



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

**“DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA  
*in vitro* DE COMBINACIONES DIÁDICAS DE  
FÁRMACOS DE DISTINTA FAMILIA QUÍMICA EN  
TROFOZOÍTOS DE *Giardia duodenalis*. ”**

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIOLOGO**

PRESENTA:

**KARLA GLORIA JIMÉNEZ ACOSTA**

DIRECTORES DE TESIS: Dr. Raul Argüello García  
Dra. Maria Guadalupe Ortega Pierres

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 2 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la dirección del Dr. Raúl Argüello García, Auxiliar de Investigación y de la Dra. Ma. Guadalupe Ortega Pierres Investigador Titular de tiempo completo y Jefa del Departamento de Genética y Biología Molecular.

## DEDICATORIAS

**A mis padres, Miguel y Angelica:** Por guiar mi vida, brindándome siempre su amor, apoyo, confianza, comprensión, consejos, gracias a ustedes que son mi mayor ejemplo y orgullo, hoy culmina una de las etapas más importantes de mi vida, que logre a su lado, les dedico con todo mi amor y agradecimiento este trabajo.

**A mis hermanas, Angie y Moni:** Por su apoyo, confianza y cariño incondicional, por que siempre han estado a mi lado, gracias a sus invaluable consejos que me han ayudado durante toda mi vida y me han impulsado a salir adelante, este logro es también de ustedes que son parte indispensable de mi vida.

**A toda mi familia:** Por, su cariño, por estar a mi lado, por los momentos compartidos, ya que soy muy afortunada de compartir mi vida con todos ustedes.

**A Manuel:** Por tu amor, amistad, apoyo incondicional para lograr mis metas, por tus consejos, paciencia y sobre todo gracias por tu ayuda en la realización de esta tesis.

## AGRADECIMIENTOS

**A la Dra. Guadalupe Ortega Pierres:** Por permitirme integrarme a su grupo de trabajo, por las enseñanzas, el tiempo y las recomendaciones, durante toda la realización de esta tesis, por que me siento muy orgullosa de haber trabajado bajo su asesoría.

**Al Dr. Raul Argüello García:** Gracias por tu disposición paciencia, apoyo y ayuda incondicional, por la oportunidad de trabajar a tu lado, por todo el tiempo dedicado para la realización de mi tesis, por todo lo que aprendí, de ti y sobre todo por la confianza que depositaste en mi, la cual me permitió realizar este trabajo.

**A la Universidad Nacional Autónoma de México:** Por la gran oportunidad de estudiar en la universidad más importante de México.

**A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala:** Gracias a todos mis profesores que hicieron de mi estancia en la universidad una de las experiencias más enriquecedoras e inolvidables de mi vida.

**A mis amigos:** Mariana, gracias por estar siempre apoyándome, aconsejándome y por ser una amiga excepcional, A Edgar, Borre, Luis, Laura Martha, Alejandra, Marisela, que fueron y son mis amigos inseparables que compartimos juntos, momentos maravillosos durante esta importante etapa de nuestras vidas, gracias por su amistad, apoyo,

consejos y sobre todo por seguir formando parte de mi vida.

**A todos mis compañeros del laboratorio 2 de Genética y Biología Molecular :** Por los momentos

compartidos, Arturo, gracias por todo tu apoyo, Rocío, Marisela, Lupita, Lety, Nancy, Romel, y Ma. Luisa por la ayuda que me brindaron. Especialmente a Don Rene y Blanquita que gracias su apoyo técnico fue posible la realización de la fase experimental de mi tesis.

**Al honorable jurado:** Dra. Patricia Bonilla Lemus, Dra. Ma. Guadalupe Ortega, M. en C. Elizabeth Ramírez Flores, M. en C. Eric Monroy Pérez y el Dr. Raúl Argüello García por su disposición para evaluar, corregir y revisar el presente trabajo de tesis y por sus valiosas recomendaciones aportadas a esta.

## INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE CONTENIDO .....	6
ÍNDICE DE TABLAS .....	8
ÍNDICE DE FIGURAS .....	9
ABREVIATURAS .....	Error! Bookmark not defined.
RESUMEN .....	Error! Bookmark not defined.
I INTRODUCCIÓN .....	Error! Bookmark not defined.
<b>1.0.- GENERALIDADES DE <i>G. duodenalis</i> Y LA GIARDIOSIS...</b>	Error!
Bookmark not defined.	
1.1.- TAXONOMÍA Y CLASIFICACIÓN .....	Error! Bookmark not defined.
1.2.- ENTIDADES MORFOLÓGICAS DE <i>Giardia</i> ....	Error! Bookmark not defined.
1.3.- CICLO DE VIDA .....	Error! Bookmark not defined.
1.4.- TRASMISIÓN Y PATOGENICIDAD .....	Error! Bookmark not defined.
1.5.- EPIDEMIOLOGÍA .....	Error! Bookmark not defined.
1.6.- CUADRO CLÍNICO.....	Error! Bookmark not defined.
1.7.- DIAGNÓSTICO .....	Error! Bookmark not defined.
<b>2.0.- TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO .....</b>	Error! Bookmark not defined.
Bookmark not defined.	
2.1.- METRONIDAZOL: .....	Error! Bookmark not defined.
2.2.- ALBENDAZOL: .....	Error! Bookmark not defined.
2.3.- FURAZOLIDONA: .....	Error! Bookmark not defined.
2.4.- QUINACRINA: .....	Error! Bookmark not defined.
2.5.- NITAZOXANIDA: .....	Error! Bookmark not defined.
II ANTECEDENTES .....	Error! Bookmark not defined.
III JUSTIFICACIÓN .....	Error! Bookmark not defined.
IV OBJETIVOS .....	Error! Bookmark not defined.
<b>1.0.- OBJETIVO GENERAL.....</b>	Error! Bookmark not defined.
<b>2.0.- OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	Error! Bookmark not defined.
V ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	Error! Bookmark not defined.
VI MATERIAL Y MÉTODOS .....	Error! Bookmark not defined.
1.1.- Cultivo de Parásitos.....	Error! Bookmark not defined.
1.2.- Cultivo de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> .....	Error! Bookmark not defined.
1.3.- Agentes quimioterapéuticos: .....	Error! Bookmark not defined.

1.4.- Evaluación de viabilidad celular por subcultivo en medio líquido.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.5.- Determinación de DL50 y CLM .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.6.- Determinación de las Interacciones Farmacológicas (sinergia, indiferencia, aditividad y antagonismo). .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>VII RESULTADOS .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>1.0.- Subcultivo en Medio Líquido. ....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>2.0.- Efectividad Giardicida de combinaciones de Fármacos.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.1.- Determinación de Interacciones Farmacológicas.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>3.0.- Efectividad Giardicida de combinaciones de Fármacos en cepas resistentes a Metronidazol, Albendazol y Furazolidona. Error!</b>	<b>Bookmark not defined.</b>
3.1.- Cepa WB resistente a Metronidazol 23 µM.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2.- Cepa WB resistente Albendazol 5.6 µM.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3.- Cepa WB resistente a Furazolidona 5.2 µM .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>VIII DISCUSIÓN .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>IX CONCLUSIONES.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>X REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>XI APÉNDICE.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>1.1.- MEDIO DE CULTIVO TYI-S-33 SUPLEMENTADO CON BILIS (ATCC # 1404). ....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>1.2.- PREPARACIÓN SOLUCIONES DE TRABAJO ..</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>1.3.- FRACCIONES EXPERIMENTALES DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MÍNIMA, UTILIZADAS EN COMBINACIÓN PARA CADA FÁRMACO .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.3.1.- COMBINACIÓN NITAZOXANIDA-METRONIDAZOL ..	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

1.3.2.- COMBINACIÓN FURAZOLIDONA-QUINACRINA.. **Error! Bookmark not defined.**

1.3.3.- COMBINACIÓN FURAZOLIDONA-METRONIDAZOL.. **Error! Bookmark not defined.**

1.3.4.- COMBINACIÓN FURAZOLIDONA-NITAZOXANIDA... **Error! Bookmark not defined.**

1.3.5.- COMBINACIÓN FURAZOLIDONA-ALBENDAZOL. **Error! Bookmark not defined.**

1.3.6.- COMBINACIÓN METRONIDAZOL-ALBENDAZOL **Error! Bookmark not defined.**

1.3.7.- COMBINACIÓN QUINACRINA-ALBENDAZOL..... **Error! Bookmark not defined.**

1.3.8.- COMBINACIÓN METRONIDAZOL-QUINACRINA.. **Error! Bookmark not defined.**

1.3.9.- COMBINACIÓN NITAZOXANIDA-ALBENDAZOL . **Error! Bookmark not defined.**

1.3.10.- COMBINACIÓN NITAZOXANIDA-QUINACRINA. **Error! Bookmark not defined.**

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Regímenes de tratamiento comúnmente usados para la giardiosis

**Tabla 2.** Valores de Dosis letal 50 y Concentración Letal Mínima experimental para la cepa WB de *Giardia duodenalis*, para cada uno de los agentes quimioterápicos probados.

**Tabla 3.** Determinación experimental del Índice de Concentración Fraccional, así como la Interacción Farmacológica obtenida para cada una de las combinaciones diádicas probadas en cultivos de *G. duodenalis*

**Tabla 4.** Determinación experimental del Índice de Concentración Fraccional y su correspondiente Interacción Farmacológica, para las combinaciones diádicas empleadas en cultivos de *G. duodenalis* resistentes a Metronidazol, corresponden al promedio de cuatro experimentos independientes.

**Tabla 5.** Determinación experimental del Índice de Concentración Fraccional y su correspondiente Interacción Farmacológica, para las combinaciones diádicas empleadas en cultivos de *G. duodenalis* resistentes a Albendazol, corresponden al promedio de cuatro experimentos independientes.

**Tabla 6.** Determinación experimental del Índice de Concentración Fraccional y su correspondiente Interacción Farmacológica, para las combinaciones diádicas empleadas en cultivos de *G. duodenalis* resistentes a Furazolidona, corresponden al promedio de cuatro experimentos independientes.

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Fase de Trofozoíto (A) y de Quiste (B) del parásito *G. duodenalis*

**Figura 2.** Ciclo de vida de *G. duodenalis*

**Figura 3.** Curvas dosis-respuesta empleando el método de subcultivo en medio líquido para evaluar viabilidad celular en trofozoítos de *G. duodenalis*. Un inóculo de 1,000,000 trofozoítos fue expuesto a las combinaciones diádicas de Mtz-Ntz (A) y Ntz-Abz (B) Qnc-Abz (C) Abz-Mtz (D) Ntz-Qnc (E) Abz-Fzd (F) e incubados 24 hrs a 37 °C. Los datos expresados corresponden al promedio de cuatro experimentos independientes.

**Figura 4.** Curvas dosis-respuesta empleando el método de subcultivo en medio líquido para evaluar viabilidad celular en trofozoítos de *G. duodenalis*. Un inóculo de 1,000,000 trofozoítos fue expuesto a las combinaciones diádicas de Mtz-Qnc (A) y Fzd-Qnc (B) Fzd-Ntz (C) Mtz-Fzd-(D) e incubados 24 hrs a 37 °C. Los datos expresados corresponden al promedio de cuatro experimentos independientes.

**Figura 5.** Comparación de las Interacciones Farmacológicas obtenidas en trofozoítos de *G. duodenalis* expuestos a 10 diferentes combinaciones diádicas de los fármacos de mayor uso en Giardiosis.

**Figura 6.** Curvas dosis-respuesta empleando el método de subcultivo en medio líquido para evaluar viabilidad celular en trofozoítos de *G. duodenalis*, resistentes a Metronidazol.

**Figura 7.** Curvas dosis-respuesta empleando el método de subcultivo en medio líquido para evaluar viabilidad celular en trofozoítos de *G. duodenalis*, resistentes a Albendazol.

**Figura 8.** Curvas dosis-respuesta empleando el método de subcultivo en medio líquido para evaluar viabilidad celular en trofozoítos de *G. duodenalis*, resistentes a Furazolidona.

## ABREVIATURAS

Abz	Albendazol
CCD	Conteo Celular Directo
CLM	Concentración Letal Mínima
Cm	Centímetros
D.E.	Desviación Estandar
DL50	Dosis letal para el 50% del cultivo
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensayo de inmunoabsorbente acoplado a enzima
Fzd	Furazolidona
<i>G.duodenalis</i>	<b><i>Giardia duodenalis</i></b>
ICF	Indice de Concentración Fraccional
I.F.	Interacción Farmacológica
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar
µm	Micrometros
mg	Miligramos
ml	Militros
MM	Milimolar
Mtz	Metronidazol
Ntz	Nitazoxanida
PFOR	Proteina Ferredoxin Oxido Reductasa
Qnc	Quinacrina
SCML	Subcultivo en Medio Líquido
TA	Temperatura Ambiente
Tfz	Trofozoítos
TYI-S-33	Medio Tripticasa (T), extracto de levadura (Y), fierro (I), suero (S)
g	Gravedades

## RESUMEN

Los agentes quimioterapéuticos empleados en casos de giardiosis incluyen drogas de diversa naturaleza química como los 5-nitroimidazoles (metronidazol, Mtz), 5-nitrofuranos (furazolidona, Fzd), 5-nitrotiazoles (nitazoxanida, Ntz), acridinas (quinacrina, Qnc) y bencimidazoles (albendazol, Abz), constituyendo hasta ahora el principal recurso práctico para el control de esta infección. Estos compuestos también presentan mecanismos de citotoxicidad relativamente diferentes. Sin embargo, además de presentar efectos colaterales diversos, actualmente se ha observado un incremento de casos clínicos refractarios al tratamiento con varios de estos fármacos, particularmente metronidazol y albendazol, lo cual indica la necesidad de optimizar su potencial terapéutico. Una estrategia útil en este sentido ha sido el empleo de combinaciones de dos fármacos con distinto mecanismo de acción, que mejoren o potencien el efecto que se presenta con cada droga por separado.

Con el fin de abordar este último aspecto, trofozoítos de *Giardia duodenalis* fueron expuestos *in vitro* a combinaciones diádicas de fármacos que implicaron Mtz o Abz combinado con Qnc, Fzd o Ntz. El análisis de las interacciones farmacológicas se realizó obteniendo curvas dosis-respuesta considerando la viabilidad celular evaluada mediante subcultivo en medio líquido y empleando fracciones de la concentración letal mínima (CLM), para cada fármaco incluido en la combinación, calculándose así los nuevos valores correspondientes de CLM. El tipo de interacción (sinergismo, aditividad, indiferencia, antagonismo) se determinó calculando el valor del índice

concentración fraccional (ICF) para cada combinación analizada. Una vez obtenidos los resultados, las combinaciones con menor valor de ICF se probaron en cultivos resistentes a Metronidazol, Albendazol y Furazolidona, obtenidos previamente en nuestro grupo de trabajo.

Los datos obtenidos mostraron que la combinación Mtz-Fzd presentó el menor valor de ICF (sinergismo) coincidiendo con una combinación prácticamente equimolar de las drogas, siguiendo en efectividad las combinaciones Fzd-Ntz, Fzd-Qnc y Mtz-Qnc (aditividad). Por su parte, las combinaciones Abz-Fzd, Ntz-Qnc, Abz-Mtz, Qnc-Abz y Ntz-Abz presentaron valores de ICF más altos (indiferencia). La única combinación que presentó antagonismo fue Mtz-Ntz. En cepas resistentes para metronidazol 23  $\mu\text{M}$ , las combinaciones Mtz-Fzd y Fzd-Qnc presentaron indiferencia farmacológica y Fzd-Ntz presentaron antagonismo, no encontrándose así efecto de las combinaciones en esta cepa.

Para la cepa resistente a albendazol 5.6  $\mu\text{M}$ , las combinaciones probadas fueron Fzd-Mtz, Fzd-Ntz obteniendo aditividad al combinar estos fármacos, y en el caso de Fzd-Abz se observó antagonismo. Así se observaron interacciones significativas en esta cepa en ausencia de albendazol.

La última cepa resistente evaluada fue Furazolidona 5.2  $\mu\text{M}$ , en la cual los resultados obtenidos fueron muy parecidos a los obtenidos para la cepa WB. Así para la combinación Fzd-Mtz presentó sinergismo, mientras que para Fzd-Ntz y Fzd-Qnc el resultado fue aditividad.

De manera global la furazolidona, presentó la mejor efectividad como elemento de las combinaciones, el metronidazol, nitazoxanida y albendazol

fueron los más ineficaces en las combinaciones contrastando con el hecho de ser los más efectivos cuando se emplean individualmente.

Estas observaciones, en su conjunto, aportan información novedosa en relación con las interacciones entre drogas con distinto mecanismo de acción contra trofozoítos de *Giardia* y ofrecen buenas perspectivas para su empleo en casos de giardiosis experimental y clínica.

# I INTRODUCCIÓN

## 1.0.- GENERALIDADES DE *G. duodenalis* Y LA GIARDIOSIS

Los parásitos son los organismos que obtienen el alimento y protección de otros seres vivos que son los hospederos. Pueden ser transmitidos de animales a los seres humanos, de seres humanos a otros humanos, o de seres humanos a los animales. Varios parásitos han surgido como causantes de enfermedades adquiridas por los alimentos y el agua. Los parásitos viven y se reproducen dentro los tejidos finos y los órganos de hospederos humanos y animales infectados, y de estos se excretan a menudo en heces. Los parásitos son de diversos tipos y diferente tamaño y van desde organismos minúsculos, microscópicos (protozoos) a otros más grandes y multicelulares (hongos, helmintos y artrópodos) que se pueden observar a simple vista.

Los estudios para control de las infecciones por protozoarios parásitos se han centrado en el desarrollo de una quimioterapia eficaz y en evitar la resistencia de la droga en el tratamiento de los tres protozoos anaerobios más importantes que infectan centenares de millones de gente por todo el mundo. *Giardia duodenalis* es una causa de la diarrea severa y debilitante, especialmente en niños y jóvenes, *Entamoeba histolytica* causa absceso améptico en hígado y disentería, *Trichomonas vaginalis* es un parásito transmitido sexualmente y es una causa importante de la infertilidad en la mujer (Carrera *et al.*, 1999).

En México se han registrado altos índices de infecciones intestinales causadas por protozoarios parásitos. Esto se debe principalmente a la presencia de

múltiples factores de riesgo asociados con las condiciones socioeconómicas precarias de una gran parte de la población mexicana (Argüello, 1991). En este trabajo se aborda el estudio de *G. duodenalis*, posiblemente el protozooario intestinal de mayor frecuencia en infecciones asociadas a diarrea en nuestro medio.

