DEPC, se dejó en agitación una noche y se esterilizó en autoclave al día siguiente para inactivar el DEPC.

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS SALINA (PBS) STOCK 10 X

Cloruro de sodio	80.0 gr
Cloruro de potasio	2.0 gr
Fosfato de sodio dibásico heptahidratado	21.7 gr
Fosfato de potasio monobásico	2.0 gr

Los reactivos mencionados anteriormente se disolvieron en agua destilada hasta 800 ml, enseguida se ajustó el pH = 7.2 y se aforó a 1 lt. Para su uso a 1X disolver 1:10 en agua destilada. Es estable varias semanas a TA.

BROMURO DE ETIDIO (10 mg/ml)

Se disolvieron 0.1 gr de bromuro de etidio en 10 ml de agua bidestilada estéril. Se guardó protegido de la luz. Para preparar una solución de bromuro de etidio con una concentración de 0.5 mg/ml se tomaron 0.05 ml de la solución stock (10 mg/ml) y se aforó a 1 ml con agua desionizada.

BUFFER A

Acido maleico 0.1 M	5.8 gr
NaCl 0.15 M	4.38 gr

Se disolvieron en agua desionizada se ajusto el pH a 7.5 con cristales de NaOH, y se aforo a 500 ml. Se esterilizó en autoclave.

BUFFER B (REACTIVO DE BLOQUEO AL 10 %)

Se hizo una dilución 1:10 en buffer de ácido maleico y se esterilizó por autoclave antes de utilizarse.

BUFFER DE DETECCION C

Se mezclaron 3 ml de tris-base HCl 1M pH 9.5 con 0.6 ml de NaCl 5 M y 1.5 ml de $MgCl_2$ 1 M. Se aforó a 24.9 ml con agua desionizada, preparándose al momento de utilizarse.

BUFFER DE DESNATURALIZACION

NaOH 0.4N	8 gr
NaCl	43.8 gr

Los reactivos antes mencionados se colocaron en un matraz volumétrico de 500 ml, se adicionó 300 ml de agua desionizada, se disolvió y se aforó a volumen.

BUFFER DE DIGESTION

Para preparar 100 ml:

NaCl 100mM	0.5845 gr
Tris-HCl pH 8 10 mM	0.1576 gr
EDTA pH 8 25 mM	0.9381 gr
SDS 0.5 %	0.5 gr

Los reactivos se adicionaron y se aforó a un volumen de 100 ml con agua tratada con DEPC, la completa disolución se llevo al cabo con calentamiento y agitación magnética.

BUFFER DE LAVADO I

Se mezclaron 100 ml de buffer 20 X SSC y 10 ml de SDS al 10 %. Se aforó a 1 lt con agua desionizada.

BUFFER DE LAVADO II

Se mezclaron 5 ml de buffer 20 X SSC con 10 ml de SDS al 10 %, se aforó a 1 lt con agua desionizada, y se esterilizó en autoclave.

BUFFER MOPS 10 X

MOPS 0.2 M	41.86 gr
Acetato de sodio 0.05 M	6.80 gr
EDTA 0.01 M	3.72 gr

Los reactivos se transfirieron a un vaso de precipitados de 1 lt, y se adicionó 800 ml de agua Milli-Q, luego se ajustó el pH de 5.5 a 7.0 con hidróxido de sodio. No se esterilizo en autoclave. Para su uso a una concentración 1X se hizo una dilución 1:10.

BUFFER DE NEUTRALIZACION

Tris-HCl 0.1 M	7.88 gr
NaCl 1.5 M	43.8 gr

Los reactivos se transfirieron a un matraz volumétrico de 500 ml que contenía 250 ml de agua desionizada, se disolvieron, y se llevó al aforo en matraz volumétrico de 500ml.

BUFFER SSC 20 X

Para elaborar 1 lt:

NaCl 3 M	175.3 gr
Citrato $\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3 M	88.2 gr

Se adicionaron 800 ml de agua desionizada y se ajustó el pH a 7.0 con HCl 1 M, enseguida se agregó agua hasta completar 1 lt. Para su uso a 10 X se hace una dilución 1:1, y para 2 X una dilución 1:10 con agua desionizada.

BUFFER TBE 20 X

Para preparar 1 lt:

Tris base (1 M)	121 gr
Acido bórico (1 M)	61.7 gr
EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (20 mM)	7.44 gr

Se disolvieron los reactivos mencionados anteriormente en agua y se aforó a 1 lt, enseguida se esterilizó. Se almacenó a TA. Para su uso a 0.5 X se transfieren 25 ml de la solución antes mencionada y se llevó a 1000 ml en matraz volumétrico de 1 lt con agua desionizada.

BUFFER TE (TRIS/EDTA)

Para preparar 100 ml:

Tris 10 mM pH 7.4	0.5 ml a partir de un stock de 2 M
EDTA 0.1 M pH 8	20 μl de una soln. stock 0.5 M
Agua desionizada	99.3 ml

Se almacenó a TA.

CLORURO DE SODIO 100 mM

Para preparar 100 ml de una solución de NaCl 100 mM se pesaron 0.58 gr de cloruro de sodio, se disolvió y se aforó a 100 ml en matraz volumétrico con agua desionizada, posteriormente se esterilizó en autoclave.

CLORURO DE MAGNESIO (MgCl_2) 1 M

Se adicionó 20.3 gr de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a un matraz volumétrico de 100 ml que contenía 50 ml de agua desionizada, se disolvió y se llevo al aforo. Se esterilizó por autoclave.

COLORANTE PARA ELECTROFORESIS

Para preparar 10 ml:

		Concentración final
Glicerol	5 ml	50 %
Buffer TAE 40 X	250 μl	1 X
Azul de bromofenol saturada	1 ml	1 %
Xilen cianol al 10 %	1 ml	1 %
Agua desionizada	2.75 ml	

Se almacenó en alicuotas de 1 ml a -20°C .

EDTA (ACIDO ETILENDIAMINO TETRACETICO, SAL DISODICA) 0.5 M

EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

93.05 gr

Se mezcló el EDTA en 200 ml de agua desionizada y se adicionó NaOH 10 N pH 8.0 luego se agregó agua hasta obtener un volumen de aforo de 500 ml.

EDTA 200 mM pH 8.2

Para preparar 100 ml de dicha solución se pesaron 7.44 gr de EDTA y se adicionaron 80 ml con agua desionizada, se ajustó el pH 8.2 se aforó a 100 ml y se esterilizó en autoclave.

ETANOL AL 75 %

Para preparar 20 ml de EtOH al 75 % se adicionaron 15 ml de etanol absoluto (100 %) y se agregaron 5 ml de agua desionizada estéril.

FENOL BUFERADO

Se adicionaron volúmenes semejantes de fenol licuado y de buffer Tris.HCl 0.5 M pH 8.0. Se agitó la mezcla con un agitador magnético durante 15 min, se sacó el agitador, y se mantuvo en reposo hasta que las dos fases se separaron, se eliminó la fase acuosa, y se volvió adicionar buffer Tris-HCl, repitiendo las extracciones hasta que el pH de la fase fenólica se mantuvo en 8.0. Una vez que se equilibró el fenol se eliminó la fase acuosa, y se adicionó 0.1 volumen de Tris HCl 0.1M pH 8.0 conteniendo β -mercaptoetanol. El fenol se almacenó en botella oscura a 4°C durante un mes.

HIDROXIDO DE SODIO 1 M

Se agregó 60 ml de agua desionizada en un vaso de precipitados de 100 ml, se pesaron 4 g de NaOH y se vaciaron en dicho recipiente, finalmente esto se transfirió a un matraz volumétrico de 100 ml completando hasta la marca. Esta solución se esterilizó por autoclave.

