



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

“EFICACIA DE COMPUESTOS DERIVADOS DE ACRIDINA SOBRE TROFOZOÍTOS DE *Giardia duodenalis in vitro*. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA PARCIAL DE CULTIVOS DEL PARÁSITO RESISTENTES A DISTINTOS FARMACOS”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

**P R E S E N T A:
LETICIA VELAZQUEZ DELGADO**

ASESORES:

DR. RAUL ARGÜELLO GARCIA

DRA. MARIA GUADALUPE ORTEGA PIERRES

DRA. LUISA MARTINEZ AGUILAR

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

ADios

Gracias.....

Por permitirme llegar a este día, por darme fuerzas, salud e iluminar mi vida haciendo frente a los fracasos y alegrías. Por ser mi alimento, mi hogar y mi refugio. Por tan sólo un segundo más para respirar.

“Nunca te arrepentirás de haber realizado hoy lo que pensabas dejar para mañana, por que en la juventud aprendemos pero en la vejez comprendemos”.

“La recompensa no está en el resultado sino en el esfuerzo realizado bajo la mirada de Dios”.

“Si amas la vida no desperdicies el tiempo, porque el tiempo es la tela de la vida”.

Dedico este trabajo realizado con gran esfuerzo e
ínmenso amor....

A mis padres

Por ser el fundamento en mi vida y recibir de ustedes su apoyo total e incondicional. Por brindarme su confianza y la oportunidad de lograr este gran reto, haciendo de mí una persona útil, capaz de ejercer mi profesión . Agradezco su enseñanza de ayudar a los demás, siendo esto un claro ejemplo de ustedes mismos.

iii Mil gracias !!!

A mi hermano: Andrés

Por aguantarme todo este tiempo en los momentos compartidos; tu invaluable ayuda y por encontrar el camino correcto para tu nueva forma de vida, la cual nos ha permitido convivir mejor en nuestra familia. Gracias por todos los detalles recibidos.

A una persona especial.....

Que es mi mamá, porque ante todo has sido mi amiga y mi confidente, además de tus sabios consejos. Siempre recordaré tu frase y espero aplicarla día con día: “La suerte no llega, cada quien trabaja por la vida que uno quiere”.

¡ Espero nunca fallarte!

Dedico este trabajo con amor y cariño

A mi abuelita †

Por que ella refleja el esfuerzo y trabajo a lo largo de toda una vida, además de ser el pilar de mi familia.....

Abue la frase anterior la escribí cuando aun estabas con nosotros y aunque físicamente ya no te puedo ver, siempre estarás en mi mente y mi corazón. Ahora eres libre!! Mi consuelo es que estas al lado de Jesús y que algún día estaremos juntas otra vez.

Por ello, el gran esfuerzo que estoy realizando ahora al volver a retomar todo esto, me enorgullece saber que lo estas viendo y que me acompañaras a presentar este trabajo.

A mis tía(o)s

Por el apoyo incondicional obtenido en toda mi vida. Por su lucha y constancia ante cualquier contratiempo, además del amor y paciencia que nos ofrecen día con día a todos sus hijo(a)s y espero que siempre lo valoremos.

Una mención especial para mi tía Inés quien ha sido el espejo en quien siempre soñé reflejarme y además de ser un claro ejemplo para mí de una vida de lucha constante.

A mis primas (os)

Por el ánimo en los momentos más difíciles y por despertar en mí la motivación de seguir adelante.

También con gran amor y admiración a mis hermanas Martuchis y Adriana.

A los todos los peques porque ellos me inspiran en seguir trabajando para lograr un mejor futuro para México y para que sigamos el ejemplo que nuestros padres por más humilde que sea, nos han enseñado y aprendamos a compartirlo con ellos (la unión familiar).

A toda mi familia

Por enseñarme que una familia unida siempre tendrá comprensión, amor, cariño y apoyo.

A pesar de las dificultades que se han presentado en los últimos años, mi sueño siempre será que en mi familia exista los lazos más importantes de unidad..... el amor y el perdón.

Siempre recordaremos a quienes ya no están con nosotros y seguirán siendo importantes en nuestro corazón.

También a tí te lo dedico y te seguiré esperando....