## 1.1.- TAXONOMÍA Y CLASIFICACIÓN

Entre las parasitosis intestinales que afectan con mayor frecuencia al ser humano se encuentra la Giardiosis, cuyo agente etiológico es el protozooario parásito *Giardia sp.* Este protozooario fue descubierto por el holandés Anthony Van Leeuwenhoek en 1681, quien usó sus heces como material de estudio (Dobell, 1920). En 1859, W. Lambl, fue quien dio la primera descripción del parásito, al observarlo en evacuaciones diarreicas de un niño con enteritis. Blanchard, treinta años mas tarde, denomina a la enfermedad como lambliasis. Kofoid y Christiansen (1915) proponen el nombre de *Giardia lamblia* para este protozooario en honor al profesor A. Girad de Paris y al Doctor F. Lambl de Praga, quienes realizaron estudios detallados sobre la descripción morfológica de éste parásito (Adam, 2001; Chester. *et al.*, 1992).

Los protozoarios se han clasificado tradicionalmente por su morfología en: flagelados, ciliados, amibas y esporozoarios. (Hickman *et al.*, 1988). *G.duodenalis* se encuentra dentro de los protozoarios flagelados. (Pertenece al Subphylum Sarcomastigophora (comprende organismos cuya locomoción es efectuada por flagelos, pseudópodos o ambos), Superclase Mastigophora (solo protozoarios flagelados), Clase Zoomastigophorea (cloroplastos ausentes), Orden Diplomonadida (organismos que poseen dos cariomastigoforos, cada

uno con 4 flagelos, dos núcleos), Familia Hexamitidae (seis u ocho flagelos, dos núcleos, simetría bilateral y en algunos casos axostilos y cuerpos medios o parabasales), (Adam, 2001). Recientemente, Tovar y colaboradores, 2003, demostraron que *Giardia* tiene vestigios de organelos mitocondriales (mitosomas)

*G. duodenalis* está considerado actualmente como el organismo eucariota más primitivo con base en comparaciones filogenéticas de la secuencia del ARN ribosomal 16S, ya que es más pequeña que la de los otros eucariontes e incluso que la de las eubacterias y presenta un gran parecido con las secuencias de las arqueobacterias (Sogin *et al.*,1989)

Este protozoo coloniza el intestino delgado de los hospederos susceptibles y ocasiona en ellos la infección denominada giardiosis, la cual también afecta a mamíferos, aves, reptiles y anfibios (Adam, 1991).

Filice (1952) realizó la clasificación del género basándose en criterios como la especificidad del hospedero, las dimensiones del cuerpo y las variaciones en estructuras:

***G. agilis***, que se aloja en anfibios, posee forma alargada, (20-30 $\mu$  X 4-5  $\mu$ m) y tiene dos estructuras denominadas cuerpos medianos que semejan gotas de agua.

***G. muris***, que parásita murinos y aves pequeñas, tiene forma redonda (9-12 X 7 $\mu$ m) y dos cuerpos medianos ovales.

***G. duodenalis***, especie que se encuentra en muchos vertebrados incluyendo al hombre, (9 a 21  $\mu$ m X 5 a 15  $\mu$ m), la cual presenta una morfología piriforme, ventralmente aplanada y un cuerpo mediano en forma de martillo.

Actualmente, por medio de estudios de microscopía electrónica se han descrito tres nuevas especies que son: *G. psittaci*, infecta al periquillo australiano, *G. ardae* que infecta garzas y *G. microti* que infecta específicamente ratas de campo o silvestres (Adam, 2001).

Debido a la importancia de los protozoarios del Género *Giardia* desde un punto de vista evolutivo, se han estudiado con la finalidad de establecer su posición filogenética.

## 1.2- ENTIDADES MORFOLÓGICAS DE *Giardia*

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

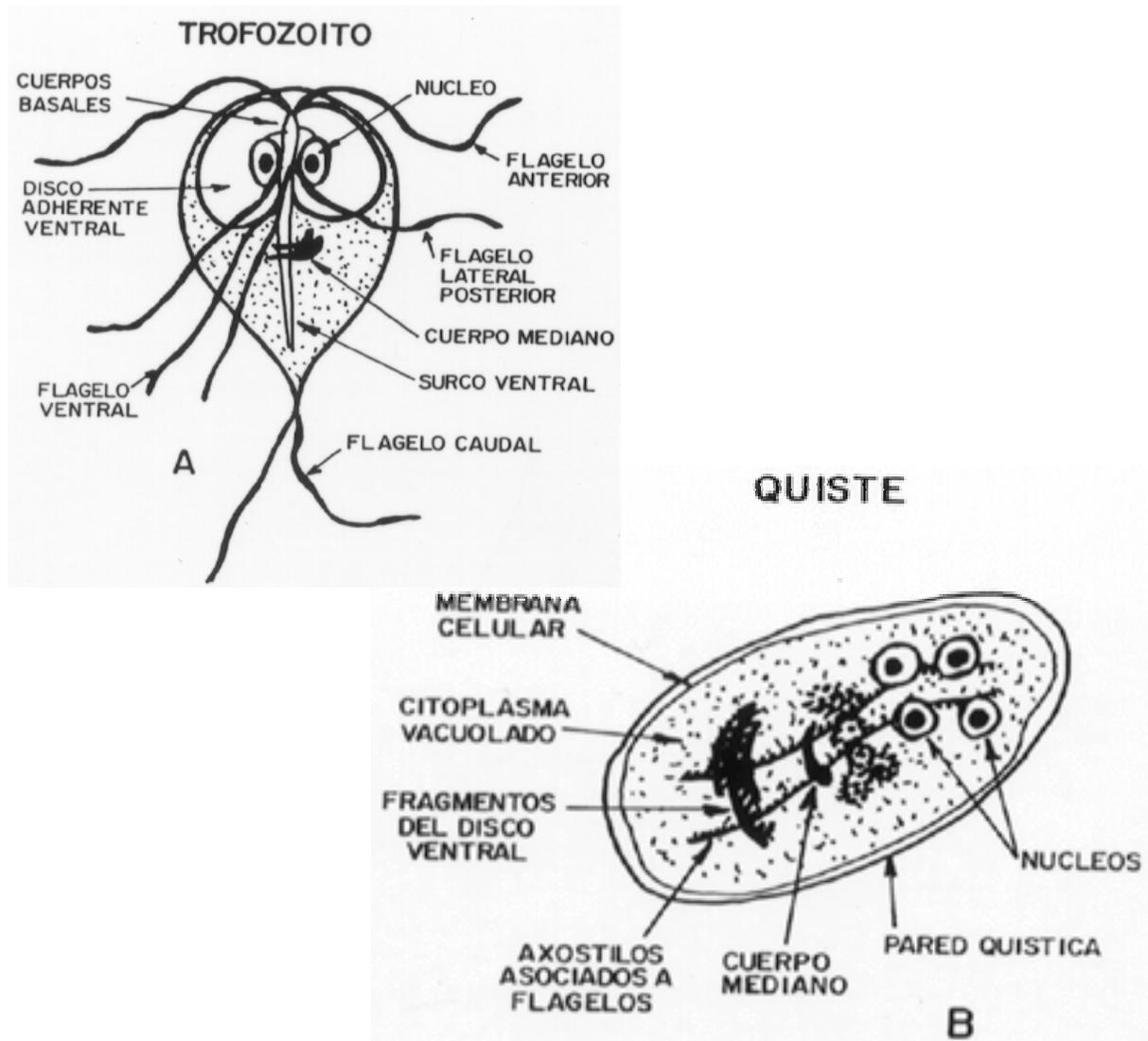


Figura 1. Fase de Trofozoíto (A) y de Quiste (B) del parásito *G. duodenalis*

Morfología del Trofozoíto: El trofozoíto (figura 1-A) presenta simetría bilateral en forma de pera y varía en tamaño de 9 a 21  $\mu\text{m}$  de largo por 5 a 15  $\mu\text{m}$  de ancho. Su dorso es cóncavo y en la parte ventral tiene un disco succionador superficial cóncavo, el cual parece ser de gran importancia en la patogenicidad del organismo, pues es una estructura rica en  $\alpha$ -actina, miosina y tropomiosina que le permite la adhesión a las microvellosidades intestinales. Además, se distingue por la presencia de la proteína giardina (Peattie *et al.*, 1989) así como por su gran cantidad de microtúbulos organizados en espiral. Tiene dos núcleos y cuatro pares de flagelos (anteriores, posteriores, ventrales y caudales), se mueve en forma irregular balanceándose con sus flagelos. Este parásito tiene dos núcleos idénticos (sin nucléolos) localizados en la mitad anterior del organismo, un citoplasma con vacuolas lisosómicas, ribosomales y gránulos de glicógeno. Se divide por fisión longitudinal binaria y se enquista conforme las heces líquidas se deshidratan en forma gradual durante su paso por el intestino. Entre los elementos que estimulan el enquistamiento *in vitro* se encuentran soluciones de lipoproteínas y colesterol con albúmina sérica bovina en substitución del suero bovino normalmente utilizado en el medio de cultivo (Reinner *et al.*, 1995), así como también se ha visto que existen lecitinas que pertenecen a la dieta normal y favorecen este proceso (Ortega *et al.*, 1994).

Morfología del Quiste: Los quistes (figura. 1-B) son elipsoides y miden de 8 a 12 $\mu\text{m}$  y de 6 a 10 $\mu\text{m}$  de ancho. Los quistes inmaduros tienen dos núcleos y los maduros cuatro. La separación de los contenidos de la pared del quiste son una característica diagnóstica: Los quistes contienen los flagelos retráctiles en

axonemas que se encuentran en cuatro pares de cerdas curvadas, un cuerpo mediano y fibrillas. La pared del quiste, hialina y dura es secretada a partir del citoplasma condensado, los órganos internos se van plegando y la formación del disco succionador ocurre conforme el quiste ingerido va madurando y se producen dos trofozoítos gemelos idénticos con el desenquistamiento en el duodeno. Los quistes de *Giardia* se destruyen con facilidad cuando se desecan, pero permanecen viables a 21°C durante un mes y por períodos más largos cuando el clima es frío (Goldsmith, 1995)

### **1.3.- CICLO DE VIDA**

*Giardia* presenta un ciclo de vida simple: (1) La infección del hospedero inicia cuando el quiste es ingerido a través de agua, alimentos contaminados con heces fecales o por contacto de persona a persona. (2) Después de que el quiste es ingerido, desenquista en forma de trofozoíto debido a la alta acidez gástrica, a la presencia de enzimas hidrolíticas como proteasas pancreáticas (Ward *et al.*, 1997) seguida por la brusca elevación del pH propio del intestino y a la temperatura interna corporal de 37°C (Schaefer, 1990). (3) El trofozoíto se adhiere directamente sobre el borde de las microvellosidades epiteliales del intestino delgado (duodeno o yeyuno) por medio de un disco ventral adherente, en este lugar se replica por fisión binaria longitudinal y de cada quiste emerge un trofozoíto tetranucleado, lo que incrementa la cantidad de trofozoítos (4) (responsables de los síntomas de la giardiosis: diarrea y malabsorción) y algunos de ellos son liberados en las heces (Adam 1991, 2001). (5) Los organismos se redondean, formando una pared quística hacia la parte distal del intestino delgado y los quistes se eliminan por medio de las

heces. Los quistes eliminados maduran en horas y permanecen viables varios días, a temperaturas de 12 a 22°C, los quistes permanecen viables hasta por 66 días (Bingham *et al.*, 1979). (5) El quiste es relativamente resistente a las condiciones ambientales como cambios de temperatura y deshidratación, lo cual le permite sobrevivir en la intemperie hasta que son ingeridas por un nuevo hospedero, completando así el ciclo. (Schupp, *et al.*, 1990).

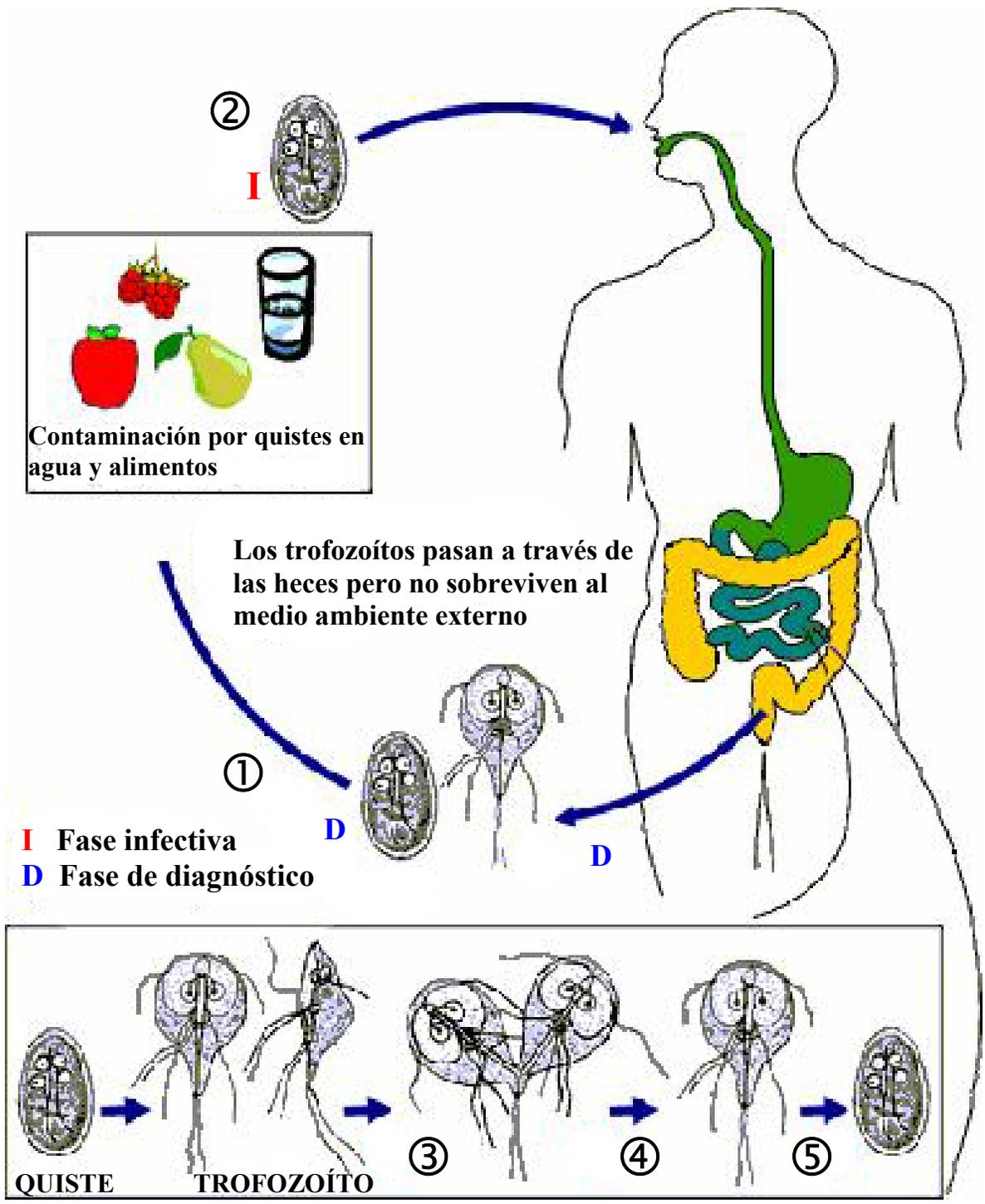


Figura 2. Ciclo de vida de *G. duodenalis*. (Tomado de [www.dpd.cdc.gov/dpdx/default.html](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/default.html))

#### 1.4.- TRASMISIÓN Y PATOGENICIDAD

La giardiasis se caracteriza por síntomas gastrointestinales que van desde diarrea aguda que se cura espontáneamente, hasta un trastorno crónico con episodios diarreicos y estados ocasionales de mala absorción (Craig y Sitzel, 1984).

Los factores de transmisión de la giardiosis incluyen: la contaminación del agua y alimentos con quistes, la defecación al ras del suelo en áreas urbanas y rurales, el contacto persona-persona, en condiciones de baja higiene, el uso de letrinas inadecuadas, el riego de hortalizas con aguas negras. Esta parasitosis es una zoonosis, existen reservorios como animales domésticos (gatos o perros) o silvestres (castores) y tan solo se necesita ingerir de 15 a 100 quistes para ser infectado (Carrada, 1984 a). En Australia se han detectado casos de personas infectadas por nadar en el mar y estar en playas contaminadas. La infección por insectos podría ser otra forma de adquirir la enfermedad ya que se ha demostrado experimentalmente que los quiste de *G. duodenalis* sobreviven al intestino de las moscas, sin embargo esta forma de transmisión es aun desconocida (Boreham *et al.*, 1990).

La presentación asintomática involucra un portador aparentemente sano que excreta quistes, pero con absorción intestinal subclínica deficiente (Coello-Ramírez, 1981).

La transmisión oro-fecal directa de *Giardia* ocurre con la exposición directa de las heces que se encuentran en la comida, agua o suelo con el propio sujeto o al ser tomados objetos directamente con las manos y éstas ser llevadas a la boca. Se presenta principalmente en zonas carentes de higiene y dentro del grupo familiar, así como en comunidades donde los niños asisten a guarderías (WHO, 1986).

Las infecciones crónicas se caracterizan por presentar esteatorrea que acompaña un síndrome de mala absorción 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 período de incubación oscila entre 7 y 21 días (Knight, 1980). El amplio espectro de la respuesta clínica puede ser atribuido a la variación en la virulencia de los aislados de *Giardia*, a factores del hospedero tales como la respuesta inmune o bien una combinación de los dos. *Giardia* provoca alrededor de un 7 % de casos de diarrea aguda y del 11-45 % de casos de diarrea crónica, y menos del 50 % de pacientes sintomáticos presentan evidencias bioquímicas de malabsorción de carbohidratos, grasas y micronutrientes, aunque también suele ser responsable del desarrollo y crecimiento retardado en niños. El mayor impacto clínico de este parásito es en infantes y niños, durante los primeros 3 años de vida, en estados de desnutrición y en pacientes inmunocomprometidos. (Farthing *et al*, 1986; Sullivan *et al*, 1991).

Este parásito es el más identificado en la epidemias diarreicas en donde están implicadas fuentes de agua (WHO, 1986). Incluso hay brotes de infección en lugares donde las personas toman agua de riachuelos donde el agua corre o en montañas donde es cristalina; esto se da por la defecación de animales o

visitantes de esos lugares. En climas fríos los quistes pueden sobrevivir en el agua por meses aunque las grandes epidemias se han asociado con el agua contaminada. La ruta oro-fecal es la mayor fuente de infección particularmente en ciudades donde el agua es cálida o donde hay drenajes ineficientes y no recircula el agua (Upcroft and Upcroft, 2001).