HIDROXIDO DE SODIO 0.4 M

Se pesaron 1.6 gr de NaOH y se colocó en un vaso de precipitados de 100 ml se agregó 50 ml agua desionizada, y una vez disueltas las escamas se aforó a 100 ml en un matraz volumétrico. La solución se esterilizó por autoclave.

PREPARACION DE ESCALERA DE 100 pb

Para preparar 25 μ l como stock se adicionaron los siguientes reactivos:

		Concentración final
NaCl 100 M	5 μ l	20 mM
Marcadores de peso molecular	6.25 μ l	0.25 μ g/ μ l
Agua inyectable	13.75 μ l	

La alícuota se conservó a -20°C.

PREPARACION DE MEDIO LURIA PARA PRUEBA DE ESTERILIDAD

Peptona (Dibco)	10.0 gr
NaCl (Monterrey)	10.0 gr
Extracto de levadura (Dibco)	5.0 gr
Agar bacteriológico (Dibco)	15.0 gr

Se disolvieron los reactivos mencionados anteriormente en 800 ml de agua bidestilada y se ajustó el pH a 7.5 con 1 ml de NaOH 2 M (Baker), el medio se aforó a 1 litro y se esterilizó en autoclave. Posteriormente se decantó el agar a

45°C sobre cajas petri de plástico estériles, se dejó solidificar el agar y se hizo prueba de esterilidad a 37°C durante toda una noche, finalmente se almacenaron las cajas a 4°C hasta que se utilizaron.

PROTEINASA K (10 mg/ml)

Se pesaron 0.01 gr de proteinasa K y se disolvieron en 1 ml de agua desionizada estéril. Se mantuvo a -20°C por no más de un año.

RNasa A 1.0 (mg/ml)

Se pesó 0.01 gr de RNasa A y se disolvieron en 1 ml de buffer TE, se calentó a 70°C durante 10 min con la finalidad de inactivar la DNasa, y se dejó enfriar a TA, posteriormente se almacenó a -20°C.

SDS AL 10 %

Se disolvieron 10 gr de SDS con calentamiento a 65°C en 100 ml de agua desionizada durante 20 min, y se almacenó a TA. Para su uso al 0.1 % se adiciono 1 ml de la solución anterior y se aforo en un matraz volumétrico de 100 ml con agua desionizada.

SOLUCION DE CLORURO DE SODIO 5 M

Se pesaron 29.22 gr de NaCl, se disolvieron y se llevó al aforo de 100 ml en un matraz volumétrico con agua desionizada, se esterilizó por autoclave.

SOLUCION DE HCl 0.25 M

Se agregaron 250 ml de agua desionizada en un matraz volumétrico de 500 ml, se adicionaron 41.36 ml de HCl concentrado el cual tenía las siguientes especificaciones pureza de 37.2 %, densidad 1.185 g/ml, peso molecular 36.465, posteriormente se llevo a volumen con agua desionizada y se esterilizó en autoclave.

SOLUCION DE DENUDAMIENTO (REMOCION DE SONDAS ALCALINAS)

Para preparar 500 ml:

NaOH 0.2 N

SDS 0.1 %

Se disolvieron los reactivos en 450 ml agua destilada, con agitación mecánica y calor, finalmente se aforó a 500 ml.

TIOCIANATO DE GUANIDINA 4 M

Se pesaron 236.32 gr de tiocianato de guanidina y se aforó con buffer TE pH 8.0 hasta obtener un volumen de aforo de 500 ml, posteriormente se esterilizó por autoclave a 121°C durante 15 min.

TRIS HCl 10 mM pH 9.5

Se pesaron 0.316 gr de tris HCl, se adiciono 125 ml agua desionizada, se ajustó el pH a 9.5 con HCl 0.1 N y se aforo en matraz volumétrico de 200 ml con agua desionizada.

XILEN CIANOL AL 10 %

Se pesaron 5 gr de xilen cianol, y se adicionaron 5 ml de agua desionizada estéril.

Nota: Para cumplir adecuadamente con las normas de eliminación de microorganismos patógenos se adicionó a los cultivos resistentes al metronidazol una solución de etanol al 70 % o bien cloro concentrado, permaneciendo así durante aproximadamente 20 minutos.

APENDICE II: TECNICAS COMPLEMENTARIAS

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

Se cultivaron los trofozoitos en medio TYI-S-33 hasta fase logarítmica de crecimiento. Se enfriaron los tubos de cultivo una hora en un baño agua – hielo, se centrifugaron a 840 x g durante 10 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se contó en cámara de Newbauer, se agregó medio adicionado con DMSO al 10 % (en razón 1:1 por cada 2×10^6 trofozoitos) y se resuspendieron. Se transfirió el contenido a criotubos Nunc MR de 1.8 ml de capacidad y se enfriaron en baño de agua – hielo. Se almacenaron los tubos en ultracongelador a -70°C una noche. Se transfirieron los criotubos a inmersión en N₂ líquido y se almacenaron hasta su descongelación. Fueron viables hasta por cuatro años.

DESCONGELACION DE TROFOZOITOS DE *G. duodenalis*

Se colocaron los criotubos a TA hasta su fusión, se transfirió el medio con células a un tubo cónico de 15 ml conteniendo 13 ml de medio TYI-S-33 fresco. Se centrifugo a 840 x g durante 10 min a TA, se decanto el sobrenadante y se lleno con 15 ml de medio fresco, se revisaron los trofozoitos al microscopio óptico, se incubaron a 37°C, y se cambio el medio aproximadamente 8 horas después de haber descongelado para eliminar las células muertas.

CRISTALERIA EMPLEADA EN EXTRACCION DE RNA

Todo el material de vidrio que contenía los reactivos utilizados en la extracción del RNA se transfirió al horno a 270°C durante 4 hrs, o a 180°C durante toda una noche, esto con la finalidad de evitar la presencia de RNasas y evitar la degradación del RNA.

CAPITULO IX. REFERENCIAS

- Abbaszadegan M., Gerba C.P., y Rose J.B. (1991) Detection of *Giardia* cyst with a cDNA probe and applications to water samples. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**, 927-931.
- Abboud P., Lemée V., Gargala G., Brasseur P., Ballet J.J., Borsa-Lebas F., Caron F., y Favennec L. (2001) Successful treatment of metronidazole and albendazole-resistant giardiasis with nitazoxanide in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Clinical Infectious Diseases*. **32** (15), 1792-1794.
- Adam R.D. (1991) The biology of *Giardia* spp. *Microbiological Reviews*. **55** (4), 706-732.
- Aley S.B. y Gillin F.D. (1993) *Giardia lamblia*: post-translational processing and status of exposed cysteine residues in TSA417, a variable surface antigen. *Experimental Parasitology*. **77**, 295-305.
- Al-Tukhi M.H., Ackers J.P., Al-Ahdal M.N., y Peters W. (1993) Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of anti-giardia specific immunoglobulin G in filter paper blood samples. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **87**, 36-38.
- Andrews R. H., Adams M., Boreham P.F.L., Mayrhofer G., y Meloni B.P. (1989) *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. *International Journal of Parasitology*. **92**, 209-217.
- Andrews B.J., Panitescu D., Jipa G.H., Vasile-Bugarin A.C., Vasiliu R.P., y Ronnevig J.R. (1995) Chemotherapy for giardiasis: Randomized clinical trial of bacitracin, bacitracin zinc, and a combination of bacitracin zinc with neomycin. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **52** (4), 318-321.
- Archibald S.C., Mitchell R.W., Upcroft J.A., Boreham P.F.L., y Upcroft P. (1991) Variation between human and animal isolates of *Giardia* as demonstrated by DNA fingerprinting. *International Journal of Parasitology*. **21** (1), 123-124.
- Ayala D.E., y Hermida R.C. (1987) Circannual variation in the incidence of giardiasis: illustrative rationale for timing intervention for health education. *Chronobiologia*. **14**, 149.
- Baum K.F., Berens R.L., Jones R.H., y Marr J.J. (1988) A new method for cloning *Giardia lamblia* with a discussion of the statistical considerations of limiting dilution. *Journal of Parasitology*. **74** (2), 267-269.
- Bernal R.R., Hernández S.G., Gámez A.A., y Ramírez H.E. (1995) Giardiasis infantil en un hospital de concentración. *Memorias del Primer Encuentro Nacional de Giardiasis, México, D.F.*, 14.
- Bingham A.K., Jarrol E.L. Jr., Meyer E.A., y Radulescu S. (1979) Induction of *Giardia* excystation and the effect of temperature on cyst viability as compared by eosin-exclusion and *in vitro* excystation. En *Waterborne Transmission and Transmission of Giardiasis*. Edited by Jakubowski W., and Hoff J.C., U.S. Environmental Protection Agency, Ohio, 217-226.
- Birkhead G., y Vogt R.I. (1989) Epidemiologic surveillance for endemic *Giardia lamblia* infection in Vermont: the role of waterborne and person-to-person transmission. *American Journal of Epidemiology*. **129**, 762-768.
- Boreham P.F.L., S. Benrimoj, M. Ong, M. Craig, R.W. Shepherd, D. Hill, y B. Singleton. (1986) A compliance study in pediatric patients receiving treatment for giardiasis. *Australian Journal Hospital Pharmacy*. **16**, 138-142.