A mis amigos

Arlette (bebe), Carmen (Mita), Moni , Marita , Gaby, Erika, Odín, Diana, Elizabeth y Ricardo por los momentos agradables y difíciles que pasamos juntos, aprendiendo a levantarnos cuando lo necesitamos, porque a pesar de que a cada uno de ustedes los fui conociendo a lo largo de mi vida profesional todos han compartido una parte importante de su vida junto a mí.

A mis profesores

Por sembrar constantemente la semilla de la ciencia y el saber en la juventud de México que tiene sed de nuevos profesionistas honestos y trabajadores.

A la FEESC

Por darme una oportunidad para descubrir este camino y recoger el fruto de lo que un día sembramos. A esta maravillosa carrera y escuela, por la que sus muros observan día a día gente nueva con esta vocación.

A los compañeros QFB's Generación 94-98.

A mis amigos del Colegio de Bachilleres Plantel No. 5 y profesores

A toda la banda de las Margaritas a las que siempre recuerdo con cariño (Danae , Luz , Adriana, Marina, y Lulú) y con especial aprecio a Rafa , Cruz , David y Miguel . A los profesores de este plantel de quienes recibí sus conocimientos y convicciones.

A los compañeros de Harmon-Hall Sta. Mónica

Por su apoyo y ánimo en momentos difíciles y agradables, con especial gratitud para Henry , Hilda , Nilson , Rodolfo, Maripaz, Fernando , María Elena , Sergio (El teacher); ¡ Thanks for all!

A Raquel Romo y Raúl Argüello por confiar profesionalmente en mí y por darme mi primera oportunidad laboral.

A los aztracompañeros

Araceli González por su compañerismo y por ser un gran aliciente. Héctor Armenta , Benjamín Coverston y Patricio Domínguez por alegrarme la vida cuando parecía estar muriendo.

Héctor López y Hugo Rojas por ser grandes amigos.

Agradecimientos

Con profundo agradecimiento.....

A la Dra. Ma. Guadalupe Ortega Pierres

Por permitirme colaborar en su grupo de trabajo y enseñarme que existe otra perspectiva en la vida..... la investigación .

A Raúl Argüello García

Por su larga paciencia, confianza y su agradable amistad a lo largo de este trabajo . Por ser un gran maestro, un estupendo amigo y un padre, que ha dejado imborrable huella en mi vida profesional.

A la Dra. Luísa Martínez

Por su apoyo profesional y moral en la revisión de este trabajo, además de formar parte de este.

A todo el Laboratorio 2 de Genética y Biología Molecular

Rocío , Arturo , Alonso , Luis , Alberto , Elizabeth , Nancy , Paty ,
Lupita , Mary , Lydía y Raúl.

Por todas las facilidades otorgadas y consejos recibidos, además de su
valiosa amistad.

También de manera especial a Blanca Herrera , Sr. René López , Leticia
Juárez por su apoyo y ayuda técnica ya que sin ellos nuestra labor no
sería posible.

Al honorable jurado

Por su ayuda profesional , académica y su participación en este trabajo de
tesis. Además de sus acertadas sugerencias y buena disposición .

A todas aquellas personas que han formado parte de mi vida emocional y
que alguna vez me brindaron una sonrisa o un regaño. Siempre estarán en
mí corazón.

¡¡¡Muchas Gracias!!!

Este trabajo fue desarrollado en el laboratorio 2 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) bajo la dirección del Dr. Raúl Argüello García, Auxiliar de Investigación del Departamento y de la Dra. Guadalupe Ortega Pierres Profesora Titular del mismo, con la coasesoría de la Dra. Luisa Martínez Aguilar, Profesora de Tiempo Completo Titular A en la Sección de Bioquímica y Farmacología Humana del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM

Durante el desarrollo de este trabajo, el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), institución a la cual hace patente su agradecimiento.