Entre los alimentos más comúnmente contaminados con quistes de *Giardia* se encuentran las frutas y verduras como la fresa o la lechuga (Bier, 1991) ya que el agua contaminada se utiliza para el riego. En México puede ser un factor importante de transmisión dado el uso de aguas negras en el riego de estos productos que suelen comerse crudos. Los quistes de *Giardia* sobreviven en agua fría (4°C) hasta por lo menos dos meses, por lo que se cree que los productos perecederos que se guardan refrigerados pudieran tener quistes de *Giardia* (WHO, 1986).

En los últimos años se ha incrementado la infección de *G. duodenalis* por medio de las relaciones sexuales principalmente en homosexuales. Los quistes de este protozooario se adquieren muy probablemente con el contacto anal y perineal y subsecuentemente se transmiten por vía oral. En un estudio realizado en Australia, en la población de hombres homosexuales se encontró que el 4% de 143 sujetos estaban infectados (Boreham *et al.*, 1990).

La giardiosis humana presenta un espectro patológico amplio, desde la infección asintomática, es decir, a pesar de que exista una infección intestinal por *G. duodenalis* puede pasar desapercibida, y solo ocasionar trastornos

intestinales transitorios que no ameritan ser manejados con medicamento alguno. (Chester *et al.*,1992).

La giardiosis es una infección intestinal en la cual *G. duodenalis*, origina una serie de alteraciones morfofisiológicas. La invasión de las criptas glandulares del duodeno-yeyuno por *G. duodenalis*, aunque su número sea elevado, no produce irritación aparente. Estos parásitos no invaden los tejidos, pero sí se alimentan de las secreciones de la mucosa y en la mayor parte de los casos son aparentes “comensales“ en su relación con el huésped (Chester *et al.*, 1992).

Esta infección se presenta en la mayoría de los niños y existen también pacientes sintomáticos con diarrea de evolución aguda o crónica con heces espesas o esteatorreicas que contienen gran cantidad de moco y grasa (Chester *et al.*,1992).

## **1.5.- EPIDEMIOLOGÍA**

Desde el punto de vista epidemiológico, la giardiosis tiene distribución cosmopolita y está ubicada entre las 20 principales enfermedades infecciosas particularmente en países en vías de desarrollo como África, Asia y Latinoamérica en las cuales la parasitosis es endémica y especialmente en lugares donde el clima es templado y húmedo (Chester *et al.*, 1992, Goldsmith, 1995) En México, *Giardia* es el parásito entérico diagnosticado con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos. Por lo general, afecta a la

población infantil en etapa preescolar y lactantes los cuales son más susceptibles que los adultos. (Warren, 1988; IMSS, 1990).

Algunos lugares de alto riesgo para viajeros incluyen la Unión Soviética, sureste y sur de Asia, oeste y centro de África, México y oeste de Sudamérica. (Goldsmith, 1995)

En México, el impacto de la giardiosis es muy alto. Si bien hacia mediados de los 1990s las campañas de difusión contra *Vibrio cholerae* abatieron colateral y temporalmente las tasas de giardiosis, éstas han vuelto a elevarse de tal forma que entre 2,000-5,000 casos sintomáticos son reportados mensualmente a nivel del Sector Salud (DGE-SSA, 1990-2001). Entre 1977 y 1985 se observó una variabilidad circanual de la incidencia, con una cresta en la tercera semana de julio y un promedio mensual superior al promedio en los meses de mayo a septiembre, y una tendencia ascendente con los años (Hermida *et al.*, 1990) En la década de 1980s, se reportaron tasas de incidencias aún mayores del 60 % en varias regiones metropolitanas y conurbadas de la Ciudad de México (Coello-Ramírez, 1981; Dueñas-López, 1984). Por su parte en el periodo de 1990-1995 se observaron en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” tasas de incidencia global del 37 % en niños, de los cuales fueron: 21.4 % lactantes, 41.7 % de edad preescolar, 27.9 % de edad escolar y 9.0 % adolescentes (Bernal y cols., 1995)

En años recientes se le ha dado importancia médica al protozooario *G. duodenalis* como patógeno, a la vez que los datos epidemiológicos nacionales

lo han identificado entre los agentes de parasitosis intestinal más frecuente (IMSS, 1990). En Estados Unidos de Norteamérica se ha identificado a *G. duodenalis* como el patógeno más común durante 1972-1981 (Craig y Sitzel, 1984). La incidencia de esta parasitosis intestinal se ha reportado que es del 2 % al 12 % de la población mundial (Smith *et al.*, 1982). En México se calcula que hay nueve millones de personas parasitadas por *G. duodenalis*, siendo este protozooario la causa más común de parasitosis intestinal (Biagi, 1983).

En lo que respecta a la asociación de la giardiosis con factores de riesgo en nuestras comunidades, Tay y cols. (1994) han reportado una prevalencia de la giardiosis en nuestro país de alrededor del 22 %, semejante a décadas anteriores, como consecuencia de factores de hábitos higiénicos y alimentarios deficientes, malas condiciones sanitarias y fecalismo al aire libre. En comunidades de Morelos, hasta el 20 % de individuos de 1-14 años de edad que habitan regiones donde se practica la irrigación con aguas residuales, presentaron infección por *Giardia* (Cifuentes y cols., 2000). Incluso se han observado incidencias de hasta un 82 % de residentes en asentamientos de la frontera norte sin servicios de agua y drenaje, interesantemente, la mayoría de los individuos presentaron infección crónica pero asintomática (Redlinger y cols., 2002).

## **1.6.- CUADRO CLÍNICO**

La giardiosis humana presenta un espectro patológico amplio, desde la infección asintomática, solo ocasiona trastornos intestinales transitorios que no ameritan ser manejados con medicamento alguno.

Existen también pacientes sintomáticos con diarrea de evolución aguda o crónica con heces espesas o esteatorreicas que contienen gran cantidad de moco y grasa (Chester *et al.*, 1992). Se ha observado que los sujetos con giardiosis sufren una colonización bacteriana del intestino delgado (duodeno) y presentan niveles notablemente elevados de ácidos biliares libres, provocando la descoagulación de las sales biliares impidiendo así, la absorción de grasas causando la esteatorrea (Tandon *et al.*, 1977). También presentan irritación duodenal con excesiva secreción de moco acompañado con dolor abdominal. Así mismo pueden presentar verdaderos cuadros de mala absorción intestinal con afectación del estado nutricional (anorexia). Este tipo de personas pierde peso como resultado de la deshidratación constante y pérdida del apetito, Otros síntomas son el vómito, fiebre, cefalea, flatulencias, cansancio (García and Larracilla, 1983; Carrada, 1984b; Chester *et al.*, 1992).

El periodo de incubación de la giardiosis por lo general es de 1 a 2 semanas y el lapso entre la infección y el inicio de los síntomas es cercano a 15 días; la infección en humanos es de duración corta (3 meses como máximo) y la fase aguda suele durar de tres a cuatro días. La giardiosis no es mortal en humanos (Carrada, 1984 a).

## 1.7.- DIAGNÓSTICO

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

La giardiosis es diagnosticada tradicionalmente por exámenes coproparasitológicos para hallar quistes o trofozoítos en heces diarreicas o quistes en heces formadas, con una positividad entre el 97 y 100 % (WHO, 1986). Debido al mecanismo de adherencia del parásito a la mucosa intestinal mediante su disco ventral, es posible que se puedan examinar series de cinco a seis muestras de heces sin que se pueda observar el protozoo (PAC Infecto, 1998), por lo que es recomendable repetir el procedimiento, para tener un mayor grado de confianza. Las muestras se examinan por microscopia fijadas con alcohol polivinílico o formalina y se tiñen con tricomo o hematoxilina de hierro, posteriormente se concentran con formalin-etil-acetato o sulfato de zinc. El examen microscópico de las heces para detectar quistes y trofozoítos es usualmente la primera prueba de diagnóstico que se realiza en pacientes cuando se sospecha que padecen giardiosis (Adam, 1991).

El estudio de líquido duodenal es una buena alternativa con una efectividad del 100 % (WHO, 1986). La prueba es llamada “entero-test” o “string test” y consiste en la obtención de líquido y moco duodenal a través de una cápsula de gelatina con una pesa de plomo que contiene un hilo de nylon de 90-140 cm de largo. El paciente ingiere la cápsula con el extremo libre del hilo adherido a la mejilla. Después de 4 horas, se extrae el hilo, para examinarlo al

microscopio y detectar los trofozoítos del líquido duodenal (González de la Rosa *et al.*, 1999).

Otro método como la biopsia de la mucosa duodenal puede ser el método de diagnóstico más sensible (100%) ya que permite la colecta de trofozoítos, pero es un método poco accesible por ser costoso e invasivo (WHO, 1986; González de la Rosa *et al.*, 1999).

Por otro lado se pueden llevar a cabo pruebas serológicas en las cuales se detectan anticuerpos o antígenos específicos de *Giardia lamblia*. Así, se han desarrollado exámenes como el de ELISA (prueba de inmunoensayo enzimático) puede detectar la presencia de un antígeno de 65kDa (GSA-65). Este último es una glicoproteína producida por el parásito en el duodeno y siempre está presente en las heces de los individuos infectados, independientemente de la forma de eliminación de la *Giardia* (trofozoíto o quiste). El copro ELISA presenta una alta sensibilidad (93-97 %) con una especificidad del 100 % sin embargo estos métodos no son aún rutinarios en el diagnóstico (García and Larracilla, 1983; González de la Rosa *et al.* , 1999).

## **2.0.- TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO**

La piedra angular del control de la giardiosis es el tratamiento basado en el empleo de agentes quimioterapéuticos efectivos. Con el desarrollo de las técnicas de síntesis química se han utilizado una serie de agentes de diversas familias químicas, cuyo empleo para el caso de infecciones por *Giardia* ha

sido en un principio circunstancial y no basado en un diseño racionalizado sobre el efecto hacia este parásito. De estos fármacos los más utilizados se encuentran clasificados en distintas familias químicas que incluyen a los 5-nitroimidazoles como el metronidazol (Mtz), 5-nitrofuranos como la furazolidona (Fzd), acridinas como la quinacrina (Qnc), bencimidazoles como el albendazol (Abz) y 5-nitrotiazoles como la nitazoxanida (Ntz). Si bien los agentes mencionados son generalmente eficaces, presentan algunos inconvenientes como son: a) la presencia de efectos secundarios, b) la presencia creciente de casos refractarios al tratamiento con estos agentes (Gardner and Hill, 2001). A continuación en la Tabla 1 se mencionan sus características más importantes.

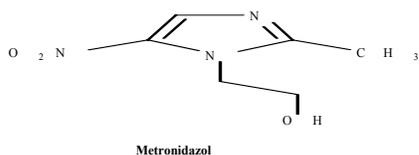
TABLA 1. Regímenes de tratamiento comúnmente usados para la giardiosis.

DROGA	DOSIS (ADULTOS)	DURACIÓN (Días)	EFICACIA %	DOSIS (NIÑOS)	DURACIÓN (Días)	EFICACIA %
<b>Albendazol*</b>	200-400 mg/día	5-7	94-100	15 mg/Kg/día	5-7	94-100
<b>Furazolidona*</b>	400 mg/día	7-10	80-85	8 mg/Kg/día	7-10	81-96
<b>Metronidazol*</b>	500-750 mg/día	5-10	60-95	15-22.5 mg/Kg/ día	5-10	80-100
<b>Nitazoxanida✓</b>	500 mg / 2 día	3	81	100-200 mg	3	85
<b>Paromomicina*</b>	10-50 mg/Kg/día	5-10	55-88	30 mg/Kg/día	3	55-80
<b>Quinacrina*</b>	300 mg/día	5-7	95-100	6-8 mg/Kg/día	7-10	81-96
<b>Tinidazol*</b>	1.0-2.0g	Dosis única	74-100	50 mg/Kg	Dosis única	80-96

\* Gardner and Hill, 2001.

✓Ortiz *et al.*, 2001 y Rossignol *et al.*, 2001.

## 2.1.- METRONIDAZOL:



Esta droga es un 5-nitroimidazol (2-metil-5-nitroimidazol-1-etanol) que tiene actividad contra la mayor parte de bacterias anaerobias y diversos protozoarios. Hacia

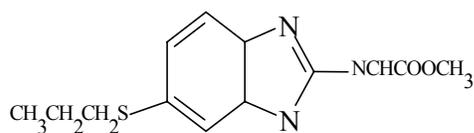
1962 se reportó que el metronidazol se podría utilizar para tratar la giardiosis (Darbon *et al.*, 1962) y desde entonces es considerado como el tratamiento de elección. En cuanto a su farmacocinética, el 80 %, es metabolizado por el hígado y excretado por los riñones. (Davidson, 1990; González de la Rosa *et al.*, 1999). La ingestión de alimentos no influye en su biodisponibilidad y la vida media del fármaco sin modificar es de 7.5 horas. Las reacciones adversas observadas con mayor frecuencia se refieren al tubo digestivo e incluyen náuseas, vómitos, calambres, diarrea, sabor metálico dolor abdominal y de cabeza. Con menor frecuencia se han reportado vértigo, ataxia, parestesias, neuropatía periférica y neutropenia. Generalmente estas reacciones desaparecen al interrumpir el tratamiento. (Craig y Sitzel, 1984).

El metronidazol es un compuesto de peso molecular bajo gracias a ello se difunde a todos los tejidos del organismo, el acceso a las células se realiza por difusión simple y no por transporte activo (Katzung, 1993). Al entrar la droga al trofozoíto de *Giardia* afecta el transporte de electrones de la Piruvato-Ferredoxina Oxido Reductasa (PFOR) la cual dona electrones al grupo nitro de la droga (Samuelson, 1999; Townson *et al.*, 1994 Upcroft and Upcroft, 1998) y ésta es activada por la reducción de dicho grupo (Samuelson, 1999; Townson *et al.*, 1994; Tracy and Webster, 1996). Los productos de esta reducción al parecer destruyen a los microorganismos al reaccionar con

diversas macromoléculas intracelulares (Katzung, 1993). Esto significa que el metronidazol reducido sirve como aceptor terminal de electrones, el cual se une covalentemente a las macromoléculas del ADN (Edwards, 1993; Muller, 1983) provocando la ruptura de la forma helicoidal de este. El metronidazol también inhibe su respiración (Farthing, 1992; Paget *et al.*, 1989) por lo que el trofozoíto muere (Gillis and Wiseman, 1996 ).

Se ha observado toxicidad, mutagénesis en bacterias y carcinogenicidad cuando se emplea en altas dosis y por períodos prolongados en ratones, así mismo se ha asociado a un alto riesgo de cáncer en humanos (Davidson, 1990; Chester *et al.*, 1992).

## 2.2.- ALBENDAZOL:



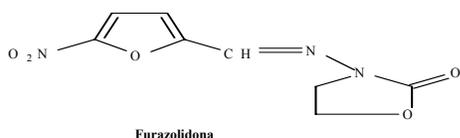
**Albendazol**

Es un fármaco, derivado de los bencimidazoles. Estos fueron obtenidos de una parte estructural de la vitamina B12 llamado 1,6-dimetil. 1-( $\alpha$ -D-ribofuranosil) bencimidazol (Thowsend and Wise, 1990).

Este medicamento se introdujo en 1982 como un antihelmintico, pero no fue hasta 1986 que se empleo para casos de giardiosis (Upcroft and Upcroft, 2001). Esta droga es capaz de unirse a proteínas contráctiles como la  $\alpha$ -tubulina del citoesqueleto del disco adherente de *Giardia*, afectando la polimerización y despolimerización de ésta (Edlind *et al.*, 1990; Morgan *et al.*, 1993; Reynoldson *et al.*, 1991)

Después de su administración oral, este fármaco se absorbe y metaboliza con rapidez, principalmente hasta sulfóxido de albendazol y, en menor grado, hasta otros metabolitos. Su vida media es de 8 a 9 horas. Los metabolitos se excretan sobre todo por la orina y sólo una pequeña cantidad por las heces. Según lo observado en la mayor parte de los estudios en animales de experimentación, no es de esperarse que el albendazol tenga efectos farmacológicos en el ser humano a las dosis orales terapéuticas. Incluso, cuando se usa albendazol por 1 a 3 días, al parecer no tiene efectos secundarios significativos. Se le han atribuido malestares epigástricos leves, diarrea, cefalalgia, náuseas, mareos, lasitud e insomnio en cerca del 6 % de los pacientes. (Katzung, 1993).

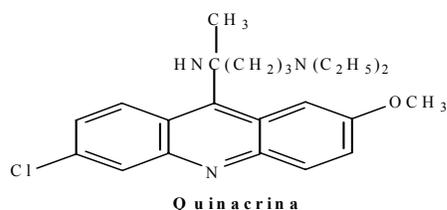
### 2.3.- FURAZOLIDONA:



Este 5-nitrofurano, (3-5-nitro-2-furanil) Es un derivado de los nitrofuranos estos constituyen un conjunto de medicamentos obtenidos por síntesis y que derivan en un núcleo químico común: el furano. En 1960 se comenzó a usar para el tratamiento de giardiosis humana con grandes beneficios (Carrera *et al.*, 1979). Como suspensión de uso oral, se emplea para combatir infecciones intestinales causadas por bacterias y el protozoario *G. duodenalis*. Se absorbe completamente por las vías digestivas de una manera rápida, en los riñones el fármaco se elimina en la orina por filtración glomerular y secreción tubular. Debido a su preparación líquida se utiliza con mayor frecuencia entre la población pediátrica. (Carrera *et al.*, 1979; Katzung, 1993). Si bien el mecanismo primario de acción de los nitrofuranos no es conocido, se sabe que

inhiben cierto número de sistemas enzimáticos diferentes, tanto en células bacterianas como de mamífero. Los nitrofuranos son selectivamente tóxicos para células microbianas, ya que en el humano no se alcanzan concentraciones séricas elevadas debido a su rápida inactivación en el hígado. (Katzung, 1993) Su mecanismo de acción no está muy bien estudiado pero este consiste en inhibir el sistema de transporte de electrones en la vía glicolítica, es decir reduce la activación en trofozoítos de *G. duodenalis* vía NADH oxidasa. Su efecto giardicida se le atribuye a la toxicidad de los productos reducidos, los cuales pueden dañar componentes celulares importantes incluyendo el ADN (Brown *et al.*, 1996; Upcroft and Upcroft, 1998). Este medicamento puede provocar náuseas, vómito, diarrea, hipersensibilidad, boca seca, cambio de coloración en la orina y puede causar hemólisis intravascular (Davidson, 1990; González de la Rosa *et al.*, 1999).

#### 2.4.- QUINACRINA:



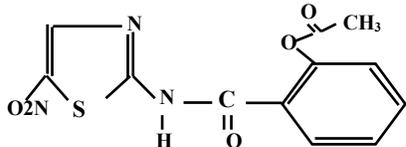
Atabrine N-4-(6-cloro-2-metoxi-9-acridinil)-N1-dietil-1,4-pentanendiamina dihidrocloruro.