Boreham P.F.L., Phillips R.E. y Shepherd R.W. (1987) Heterogeneity in the responses of clones of *Giardia intestinalis* to anti-giardial drugs. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. **81**, 406-407.

Boreham P.F.L., Smith N.C., y Shepherd R.W. (1988 a) Drug resistance and the treatment of giardiasis. Advances in *Giardia* Research. P.M. Wallis & B.R. Hammond, University of Calgary Press, Calgary. 3-7.

Boreham P.F.L., Phillips R.E., y Shepherd R.W. (1988 b) Altered uptake of metronidazole *in vitro* by stocks of *Giardia intestinalis* with different drug sensitivities. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. **82**, 104-106.

Borst P., y Ouellette M. (1995) New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. Annual Review of Microbiology. **49**, 427-460.

Botero D. (1986) Nematode infections of man: intestinal infections. En: W.C. Campbell and R.S. Rew. (ed). Chemotherapy of parasitic diseases. Plenum Press, New York. 267-276.

Brawerman G. (1974) The isolation of messenger RNA from mammalian cells. In "Methods in Enzymology (K. Moldave y L. Grossman, Eds.), Vol, 30, pp. 605-612. Academic Press, New York.

Britz M.L., y Wilkinson R.G. (1979) Isolation and properties of metronidazole-resistant mutants of *Bacteroides fragilis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **16** (1), 19-27.

Brown D.M., Upcroft J.A., y Upcroft P. (1993) Cysteine is the major low-molecular weight thiol in *Giardia duodenalis*. Molecular and Biochemical Parasitology. **61**, 155-158.

Brown D.M. (1995 a) Oxidative stress management in *Giardia duodenalis*. B. ApplSc. Hons.

Brown D.M., Upcroft J.A., y Upcroft P. (1995 b) Free radical detoxification in *Giardia duodenalis*. Molecular Biochemical Parasitology. **72** (1-2), 47-56.

Brown D.M., Upcroft J.A., y Upcroft P. (1996) A H₂O – producing NADH oxidase from the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. European Journal Biochemistry. **241** (1), 155-161.

Brown D.M., Upcroft J.A., Dodd H.N., Chen N., Upcroft P. (1999) Alternative 2-keto acid oxidoreductase activities in *Trichomonas vaginalis*. Molecular Biochemical Parasitology. **98** (2), 203-214.

Buret A., den Hollander., N. Wallis., P.M., Befus D., y Olson M.E. (1990) Zoonotic potential of giardiasis in domestic ruminants. Journal of Infectious Diseases. **162**, 231-237.

Butcher P.D., Cevallos A.M., Carnaby S., Alstead E.M., Swarbrick E.T., y Farthing M.J.G. (1994) Phenotypic and genotypic variation in *Giardia lamblia* isolates during chronic infection. Gut. **35**, 51-54.

Carnaby S., McHugh T.D., y Farthing M.J.G. (1991) DNA fingerprinting of *Giardia lamblia* with the M13 bacteriophage genome. Gut. **32** (5), A596-597.

Carosi G., Gulletta M., Chiodera A., Caligaris S., Matteelli A., y Castelli F. (1994) Parasitological implications of population mobility: amoebiasis and other protozoal intestinal infections. 8th International Congress of Parasitology, Izmir, Turkey, 35.

Carrada B.T. (1984) Giardiasis intestinal. Epidemiología (Primera de dos partes). Revista Mexicana de Pediatría, 497-505.

- Carter N.S. y Fairlamb A.H. (1993) Arsenical-resistant trypanosomes lack an usual adenosine transporter. *Nature*. **361**, 173-175.
- Cavalier S. T. (1987) Eukaryotes with no mitochondria. *Nature*. **326**, 332-333.
- Cerkasosova A. Cerkasov J., y Kulda J. (1984) Metabolic differences between metronidazole resistant and susceptible strains of *Trichomonas foetus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **11**, 105-118.
- Char S., Shetty N., Narasimha M., Elliot E., Macaden R., y Farthing M.J.G. (1991) Serum antibody response in children with *Giardia lamblia* infection and identification of an immunodominant 57-kilodalton antigen. *Parasite Immunology*. **13**, 329-337.
- Char S., Cevallos A.M., Yamson P., Sullivan P.B., Neale G., y Farthing M.J.G. (1992) Impaired IgA response to *Giardia* heat shock antigen in children with persistent diarrhoea and giardiasis. *Gut*. **10** (5), 125-130.
- Chávez B., Cedillo R.R., y Martínez P.A. (1992) *Giardia lamblia*: ultrastructural study of the *in vitro* effect of benzimidazoles. *Journal of Protozoology*. **39** (4), 510-515.
- Chawla L.S., Sehgal A.K., Broor S.L., Verma R.S., y Chhuttani P.N. (1975) Tryptic activity in the duodenal aspirate following a estándar test meal in giardiasis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. **10**, 445-447.
- Chen N., Upcroft J.A., y Upcroft P. (1995) A *Giardia duodenalis* gene encoding a protein with multiple repeats of a toxin homologue. *Parasitology*. **111**, 423-431.
- Chen N., Upcroft J.A., y Upcroft P. (1996) A new cysteine-rich protein-encoding gene family in *Giardia duodenalis*. *Gene*. **169**, 33-38.
- Chirgwin J.M., A.E. Przybyla, R.J. MacDonald, y W.J. Rutter (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*. **18**, 5294-5299.
- Chomczynski P., y Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. **162** (1), 156-159.
- Coghlan V.M. y Vickery L. E. (1992) Electrostatic Interactions stabilizing ferredoxin electron transfer complexes. Disruption by "conservative" mutations. *Journal Biology Chemistry*. **267** (13), 8932-8935.
- Cook P.R., y Brazell I.A. (1975) Supercoils in human DNA. *Journal of Cell Sciences*. **19**, 261-279.
- Cook P.R., Brazell I.A., y Jost E. (1976) Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *Journal of Cell Sciences*. **22**, 303-324.
- Cowman A.F., Morry M.J., Biggs B.A., Cross G.A.M. y Foote S.J. (1988) Amino acids changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidilate synthase genes of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **25**, 9109-9113.
- Cowman A.F. (1991) The P-glycoprotein homologues of *Plasmodium falciparum*: Are they involved in chloroquine resistance?. *Parasitology Today*. **7** (4), 70-75.
- Crouch A.A., Seow W.K., y Thong Y. H. (1986) Effect of twenty-three chemotherapeutic agents on the adherence and growth of *Giardia lamblia* *in vitro*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **80**, 893-896.