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ABREVIATURAS

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

1.1	Generalidades.....	1
1.2	Taxonomía.....	2
1.3	Morfología.....	3
1.4	Ciclo de vida.....	4
1.5	Epidemiología.....	9
1.6	Patogenia.....	10
1.7	Aspectos clínicos.....	10
1.8	Diagnóstico.....	11
1.9	Tratamiento.....	13
1.10	Profilaxis.....	18

2. ANTECEDENTES GENERALES..... 21

3. JUSTIFICACIÓN..... 23

4. OBJETIVOS

4.1	Generales.....	26
4.2	Particulares.....	26

5. MATERIALES Y METODOS

5.1.	Parásitos.....	28
5.2.	Compuestos derivados de acridina.....	28



5.3.	Cultivo, cosecha y criopreservación de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	29
5.4.	Clonación.....	31
5.5.	Pruebas de susceptibilidad a fármacos.....	32
5.5.1.	Subcultivo en medio líquido (SML).....	33
5.5.2.	Incorporación de timidina tritiada ($^3\text{H-TdR}$).....	34
5.5.3.	Reducción de sales de tetrazolio (MTT)	34
5.5.4.	Tinción con colorantes fluorogénicos (DAF-IP).....	35
5.6.	Determinación de CI_{50} y CLM de compuestos derivados de acridinas sobre trofozoítos de <i>G. duodenalis in vitro</i>	36
5.7.	Determinación de sensibilidad <i>in vitro</i> de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> a combinaciones de derivados de acridina.....	37
5.8.	Obtención de cultivos resistentes a quinacrina por subcultivo en medio líquido (SML) en concentración ascendente de fármaco.....	38
5.8.1	Selección inducida por el fármaco.....	38
5.9.	Evaluación de perfiles fenotípicos de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> sensibles y resistentes a quinacrina, furazolidona, metronidazol y albendazol.....	39
5.9.1	Marcaje de proteínas de superficie de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> con ^{125}I	39
5.9.2.	Marcaje metabólico con ^{35}S -metionina.....	40
5.9.3.	Análisis electroforético de extractos solubles marcados con ^{125}I y ^{35}S -metionina. Electroforesis en geles de	

	poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)	
	41
5.10	Métodos estadísticos.....	43
6.	RESULTADOS	
6.1	Cultivo de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	44
6.2	Evaluación de métodos para estimar la viabilidad celular de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> expuestos a quinacrina.....	45
6.2.1	Subcultivo en medio líquido (SML).....	46
6.2.2	Incorporación de timidina tritiada (³ H-TdR).....	46
6.2.3	Reducción de sales de tetrazolio (MTT).....	46
6.2.4	Tinción con colorantes fluorogénicos (DAF-IP).....	47
6.3	Análisis del efecto de las distintas concentraciones de derivados de acridina en trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	48
6.4	Obtención de CI ₅₀ y CLM de derivados de acridina.....	53
6.5	Análisis de la relación estructura-actividad <i>in vitro</i> de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> entre los derivados de acridina...	58
6.6	Análisis de sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>G. duodenalis</i> a combinaciones de derivados de acridina.....	59
6.7	Obtención de cultivos resistentes a quinacrina.....	60
6.8	Determinación de perfiles fenotípicos en trofozoítos sensibles y resistentes a quinacrina, furazolidona, metronidazol y albendazol.	
6.8.1	Marcaje de antígenos de superficie con ¹²⁵ I.....	68
	a) Caracterización electroforética.....	68
	b) Análisis densitométrico.....	71



6.8.2	Marcaje metabólico con ^{35}S -metionina.....	81
	a) Caracterización electroforética para ^{35}S -metionina..	81
	b) Análisis densitométrico.....	83
7.	DISCUSION	95
8.	CONCLUSIONES	120
9.	ANEXOS	
	Anexo I. Reactivos y soluciones complementarias	
	Medio de TYI-S-33 suplementado con bilis.....	122
	Amortiguador de fosfatos salina (PBS) (Stock 10X).....	123
	Preparación de colorantes fluorogénicos (DAF-IP).....	123
	Preparación de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT).....	124
	Solución para emisión de centelleo.....	124
	Preparación de medio de Luria para prueba de esterilidad.....	125
	Determinación de proteínas con el reactivo de fenol de Folín (Método de Lowry).....	125
	Electroforesis de proteínas en geles con un gradiente continuo de acrilamida (5-15%).....	127
	Marcaje de antígenos de superficie con ^{125}I -lactoperoxidasa.....	131
	Secado de geles, autorradiografía indirecta y revelado de placas de rayos X para geles en los que se separan proteínas radiomarcadas por SDS-PAGE	132
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	135