Es un derivado de acridina y el principal agente sintético usado para la profilaxis antipalúdica (Katzung, 1993). Este fue el primer fármaco efectivo utilizado contra *Giardia* y tiene actividad anticestódica. (Upcroft and Upcroft, 2001). Su uso clínico actual es principalmente en malaria, teniosis y giardiosis. No obstante, esta droga no se comercializa en México, ya que inclusive se ha empleado como un método químico abortivo. Este se absorbe rápidamente por lo que se une a los tejidos y es liberado lentamente. El 10 % se excreta en la orina

Este compuesto se fija al ADN por mecanismo de intercalación y, en consecuencia, bloquea la actividad de las polimerasas de ADN y ARN, impidiendo la síntesis de ácidos nucleicos. No se conoce con exactitud si este es el mecanismo involucrado en su acción antiparasitaria. La quínacrina se administra por vía bucal y se absorbe fácilmente a nivel de intestino. Este tiende a acumularse en los tejidos y dada su eliminación lenta, se puede detectar en la orina hasta 2 meses después de interrumpir el tratamiento.

Los efectos secundarios más frecuentes incluyen cefalea, vértigo y vómito. Si esta droga se ingiere en altas dosis puede causar coloración amarilla en la piel (Davidson, 1990; González de la Rosa *et al.*, 1999)

### 2.5.- NITAZOXANIDA:



2-(acetolyloxy)-N-(5-nitro-2-Tiazolil) Es un derivado del 5-nitrotiazoles cuyo mecanismo de citotoxicidad en protozoarios parece consistir en un paso inicial de reducción del grupo 5-nitro por

enzimas tipo piruvato-ferredoxina oxidorreductasa; este radical tóxico repercute al nivel de metabolismo de carbohidratos, y posiblemente de replicación del ADN. En helmintos, este fármaco inhibe la polimerización de la tubulina. La nitazoxanida es absorbida rápidamente en el tracto intestinal, y 2 horas después de la administración se pueden detectar valores pico en sangre del orden de 1.9 µg/ml. El principal metabolito se forma rápidamente por oxidación de la cadena acetilo en 2-(hidroxi 1-N-(5-nitro 2-tiazol/benzamida) y se excreta sin cambios por orina en las siguientes 24 hrs. Las reacciones adversas más comunes son a nivel del tracto gastrointestinal, particularmente

náuseas en el 8% de los pacientes, algunas veces acompañados de cefaleas, anorexia y ocasionalmente vómito y malestar epigástrico inespecífico y dolor abdominal tipo cólico. (Katzung, 1993).

## II ANTECEDENTES

Los organismos parásitos han desarrollado mecanismos de sobrevivencia que les han permitido resistir el efecto citocida de muchos de los agentes quimioterapéuticos mencionados. La resistencia a fármacos en parásitos está definida como un incremento en la capacidad de organismos individuales dentro de una cepa a tolerar dosis de un compuesto, el cual podría ser letal para la mayoría de los parásitos en una población normal de la misma especie. Los agentes quimioterapéuticos empleados en casos de giardiosis que incluyen drogas de diversa naturaleza química, constituyen por hoy el único recurso práctico para el control de la giardiosis. Aunque estos compuestos también presentan mecanismos de toxicidad relativamente diferentes, se ha reportado un incremento de casos clínicos refractarios al tratamiento con estos fármacos.

En el campo de la giardiosis, si bien es creciente la frecuencia de casos refractarios al tratamiento, existen evidencias experimentales y clínicas que apoyan la factibilidad del uso de combinaciones de fármacos. Así, Crouch y cols. (1990), han reportado la sensibilidad *in vitro* de *G. duodenalis* a azitromicina como fármaco alternativo, así como a combinaciones diádicas de azitromicina, doxiciclina, mefloquina, tinidazol y furazolidona. Las combinaciones azitromicina–furazolidona, doxiciclina–mefloquina, doxiciclina- tinidazol y mefloquina-tinidazol presentaron inhibición de la adherencia del parásito con interacción sinérgica, por lo que podrían tener utilidad en modelos de infección. Sin embargo, se requieren estudios más detallados al respecto para establecer las combinaciones más adecuadas para

su aplicación potencial a nivel clínico. En este contexto, el estudio reportado por Cacopardo *et al.* (1995), sugirió que el albendazol por sí solo no es una efectiva terapia alternativa para casos de giardiosis refractarios al tratamiento con metronidazol. Al asociar metronidazol con albendazol, se presentó interacción sinérgica que sí permitió resolver muchos de los casos mencionados.

Los fármacos empleados en el tratamiento de la giardiosis tienen mecanismos de acción diversos; sin embargo, cabe mencionar que algunos de ellos tienen semejanzas estructurales. En particular, los derivados de imidazol, tiazol y furano presentan un grupo nitro en posición 5. Estas drogas nitroheterocíclicas presentan generación de radicales nitro por reducción de las moléculas parentales. No obstante, para las familias de nitroimidazoles y nitrofuranos el potencial terapéutico es diferente, ya que los mecanismos de resistencia observados en cultivos refractarios a la acción de estos fármacos implican rutas bioquímicas distintas (Smith *et al.*, 1988; Townson *et al.*, 1994). Por lo tanto, la gama de combinaciones a evaluar en casos de giardiosis no deja de ser cuantitativamente compleja, por lo que se requiere realizar estudios racionalizados al respecto y este aspecto se abordó en el presente trabajo.

Como un modelo útil de estudio de la aplicación de tratamiento con combinaciones de drogas, se encuentran las infecciones fúngicas. Un buen ejemplo es la nikomicina Z, un antibiótico que inhibe la síntesis de quitina en hongos e insectos, la cual se ha utilizado exitosamente a nivel experimental y clínico en combinaciones con azoles como el fluconazol y el itraconazol, drogas de mecanismo de citotoxicidad a nivel intracelular. Así, se han

observado interacciones aditivas y sinérgicas contra *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, y *Coccidioides immitis*. También se observó sinérgismo entre nikomicina Z e itraconazol contra *Aspergillus fumigatus* y *A. flavus*. Aunque los mecanismos para la interacción potenciada entre nikomicina y azoles no se conoce, se sugiere que la pérdida de integridad de la membrana causada por la nikomicina facilita la entrada de los azoles a la célula. Alternativamente, se podría interrumpir la síntesis de quitina o el transporte de precursores de la pared celular lo que facilitaría la permeación de los azoles (Li and Rinaldi, 1999).

### III JUSTIFICACIÓN

Un primer aspecto que cabe resaltar es que las drogas mencionadas se han utilizado en giardiosis en base a extrapolaciones circunstanciales, esto es, no se diseñaron inicialmente para tratar infecciones por *Giardia*. Por lo tanto, se pueden plantear 2 perspectivas racionales para el tratamiento futuro con agentes quimioterapéuticos: (a) identificar nuevas drogas giardicidas con base en estudios de modelamiento molecular y relaciones estructura-actividad, y (b) optimizar el potencial terapéutico de los fármacos disponibles actualmente.

Con relación a esto último, en años recientes ha tenido un auge importante el establecimiento de tratamientos con combinaciones de fármacos que han sido ineficaces en tratamiento único. El objeto del uso de combinaciones de drogas es poder establecer interacciones farmacológicas que potencien el efecto de cualquiera de las drogas de la combinación. Las interacciones entre compuestos descritas en la literatura implican: antagonismo, indiferencia, aditividad y sinergia. Solamente el sinergismo es un resultado deseable en términos de potenciación real del tratamiento quimioterapéutico.

Un problema concreto y actual es que se están presentando casos refractarios al tratamiento de la giardiosis, particularmente con metronidazol y albendazol. Por un lado, el metronidazol se ha empleado en una forma poco controlada y, debido a sus efectos secundarios, en muchas ocasiones el tratamiento no se concluye. Por otro lado, el albendazol si bien se ha empleado más

recientemente en México y con menores efectos secundarios, durante las jornadas denominadas Semanas Nacionales de Salud, cada niño recibe una dosis de 400 mg. de albendazol con la finalidad de eliminar infecciones por helmintos. No obstante, dada la alta prevalencia de la giardiosis en la niñez y que esta posología no es suficiente para resolver una infección por *Giardia*, se puede estar nuevamente incurriendo en el uso inadecuado de esta droga y generar así, como ya ha ocurrido en otros países, un mayor índice de casos refractarios al tratamiento. Se puede pensar que este problema es originado por dos razones: (a) la inefectividad de los agentes quimioterapéuticos utilizados, ó (b) la presencia de parásitos resistentes a drogas.

Para abordar estos aspectos, en el presente trabajo se planteo analizar el perfil de sensibilidad *in vitro* de distintos cultivos de trofozoítos de *G. duodenalis* al ser expuestos a combinaciones diádicas de drogas de los grupos mencionados anteriormente (5-ni, 5-nf, acr, bz y 5-nt). Los cultivos que se emplearon son cepas de referencia y cultivos resistentes a fármacos como albendazol, metronidazol y furazolidona. La selección de las combinaciones más efectivas se realizó aplicando metodologías para determinar índices fraccionales de concentración (ICF; Li and Rinaldi, 1999) y las correspondientes interacciones de medicamentos (sinergismo, antagonismo, aditividad e indiferencia) para su posterior aplicación en estudios de infección, considerando útiles para este fin solamente aquellas combinaciones que presenten efectos sinérgicos significativos.

Con base en lo anterior, una perspectiva interesante para el desarrollo de métodos de control para infecciones por *G. duodenalis* es el uso

combinaciones de fármacos que potencien el efecto y disminuyan los efectos colaterales para ser utilizados en la práctica clínica.

## **IV OBJETIVOS**

### **1.0.- OBJETIVO GENERAL**

**1.1.-** Analizar la sensibilidad *in vitro* de distintos cultivos de trofozoítos de *G. duodenalis* al ser expuestos a combinaciones diádicas de derivados representativos de las familias de 5-nitroimidazoles, 5-nitrofuranos, derivados de acridina, bencimidazoles y 5-nitrotiazoles.

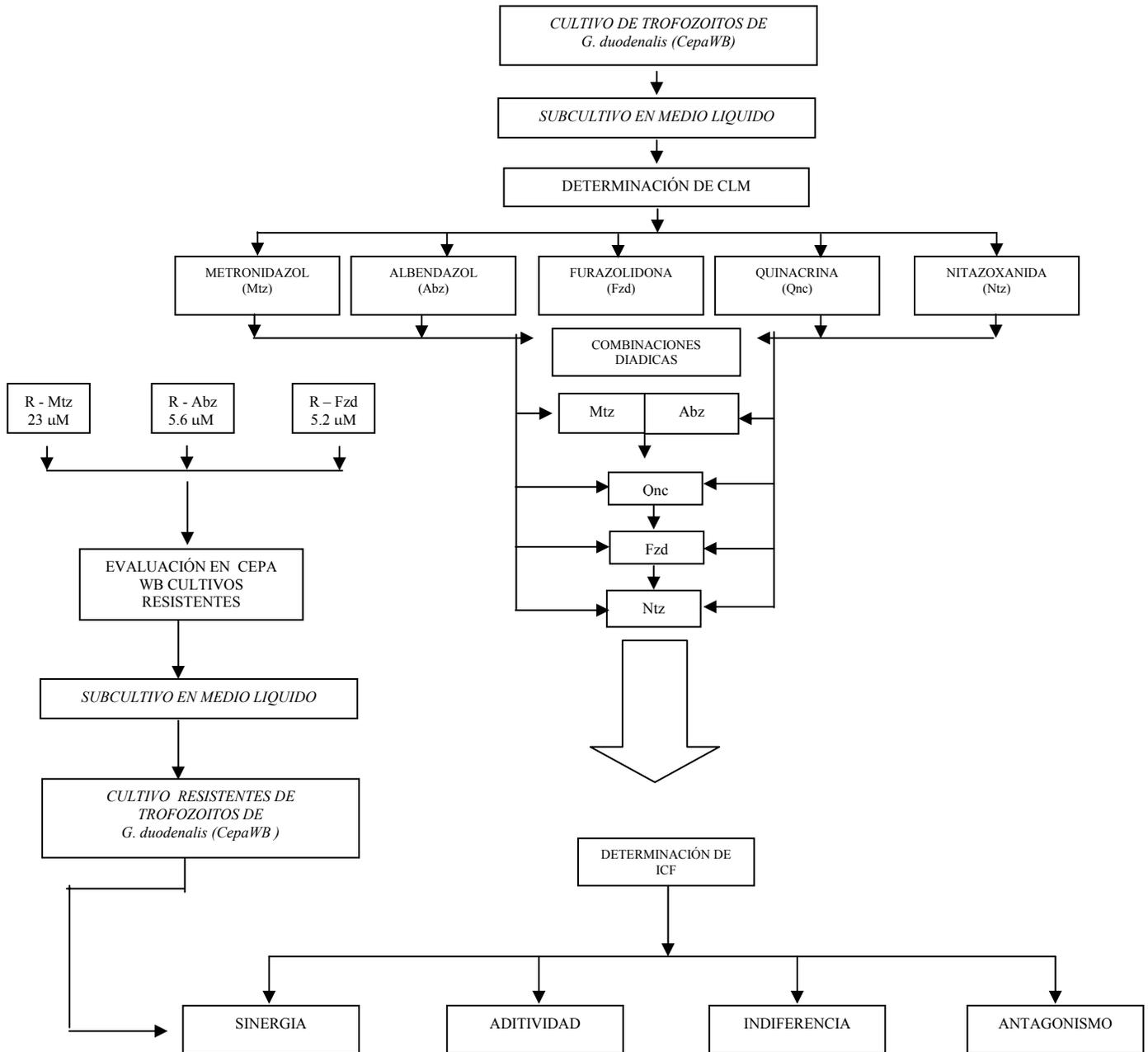
### **2.0.- OBJETIVOS PARTICULARES**

**2.1** Comparar la efectividad de las combinaciones diádicas de drogas con diferente mecanismo de acción hacia cultivos de la cepa WB de trofozoítos de *Giardia duodenalis*.

**2.2-** Determinar el tipo de interacción farmacológica (sinergismo, antagonismo, aditividad o indiferencia) que se presenta con el uso de las combinaciones mencionadas.

**2.3.-** Evaluar el efecto de estas combinaciones en cultivos de *G. duodenalis* resistentes a fármacos como albendazol, metronidazol y furazolidona.

## V ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CLM: CONCENTRACIÓN LETAL MÍNIMA  
 ICF: ÍNDICE DE CONCENTRACIÓN FRACCIONAL

## VI MATERIAL Y MÉTODOS

### 1.1.- Cultivo de Parásitos

Se emplearon trofozoítos de la cepa *G. duodenalis* WB, (American Type Culture Collection # 30957 ) que fue aislada a partir del fluido intestinal de un individuo de 27 años de edad con giardiosis sintomática refractaria a tratamientos de metronidazol y quinacrina, quien adquirió la enfermedad en Afganistán y la manifestó por dos años y medio (Smith *et al.* ,1982). También se utilizaron cultivos resistentes *in vitro* obtenidos en el Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN que presentaron tolerancia a albendazol 5.6  $\mu\text{M}$  (Cruz, 2001), metronidazol 23  $\mu\text{M}$  (Romero, 1996), y furazolidona 5.2  $\mu\text{M}$  (Molina, 2004)

### 1.2.- Cultivo de trofozoítos de *G. duodenalis*

Las cepas antes mencionadas se cultivaron en tubos de plástico de 15 ml, en viales de borosilicato de 4.5 mL o en botellas de plástico de 40 o 60 mL de acuerdo a los requerimientos experimentales. Los cultivos se mantuvieron a 37<sup>0</sup>C [incubadora Precisión modelo 4EG], hasta alcanzar la confluencia y se realizaron resiembras de los mismos cada 2 o 3 días en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar, en medio TYI-S-33 (desarrollado por Diamond *et al.*, 1978 y modificado por Keister, 1983), suplementado con suero bovino al 10 % con 1 ml de los antibióticos estreptomicina (50,000 U.I./L) - penicilina (50 mg/L). Para realizar las resiembras y cosechas, los recipientes de cultivo se enfriaron por 20 minutos o

más en baño de hielo-agua y después de agitar para homogeneizar los trofozoítos ya despegados de las paredes dentro del recipiente, se decanto el medio sustituyéndolo con medio nuevo. Dicho cultivo en ocasiones, en vez de ser decantado, fue cosechado para los diferentes ensayos realizados.

### **1.3.- Agentes quimioterapéuticos:**

Los agentes químicos empleados fueron el metronidazol, albendazol, furazolidona, quinacrina (Sigma Chemical Co., St. Louis U.S.A), y nitazoxanida (Lab. Columbia S.A. De C.V.). Los fármacos fueron disueltos en dimetil sulfoxido (DMSO) como soluciones de trabajo. (Ver Apéndice 1.2).

### **1.4.- Evaluación de viabilidad celular por subcultivo en medio líquido.**

Este método se baso en el propuesto por Hill y cols. (1986), en donde las botellas se enfriaron en un baño de hielo-agua por un lapso de media hora, para lograr el desprendimiento total de las células que se encontraban pegadas a la pared de las botellas. Se tomo una muestra en esterilidad y se efectuó un conteo celular en el microscopio óptico, con cámara de Neubauer para inocular 1,000,000 trofozoítos en viales de vidrio de borosilicato de 4.5 mL. Posteriormente se añadió medio fresco TYI-S-33 y se inoculo con las diferentes concentraciones de las combinaciones de fármacos a evaluar se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido las 24 hrs se realizo el mismo procedimiento descrito anteriormente colocando 100,000 trofozoítos/mL en viales de vidrio y se añadió igualmente medio fresco sin ningún compuesto a evaluar e incubándose por 48 hrs a 37°C. Simultáneamente se inocularon en viales un número definido de trofozoítos

dentro de un rango de 5,000 hasta 200,000 trofozoítos, para lo cual se contaron los trofozoítos obtenidos después de 48 horas de incubación a 37°C. Para obtener el número inicial de parásitos viables inoculados en cada vial (tiempo cero), se consideró el número final de trofozoítos obtenidos después de 48 horas. Así el número inicial de parásitos viables se extrapola la curva de calibración usando el número total corregido a las 48 horas. Finalmente el porcentaje de viabilidad se calculó mediante la siguiente fórmula: (Hill *et al.*, 1986).