- Crouch A.A., Seow W.K., Whitman L.M., y Thong Y.H. (1990) Sensitivity *in vitro* of *Giardia intestinalis* to dyadic combinations of azitromycin, doxycycline, mefloquine, tinidazole and furazolidone. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. **84**, 246-248.
- Cruz-Soto. M., Argüello-García. R., y Ortega Pierres.M.G. (1996) Obtención y caracterización parcial de cultivos de *Giardia duodenalis* resistentes a fármacos del grupo de los bencimidazoles. Memorias del Congreso Nacional de Parasitología CONAPAR. Aguascalientes, Agu.
- Cruz S. M. (2000) Determinación de la eficacia y actividad biológica *in vitro* de fármacos de la familia de los bencimidazoles ante el protozoario *G. duodenalis*. Caracterización parcial de la resistencia a fármacos de dicha familia. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. UNAM.
- Dachs G.U., Abratt V.R., y Woods D.R. (1995) Mode of action of metronidazole and a *Bacteroides fragilis* met A resistance gene in *Escherichia coli*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. **35** (4), 483-496.
- Dan M., Wang A.L., y Wang C. C. (2000) Inhibition of pyruvate-ferredoxin oxidoreductase gene expression in *Giardia lamblia* by a virus-mediated hammerhead ribozyme. Molecular Microbiology. **36** (2), 447-456.
- Daniels C. W., y Belosevic M. (1995) Disaccharidase activity in male and female C57BL/6 mice infected with *Giardia muris*. Parasitology Research. **81**, 143-147.
- Davidson R.A. (1984) Issues in clinical parasitology: the treatment in giardiasis. American Journal Gastroenterology. **79**, 256-261.
- Davies R.B., y Hibler C.P. (1979) Animal reservoirs and cross-species transmission of *Giardia*. In Waterborne Transmission of giardiasis. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio. 104-126.
- De Carneri I (1966) Variation of the sensitivity of a strain of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole after culturing in the presence or absence of the drug. In "Proceeding of the first international Congress of Parasitology. Vol. 1. 366-367.
- De Jonckheere J.F., Majewska A.C., y Kasprzak W. (1990) *Giardia* isolates from primates and rodents display the same molecular polymorphism as human isolates. Molecular and Biochemical Parasitology. **39**, 23-29.
- Debets-Ossenkopp Y.J., Pot R.G., van Westerloo D. J., Goodwin A., Vandenbroucke-Grauls C.M., Berg D.E., Hoffman P.S., y Kusters J.G. (1999) Insertion of mini-IS605 and deletion of adjacent sequences in the nitroreductase (rdxA) gene cause metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* NCTC11637. Antimicrobial Agents of Chemotherapy. **43** (1), 2657-2662.
- Demeš P., y col., J. Kulda y col., (1985). Abstract International Symposium Trichomonads and Trichomoniasis. Prague.
- Deneke S.M. (2000) Thiol-based antioxidants. Current Topics in Cellular Regulation. **36**, 151-180.
- Dennis M.Miller., Nathan H. Spear., y Steven D.Aust. (1992) Effects of deferrioxamine on iron-catalyzed lipid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics. **295** (2), 240-246.
- Descoteaux S., Ayala P., Orozco E., y Samuelson J. (1992) Primary sequences of two P-glycoprotein genes of *Entamoeba histolytica*. Molecular Biochemical Parasitology. **54**, 201-212.

- Diamond L.S., Harlow D., y Cunnick C.C. (1978) A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. **4**, 431-432.
- Dias F.B.P., Andrade A.F., de Souza W., Esteves M.J., y Angluster J. (1992) Cell surface saccharide differences in drug-susceptible and drug resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. Microbios. **71** (286), 55-64.
- Díaz G., Bernal R., Morales A., Mondragón J., Hernández G., y Ramírez R. (1999) Nitazoxanida: Tratamiento de parasitosis intestinal en niños en México. Ponencia en mesa de trabajo. XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología. Acapulco, Gro.
- DiMascio P., Murphy M.E., y Sles H. (1991) Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. American Journal of Clinical Nutrition. **53** (1), 194S-200S.
- Duncombe V.M., Bolin T.D., Davis A.E., Cummins A.G., y Crouch R.L. (1978) Histopathology in giardiasis: a correlation with diarrhoea. Australian and New Zealy Journal of Medicine. **8**, 392-396.
- Edlind T.D., y Chakraborty P.R. (1987) Unusual ribosomal RNA of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. Nucleic Acids Research. **15**, 7889-7901.
- Edlind T.D. (1989) Susceptibility of *Giardia lamblia* to aminoglycoside protein synthesis inhibitors: correlation with rRNA structure. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **33**, 484-488.
- Edwards D.I., Dye M., y Carne Hilary. (1973) The selective toxicity of antimicrobial nitroheterocyclic drugs. Journal of General Microbiology. **76**, 135-145.
- Edwards D.I., E. J. Thompson, J. Tomusange y D. Shanson. (1979) Inactivation of metronidazole by aerobic organisms. Journal Antimicrobial Chemotherapy. **5**, 315-316.
- Edwards D.I. (1980) Mechanisms of selective toxicity of metronidazole and other nitroimidazole drugs. British Journal Vener Diseases. **56** (5), 285-290.
- Ellis J.E., Wingfield J.M., Cole D., Boreham P.F.L., y Lloyd D. (1993 a) Oxygen affinities of metronidazole resistant and sensitive stocks of *Giardia intestinalis*. International Journal for Parasitology. **23** (1), 35-39.
- Ellis J.E., Williams R., Cole D., Cammack R., y Lloyd D. (1993 b) Electron transport components of the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. FEBS Letters. **325** (3), 196-200.
- Erlandsen S.L., y Chase D.G. (1974) Morphological alterations in the microvillus border of villous epithelial cells produced by intestinal micro-organisms. American Journal of Clinical Nutrition. **27**, 1277-1286.
- Erlandsen S.L., y Bemrick W.J. (1987) SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. Journal of Parasitology. **73**, 623-629.
- Erlandsen S.L., Bemrick W.J., Schupp D.E., Shields J.M., Jarrol E.L., Sauch J.F., y Pawlay J.B. (1990 a) High resolution immunogold localization of *Giardia* cyst wall antigens using field emission SEM with secondary and backscatter electron imaging. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. **38**, 625-632.
- Erlandsen S.L., Bemrick W.J., Wells C.L., Feely D.E., Knudsen L., Campbell S.R., van Keulen H., y Jarroll E.L. (1990 b) Axenic culture and characterization of *Giardia ardae* from the great heron (*Ardea herodias*). Journal of Parasitology. **76**, 717-724.

Erlandsen S.L., y Rasch E.M. (1994) The DNA content of trophozoites and cysts of *Giardia lamblia* by microdensitometric quantitation of Feulgen staining and examination by laser scanning confocal microscopy. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. **42** (11), 1413-1416.

Farthing M.J.G., Mata L., Urrutia J.J., y Kronmal R.A. (1986 a) Natural history of *Giardia* infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth. American Journal of Clinical Nutrition. **43**, 393-403.

Farthing M.J.G., Pereira M.E.A., y Keusch G.T. (1986 b) Description and characterization of a surface lectin from *Giardia lamblia*. Infection and Immunity. **51**, 661-667.

Farthing M.J.G. (1990) Immunopathology of giardiasis. Springer Seminars in Immunopathology. **12**, 269-282.