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1.	Especies conocidas en el género <i>Giardia</i>	6
Tabla 2.	Fármacos comúnmente usados para el tratamiento de la Giardiosis.....	19
Tabla 3.	Valores de CI's y CLM's obtenidos empleando los diferentes métodos de evaluación de viabilidad sobre los trofozoítos de la cepa WB expuestos a quinacrina.....	52
Tabla 4.	Características de solubilidad para los derivados de acridina empleados.....	54
Tabla 5.	Valores de CI's y CLM's obtenidos por SML de trofozoítos de la cepa WB expuestos a los derivados de acridina.....	56
Tabla 6.	Clasificación del efecto farmacológico de los derivados de acridina en base a las CLM's obtenidas experimentalmente.....	57
Tabla 7.	Interacciones farmacológicas resultantes entre los derivados de acridina en base a sus ICF's.....	62
Tabla 8.	Valores de CI's y CLM's obtenidos empleando el método de SML sobre trofozoítos de la cepa WB y P1 expuestos a quinacrina.....	66
Figura 1.	Entidades morfológicas del parásito <i>G. duodenalis</i>	7
Figura 2.	Ciclo de vida del parásito <i>G. duodenalis</i>	8
Figura 3.	Estructura química de quinacrina.....	14
Figura 4.	Estructura química de furazolidona.....	15
Figura 5.	Estructura química de metronidazol.....	16
Figura 6.	Estructura química de albendazol.....	17
Figura 7.	Mecanismo de acción propuesto para la quinacrina.....	20



Figura 8.	Estructuras químicas de los compuestos derivados de acridina empleados en este trabajo.....	50
Figura 9.	Determinación de la viabilidad en trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> de la cepa WB expuestos a quinacrina empleando diferentes métodos.....	51
Figura 10.	Curvas de viabilidad para medir la concentración-respuesta de los derivados de acridina en trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> de la cepa WB	55
Figura 11.	Cinética de resistencia a quinacrina de la cepa WB de <i>G. duodenalis</i> inducidas por selección al fármaco.....	63
Figura 12.	Evaluación de resistencia a trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> sensibles y resistentes expuestos a 12.5 μ M de quinacrina	64
Figura 13.	Determinación de viabilidad celular por el método de SML de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> expuestos a quinacrina empleando 2 cepas diferentes.....	65
Figura 14.	Análisis por microscopia con sistema de epifluorescencia de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> sensibles y resistentes a quinacrina...	67
Figura 15.	Análisis electroforético de antígenos solubles totales de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	72
Figura 16.	Análisis electroforético de antígenos solubles totales de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> resistentes a diferentes fármacos.....	73
Figura 17.	Análisis electroforético de antígenos solubles totales de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> resistentes a concentraciones ascendentes de quinacrina.....	74
Figura 18.	Análisis autorradiográfico de antígenos de superficie de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	75



Figura 19. Análisis autorradiográfico de antígenos de superficie de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> resistentes a diferentes fármacos.....	76
Figura 20. Análisis autorradiográfico de antígenos de superficie de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> resistentes a concentraciones ascendentes de quinacrina.....	77
Figura 21. Análisis densitométrico de antígenos de superficie de cepas de <i>G. duodenalis</i> resistentes a diferentes fármacos.....	78
Figura 22. Análisis densitométrico de antígenos de superficie de cepas de <i>G. duodenalis</i> resistentes a concentraciones ascendentes de quinacrina.....	79
Figura 23. Análisis densitométrico de antígenos de superficie de cepas de <i>G. duodenalis</i> resistentes a concentraciones ascendentes de quinacrina.....	80
Figura 24. Análisis electroforético de extractos de proteínas totales de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	85
Figura 25. Análisis electroforético de extractos de proteínas totales de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> resistentes a diferentes fármacos.....	86
Figura 26. Análisis autorradiográfico de extractos de proteínas totales de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> a concentraciones ascendentes de quinacrina.....	87
Figura 27. Análisis autorradiográfico de proteínas marcadas con ³⁵ S-metionina de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	88
Figura 28. Análisis autorradiográfico de proteínas marcadas con ³⁵ S-metionina de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> resistentes a diferentes fármacos.....	89