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{\text{No. de células vivas a las 0 hrs}}{100.000} \times 100$$

### **1.5.- Determinación de DL50 y CLM**

La determinación de la DL50 y la CLM se realizó para los fármacos: 5-nitroimidazoles, 5-nitrofuranos, derivados de acridina, bencimidazoles y 5-nitrotiazoles. Estos estudios se realizaron utilizando la cepa de referencia WB, y realizando curvas dosis–respuesta de fármacos derivados de los grupos mencionados anteriormente. Como criterios para evaluar la susceptibilidad de *G. duodenalis* hacia estos fármacos se eligieron la DL50 y CLM, de tal manera que para obtener las gráficas de tipo sigmoide se procedió a realizar un análisis de regresión lineal con la finalidad de obtener dichos valores. El procedimiento consistió en cultivar los trofozoítos hasta fase logarítmica de crecimiento, esto es, con un 100 % de confluencia, después se cosecharon las células por enfriamiento y se contaron en un hemocitómetro. A los viales de

borosilicato de 4.5 mL se les agregó las cantidades de fármaco respectivas, y se adicionaron 1,000,000 de trofozoítos, aforando con medio de cultivo TYI-S33. Los tubos se incubaron por un periodo de 24 horas a 37<sup>0</sup>C, después se enfriaron para cosechar las células por centrifugación, (1800 rpm) eliminando el sobrenadante y calculando el porcentaje de viabilidad, descrito en el método de Subcultivo en medio líquido. (Romero, 1996).

### **1.6.- Determinación de las Interacciones Farmacológicas (sinergia, indiferencia, aditividad y antagonismo).**

Para llevar a cabo el análisis de Interacciones farmacológicas en *Giardia duodenalis* se utilizó el método de subcultivo en medio líquido ( Hill *et al.*, 1986). La evaluación de viabilidad celular se realizó a partir de estudios previos (Cruz, 2001 y Romero, 1996).

Los trofozoítos de *Giardia duodenalis* resistentes a un anti-giardiasico en particular (albendazol, metronidazol y furazolidona) fueron expuestos a fármacos de la misma o diferente naturaleza química a concentraciones específicas manejadas en las combinaciones realizadas para cepa WB. Para ello, se colocaron 10<sup>6</sup> trofozoítos *de Giardia duodenalis* en un vial el cual se aforó con medio TYI-S-33 fresco y los viales, se incubaron durante 24 hrs a 37°. La viabilidad se determinó empleando el método de subcultivo en medio líquido, ya descrito. De los cultivos en los que se evaluaron las interacciones farmacológicas con las combinaciones diádicas de drogas seleccionadas para cultivos resistentes, se obtuvieron curvas dosis-respuesta utilizando dosis fraccionales de las CLMs que se obtuvieron para cada uno de los fármacos de

la combinación en cuestión. Posteriormente se calculó el índice fraccional de concentración (ICF) para la combinación en estudio mediante la fórmula reportada por Li and Rinaldi (1999).

$$ICF = \frac{CLM\_A\_combinación}{CLM\_A\_solo} + \frac{CLM\_B\_combinación}{CLM\_B\_solo}$$

Las interacciones de los fármacos se clasificaron en:

Sinergia	$ICF \leq 0.5$
Aditividad	$ICF > 0.5 \leq 1.0$
Indiferencia	$ICF > 1.0 \leq 2.0$
Antagonismo	$ICF > 2.0$

## VII RESULTADOS

En el presente trabajo se realizaron tres etapas experimentales. La primera se basó en estudios previos en el grupo al que me encuentro adscrita, en el cual se habían evaluado y determinado los valores de dosis letal 50 y concentración letal mínima (DL50 y CLM, respectivamente) para los fármacos como metronidazol, (Romero, 1996), albendazol (Cruz, 2001), quinacrina (Velazquez, 2004) furazolidona (Molina, 2004) y nitazoxanida (Arce, 2004). Se emplearon los ensayos de subcultivo en medio líquido, para proceder con el conteo celular directo para cada uno de estos fármacos en cepas WB para corroborar que los resultados obtenidos previamente fueran reproducibles para así dar inicio a la fase experimental. Una vez concluidos estos ensayos, se procedió a la determinación de interacciones farmacológicas en donde se obtuvieron curvas dosis-respuesta utilizando dosis fraccionales de las CLMs que se han obtenido para cada uno de los fármacos de la combinación en cuestión. Posteriormente se calculó el índice de concentración fraccional para la combinación en estudio mediante la fórmula reportada por Li and Rinaldi (1999). Para finalizar, las mejores combinaciones obtenidas se probaron en cepas resistentes a albendazol, metronidazol y furazolidona para observar el resultado en cultivos resistentes.

### **1.0.- Subcultivo en Medio Líquido.**

#### **1.1.- Determinación de DL50 Y CLM**

Con este ensayo se evaluó la capacidad de las células para poder replicarse después de haber sido expuestas a un agente potencialmente citotóxico,

siguiendo la metodología descrita en material y métodos. Se obtuvieron valores de DL 50 y de CLM para cada uno de los fármacos en cuestión. En la tabla 2 se muestran los resultados de DL 50 Y CLM de los fármacos utilizados. Cabe mencionar que para descartar que el disolvente interfiriera en el resultado obtenido los fármacos utilizados se disolvieron en Dimetilsulfoxido (DMSO) siendo este altamente polar ya que disuelve una gran variedad de sustancias tanto hidrosolubles como liposolubles.

Familia Química	Fármaco		
Bencimidazol	Albendazol	DL 50	0.078 $\mu\text{M}$
		CLM	0.154 $\mu\text{M}$
5-Nitrotiazol	Nitazoxanida	DL 50	0.578 $\mu\text{M}$
		CLM	1.589 $\mu\text{M}$
5-Nitroimidazol	Metronidazol	DL 50	2.410 $\mu\text{M}$
		CLM	4.500 $\mu\text{M}$
5-Nitrofurano	Furazolidona	DL 50	1.670 $\mu\text{M}$
		CLM	4.850 $\mu\text{M}$
Acridinas	Quinacrina	DL 50	0.463 $\mu\text{M}$
		CLM	12.350 $\mu\text{M}$

DL 50 Dosis Letal 50

CLM: Concentración Letal Mínima.

Tabla 2. Valores de Dosis letal 50 (DL 50) y Concentración Letal Mínima (CLM) experimental para la cepa WB de *Giardia duodenalis*, para cada uno de los agentes quimioterapéuticos probados.

## **2.0.- Efectividad Giardicida de combinaciones de Fármacos**

### **2.1.- Determinación de Interacciones Farmacológicas**

Para el presente trabajo resulto más conveniente el empleo de combinaciones empleando los fármacos de mayor actividad dentro de sus respectivas familias químicas. De esta forma, se realizaron los ensayos en función del número de veces que cada fármaco pudiera combinarse con los demás, tomando como punto de partida para realizar las combinaciones la concentración letal mínima CLM de cada fármaco.

Se eligió el metronidazol como el primer fármaco que iba a ser combinado con todos, debido a su amplio uso en giardiosis clínica. La primera combinación realizada fue con los fármacos más utilizados actualmente el metronidazol-albendazol, sabiendo que estos fármacos por separado tienen una eficacia del 80-100 % y 94-100 % respectivamente, siendo más eficaz en terapia el albendazol. (Gardner and Hill, 2001). Para esta combinación se obtuvo una ICF de 1.92 dando una interacción farmacológica de indiferencia

Así mismo se procedió a ensayar la combinación de metronidazol quinacrina. Estos dos fármacos han sido usados desde hace varias décadas aunque la eficacia de la quinacrina es de 81-96 % no es utilizada actualmente debido a los efectos secundarios que produce. (Gardner and Hill, 2001). Lo interesante es que estos dos fármacos al combinarse dieron un ICF de 0.78, siendo esto, una interacción de aditividad.

Posteriormente se analizaron otras combinaciones que incluyeron al metronidazol y buscando una mejor interacción farmacológica se combinó con furazolidona el cual tiene efectividad clínica del 81-96 %. (Gardner and Hill, 2001), en la combinación se obtuvo un ICF de 0.49 obteniendo una interacción de sinergia resaltando que en combinación la Furazolidona dio un resultado satisfactorio.

Finalmente el metronidazol que es un fármaco utilizado desde hace algún tiempo se combinó con la Nitazoxanida que tiene una eficacia clínica del 85 %, (Ortiz *et al.*, 2001 y Rossignol *et al.*, 2001), siendo un fármaco de empleo reciente para giardiosis observando que al combinarse se obtuvo una ICF de 2.61, siendo esto antagonismo, lo cual sugiere que estos dos fármacos no podrían ser una buena opción terapéutica al combinarlos.

Siguiendo con los fármacos más utilizados para Giardiosis tenemos el albendazol siendo éste el mas efectivo en estudios *in vitro* se combinó con quinacrina obteniendo ICF de 1.97 dando una respuesta de Indiferencia.

El Albendazol fue combinado con Furazolidona obteniendo un valor de ICF de 1.0 resultando nuevamente Indiferencia, siguiendo con la misma tendencia, observada al combinarlo con metronidazol.

Dado que el albendazol en combinación con otros fármacos, resultaba en indiferencia se continuó combinándolo con nitazoxanida, siendo éste el

segundo compuesto más activo contra *Giardia* obteniéndose un ICF de 1.98, observando nuevamente indiferencia farmacológica.

Para el siguiente ensayo se eligió a la nitazoxanida debido a que en las combinaciones anteriores se observó que esta antagonizaba con el metronidazol y se obtenía indiferencia, con albendazol, por lo que se decidió combinar con quinacrina la cual había sido aditiva con metronidazol pero indiferente con albendazol, el resultado de la combinación nitazoxanida-quinacrina nuevamente fue de indiferencia con un ICF alto de 1.51.

En relación con la nitazoxanida, se había observado que al combinarse con los otros fármacos se obtenía antagonismo o indiferencia, al combinarlo con la furazolidona, que fue el fármaco que potenció mejor el efecto del metronidazol, el resultado fue un ICF de 0.54, siendo esta aditividad muy cercana a un efecto sinérgico.

Para concluir los ensayos con la cepa WB se combinó la Furazolidona, que había demostrado ser el más interactivo con los fármacos, con la quinacrina, obteniendo nuevamente aditividad con un ICF de 0.61.

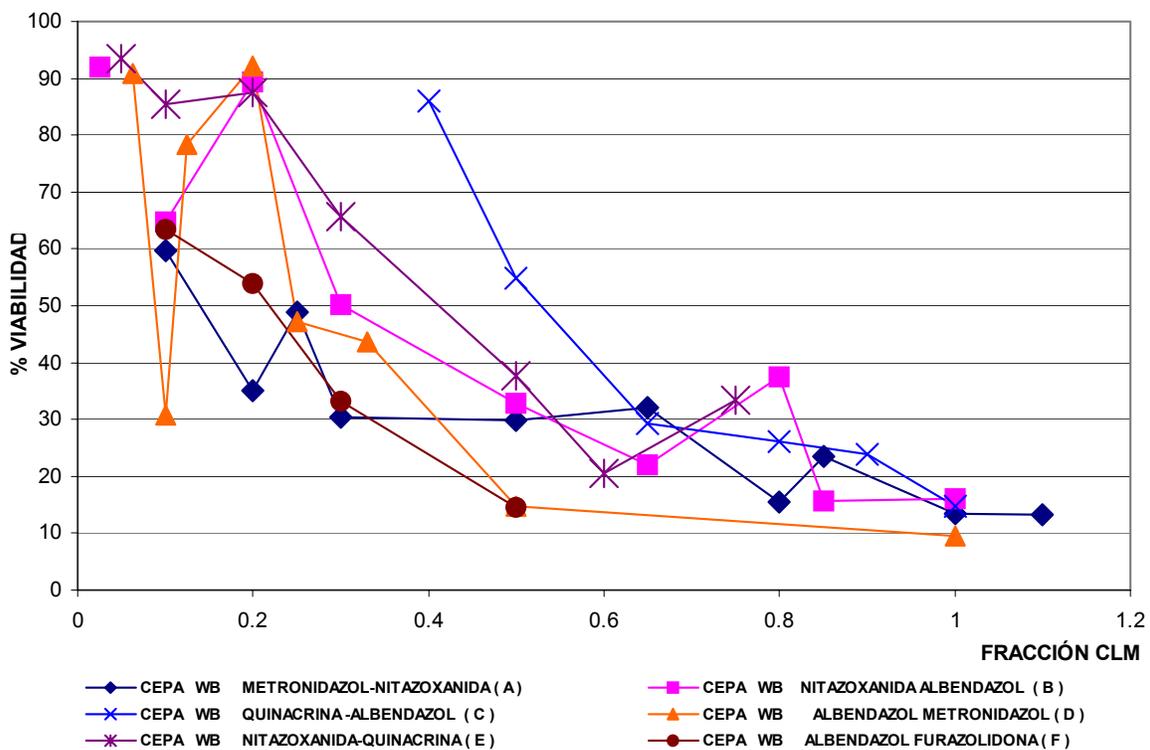


Figura 3. Curvas dosis-respuesta empleando el método de subcultivo en medio líquido para evaluar viabilidad celular en trofozoítos de *G. duodenalis*. Un inóculo de 1,000,000 trofozoítos fue expuesto a las combinaciones diádicas de Mtz-Ntz (A) y Ntz-Abz (B) Qnc-Abz (C) Abz-Mtz (D) Ntz-Qnc (E) Abz-Fzd (F) e incubados 24 hrs a 37 °C. Los datos expresados corresponden al promedio de cuatro experimentos independientes.

En la figura 3 se muestran las combinaciones farmacológicas con más altos valores de ICF obteniendo para Mtz-Ntz, (A) el antagonismo mas marcado de todas las combinaciones utilizadas: Así mismo las combinaciones Ntz-Abz, (B) Qnc-Abz, (C) Abz-Mtz, (D) Ntz-Qnc, (E) y Abz-Fzd, (F) la interacción farmacológica obtenida fue de Indiferencia.

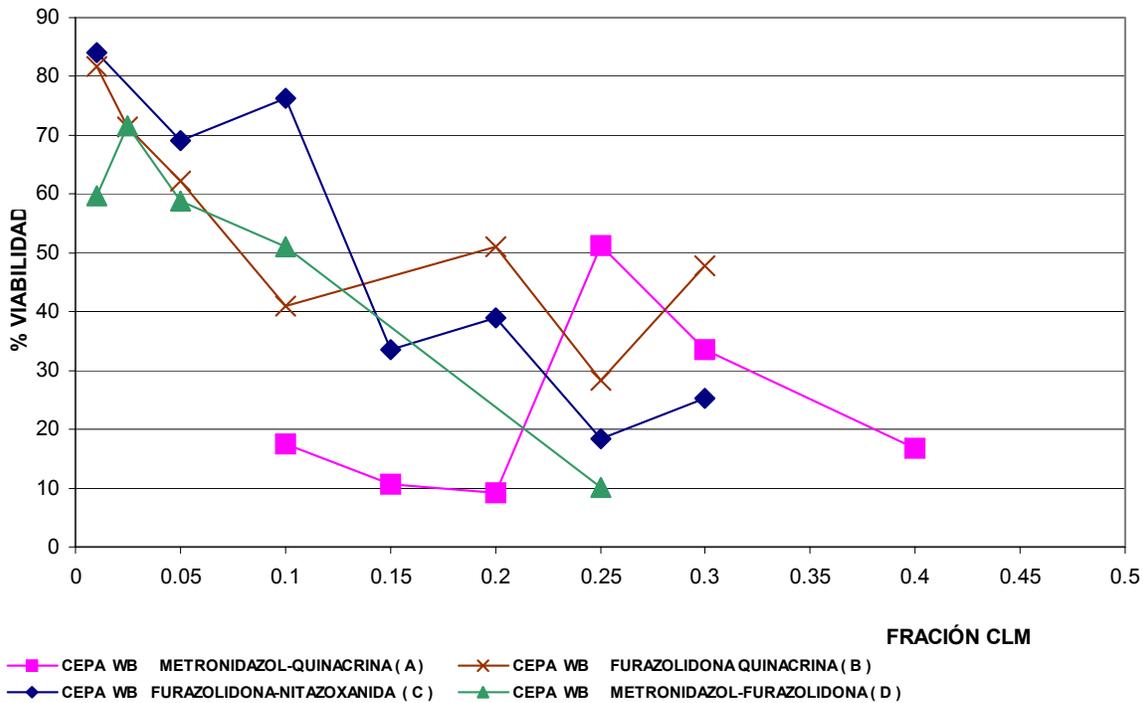


Figura 4. Curvas dosis-respuesta empleando el método de subcultivo en medio líquido para evaluar viabilidad celular en trofozoítos de *G. duodenalis*. Un inóculo de 1,000,000 trofozoítos fue expuesto a las combinaciones diádicas de Mtz-Qnc, (A) Fzd-Qnc, (B) Fzd-Ntz (C) y Mtz-Fzd-(D) e incubados 24 hrs a 37 °C. Los datos expresados corresponden al promedio de cuatro experimentos independientes.

En la figura 4 se agruparon las combinaciones en las que se obtuvo un valor menor de ICF. Así se observaron valores de aditividad para las combinaciones Mtz-Qnc, (A) Fzd-Qnc, (B) y Fzd-Ntz, (C) y la combinación con valores sinérgicos fue la de Mtz-Fzd, (D).

En la Tabla 3 se muestran los resultados para cada combinación con los valores individuales y su correspondiente determinación de interacciones farmacológicas.

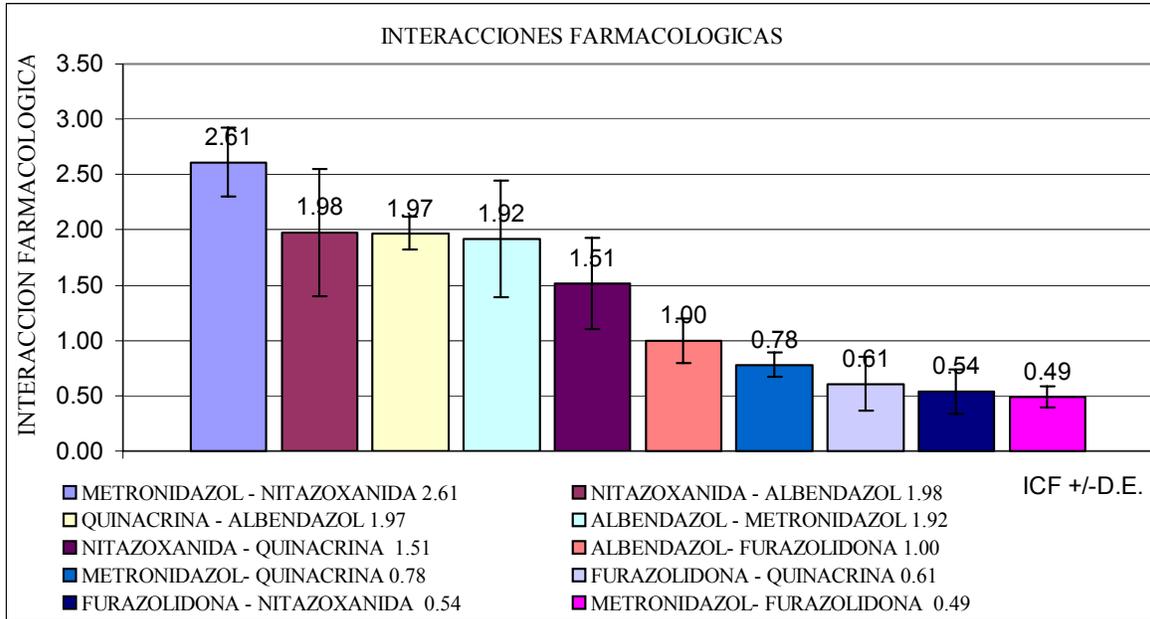


Figura 5. Comparación de las Interacciones Farmacológicas obtenidas en trofozoítos de *G. duodenalis* expuestos a 10 diferentes combinaciones diádicas de los fármacos de mayor uso en Giardiosis.