Faubert G.M. (1988) Evidence that giardiasis is a zoonosis. Parasitology Today. **4** (3), 66-68.

Figuerola L., Navarrete N., Franjola R., y Puga S. (1981) A coproparasitoscopic survey among school children from the city of Concepcion, Chile. Boletín Chileno de Parasitología. **36**, 66-67.

Filice F.P. (1952) Studies on the citology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. University of California Publications in Zoology. **57**, 53-143.

Fuentes N. I., Escobar B.T., González U.B.J., y Jung C.H. (1992) Determinación de constantes de ionización (pka) de compuestos con actividad antihelmíntica. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. **23** (4), 102.

Fukuyama K., Nagahara Y., Tsukihara T., Katsube Y., Hase T., y Matsubara H. (1988) Tertiary structure of *Bacillus thermoproteolyticus* [4Fe-4S] ferredoxin: evolutionary implications for bacterial ferredoxins. Journal Molecular Biology. **199**, 183-193.

Ganguly N.K., y Mahajan R.C. (1981) Comparative evaluation of indirect haemagglutination and immunofluorescence test in sero-diagnosis of giardiasis. Indian Journal of Medicine Research. **73** (suppl.) 111-113.

García L., Hermida R.C., Ayala D.E., y Arroyave R.J. (1989) Geographic differences in the circannual incidence of giardiasis. Journal Interdisc. Cycle Research. **20**, 185-186.

Gilbert H.F. (1990) Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. Advances in Enzymology. Relat. Areas Molecular Biology. **63**, 69-172.

Gilbert H.F. (1995) Thiol/Disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability. Methods in Enzymology. **251**, 8-28.

Gillin F.D., y Diamond L.S. (1981 a) *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: Growth responses to reducing agents. Experimental Parasitology. **51**, 382-391.

Gillin F.D., y Diamond L.S. (1981 b) *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: Effects of cysteine and oxygen tension on trophozoite attachment to glass and survival in culture media. Experimental Parasitology. **52**, 9-17.

Gillin F.D., y Reiner D.S. (1982) Attachment of the flagellate *Giardia lamblia*: Role of reducing agents, serum, temperature, and ionic composition. Molecular and Cellular Biology. **2** (4), 369-377.

Gillin D.F., Hagblom P., Harwood J., Aley S.B., Reiner D.S., McCaffery M., So M., y Guiney D.G. (1990) Isolation and expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **87**, 4463-4467.

Goodwin A., Kersulyte D., Sisson G., Veldhuyzen van Zanten S.J., Berg D.E., Hoffman P.S. (1998) Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (rdx A) that encodes an oxygen – insensitive NADPH nitroreductase. *Molecular Microbiology*. **28** (2), 383-393.

Godts B., Hemelhot W., Tilborgh K.V., Retore P., Cadranal S., y Butzler J.P. (1985) Evaluation of a new method for routine *in vitro* cultivation of *Giardia lamblia* from human duodenal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. **22**, 702-704.

Correll T.E. (1985) Effect of culture medium iron content on the biochemical composition and metabolism of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Bacteriology*. **161**, 1228-1230.

Gupta R.K., y Mehta S. (1973) Giardiasis in children: a study of pancreatic functions. *Indian Journal of Medical Research*. **61**, 743-748.

Hall A., y Nahar Q. (1993) Albendazole as a treatment for infections with *Giardia intestinalis* in children in Bangladesh. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **87**, 84-86.

Hason P.R., y Patterson B.A. (1987) Epidemiology of *Giardia lamblia* infection in children: cross-sectional and longitudinal studies in urban and rural communities in Zimbabwe. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **37**, 277-282.

Hare D.D., Jarroll E.L., y Lindmark D.G. (1989) *Giardia lamblia*: characterization of proteinase activity in trophozoites. *Experimental Parasitology*. **68**, 168-175.

Harley V.S. (1988) The importance of non-waterborne modes of transmission for giardiasis a case study. *Advances in Giardia Research*. P.M. Wallis & B.R. Hammond (eds). University of Calgary Press, Calgary, 15-19.

Hartong W.A., Gourley W.K., y Arvanitakis C. (1979) Giardiasis: clinical spectrum and functional structural abnormalities of the small intestinal mucosa. *Gastroenterology*. **77**, 61-69.

Hermida R.C., Ayala D.E., y Arroyave R.J. (1990) Circannual incidence of *Giardia lamblia* in México. *Chronobiol. International*. **7**, 329-340.

Hernández S.J. (1992) Identificación de una molécula de superficie de *Giardia lamblia* de ≈200 kDa y su participación en el fenómeno de adherencia. Tesis de Doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Departamento de Inmunología I.P.N. México. 27.

Honigberg B.M. (1978) Trichomonads of importance in human medicine. In "Parasitic protozoa" (J.P. Kreier, ed). Vol. 2, pp. 275-454. Academic Press, New York.

Horner D.S., Hirt R.P., y Embley T.M. (1999) A single origin of eukaryotic pyruvate: ferredoxin oxidoreductase genes: implications for the evolution of anaerobic eukaryotes. *Molecular Biology Evolution*. **16** (9), 1280-1291.

Hoskins L.C., Winawer S.Y., Broitman S.A., Gottlieb L.S., y Zamcheck N. (1967) Clinical giardiasis and intestinal malabsorption. *Gastroenterology*. **53**, 265-279.

Hossain M.M., Ljungstrom I., Glass R.I., Lundin L., Stoll B.J., y Huidt G. (1983) Amoebiasis and giardiasis in Bangladesh: parasitological and serological studies. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **77**, 552-554.

Hoynes G.F., Boreham P.F.L., Parsons P.G., Ward C., y Biggs B. (1989) The effect of the drugs on the cell cycle of *Giardia intestinalis*. *Parasitology*. **99**, 333-339.

Inge P.M.G., Edson C.M., y Farthing M.J.G. (1988) Attachment of *Giardia lamblia* to mammalian intestinal cells. *Gut*. **29**, 795-801.

Ings R.M.J., McFadzean J.A., y Ormerod W.E. (1974) The mode of action of metronidazole in *Trichomonas vaginalis* and other micro-organisms. *Biochemical Pharmacology*. **23**, 1421-1429.

Inselburg J., Bzik D.J., y Horii T. (1987) Pyrimetamine resistant *Plasmodium falciparum*: overproduction of dihydrofolate reductase by a gene duplication. *Molecular Biochemical Parasitology*. **26**, 121-134.

Janoff E.N., Craft J.C., Pickering L.K., Novotny T., Blaser M.J., Knisley C.V., y Reller L.B. (1989) Diagnosis of *Giardia lamblia* infections: band detection of parasite-specific antigens. *Journal of Clinical Microbiology*. **27** (3), 431-435.

Jenks P.J., Ferrero R.L., y Labigne A. (1999) The role of the rdxA gene in the evolution of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **43** (6), 753-758.

Johnson P.J. (1993) Metronidazole and drug resistance. *Parasitology Today*. **9** (5), 183-186.

Johnson P.J., Schuck B.L., y Delgadillo M.G. (1994) Analysis of a single-domain P-glycoprotein-like gene in the early-diverging protist *Trichomonas vaginalis*. *Molecular Biochemical Parasitology*. **66** (1), 127-137.

Jokipii L., y Jokipii M.M. (1982) Treatment of giardiasis: comparative evaluation of ornidazole and tinidazole as a single oral dose. *Gastroenterology*. **83**, 399-404.

Jorgensen M.A., Manos J., Mendz G. L., y Hazell S.L. (1998) The mode of metronidazole in *Helicobacter pylori*: full cycling or reduction?. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. **41** (1), 67-75.

Kabnick K.S. y Peattie D.A. (1990) *In situ* analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. *Journal of Cell Sciences*. **95**, 353.