Figura 29.	Análisis autorradiográfico de proteínas marcadas con ³⁵ S-metionina de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> resistentes a concentraciones ascendentes de quinacrina.....	90
Figura 30.	Análisis densitométrico de síntesis de proteínas de cepas de <i>G. duodenalis</i> resistentes a diferentes fármacos.....	91
Figura 31	Análisis densitométrico de síntesis de proteínas de cepas de <i>G. duodenalis</i> resistentes a concentraciones ascendentes de quinacrina.....	92
Figura 32.	Análisis densitométrico de síntesis de proteínas de cepas de <i>G. duodenalis</i> resistentes a concentraciones ascendentes de quinacrina.....	93
Figura 33.	Análisis comparativo de CLM's de cepas sensibles y resistentes a quinacrina, albendazol, furazolidona, metronidazol (A) y el factor R/S de cada uno de los fármacos (B).....	94

ABREVIATURAS

% (p/v) ó (v/v)	Concentración peso a volumen ó volumen a volumen
% CFE	Porcentaje de eficiencia de formación de colonias
λ	Longitud de onda
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μm	Micras o micrómetros
$^3\text{H-TdR}$	Timidina marcada con tritio
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag's	Antígenos
Alb	Albendazol
c.b.p.	cuanto baste para
c.p.m.	cuenta por minuto
CI₂₅	Concentración inhibitoria para el 25% del cultivo
CI₅₀	Concentración inhibitoria para el 50% del cultivo
CI₇₅	Concentración inhibitoria para el 75% del cultivo
CIE	Contrainmunolectroforesis
CLM	Concentración Letal Mínima
Col.	Colaboradores
D.O.	Densidad óptica
DAF	Diacetato de fluoresceína
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido

ELISA	Ensayos de inmunoabsorbente acoplado a enzima
Factor R/S	Factor Resistencia/Sensibilidad
Fzd	Furazolidona
<i>G. duodenalis</i>	<i>Giardia duodenalis</i>
g.	Gramos
h., hrs.	Hora y horas
ICF	Indice de concentración fraccional
IP	Ioduro de propidio
kDa	Kilodaltones
Kg	Kilogramo
M	Concentración molar
mg	Miligramos
mg	Miligramos
min.	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
Mr	Masa relativa
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio
Mtz	Metronidazol
N	Concentración normal
N₂	Nitrógeno
nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
°C	Temperatura en grados centígrados
P1	Cepa Portland -1

PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PCR	Reacción de cadena de polimerasa
pg.	Picogramos
pH	Potencial de hidrogeno
PLFR	Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción
PM	Peso molecular
PMS	Metasulfato de fenazina
PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo
Qnc	Quinacrina
r	Coefficiente de correlación
Rf	Migración relativa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato
seg.	Segundos
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
TYI-S-33	Medio con tripticasa (T), extracto de levadura (Y), Hierro (I) y suero (S).
U.I.	Unidades internacionales
x.g.	Gravedades



RESUMEN

Giardia duodenalis (*G. duodenalis*) es un protozooario flagelado binucleado que parásita a un amplio rango de vertebrados, entre ellos el hombre y que produce la infección denominada giardiosis, la cual presenta cuadros clínicos que pueden manifestarse como diarrea hasta síndrome de mala absorción. La giardiosis puede considerarse como un problema de salud pública que repercute a nivel mundial. Dicha parasitosis, al igual que otras se controla primeramente empleando agentes quimioterápicos, como quinacrina, furazolidona, derivados de nitroimidazoles (metronidazol, tinidazol y secnidazol); más recientemente el albendazol y nitazoxanida. Estos fármacos han resultados efectivos, sin embargo la presencia de casos refractarios a algunos de ellos han limitado su eficacia contra el parásito, debido al uso empírico y extensivo de estos fármacos aunado a sus efectos adversos.

La quinacrina (Qnc) es un derivado de acridina de alta eficacia contra la giardiosis y ha sido considerado como un fármaco de elección, con la desventaja de presentar algunos efectos secundarios. Además de ser empleado como agente antimalárico, ha sido útil en la reversión clínica en casos de resistencia a otros fármacos. En el desarrollo de este trabajo se planteó optimizar la actividad de este grupo de fármacos a fin de disminuir su toxicidad sin repercutir significativamente en su eficacia contra el parásito, además de comparar los perfiles fenotípicos que presentan trofozoítos resistentes y sensibles de *G. duodenalis in vitro* a diferentes fármacos (furazolidona, metronidazol, albendazol y quinacrina).