COMBINACIÓN	ICF	D. E.	I. F.
<b>METRONIDAZOL - NITAZOXANIDA</b>	2.61	0.31	Antagonismo
<b>NITAZOXANIDA - ALBENDAZOL</b>	1.98	0.57	Indiferencia
<b>QUINACRINA - ALBENDAZOL</b>	1.97	0.15	Indiferencia
<b>ALBENDAZOL - METRONIDAZOL</b>	1.92	0.53	Indiferencia
<b>NITAZOXANIDA - QUINACRINA</b>	1.51	0.41	Indiferencia
<b>ALBENDAZOL - FURAZOLIDONA</b>	1.00	0.20	Indiferencia
<b>METRONIDAZOL - QUINACRINA</b>	0.78	0.11	Aditividad
<b>FURAZOLIDONA - QUINACRINA</b>	0.61	0.24	Aditividad
<b>FURAZOLIDONA - NITAZOXANIDA</b>	0.54	0.20	Aditividad
<b>METRONIDAZOL - FURAZOLIDONA</b>	0.49	0.09	Sinergia

Tabla 3. Determinación experimental del Índice de Concentración Fraccional, así como la Interacción Farmacológica obtenida para cada una de las combinaciones diádicas probadas en cultivos de *G. duodenalis*.

### **3.0- Efectividad Giardicida de combinaciones de Fármacos en cepas resistentes a Metronidazol, Albendazol y Furazolidona.**

Considerando los datos obtenidos al emplear las combinaciones con mejor eficacia en la cepa WB, se procedió a probar el efecto sobre cepas resistentes *in vitro*, las cuales se obtuvieron subcultivando trofozoítos de la cepa WB en concentraciones subletales crecientes tanto para Metronidazol (R-Mtz 23  $\mu\text{M}$ ), Albendazol (R-Abz 5.6  $\mu\text{M}$ ) y Furazolidona (R-Fzd 5.2  $\mu\text{M}$ ). Con esta evaluación, se buscó establecer un patrón de comparación y saber si las combinaciones elegidas tenían la misma eficacia sobre estas cepas sensibles (WB).

#### **3.1.- Cepa WB resistente a Metronidazol 23 $\mu\text{M}$**

En los ensayos con las cepas resistentes iniciamos con la cepa resistente a Metronidazol 23  $\mu\text{M}$ . Recordemos que el metronidazol es el fármaco mas usado para el tratamiento de Giardiosis. Las combinaciones utilizadas fueron las de Metronidazol-Furazolidona, Furazolidona-Quinacrina y Furazolidona-Nitazoxanida.

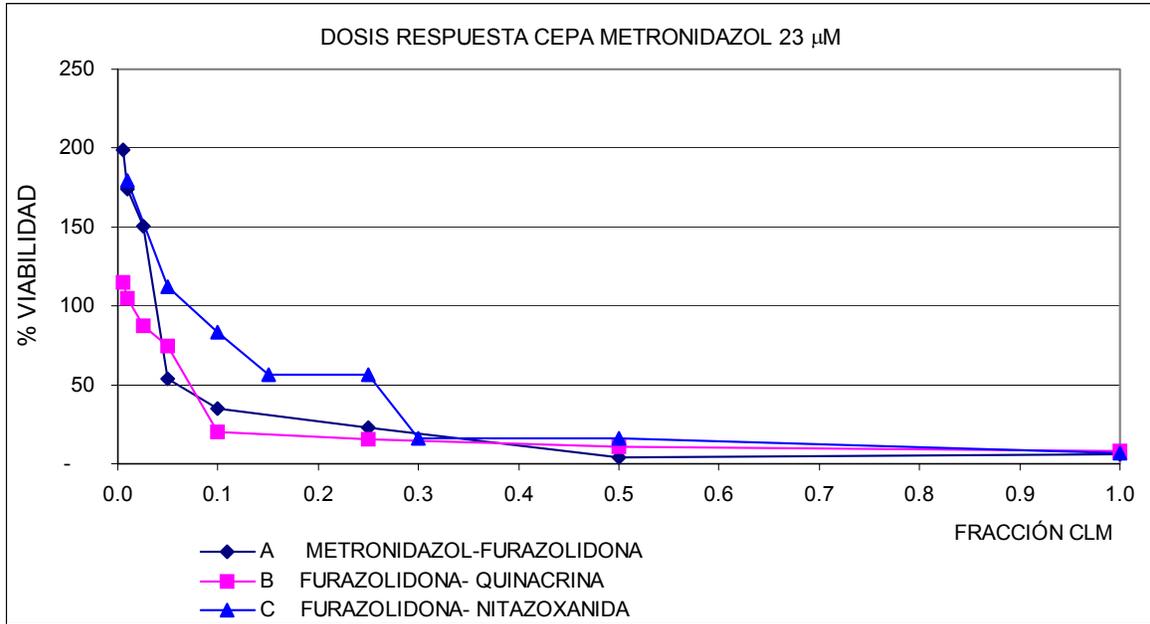


Figura 6. Curvas dosis-respuesta empleando el método de subcultivo en medio líquido para evaluar viabilidad celular en trofozoítos de *G. duodenalis*, resistentes a Metronidazol. Un inóculo de 1,000,000 trofozoítos fue expuesto a las combinaciones diádicas de Fzd-Ntz (A) y Fzd-Qnc (B) y Fzd-Ntz (C) e incubados 24 hrs a 37 °C. Los datos expresados corresponden al promedio de cuatro experimentos independientes.

COMBINACIÓN	ICF	D. E.	I. F.
METRONIDAZOL FURAZOLIDONA	1.21	0.141	INDIFERENCIA
FURAZOLIDONA- QUINACRINA	1.55	0.261	INDIFERENCIA
FURAZOLIDONA- NITAZOXANIDA	2.13	0.311	ANTAGONISMO

ICF: Índice de Concentración Fraccional.

D.E. Desviación Estándar.

I.F. Interacción Farmacológica

Tabla 4. Determinación experimental del Índice de Concentración Fraccional y su correspondiente Interacción Farmacológica, para las combinaciones diádicas empleadas en cultivos de *G. duodenalis* resistentes a Metronidazol, corresponden al promedio de cuatro experimentos independientes.

### **3.2.- Cepa WB resistente Albendazol 5.6 $\mu$ M**

El Albendazol es el fármaco más efectivo cuando se emplea individualmente, llega a tener eficacia hasta en un 100 %, (Gardner and Hill, 2001). El comportamiento de este fármaco cuando se empleo como elemento de combinación en cepa WB no resulto en interacciones farmacológicas efectivas. Las combinaciones diádicas probadas para esta cepa fueron Metronidazol-Furazolidona, Furazolidona-Nitazoxanida y Furazolidona-Albendazol.

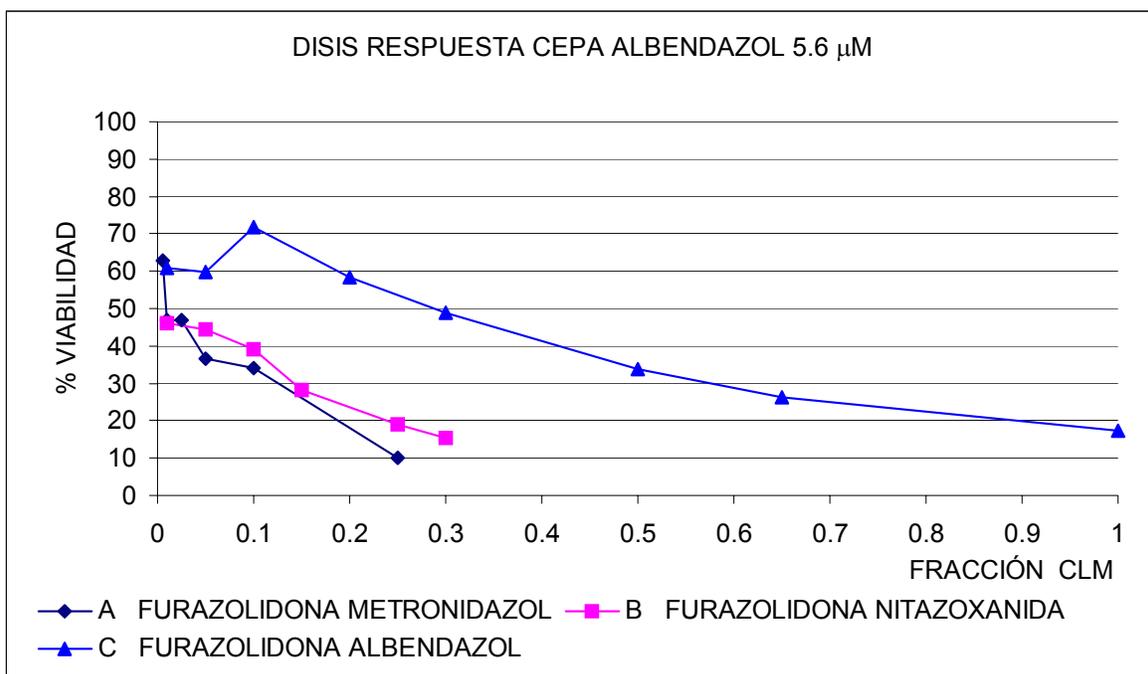


Figura 7. Curvas dosis-respuesta empleando el método de subcultivo en medio líquido para evaluar viabilidad celular en trofozoítos de *G. duodenalis*, resistentes a Albendazol. Un inóculo de 1,000,000 trofozoítos fue expuesto a las combinaciones diádicas de Fzd-Mtz (A) y Fzd-Ntz (B) y Fzd-Abz (C) e incubados 24 hrs a 37 °C. Los datos expresados corresponden al promedio de cuatro experimentos independientes.

COMBINACIÓN	ICF	D. E.	I. F.
FURAZOLIDONA METRONIDAZOL	0.52	0.164	ADITIVIDAD
FURAZOLIDONA NITAZOXANIDA	0.66	0.092	ADITIVIDAD
FURAZOLIDONA ALBENDAZOL	2.25	0.262	ANTAGONISMO

ICF: Índice de Concentración Fraccional.

D.E. Desviación Estándar

I.F. Interacción Farmacológica

Tabla 5. Determinación experimental del Índice de Concentración Fraccional y su correspondiente Interacción Farmacológica, para las combinaciones diádicas empleadas en cultivos de *G. duodenalis* resistentes a Albendazol, corresponden al promedio de cuatro experimentos independientes.

### 3.3.- Cepa WB resistente a Furazolidona 5.2 $\mu\text{M}$

La furazolidona fue el fármaco más efectivo en combinación. Las combinaciones probadas en esta cepa fueron Metronidazol-Furazolidona, Furazolidona-Quinacrina y Furazolidona-Nitazoxanida.

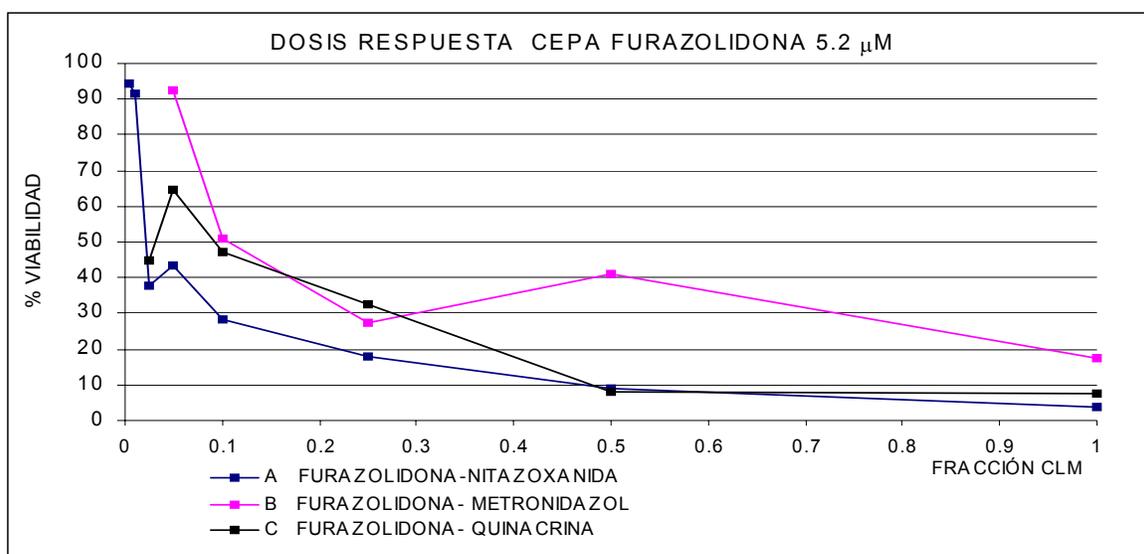


Figura 8. Curvas dosis-respuesta empleando el método de subcultivo en medio líquido para evaluar viabilidad celular en trofozoítos de *G. duodenalis*, resistentes a Furazolidona. Un inóculo de 1,000,000 trofozoítos fue expuesto a las combinaciones diádicas de Fzd-Mtz (A) y Fzd-Ntz (B) y Fzd-Abz (C) e incubados 24 hrs a 37 °C. Los datos expresados corresponden al promedio de cuatro experimentos independientes.

COMBINACIÓN	ICF	D. E.	I. F.
FURAZOLIDONA-NITAZOXANIDA	0.884	0.234	ADITIVIDAD
FURAZOLIDONA-METRONIDAZOL	0.504	0.187	SINERGIA
FURAZOLIDONA-QUINACRINA	0.524	0.142	ADITIVIDAD

ICF: Índice de Concentración Fraccional.

D.E. Desviación Estándar.

I.F. Interacción Farmacológica.

Tabla 6. Determinación experimental del Índice de Concentración Fraccional y su correspondiente Interacción Farmacológica, para las combinaciones diádicas empleadas en cultivos de *G. duodenalis* resistentes a Furazolidona, corresponden al promedio de cuatro experimentos independientes.

## VIII DISCUSIÓN

En estudios recientes, llevados a cabo en nuestro grupo de trabajo se ha sugerido que el uso de combinaciones diádicas de fármacos de la misma familia química resulta, por lo general, en interacciones farmacológicas semejantes pero características del grupo o familia química en cuestión (Arce, 2004; Cruz, 2001; Molina, 2004; Velásquez, 2004). Sin embargo en el presente trabajo, resultó más conveniente el empleo de combinaciones entre fármacos de mayor actividad clínica dentro de sus respectivas familias químicas. Así, se realizaron los ensayos en función del número de veces que cada fármaco pudiera combinarse con los demás. Con la finalidad de descartar que el disolvente interfiriera en el resultado obtenido al combinar los fármacos, todos los fármacos utilizados se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) siendo este altamente polar ya que disuelve una gran variedad de sustancias tanto hidrosolubles como liposolubles. Este compuesto tiene una toxicidad general aguda muy baja, por lo que no altera la toxicidad de los medicamentos (Meyer *et al.*, 1980) permitiéndonos así tener un disolvente común para las combinaciones de los fármacos.

Al comparar la efectividad de las combinaciones diádicas utilizadas, es notable mencionar que siempre que utilizamos albendazol los niveles de ICF fueron altos, presentándose en el rango de indiferencia. En la literatura existe un antecedente de que metronidazol y albendazol podrían presentar un efecto sinérgico en giardiasis (Cacopardo *et al.*, 1995), en otros estudios el albendazol en combinación con ivermectina y dietilcarbamazina contra *Ascaris* y *Trichuris spp.* ha presentado una cura significativamente más alta en

la reducción de estas infecciones, en comparación al uso de estos fármacos solos (Belizario *et al.* 2003). Los datos que se obtuvieron fueron de indiferencia, con valor de 1.98 para la combinación nitazoxanida-albendazol, y de 1.97 para quinacrina-albendazol. El valor obtenido fue de 1.92 para la combinación de albendazol-metronidazol y de 1.0 al combinar este con furazolidona, siendo éste el valor más bajo del albendazol en combinación, lo que nos indica que al obtener indiferencia de estas drogas en combinación, el resultado obtenido es el mismo que cuando la droga es usada sola. En particular, los valores para la combinación metronidazol-albendazol parecen no coincidir con lo reportado. Se debe tomar en cuenta que si bien el albendazol presentó sinergia con metronidazol en casos clínicos refractarios a metronidazol, no significa necesariamente que el albendazol debe ser sinérgico *in vitro* con otros fármacos, incluyendo metronidazol, en una cepa como la WB que es sensible a metronidazol y albendazol.

En lo que se refiere a las combinaciones con nitazoxanida, este fármaco en la mayoría de las combinaciones fue un mal elemento de combinación. Si bien la literatura sugiere que la nitazoxanida puede ser activa para inhibir el crecimiento *in vitro* de organismos como *Cryptosporidium parvum* en combinación con azitromicina o rifabutina (Giacometti *et al.*, 2000), en el presente trabajo el valor de ICF más alto fue el obtenido en la combinación de nitazoxanida-metronidazol con un valor de 2.61, presentando el antagonismo más notable. Este resultado mostró la disminución o anulación del efecto farmacológico de una droga por la acción de la otra. Por su parte, la combinación albendazol-nitazoxanida presentó un ICF de 1.98, por lo que estos dos fármacos no podrían ser buenos como alternativa en terapia de

combinación, ya que el resultado es menor del que hubiéramos obtenido con uno solo de los fármacos, contrastando con el hecho de ser los más efectivos en terapia sola. Cuando se combino nitazoxanida con quinacrina el resultado de la interacción farmacológica fue de indiferencia con un ICF de 1.51. En este sentido, existen datos recientes sobre la sensibilidad *in vitro* de aislados de *G. duodenalis* obtenidos de diferentes huéspedes a nitazoxanida. Se observó mayor susceptibilidad al tinidazol que a la nitazoxanida, debido a la deformación de los trofozoítos, sugiriendo que la nitazoxanida induce modificaciones en la membrana y lisis celular (Ponce *et al.*, 2001).