Kamath K.R., y Murugasu R. (1974) A comparative study of four methods for detecting *Giardia lamblia* in children with diarrheal disease and malabsorption. *Gastroenterology*. **66**, 16-21.

Kappus K., y Juranek D. (1988) *Giardia* in the well (letter). *Journal of the American Medical Association*. **259**, 1810.

Karanis P., Maier W., Schoenen D., y Seitz H.M. (1991) Studies on the lethal effect of ultraviolet light on *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Research*. **77**, 369-373.

Katellaris P.H., McHugh T.D., Carnaby S., Cevallos A.M., Char S., y Farthing M.J.G. (1991) Bile modulates genotypic and phenotypic characteristics of *Giardia lamblia*. *Gut*. **32**, A1260.

Katellaris P.H., y Farthing M.J.G. (1992) Diarrhoeal and malabsorption in giardiasis: a multifactorial process. *Gut*. **33**, 295-297.

Keister D.B. (1983) Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **77**, 487-488.

Kelly J.D. y Hall C.A. (1979) Resistance of animal helminths to anthelmintics. *Advanced Pharmacology Chemotherapy*. **16**, 89-128.

Kerscher L., y Oesterhelt D. (1982) Pyruvate: ferredoxin oxidoreductase — new findings on an ancient enzyme. *Trends in Biochemical Sciences*. 371-374.

Keyer K., e Imlay J.A. (1996) Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93, 13635-13640.

Keystone J.S., Krajden S., y Warren M.R. (1978) Person-to-person transmission of *Giardia lamblia* in day-care nurseries. *Cancer Medicine Association Journal*. 119, 241-242, 247-248.

Khailova L.S., Alexandrovitch O.V., y Severin S.E. (1985) Substrate-dependent inactivation of muscle pyruvate dehydrogenase: Identification of the acetyl-substituted enzyme form. *Biochemistry International*. 10 (2), 291-300.

Knight R. (1980) Epidemiology and transmission of giardiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 74 (4), 433-435.

Koch R.L., y Goldman P. (1979) The anaerobic metabolism of metronidazole forms N-(2-hydroxyethyl) oxamic acid. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 208, 406.

Kulda J., Čerkasovová J., y Demeš P. (1984) *Tritrichomonas foetus*. Stable anaerobic resistance to metronidazole *in vitro*. *Experimental Parasitology*. 57, 93-103.

Kulda J., Tachezy J., y Čerkasovová J. (1993) In vitro induced anaerobic resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. *Journal Eukaryotic Microbiology*. 40 (3), 262-269.

Kulda J. (1999) Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *International Journal for Parasitology*. 29 (2), 199-212.

Lacey E. (1990) Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today*. 6, 112-115.

Land K.M., y Johnson P.J. (1999) Molecular basis of metronidazole resistance in pathogenic bacterium and protozoa. *Drug Resistance Update*. 2 (5), 289-294.

Land K.M., Clements D.L., y Johnson P.J. (2001) Loss of multiple hydrogenosomal proteins associated with organelle metabolism and high-level drug resistance in Trichomonads. *Experimental Parasitology*. 97, 102-110.

Legator M.S., Conor T.H., y Stoeckel M. (1975) Detection of mutagenic activity of metronidazole and niridazole in body fluid of humans and mice. *Science*. 76, 1118-1119.

Lev B., Ward H., Keusch G.T., y Pereira M.E.A. (1986) Lectin activation in *Giardia lamblia* by host protease: a novel host-parasite interaction. *Science*. 232, 71-73.

Lindley T.A., Chakraborty P.R., y Edlind T.D. (1988) Heat shock and stress response in *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 28, 135-144.

Lindmark D.G., y Muller M. (1976) Antitrichomonal action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. *Antimicrobiological Agents and Chemotherapy*. 10, 476.

Liston D.R., y Johnson P.J. (1999) Analysis of a ubiquitous promoter element in a primitive eukaryote: Early evolution of the initiator element. *Molecular and Cellular Biology*. 19, 2380-2388.

Liu S. M., Brown D.M., O'Donoghue P., Upcroft P., y Upcroft J.A. (2000) Ferredoxin involvement in metronidazole resistance of *Giardia duodenalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 108, 137-140.

Lloyd D., Yarlett N., Hillman K., Paget T.A., Chapman A., Ellis J.E., y Williams A.G. (1989) Oxygen and aerotolerant protozoa: studies using non-invasive techniques. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Anaerobic Protozoa* (Edited by Lloyd D., Coombs G.H., y Paget T. A.) pp. 1-21. Harwood Academic, Chur, Switzerland.

MacDonald T.T., y Spencer J. (1988) Evidence that activated mucosal T cells play a role in the pathogenesis of enteropathy in human small intestine. *Journal of Experimental Medicine*. **167**, 1341-1349.

Mahbubani M.G., Bej A.K., Perlin M.G., Schaefer F.W., Jakubowski W., y Atlas R.M. (1992) Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. By using polymerase chain reaction and gene probes. *Journal of Clinical Microbiology*. **30**, 74-78.

Majewska A.C., Kasprzak W., De Jonckheere J.F., y Kaczmarek E. (1991) Heterogeneity in the sensitivity of stocks and clones of *Giardia* to metronidazole and ornidazole. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **85**, 67-69.

Markov G.G. e Ivanov I.G. (1974) Hydroxylapatite column chromatography in procedures for isolation of purified DNA. *Analytical Biochemistry*. **59**, 555-563.

Meloni B.P., Thompson R.C.A., Reynoldson J.A., y Seville P. (1990) Albendazole: a more effective anti-giardial agent *in vitro* than metronidazole or tinidazole. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **84**, 375-379.

Meloni B.P., Lymbery A.J., y Thompson R.C.A. (1995) Genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis* by enzyme electrophoresis: Implications for reproductive biology, population structure, taxonomy and epidemiology. *Journal of Parasitology*. **81** (3), 368-383.

Mendelson R.M. (1980) The treatment of giardiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **74**, 438-439.

Menon S., y Ragsdale S. W. (1997) Mechanism of the *Clostridium thermoaceticum* pyruvate:ferredoxin oxidoreductase: evidence for the common catalytic intermediacy of the hydroxyethylthiamine pyrophosphate radical. *Biochemistry*. **36** (28), 8484-8494.

Meyer E.A. (1974) *Microorganisms and human disease*. New York. Appleton-Century-Crofts.

Miller D.M., Spear N.H., y Aust S.D. (1992) Effects of deferrioxamine on iron-catalyzed lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **295** (2), 240-246.

Miotti P.G., Gilman R.H., Santosham M., Randder R.W., y Yolken R.H. (1986) Age-related rate seropositivity of antibody to *Giardia lamblia* in four diverse populations. *Journal of Clinical Microbiology*. **24**, 972-975.

Montañez C., Cervantes L., Ovando C., y Ortega-Pierres G. (1989) *Giardia lamblia*: Isolation of RNA. *Experimental Parasitology*. **68**, 354-356.

Moore R.A., Beckthold B., y Bryan L.E. (1995) Metronidazole uptake in *Helicobacter pylori*. *Canadian Journal of Microbiology*. **41**, 746-749.

Morecki R., y Parker J.G. (1967) Ultrasound studies of the human *Giardia lamblia* and subjacent jejunal mucosa in a subject with steatorrhea. *Gastroenterology*. **52**, 151-164.