En base a lo anterior, se evaluó el modo de acción de la Qnc empleando 4 métodos de determinación de viabilidad celular que incluyeron subcultivo en medio líquido (SML), incorporación de timidina tritiada ($^3\text{HTdR}$), reducción de sales de tetrazolio (MTT) y tinción con colorantes fluorogénicos (DAF-IP). Entre

estos métodos se seleccionó el óptimo para posteriormente determinar el efecto que presentan los derivados con modificaciones en la estructura química de la acridina (9-amino-acridina, 9-carboxi-acridina, acridina naranja, acridina amarilla, quinina, primaquina, cloroquina y quinacrina) sobre la viabilidad de trofozoítos de *G. duodenalis*. Posteriormente, se obtuvieron las curvas concentración-respuesta y se calcularon las concentraciones letales mínimas (CLM) correspondientes. Estos datos se emplearon para clasificar a los derivados en función de su eficacia y para determinar el tipo de interacciones farmacológicas que presentan las combinaciones diádicas. Así se evaluaron distintos tipos de combinaciones y se obtuvieron los índices de concentración fraccional (ICF) para cada caso y así determinar las posibles interacciones que se presentan de sinergia, antagonismo, aditividad o indiferencia.

También se analizó parcialmente el fenómeno de resistencia a fármacos *in vitro*, empleando el método de selección inducida por estos, y para ello la cepa de referencia WB de *G. duodenalis* fue expuesta a concentraciones ascendentes de quinacrina, una vez obtenida la cepa resistente a quinacrina (Qnc), se hizo una comparación de perfiles fenotípicos con otras cepas resistentes a fármacos de diferentes familias (furazolidona, metronidazol y albendazol) mediante el método de radioionización de antígenos (Ag's) de superficie y marcaje metabólico con ³⁵S.

Los resultados obtenidos mostraron que la quinacrina afecta inicialmente la capacidad de replicación de los parásitos determinada por subcultivo en medio líquido (SML), observándose a concentraciones más altas una disminución en la síntesis de ADN medida por la incorporación de timidina tritiada (³H-TdR) y la tasa metabólica de la glicólisis estimada por la reducción de sales de tetrazolio (MTT) y por último la actividad de las hidrolasas citosólicas medida por una tinción con colorantes fluorogénicos (DAF-IP). En el análisis estructura-actividad entre los derivados de acridina, se observó que la actividad se incrementa con la

presencia de un sustituyente NHR (R= sustituyente alifático) en C₉, potenciando el efecto la presencia de grupos NH₂ en C₃ y C₆. Cuando se evaluaron las combinaciones diádicas de los derivados con modificaciones en los sustituyentes C₃, C₆ y C₉ presentaron sinergismo, mientras que al incluir derivados con diferencias estructurales en los anillos bencénicos de la acridina, se observó antagonismo.

En cuanto a la obtención de cultivos resistentes a quinacrina (Qnc) por selección inducida al fármaco este método permitió aumentar gradualmente la concentración de Qnc hasta tener un cultivo de 12.5 μM superior a la CLM obtenida experimentalmente.

Los resultados obtenidos en los perfiles fenotípicos sugieren que la presencia de solventes para los fármacos empleados o el medio de cultivo no influye en los patrones de expresión de la síntesis de proteínas y en la expresión de los antígenos de superficie del parásito. Sin embargo, la presencia del fármaco determina el patrón de expresión por lo que en este trabajo se sugiere que la variabilidad en los perfiles fenotípicos de *G. duodenalis* que presentan las cepas resistentes dependen de la naturaleza química del fármaco.

Por último este trabajo aporta información básica útil para el diseño futuro de fármacos con una mayor eficacia contra el parásito que permitan la optimización del potencial terapéutico de estos compuestos en el tratamiento de la giardiosis y por otra parte sugiere a que nivel afecta el fármaco *in vitro* cuando se genera la resistencia en cepas de *G. duodenalis*.



1. INTRODUCCION

1.1 GENERALIDADES

En el campo de la Salud Pública se estima que una tercera parte de la población mundial está infectada con parásitos y como consecuencia existen un gran número anual de muertes independientemente de la localización parasitaria ya sea en intestino, sangre u otros tejidos (Warren, 1988).