Una de las interacciones aditivas fue quinacrina-metronidazol con un ICF de 0.78. Se ha reportado que para casos de giardiosis refractaria el tratamiento con nitroimidazoles. La combinación de éstos con quinacrina es efectiva en tratamientos prolongados (Gardner and Hill, 2001). De acuerdo con esto, Nash *et al.* (2001) reportó que al usar la combinación quinacrina-metronidazol en seis pacientes, ésta resultó favorable para 5 de ellos. Siguiendo con las combinaciones que presentaron aditividad se encuentran furazolidona-quinacrina con 0.61 y furazolidona-nitazoxanida con 0.54, muy cercano a la sinergia. Estos resultados muestran que al usar en combinación estos fármacos el efecto obtenido de la combinación es igual a la suma de sus efectos individuales. Es importante mencionar que la quinacrina es un fármaco noble en combinación, ya que si se administra con un fármaco efectivo en ésta sus niveles de ICF son bajos (aditividad) sucediendo lo contrario al combinarlo con nitazoxanida y albendazol, con los cuales se observó interacción tipo indiferencia. La combinación furazolidona- metronidazol con valor de ICF de 0.49 nos mostró un claro sinergismo, siendo esta la combinación más efectiva de fármacos, notándose que los derivados de imidazol, tiazol y furano presentan semejanzas estructurales pero presentan

potencial terapéutico diferentes. Esto último es importante porque de presentarse interacción sinérgica entre estas drogas, se puede potenciar el efecto y se podría así disminuir la dosificación y reacciones adversas de las drogas en combinación. A este respecto, Vasil'ev *et al.* (2002) reportaron que en pacientes con úlcera duodenal asociada con *Helicobacter pylori*, al comparar dos regímenes de tratamiento: uno con omeprazol, claritromicina y metronidazol y otro con omeprazol, claritromicina y furazolidona, se observó erradicación de la infección en 9 y 8 de 10 pacientes respectivamente, encontrando efectividad clínica al usar estas combinaciones.

De esta forma, a nivel general el fármaco más efectivo como elemento de combinación fue la furazolidona, la cual siempre que se combinó los valores de ICF correspondientes fueron bajos, presentando interacciones aditivas o sinérgicas. Sólo con el albendazol se obtuvo un valor de 1.0.

Cuando se analizó la susceptibilidad *in vitro* de cultivos de la cepa WB resistentes a concentraciones de 23  $\mu\text{M}$  de metronidazol (equivalentes a aproximadamente 5 veces la CLM de la cepa parental), se observaron interacciones farmacológicas malas, es decir, de indiferencia para las combinaciones de metronidazol-furazolidona, con valor de ICF de 1.21, y para furazolidona-quinacrina, con valor de ICF de 1.55. El antagonismo se presentó con un ICF de 2.13 para esta cepa con la combinación de furazolidona-nitazoxanida. Por consiguiente, las combinaciones de mejor eficacia obtenidas para la cepa WB no lo fueron para la cepa WB resistente a metronidazol. Se ha reportado que en pacientes con úlcera duodenal asociada a *Helicobacter pylori* resistente a metronidazol, el uso de dosis no reducidas de furazolidona en combinación con amoxicilina y omeprazol fueron efectivas cuando los

pacientes toleraron las drogas y completaron el tratamiento (Roghani *et al.*, 2003).

En el caso de la cepa WB capaz de crecer en una concentración de 5.6  $\mu\text{M}$  de albendazol (aproximadamente 60 veces su CLM), los resultados fueron buenos obteniéndose aditividad, particularmente en las combinaciones donde no participó el albendazol esto es, las combinaciones de furazolidona-metronidazol (ICF 0.52) y furazolidona-nitazoxanida (ICF 0.66). En contraste, se presentó un antagonismo muy marcado (ICF 2.25) en la combinación de furazolidona-albendazol. Si bien se había observado que la furazolidona era el mejor fármaco para combinar, cuando se administró con albendazol no existió una buena interacción entre estos dos fármacos. De esta manera, el efecto de los dos en combinación fue menor del obtenido con un solo compuesto activo.

Por su parte, al evaluar la cepa WB con resistencia a concentraciones de 5.2  $\mu\text{M}$  de furazolidona (aproximadamente 1.3 veces su CLM), en general se determinaron interacciones farmacológicas buenas: aditividad para las combinaciones de furazolidona-nitazoxanida (ICF 0.88), furazolidona-quinacrina (ICF 0.52) y un valor de ICF de 0.50 para la combinación metronidazol-furazolidona. Así, al tener esta interacción observamos que el efecto combinado de los 2 fármacos fue mayor del resultante con cada uno de los dos por separado. Estos datos permitieron corroborar que la furazolidona es el fármaco más efectivo combinado, aun al ser utilizado en la cepa resistente a este fármaco.

Como se puede observar, los resultados obtenidos en las cepas resistentes sugirieron que el grado de resistencia de la cepa no determinó la eficacia de la interacción farmacológica de las combinaciones evaluadas. Así mismo, el agente al cual se indujo resistencia no determinó el comportamiento del mismo fármaco en la combinación particular en que se empleó.

A manera de perspectivas de este trabajo, la información obtenida puede servir de base para plantear la evaluación *in vitro* de la combinación metronidazol-albendazol en la cepa resistente a metronidazol, ya que esto permitiría una comparación más directa con los estudios clínicos reportados en los cuales presentó un aparente sinergismo. También se podrían evaluar las combinaciones diádicas con mejor interacción farmacológica en modelos animales y analizar los mecanismos de acción de las combinaciones ante infecciones por *Giardia duodenalis*. La utilidad de estas observaciones se podrá reflejar en la optimización terapéutica al emplear regímenes de combinación de fármacos en estudios de giardiosis experimental y clínica. Esto puede en un futuro permitir evaluar el perfil clínico de pacientes donde se empleen estas combinaciones, es decir, estudios piloto donde se evalúe la conveniencia de su uso a nivel de dosis efectivas, eficacia global y efectos adversos.

## IX CONCLUSIONES

De manera global, la furazolidona (Fzd) presentó la mejor efectividad como elemento de las combinaciones.

Con base en los valores de Índice de Concentración Fraccional (ICF) la combinación de Fzd-Mtz presentó una interacción farmacológica de sinergia, siendo la combinación con mayor potencia giardicida.

Las combinaciones de Fzd-Ntz, Fzd-Qnc y Mtz-Qnc, presentaron una interacción farmacológica aditiva, siendo un buen resultado para combinaciones *in vitro*.

El albendazol, el metronidazol y la nitazoxanida, al ser combinados entre sí, fueron los más ineficaces, contrastando con el hecho de ser los más efectivos por sí solos.

Las combinaciones empleadas en cultivos resistentes a metronidazol: (Mtz-Fzd Fzd-Qnc y Fzd-Ntz) resultaron ser ineficaces, obteniéndose indiferencia o antagonismo farmacológico a diferencia de que estas combinaciones fueron las más eficaces en la cepa WB que es relativamente sensible a estos agentes.

Las combinaciones empleadas en cultivos resistentes a albendazol dieron interacciones aditivas en ausencia de albendazol.

Los cultivos resistentes a furazolidona resultaron ser tan sensibles como la cepa WB al ser expuestos a la combinación de Fzd –Mtz obteniéndose sinergia, y existió aditividad con las combinaciones Fzd-Ntz y Fzd-Qnc

## X REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- \* Adam, D. R. (1991). The biology of *Giardia* spp. Microbiol. Rev. 55: 706-732.
  
- \* Adam, D. R. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. Clin. Microbiol. Rev. 14:447-475.
  
- \* Arce, C. G. (2004). Determinación de la eficacia *in vitro* de fármacos de la familia de los tiazoles en trofozoítos de *Giardia duodenalis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM. México.
  
- \* Argüello, G. R. (1991). Aislamiento y caracterización de antígenos relevantes del protozoario parásito *Giardia lamblia*. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán. UNAM. Mexico.
  
- \* Belizario, V.Y., Amarillo M.E., de Leon W.u. de los Reyes A.E., Bugayong M.G. and Macatangay B.J., (2003). A comparison of the efficacy of single doses of albendazole, ivermectin, and diethylcarbamazine alone or in combinations against *Ascaris* and *Trichuris* spp. Bull World Health Organ, 81 (1): 35-42

- \* Bernal, R.R., Hernández, S.G., Gámez, A.A., Ramírez, H.E. (1995). Giardiosis infantil en un hospital de concentración. Memorias del Primer Encuentro Nacional de Giardiosis, México, D.F.: pp.14.
  
- \* Biagi, F. (1983). Los protozoarios enteropatógenos y su impacto en la salud pública. Invest. Med. Int. 10:7.
  
- \* Bier, J. W. (1991). Isolation of parasites on fruits and vegetables. Southeast. Asian. J. Trop. Med. Public Health. 22:144-5.
  
- \* Bingham. K.A., Jarroll, L.E and Meyer, A.E. (1979). *Giardia* sp.: physical factors of encystations in vitro, and encystations vs eosin eclusion as determinants of viability. Exp. Parasitol. 47: 284-291
  
- \* Boreham, P. F. L., Upcroft, J. A. and Upcroft, P. (1990) Changing Approaches to the Study of *Giardia* Epidemiology: 1681-2000. *Int J Parasitol.* 20(4): 479-487.
  
- \* Brown, D.M., Upcroft, J.A., and Upcroft P. (1996). A H<sub>2</sub>O-producing NADH oxidase from the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. Eur. J. Biochem. 241: 155-161

- \* Cacopardo. B., Patamia. I., Bonaccorso V, Di Paola O., Bonforte S and Brancati G. (1995). Synergic effect of albendazole plus metronidazole association in the treatment of metronidazole- resistant *Giardiasis*. Clin Ter Dec: 146 (12): 761-767.
  
- \* Carrada, B. T. (1984a). Giardiosis intestinal. Epidemiología (Primera de dos partes). *Revista Mexicana de Pediatría*: 497-505.
  
- \* Carrada, B. T. (1984b). Giardiosis intestinal: Diagnóstico y Tratamiento (Segunda y última parte). *Revista Mexicana de Pediatría*: 525-534.
  
- \* Carrera, A.P., Barbeito, J.A., Tesis, G.C. (1979). Avances en el tratamiento de las parasitosis intestinales. Laboratorios Andrómaco. 129 pp.
  
- \* Cifuentes, E., Gomez, M., Blumenthal, U., Téllez-Rojo, M.M., Romieu, I., Ruiz-Palacios, G. and Ruiz-Velazco, S. (2000). Risk factors for *Giardia intestinalis* infection in agricultural villages practicing wastewater irrigation in Mexico. Am J Trop Med Hyg. 62 (3): 388-92.

- \* CDC (Centers of Disease Control and Prevention) (2003). Laboratory Identification of Parasites of Public Concern.

[www.dpd.cdc.gov/dpdx/default.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/default.htm)

- \* Chester, B. P., Clifton, R. and Wayne, C. E. (1992). Parasitología Clínica. Salvat Editores. Segunda Edición. México.

- \* Coello-Ramírez P. (1981) *Giardiasis*. Revista Médica del IMSS México. 19 (2):243.

- \* Craig R. y Sitzel E. R, (1984) Farmacología Medica Ed. Interamericana. México D.F. pags: 647-650, 721-724.

- \* Cruz, S. M. (2001). Determinación en el protozoario *Giardia duodenalis*. Caracterización parcial de la resistencia a drogas en este parásito. Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. UNAM. México. 152 pp.

- \* Crouch, A. A., Seow, W. K., Whitman, L. M and Thong Y. H. (1990). Sensitivity in vitro of *Giardia intestinalis* to dyadic combinations of azithromycin, doxycycline, mefloquine, tinidazol and furazolidone.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 84, 246-248.

- \* Darbon, A., Portal, A., Girier, L., Pantin, J. and Leclaire, C., (1962). Traitement de la Giardiase (lamblia) par le metronidazole. Press Med, 70: 15-16.
  
- \* Davidson, R. A. (1990). Treatment of giardiasis: the North American perspectives. En Meyer, E.A. (Eds). Giardiasis, Capitulo 19. Elsevier. Pp. 325-334.
  
- \* Diamond, L. S, Harlow, D. and Cunnick, C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other Entamoeba, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg, 4: 431-432..
  
- \* Dobell, C. (1920). The discovery of the intestinal protozoa in man. Procedures of the Royal Society of Medicine. 13: 1-15.
  
- \* Dueñas-Lopez, M.H. (1984). Frecuencia de parasitosis intestinales diagnosticadas en el laboratorio de parasitología de la S:E:S:C: Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.

- \* Edwards, D.I. (1993). Nitroimidazole drugs action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *J. Antimicrob. Chemother.* 31: 9-20.
  
- \* Edlind, T.D., Hang, T. L and Chakraborty, P.R. (1990). Activity of the antihelminthic benzimidazoles against *Giardia intestinalis in vitro*. *J. Infect. Dis.* 162: 1408-1411.
  
- \* Farthing M. J. G., Pereira M. E. A. and Keush G. T. (1986) Description and characterization of surface lectin from *Giardia lamblia*. *Infection and Immunity.* 51: 661-667.
  
- \* Farthing, M. J. G. (1992). *Giardia* comes of age; progress in epidemiology, immunology and chemotherapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 30:563-566.
  
- \* 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.
  
- \* Garcia, M, M. and Larracilla, A. J. (1983). Giardiasis Intestinal. Estudio de 100 casos y revisión del tema. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México.* 40:372-374.

- \* Gardner, B.T and Hill, R.D. (2001). Treatment of Giardiasis. Clin Microbiol Rev. 14(1): 114-128.
  
- \* Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, Ancarini F. and Scalise G. (2000). Activity of nitazoxanide alone and in combination with azithromycin and rifabutin against *Cryptosporidium parvum* in cell culture. Antimicrob Chemother Apr; 45 (4): 453-6.
  
- \* Gillis, J.C. and Wiseman, L.R. (1996). Secnidazole. A review of its antimicrobial activity, Pharmacokinetic properties and therapeutic use in the management of protozoal infections and bacterial vaginosis. Drugs. 51: 621-638.
  
- \* González de la Rosa, J. B., Barbadillo, I. F., Merino, A. J. M. y Sánchez, M. J. (1999). Aparato Digestivo, Parasitosis intestinales. Protocolo diagnóstico-terapéutico. *Boletín Pediátrico*. 39: 106-111.
  
- \* Goldsmith, H. (1995). Parasitología y Medicina Tropical. Ed. Manual Moderno. México
  
- \* Hermida, R.C., Ayala, D.E, and Arroyave, R.J. (1990). Circannual incidence of *Giardia lamblia* in México. Chronobiol Int. 7 (4) : 329-340.

- \* Hickman, P., Cleveland, P., Larry S.R., Hickman, F.M. (1988) Zoología de los invertebrados, Ed. Interamericana Mc Graw-Hill 1ª Edición México. 70
  
- \* Hill, D.R., Pohl, R. and Pearson, R.D. (1986). *Giardia lamblia*: a culture method for determining parasite viability. Am J. Trop. Med. Hyg. 35 (6): 1129-1133.
  
- \* Instituto Mexicano del Seguro Social (1990). Boletín Epidemiológico Anual. IMSS, México.
  
- \* Katzung (1993). Farmacología Básica y Clínica Ed. El Manual Moderno 4ta edición México. 921.
  
- \* Keister, D. B. (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Trans. R. Soc, Trop. Med. Hyg. 77: 487-488.
  
- \* Knight R. (1980). Epidemiology and transmission of giardiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74 (4):433-435.

- \* Kofoid, C. A. and Christiansen, E. B. (1915). On *Giardia microti* sp. Nov., from the meadow mouse. University of California Publications in Zoology. 16:23-29.
  
- \* Lambl, W. (1859). Mikroskopische untersuchungen der darmexcrete .Viertel Jahrsshrift fur die Praktische Heilkunde (Prag) 61:1-58.
  
- \* Li. R. K., and Rinaldi. M. G. (1999). In vitro Antifungal Activity of Nikkomycin Z in Combination with Fluconazole or Itraconazole. Antimicrobiol Agents and Chemotherapy, June P 1401-1405.
  
- \* Meyer, E.A. and Jarroll, E. M. (1980). Giardiasis. Am. J. Epidemiol. 111:1-11.
  
- \* Molina, A. N., (2004). Determinación de la eficacia *in vitro* de fármacos de la familia de los furanos en trofozoítos de *Giardia duodenalis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM. México.
  
- \* Morgan, U. M., J. A. Reynoldson and R.V. Thompson. (1993). Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. In vitro. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 328-331.

- \* Muller, M. (1983). Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. *Surgery*. 93: 165-171.
  
- \* Nash T.E., Ohl C.A., Thomas E, Subramanian G, Keiser P. and Moore T.A. (2001). Treatment of patients with refractory giardiasis. *Clin Infect Dis*. Jul 1;33(1): 22-8.
  
- \* Ortiz, J. J., Ayoub, A., Gargala, G., Chegne, N. L. and Favennec, L. (2001). Randomized clinical study of nitazoxanide compared to metronidazole in the treatment of symptomatic giardiasis in children from Northern Peru. *Aliment Pharmacol Ther*. 15(9):1409-15.
  
- \* Ortega. B.E., Ward, H.D., Keush, G.T. and Pereira, M.E.(1994). Growth inhibition of the intestinal parasite *Giardia lamblia* by a disetary lectin in associated with arrest of the cycle. *J. Clin. Invest*. 94 (6): 2283-8.
  
- \* Paget, T.A., Jaroll, E.L., manning, P., Lindmark, D.G. and Lloyd, D. (1989). Respiration in the cysts and trophozoites of *Giardia muris*, *J. Gen. Microbiol*. 135: 145-154.
  
- \* Ponce-M. M., Gomez, G.M., Gonzalez, M.A., Reynoso. R.R., Anislado. T.V. and Martinez,G.M. (2001). *In vitro* determination of *Giardia*

*duodenalis* susceptibility to Nitazoxanide in four isolates from different host. Revista de Investigación clínica. 53(1) 41-45.

- \* Programa de Actualización Continua en infectología (PAC Infecto). (1998). Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica A:C. Intersistemas editores. México. <http://www.drscope.com/paci/infecto-1/in1a5-p26-htm>.
- \* Reinner, D.S., Hetsko, M.L. and Gillin, F.D.(1995). A lipoprotein-cholesterol-albumin serum substitute stimulates *Giardia lamblia* encystation vesicle formation. J. Euk. Microbiol. 42 (5): 622-7.
- \* Redlinger, T., Corella-Barud, V., graham, J., Galindo, A., Avitia, R. and Cardenas, V. (2002). Hyperendemic *Cryptosporidium* and *Giardia* in households lacking municipal sewer and water on the United States-Mexico border. Am. J. Trop. Med. Hyg. 66 (6) : 794-8.
- \* Reynoldson, J. A., Thompson, R.C.A. and Meloni, B.P. (1991). The mode of action of benzimidazoles against *Giardia* and their chemotherapeutic potential against *Giardia* and other parasitic protozoa, p. 587-593. En : G. H. Coombs, and J. North (ed.), Biochemical protozoology. Taylor & Francis Ltd., London, United Kingdom.