- Moreno S.N., Mason R.P., y Docampo R. (1984) Distinct reduction of nitrofurans and metronidazole to free radical metabolites by *Trichomonas foetus* hydrogenosomal and cytosolic enzymes. *Journal of Biological Chemistry*. **259**, 8252-8259.
- Morgan U.M., Constantine C.C., Greene W.K., y Thompson R.C.A. (1993) RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis of *Giardia* DNA and correlation with isoenzyme data. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene*. **87**, 702-705.
- Moura J.G., Macedo A. L., y Palma P.N. (1994) Ferredoxins. *Methods in Enzymology*. **243**, 165-188.
- Müller M. (1981) Action of clinically utilized 5-nitroimidazoles on microorganisms. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases. Supplement*. **26**, 31-41.
- Müller M., y Gorrell T.E. (1983) Metabolism and metronidazole uptake in *Trichomonas vaginalis* isolates with different metronidazole susceptibilities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **24** (5), 667-673.
- Muller M. (1988) Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Annual Review of Microbiology*. **42**, 465-468.
- Nash T.E., Conrad J.T., y Merrit J.W. Jr (1990) Variant specific epitopes of *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **42**, 125-132.
- Nash T.E., Merrit J.W., y Conrad J.T. (1991) Isolate and epitope variability in susceptibility of *Giardia lamblia* to intestinal proteases. *Infection and Immunity*. **59**, 1334-1340.
- Nash T.E., y Mowatt M.R. (1993) Characterization of a *Giardia lamblia* variant-specific surface protein (VSP) gene from isolate GS/M and stimation of the VSP gene repertoire size. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **51**, 219-228.
- Nash T.E., Ohi C.A., Thomas E., Subramanian G., Keiser P., y Moore T.A. (2001) Treatment of patients with refractory giardiasis. *Clinical Infectious Diseases*. **33** (1), 22-28.
- North M.J., Mottram J.C., y Coombs G.H. (1990) Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitology Today*. **6**, 270-275.
- Okada M., Fuchigami T., Ri S., Kohrogi N., y Omae T. (1983) The PTPABA pancreatic function test in giardiasis. *Postgraduate Medical Journal*. **59**, 79-82.
- Osipova S.O., Giandasov Z.A., Dekhan-Khodzhaeva N.A., y Shafer N.P. (1984) Detection of specific antibodies in saliva in lamblasis infection. *Medicine Parazite Bolezni*. **5**, 57-60.
- Otaka E. y Ooi T. (1987) Examination of protein sequence homologies: IV. Twenty-seven bacterial ferredoxins. *Journal Molecular Evolution*. **26**, 257-267.
- Oullette M., y Borst P. (1991) Drug resistance and P-glycoprotein gene amplification in the protozoan parasite *Leishmania*. *Research Microbiology*. **142**, 737-746.
- Pan N., e Imlay J.A. (2001) How does oxygen inhibit central metabolism in the obligate anaerobe *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Molecular Microbiology*. **39** (6), 1562-1571.
- Parenti D.M. (1989) Characterization of a thiol proteinase in *Giardia lamblia*. *Journal of Infectious Diseases*. **160**, 1076-1080.

Pasley J.N., Daly J.J., McCullough D., McChesney T., Daly E.B., y Tank S.K. (1989) Circannual incidence of *Giardia lamblia*. *Chronobiologia International*. **6**, 185-189.

Pearson W.R., y Lipman D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **85**, 2444-2448.

Peterson D. S., Di Santi S.M., Pova M., Calvosa V. S., do Rosario V. E., y Wellems T.E. (1991) Prevalence of the dihydrofolate reductase Asn-108 mutation as the basis for pyrimethamine-resistant falciparum malaria in the Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **45**, 492-497.

Pieulle L., Magro V., y Hatchikian E. C. (1997) Isolation and analysis of the gene encoding the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase of *Desulfovibrio africanus*, production of the recombinant enzyme in *Escherichia coli*, and effect of carboxy-terminal deletions on its stability. *Journal of Bacteriology*. **179** (18), 5684-5692.

Popovic S.O. (1990) Propanolol and metronidazole for the treatment of metronidazole resistant giardiasis. *Journal Clinical Gastroenterology*. **12** (5), 604-605.

Quinkal I., Davaise V., Gaillard J., y Moulis J.M. (1994) On the role of conserved proline residues in the structure and function of *Clostridium pasteurianum* 2 [4Fe-4S] ferredoxin. *Protein Engineer*. **7** (5), 681-687.

Quon D.V.K., Dólivera C.E., y Jhonson P.J. (1992) Reduced transcription of the ferredoxin gene in metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **89**, 4402-4406.

Rasmussen B.A., Bush H., y Tally F.P. (1993) Antimicrobial resistance in *Bacteroides*. *Clinical Infectious Diseases*. **16** (4), 390S-400S.

Rasmussen B.A., Bush K., Tally F.P. (1997) Antimicrobial resistance in anaerobes. *Clinical Infectious Diseases*. **24** (1), 110S-120S.

Rodríguez G.R., Rodríguez-Guzmán L.M., y Cruz del Castillo A.H. (1999) Effectiveness and safety of mebendazole compared to nitazoxanide in the treatment of *Giardia lamblia* in children. *Review Gastroenterology of Mexico*. **64** (3), 122-126.

Romero M.L. (1996) Determinación de la eficacia y actividad biológica *in vitro* de fármacos de la familia de los 5-nitroimidazoles ante el protozoo *Giardia duodenalis*. Caracterización parcial de la resistencia a drogas en este parásito. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores - Cuautitlán. UNAM.

Rosenkranz H.S., y Speck W.T. (1975) Mutagenicity of metronidazole: activation by mammalian liver microsomes. *Biochemistry and Biophysical Research Communications*. **66**, 520.

Rosentein E., y Del Campo A.M. (1979) *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas*. 25ava, edición Mexicana. Ediciones P.L.M., 126.

Rustia M., y Shubik P. (1979) Experimental induction of hepatomas, mammary tumors and other tumors with metronidazole in non-inbred SaS: MRC(W1)BR rats. *Journal of the National Cancer Institute*. **63**, 863.

Saito T., y Williams J.P. (1991) The binding of the ferric uptake regulation protein to a DNA fragment. *European Journal of Biochemistry*. **197** (1), 43-47.

- Samarawickrema N.A., Brown D.M., Upcroft J.A., Thammapalerd N., y Upcroft P. (1997) Involvement of superoxide dismutase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. **40** (6), 833-840.
- Samra H.K., Ganguly N.K., Garg U.C., Goydal J., y Mahajan R.C. (1988) Effect of excretory-secretory products of *Giardia lamblia* on glucose and phenylalanine transport in the small intestine of Swiss albino mice. Biochemistry International. **17**, 801-812.
- Sanger F., Nicklen S., y Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain – terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **74**, 5463-5467.
- Schmerin M.J., Jones T.C., y Klein H. (1978) Giardiasis: association with homosexuality. Annual International of Medicine. **88**, 801-803.
- Schönheit P., y Schäfer T. (1995) Metabolism of hyperthermophiles. World Journal of Microbiology and Biotechnology. **11**, 26-57.
- Sindar P., Britz M.L., Wilkinson R.G. (1982) Isolation and properties of metronidazole-resistant mutants of *Clostridium perfringens*. Journal of Medical Microbiology. **15** (4), 503-509.
- Singh B. (1997) Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. International Journal of Parasitology. **27** (10), 1135-1145.
- Smith P.D., Gillin F.D., Spira W.M., y Nash T.E. (1982) Chronic giardiasis: studies on drug sensitivity, toxin production and host immune response. Gastroenterology. **83**, 797-803.
- Smith N.C., Bryant C., y Boreham P.F.L. (1988) Possible roles for pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thiol-dependent peroxidase and reductase activities in resistance to nitroheterocyclic drugs in *Giardia intestinalis*. International Journal of Parasitology. **18**, 991-997.
- Smith E.T., Blamey J. M., y Adams M.W.W. (1994) Pyruvate ferredoxin oxidoreductases of the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*, and the hyperthermophilic bacterium, *Thermotoga maritima*, have different catalytic mechanisms. Biochemistry. **33**, 1008-1016.
- Smith M.A., y Edwards D.I. (1995) The influence of microaerophilia and anaerobiosis on metronidazole uptake in *Helicobacter pylori*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. **36** (3), 453-461.
- Sogin M.L., Gunderson J.H., Elwood H.J., Alonso R.A., y Peattie D.A. (1988) Phylogenetic meaning of the kingdom conception unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. Science. **243**, 75-77.
- Southern E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal Molecular Biology. **98**, 503-517.
- Sullivan P.B., Marsh M.N., Phillips M.B., Dewit O., Neale G., Cevallos A.M., Yamson P., y Farthing M.J.G. (1991) Prevalence and treatment of giardiasis in chronic diarrhoea and malnutrition. Archives of Disease in Childhood. **60**, 304-306.
- Takano J., y Yardley J.H. (1965) Jejunal lesions in patients with giardiasis and malabsorption. An electron microscopic study. Bulletin of Johns Hopkins Hospital. **116**, 413-429.
- Tandon B.N., Tandon R.K., Satpathy B.K., y Shrinivas. (1977) Mechanism of malabsorption in giardiasis: a study of bacterial flora and bile salt deconjugation in upper jejunum. Gut. **18**, 176-181.