- \* Roghani H.S., Massarrat S, Shirekhoda M. and Butorab Z. (2003). Effect of different doses of furazolidone with amoxicillin and omeprazole on eradication of *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol* Jul;18(79): 778-82.
  
- \* Romero, M. L. (1996). Determinación de la eficacia y actividad biológica *in vitro* de fármacos de la familia de los 5-Nitroimidazoles ante el protozoario *Giardia duodenalis*. Caracterización parcial de la resistencia a drogas en este parásito. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México. p.p.
  
- \* Rossignol J. F., Ayoub A. and Ayers M. S. (2001). Treatment of diarrhea caused by *Giardia intestinalis* and *Entamoeba histolytica* or *E. dispar*: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of nitazoxanide. *J Infect Dis.* 184(3):381-4.
  
- \* Samuelson, J. (1999). Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1533-1541.
  
- \* Schaefer, W.F. (1990). Methods for encystation for *Giardia*. En: Meyer, E.A. (Eds). *Giardiasis*. Capítulo 7. Elsevier. Pp. 111-136.

- \* Smith, P. D., Gillin, F. D. Spira W. M. and 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. and 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* 18-7 pp. 991-997.
  
- \* Sogin, L.M., Gunderson, J.H., Elwood, J.H., Alonso, R.A. and Peattle, D.A. (1989). Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia* . *Science* 243 (6): 75-77.
  
- \* Schupp, D.G., Reinar, S.D., Gillin, D.F and Erlandensen, L.S. (1990). *In vitro* encystations of *Giardia*. En: Meyer, E.A. (Eds). *Giardiasis*. Capitulo 8. Elsevier. Pp 137-154.
  
- \* Sullivan P. B., Marsh M. N., Phillips, M. B., Dewith, G. Neale, G. Cevallos, A. M., Yamson, P. and Farthing M. J. G. (1991). Prevalence and treatment of *Giardiasis* chronic diarrhoea and malnutrition. *Archives of Disease in Childhood* 60: 304-306.

- \* Tandon, B. N., Tandon, R. K., Satpathy, B. K. and Shrinivas. (1977). Mechanism of malabsorption in giardiasis: a study of bacterial flora and bile salt deconjugation in upper jejunum. *Gut*. 18(3):176-81.
  
- \* Tay, J., Ruiz, A., Schenone, H., Rober, L., Sanchez-Vega, J.T., Uribarren, T., Becerril, M.A. and Romero, R. (1994). Frequency of intestinal Protozoosis in the Mexican Republic. *B. Bol Chil Parasitol*. 49 (1-2): 9-15.
  
- \* Tovar, J., León, A. G., Sánchez, B. L., Sutak, R. Tachezy, J., Van der Glezen, M., Hernández, M., Muller, M. and Lucocq, M. J. (2003). Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation: *Nature* 426 (13) 172-176.
  
- \* Townson, S. M., Hanson, G. R., Upcroft, J. A. and Upcroft, P. (1994). A purified ferredoxin from *Giardia duodenalis*. *Eur. J. Biochem*. 220: 439-446.
  
- \* Townsend, L.B. and Wise, D.S. (1990). The synthesis chemistry of certain anthelmintics benzimidazoles. *Parasitol. Today*. 6 (4) 107-112.
  
- \* Tracy, J.W., and Webster, L.T. (1996). Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections, p. 987-1008. En: J. G. Hardman, and L. E. Limbird

(ed.), The pharmacological basis of therapeutics, 9 th Ed. McGraw-Hill Book Co., New York, N.Y.

- \* Upcroft, J. and P. Upcroft. (1998). My favorite cell: *Giardia*. Bioessays. 20:256-263.
  
- \* Upcroft, P. and Upcroft, J. A. (2001). Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anerobic Protozoa. Clin. Microbiol. Rev. 14(1): 150-154.
  
- \* Vasil'ev Iu V, Zvenigorodskasia L.A., Kolomiets E.V.and Firsanova Viu. (2002). Fromilid (clarithromycin) In eradication patients in patients with duodenal ulcer associated with *Helicobacter pylori* (comparison of two treatment variations) Ter Arkh. 74(8):58-60.
  
- \* Velásquez, D. L., (2004). Determinación de la eficacia *in vitro* de fármacos de la familia de los derivados de acridina en trofozoítos de *Giardia duodenalis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM. México.
  
- \* Ward, W., Alvarado, L., Rawlings, N.D., Engel, J.C., Franklin, C and McKerrow, J.H. (1997). A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for encystations of *Giardia*. Cell. 89(3): 437-44.

\* Warren, K. S. (1988). The biology of parasitism a molecular and immunological approach New York:3-12.

\* World Health Organization (1986). Guidelines for the prevention and control of Giardiasis. WHO (Suiza).

Wolfe, M. S. (1978). *Giardiasis* New England Journal of Medicine 298: 319-321.

## XI APÉNDICE

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

Bilis bovina bacteriológica (Sigma Chem. Co)	0.05	g
Tripticasa (casein digest peptone, BBL)	20	g
Extracto de levadura (BBL)	10	g
Dextrosa (Baker An.)	10	g
Cloruro de Sodio	2	g
Cisteína-monoclorhidrato	2	g
Ácido ascórbico (Merck)	0.1	g
Fosfato de Potasio monobásico	0.6	g
Fosfato de Potasio dibásico (Baker An.)	1	g
Citrato férrico de amonio (Baker An.)	23	mg

-Disolver en H<sub>2</sub>O bidestilada hasta 800 ml.

-Ajustar pH a 6.8-6.9 y aforar a 900ml.

-Filtrar en membrana de 0.22mm de diámetro de poro.

-Realizar prueba de esterilidad.

-Completar con 100ml de suero bovino descomplementado (Hyclone) y 1ml de stock de penicilina (500,000UI) estreptomina (50 mg).

-Almacenar a 4°C hasta su uso.

\*Es estable por 2 semanas una vez completado.

## **1.2.- PREPARACIÓN SOLUCIONES DE TRABAJO**

### **1.2.1.-METRONIDAZOL 10 mM**

Metronidazol-----	0.00517 mg
Dimetilsulfoxido (DMSO)-----	3.0 mL

### **1.2.2.- FURAZOLIDONA 4.5 Mm**

Furazolidona -----	.00202 mg
Dimetilsulfoxido (DMSO) -----	2.0 mL

### **1.2.3.- ALBENDAZOL 100 mM**

Albendazol -----	.0017 mg
Dimetilsulfoxido (DMSO) -----	1.7 mL

### 1.2.3.1.-ALBENDAZOL 100 $\mu$ M

PARA 1.0 mL

Stock Albendazol 100 mM ----- 26.53  $\mu$ l

Dimetilsulfoxido (DMSO) ----- 976.47 mL

### 1.2.4.- NITAZOXANIDA 4.5 mM

Nitazoxanida-----0.00276 mg

Dimetilsulfoxido ----- 2.0 mL

### 1.2.5.- QUINACRINA 4.5 mM

Quinacrina -----0.004256 mg

Dimetilsulfoxido (DMSO) ----- 2.0 mL

### 1.3.- FRACCIONES EXPERIMENTALES DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MÍNIMA, UTILIZADAS EN COMBINACIÓN PARA CADA FÁRMACO

#### 1.3.1.- COMBINACIÓN NITAZOXANIDA-METRONIDAZOL

COMBINACIÓN NITAZOXANIDA-METRONIDAZOL		
FRACCIÓN CLM	CONCENTRACIÓN STOCK NITAZOXANIDA	VOLUMEN DEL STOCK $\mu$ l
1.1	4.5 Mm	1.74
1.0	4.5 mM	1.58
0.80	4.5 mM	1.27
0.65	4.5 mM	1.03
0.50	0.45 mM	7.9
0.30	0.45 mM	4.7
0.20	0.45 mM	3.1
0.10	0.45 mM	1.5

COMBINACIÓN NITAZOXANIDA-METRONIDAZOL		
FRACCIÓN CLM	CONCENTRACIÓN STOCK METRONIDAZOL	VOLUMEN DEL STOCK $\mu$ l
1.1	10Mm	2.22
1.0	10 mM	2.02
0.80	10 mM	1.62
0.65	10 mM	1.31
0.50	10 mM	1.01
0.30	1.0 mM	6.07
0.20	1.0 mM	4.05
0.10	1.0 mM	2.02

### 1.3.2.- COMBINACIÓN FURAZOLIDONA-QUINACRINA

COMBINACIÓN FURAZOLIDONA-QUINACRINA		
FRACCIÓN CLM	CONCENTRACIÓN STOCK FURAZOLIDONA	VOLUMEN DEL STOCK $\mu$ l
1.0	4.5 mM	4.83
0.50	4.5 mM	2.41
0.25	4.5 mM	1.20
0.10	0.45 mM	4.83
0.05	0.45 mM	2.41
0.025	0.45 mM	1.20
0.01	0.045 mM	4.83
0.005	0.045 mM	2.41

COMBINACIÓN FURAZOLIDONA-QUINACRINA		
FRACCIÓN CLM	CONCENTRACIÓN STOCK QUINACRINA	VOLUMEN DEL STOCK $\mu$ l
1.0	4.5 mM	12.35
0.50	4.5 mM	6.17
0.25	4.5 mM	3.08
0.10	4.5 mM	1.23
0.05	0.45 mM	6.17
0.025	0.45 mM	3.08
0.01	0.45 mM	1.23
0.005	0.45 mM	0.61

### 1.3.3.- COMBINACIÓN FURAZOLIDONA-METRONIDAZOL

COMBINACIÓN FURAZOLIDONA-METRONIDAZOL		
FRACCIÓN CLM	CONCENTRACIÓN STOCK FURAZOLIDONA	VOLUMEN DEL STOCK $\mu\text{L}$
1.0	4.5 mM	4.83
0.50	4.5 mM	2.41
0.25	4.5 mM	1.20
0.10	0.45 mM	4.83
0.05	0.45 mM	2.41
0.025	0.45 mM	1.20
0.10	0.045 mM	4.83
0.005	0.045 mM	2.41

COMBINACION FURAZOLIDONA-METRONIDAZOL		
FRACCIÓN CLM	CONCENTRACIÓN STOCK METRONIDAZOL	VOLUMEN DEL STOCK $\mu\text{L}$
1.0	10mM	2.0
0.50	10 mM	1.0
0.25	1 mM	5.06
0.10	1 mM	2.0
0.05	1 mM	1.0
0.025	0.1 mM	5.06
0.01	0.1 mM	2.0
0.005	0.1 mM	1.0

### 1.3.4.- COMBINACIÓN FURAZOLIDONA-NITAZOXANIDA

COMBINACIÓN FURAZOLIDONA-NITAZOXANIDA		
FRACCIÓN CLM	CONCENTRACIÓN STOCK FURAZOLIDONA	VOLUMEN DEL STOCK $\mu$ l
1.0	4.5 mM	4.83
0.50	4.5 mM	2.41
0.30	4.5 mM	1.44
0.25	4.5 mM	1.20
0.15	0.45 mM	7.33
0.10	0.45 mM	4.83
0.05	0.45 mM	2.41
0.01	0.045 mM	4.83

COMBINACIÓN FURAZOLIDONA-NITAZOXANIDA		
FRACCIÓN CLM	CONCENTRACIÓN STOCK NITAZOXANIDA	VOLUMEN DEL STOCK $\mu$ l
1.0	4.5 Mm	1.589
0.50	4.5 mM	0.794
0.30	0.45 mM	4.76
0.25	0.45 mM	3.97
0.15	0.45 mM	2.38
0.10	0.45 mM	1.58
0.05	0.045 mM	7.94
0.01	0.045 mM	1.58

### 1.3.5.- COMBINACIÓN FURAZOLIDONA-ALBENDAZOL

COMBINACIÓN FURAZOLIDONA-ALBENDAZOL		
FRACCIÓN CLM	CONCENTRACIÓN STOCK FURAZOLIDONA	VOLUMEN DEL STOCK $\mu\text{L}$
1.0	4.5 mM	4.83
0.65	4.5 mM	3.13
0.50	4.5 mM	2.41
0.30	4.5 mM	1.44
0.20	4.5 mM	0.96
0.10	0.45 mM	4.83
0.05	0.45 mM	2.41
0.01	0.45 mM	0.483

COMBINACIÓN FURAZOLIDONA- ALBENDAZOL		
FRACCIÓN CLM	CONCENTRACIÓN STOCK ALBENDAZOL	VOLUMEN DEL STOCK $\mu\text{L}$
1.0	100 $\mu\text{M}$	6.93
0.65	100 $\mu\text{M}$	4.50
0.50	100 $\mu\text{M}$	3.46
0.30	100 $\mu\text{M}$	2.07
0.20	100 $\mu\text{M}$	1.38
0.10	10 $\mu\text{M}$	6.93
0.05	10 $\mu\text{M}$	3.46
0.01	10 $\mu\text{M}$	0.693

### 1.3.6.- COMBINACIÓN METRONIDAZOL-ALBENDAZOL

COMBINACIÓN METRONIDAZOL-ALBENDAZOL		
FRACCIÓN CLM	CONCENTRACIÓN STOCK METRONIDAZOL	VOLUMEN DEL STOCK $\mu$ l
1.0	10mM	2.025
0.50	10 mM	1.01
0.10	1 mM	2.025
0.05	1 mM	1.01
0.025	0.1 mM	5.06
0.01	0.1 mM	2.025
0.005	0.1 mM	1.01
0.001	0.1 mM	.202

COMBINACION METRONIDAZOL- ALBENDAZOL		
FRACCION CLM	CONCENTRACION STOCK ALBENDAZOL	VOLUMEN DEL STOCK $\mu$ l
1.0	100 $\mu$ m	6.93
0.50	100 $\mu$ m	3.46
0.10	100 $\mu$ m	0.69
0.05	10 $\mu$ m	3.46
0.025	10 $\mu$ m	1.73
0.01	10 $\mu$ M	0.69
0.005	1 $\mu$ M	3.46
0.001	1 $\mu$ M	0.69

### 1.3.7.- COMBINACIÓN QUINACRINA-ALBENDAZOL

COMBINACIÓN QUINACRINA-ALBENDAZOL		
FRACCIÓN CLM	CONCENTRACIÓN STOCK QUINACRINA	VOLUMEN DEL STOCK $\mu\text{L}$
1.0	4.5 mM	12.35
0.90	4.5 mM	11.11
0.80	4.5 mM	9.88
0.65	4.5 mM	8.02
0.50	4.5 mM	6.17
0.40	4.5 mM	4.94
0.30	4.5 mM	3.70
0.25	4.5 mM	3.08

COMBINACIÓN QUINACRINA-ALBENDAZOL		
FRACCIÓN CLM	CONCENTRACIÓN STOCK METRONIDAZOL	VOLUMEN DEL STOCK $\mu\text{L}$
1.0	100 m	6.93
0.90	100 $\mu\text{m}$	6.23
0.80	100 $\mu\text{m}$	5.54
0.65	100 $\mu\text{m}$	4.50
0.50	100 $\mu\text{m}$	3.46
0.40	100 $\mu\text{M}$	2.77
0.30	100 $\mu\text{M}$	2.07
0.25	100 $\mu\text{M}$	1.13

### 1.3.8.- COMBINACIÓN METRONIDAZOL-QUINACRINA

COMBINACIÓN METRONIDAZOL-QUINACRINA		
FRACCIÓN CLM	CONCENTRACIÓN STOCK QUINACRINA	VOLUMEN DEL STOCK $\mu\text{L}$
1.0	4.5 mM	12.35
0.90	4.5 mM	11.11
0.80	4.5 mM	9.88
0.65	4.5 mM	8.02
0.50	4.5 mM	6.17
0.40	4.5 mM	4.94
0.30	4.5 mM	3.70
0.25	4.5 mM	3.08

COMBINACIÓN METRONIDAZOL-QUINACRINA		
FRACCIÓN CLM	CONCENTRACIÓN STOCK METRONIDAZOL	VOLUMEN DEL STOCK $\mu\text{l}$
1.0	10 mM	2.02
0.90	10 mM	1.82
0.80	10 mM	1.62
0.65	10 mM	1.31
0.50	10 mM	1.01
0.40	1 mM	8.1
0.30	1 mM	6.0
0.25	1 mM	5.0

### 1.3.9.- COMBINACIÓN NITAZOXANIDA-ALBENDAZOL

COMBINACIÓN NITAZOXANIDA-ALBENDAZOL		
FRACCIÓN CLM	CONCENTRACIÓN STOCK NITAZOXANIDA	VOLUMEN DEL STOCK $\mu\text{L}$
1.0	4.5 Mm	1.58
0.80	4.5 mM	1.27
0.65	4.5 mM	1.03
0.50	4.5 mM	.79
0.30	0.45 mM	4.76
0.20	0.45 mM	3.17
0.10	0.45 mM	1.58
0.025	0.45 mM	.397

COMBINACIÓN NITAZOXANIDA-ALBENDAZOL		
FRACCIÓN CLM	CONCENTRACIÓN STOCK ALBENDAZOL	VOLUMEN DEL STOCK $\mu\text{l}$
1.0	100 mM	6.93
0.80	100 mM	5.54
0.65	100 mM	4.50
0.50	100 mM	3.46
0.30	100 mM	2.07
0.20	100 mM	1.38
0.10	10 mM	6.93
0.025	10 mM	1.73

### 1.3.10.- COMBINACIÓN NITAZOXANIDA-QUINACRINA

COMBINACIÓN NITAZOXANIDA-QUINACRINA		
FRACCIÓN CLM	CONCENTRACIÓN STOCK QUINACRINA	VOLUMEN DEL STOCK $\mu\text{L}$
1.0	4.5 Mm	12.35
0.75	4.5 mM	9.26
0.50	4.5 mM	6.17
0.30	4.5 mM	3.70
0.20	4.5 mM	2.47
0.10	4.5 mM	1.23
0.05	0.45 mM	6.17
0.01	0.45 mM	1.23

COMBINACIÓN NITAZOXANIDA-QUINACRINA		
FRACCIÓN CLM	CONCENTRACIÓN STOCK NITAZOXANIDA	VOLUMEN DEL STOCK $\mu\text{l}$
1.0	4.5 mM	1.58
0.75	4.5 mM	1.19
0.50	0.45 mM	7.94
0.30	0.45 mM	4.76
0.20	0.45 mM	3.17
0.10	0.45 mM	1.58
0.05	0.045 mM	1.94
0.01	0.045 mM	1.58