Tankovic J., Lamarque D., Delchier J.C., Soussy C.J., Labigne A., y Jenks P. (2000) Frequent association between alteration of the *rdxA* gene and metronidazole resistance in french and north african isolates of *helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **44** (3), 608-613.

Thompson R.C.A., Lymbery A.J., y Meloni B.P. (1988) Giardiasis a zoonosis in Australia?. *Parasitology Today*. **4**, 201.

Thompson A.J. (1991) Does ferredoxin I (*Azotobacter*) represent a novel class of DNA-binding proteins that regulate gene expression in response to cellular iron (II)? *FEBS Letters*. **285** (2), 230-236.

Thompson R.C.A., y Meloni B.P. (1993 a) Molecular variation in *Giardia*. *Acta Tropica*. **53**, 167-184.

Thompson R.C.A., Reyneldson J.A., y Mendis A.H.W. (1993 b) *Giardia* and giardiasis. *Advances in Parasitology*. **32**, 70-160.

Townson S.M., Laqua H., Upcroft P., Boreham P.F.L., y Upcroft J.A. (1992) Induction of metronidazole and furazolidone resistance in *Giardia*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **86**, 521-522.

Townson S.M., Hanson G.R., Upcroft J.A., y Upcroft P. (1994 a) A purified ferredoxin from *Giardia duodenalis*. *European Journal of Biochemistry*. **220**, 439-446.

Townson S.M., Boreham P.F.L., Upcroft P., y Upcroft J.A. (1994 b) Resistance to nitroheterocyclic drugs. *Acta Tropica*. **56**, 173-194.

Townson S.M., Upcroft J.A., y Upcroft P. (1996) Characterisation and purification of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Giardia duodenalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **79**, 183-193.

Trinh S., y Reyssset G. (1996) Detection by PCR of the *nim* genes encoding 5-nitroimidazole resistance in *Bacteroides* spp. *Journal Clinical Microbiology*. **34** (9), 2078-2084.

Upcroft J.A., Boreham P.F.L., y Upcroft P. (1989) Molecular mechanisms of drug resistance in *Giardia intestinalis*. *Immunological and Molecular Basis of Pathogenesis in Parasitic Diseases*, ed. R.C. Ko. University of Hong Kong, 141-153.

Upcroft J.A., Upcroft P., y Boreham P.F.L. (1990) Drug resistance in *Giardia intestinalis*. *International Journal of Parasitology*. **20** (4), 489-496.

Upcroft J.A., Healey A., Murray D.G., Boreham P.F.L., y Upcroft P. (1992) A gene associated with cell division and drug resistance in *Giardia duodenalis*. *Parasitology*. **104**, 395-405.

Upcroft J.A., y Upcroft P. (1999) Keto-acid oxidoreductases in the anaerobic protozoa. *J. Eukaryot. Microbiology*. **46** (4), 447-449.

Upcroft J.A., Healey A., Murray D.G., Boreham P.F.L., y Upcroft P. (1992) A gene associated with cell division and drug resistance in *Giardia duodenalis*. *Parasitology*. **104**, 395-405.

Vaňáčková S., Rasoloson D., Rázga J., Hrdý I., Kulda J., y Tachezy. (2001). Iron-induced changes in pyruvate metabolism of *Tritrichomonas foetus* and involvement of iron in expression of hydrogenosomal proteins. *Microbiology*. **14**, 53-62.

Velázquez Delgado L. (2002) Eficacia de compuestos derivados de acridina sobre trofozoitos de *G. duodenalis* in vitro. Caracterización fenotípica parcial de cultivos del parásito resistentes a distintos fármacos. Tesis de Licenciatura. En prensa. Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán. UNAM.

Vinayak V.K., Jain P., y Naik S.R. (1978) Demonstration of antibodies in giardiasis using the immunodiffusion technique with *Giardia* cyst as antigen. Annual Tropical Medicine Parasitology. **72**, 581.

Wagner J.T., Ludermann H., Farber P.M., Lottspeich F., Krauth Siegel R.L. (1998) Glutamate dehydrogenase, the marker protein of *Plasmodium falciparum*- cloning, expression and characterization of the malarial enzyme. European Journal of Biochemistry. **258** (2), 813-819.

Wassmann C., Hellberg A., Tannich E., y Bruchhaus I. (1999) Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. J. Biol. Chemistry. **274** (37), 26051-26056.

Weinbach E.C., Costa J.L., y Wieber S.C. (1985) Antidepressant drugs suppress growth of the human pathogenic protozoan *Giardia lamblia*. Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology. **47**, 145-148.

Wellems T.E. (1991) Molecular genetics of drug resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. Parasitology Today. **7** (5), 110-112.

Wilfinger W.W., Mackey K., y Chomczynski P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. Biotechniques. **22** (3), 478-481.

Williams K.P., Leadlay P.F., y Lowe P.N. (1990) Inhibition of pyruvate ferredoxin oxidoreductase from *Trichomonas vaginalis* by pyruvate and its analogues. Biochemical Journal. **268**, 69-75.

Wolfe M.S. (1984) Symptomatology, diagnosis, and treatment. En: *Giardia* and Giardiasis: Biology, pathogenesis and Epidemiology Erlandsen S.L., y Meyer E.A. (eds.) Plenum Press, New York: 147-161.

Wright R.A., Spencer H.C., Brodsky R.E., y Vernon T.M. (1977) Giardiasis in Colorado: an epidemiologic study. American Journal of Epidemiology. **105**, 330-336.

Xia B., Volkman B.F., y Markley J.L. (1998) Evidence for oxidation-state-dependent conformational changes in human ferredoxin from multinuclear, multidimensional NMR spectroscopy. Biochemistry. **37** (11), 3965-3973.

Yarlett N., Yarlett N.C., y Lloyd D. (1986 a) Metronidazole-resistant clinical isolates of *Trichomonas vaginalis* have lowered oxygen affinities. Molecular Biochemical Parasitology. **19** (2), 295.

Yarlett N., Yarlett N.C., y Lloyd D. (1986 b) Ferredoxin-dependent reduction of nitroimidazole derivatives in drug-resistant and susceptible strains of *Trichomonas vaginalis*. Biochemical Pharmacology. **35** (10), 1703-1708.

Yee J., y Dennis P.P. (1992) Isolation and characterization of a NADP-dependent glutamate dehydrogenase gene from the primitive eucaryote *Giardia lamblia*. The Journal of Biological Chemistry. **267** (11), 7539-7544.

Yoch y Carithers (1979) Bacterial iron-sulfur proteins. Microbiology Review. **43**, 384-421.