En general, un parásito se define como un organismo que depende metabólicamente de un hospedero causando daño, y dependiendo de su localización se clasifican como: ectoparásitos (si se sitúan fuera del organismo) y endoparásitos (parásitos que se encuentran dentro del hospedero). En la relación hospedero-parásito generalmente existe cierta especificidad, sin embargo en ocasiones está puede llegar a ser una zoonosis (Faubert, 1988). El resultado de esta relación se ve influenciado por la patogenicidad del parásito, por lo que es necesario conocer las bases bioquímicas y fisiológicas de las parasitosis y proponer medidas terapéuticas y preventivas que puedan implementarse a las diferentes comunidades tanto rurales como urbanas.

En nuestro país la giardiosis es un problema de salud difícil de controlar, debido a diversos factores como: la falta de educación higiénica, las condiciones socioeconómicas precarias de una gran parte de la población mexicana (Tay y Col., 1978), además de que actualmente se han presentado casos refractarios al tratamiento debido a las posibles re-infecciones de los pacientes o bien a la ineficacia de los fármacos de uso común (Goodman y Col., 1990 y Steven y Col., 1992).

La giardiosis humana está definida por la Organización Mundial de la Salud como la infección intestinal ocasionada por el protozoario *Giardia duodenalis*



asociada o no con manifestaciones clínicas. Esta parasitosis tiene distribución cosmopolita, y está ubicada entre las principales enfermedades infecciosas en países subdesarrollados. Asimismo se considera a *G. duodenalis* como uno de los 10 principales parásitos en humanos, participando como causa de enfermedad en una proporción de casos semejantes a la ascariasis. En países desarrollados, *Giardia* es el parásito intestinal reportado con mayor frecuencia. En México, la giardiosis es una de las protozoosis de mayor incidencia e impacto clínico a nivel pediátrico (Meyer, 1990; Thompson y Reynoldson, 1994).

1.2 TAXONOMIA

Giardia duodenalis fue descubierto por Leeuwenhoek (1681) en sus propias heces. Sin embargo, Lambl (1859) fue quien describió con detalle al parásito y lo nombró *Cercomonas intestinalis*. El nombre de *lamblia* fue propuesto por Blanchard (1888).

Giardia ha sido clasificada en el **Phylum** *Sarcomastigophora* y **clase** *Zoomastigophorea* junto con otros parásitos flagelados tales como *Leishmania*, *Trichomonas*, *Trypanosoma* y *Dientamoeba* en el **orden** *Diplomonadida*. Considerando la secuencia de la subunidad menor de ARNr de este parásito, éste ha sido propuesto como el eucarionte más primitivo (Sogin y Col., 1988).

En la primera mitad de este siglo, la taxonomía de *Giardia* es aún confusa ya que existen numerosas especies de dudosa validez. Estas se han descrito principalmente considerando la especificidad del hospedero, las dimensiones del cuerpo y las variaciones en la estructura diferenciándolo. En un estudio de Landmark que fue publicado por Filice se sugieren tres tipos morfológicos como los más importantes: *Giardia agilis* que infecta a anfibios, *Giardia muris* que infecta roedores y *Giardia duodenalis* que infecta mamíferos incluyendo humanos (Filice,



1952). Recientemente se han reportado dos especies que ocurren en pájaros: *G. psittaci* (Erlandsen y Bemrick, 1987) la cual presenta solo un flagelo ventrolateral y *G. ardeae* (Erlandsen y Col., 1990) la cual presenta solo un flagelo caudal y una morfología variable del cuerpo mediano. Esta última incluida en el grupo “*muris*” por Filice (1952) (Tabla 1)(Thompson y Col., 2000).

Es importante mencionar que la denominación de este parásito como *G. duodenalis* en lugar de *G. lamblia* se debe a dos razones principales, siendo la primera el lugar inicial que parasita (el duodeno) y la segunda el hecho de que la nomenclatura científica actual normalmente no contempla el nombre del investigador que las descubre (Blaser, 1995). *Giardia duodenalis* es el protozooario enteropatógeno más común en humanos, siendo una importante causa de diarrea crónica y aguda, la cual puede estar asociada con una mala absorción intestinal y retraso en el crecimiento de niños (Farthing y Col., 1986a; Sullivan y Col., 1991).

1.3 MORFOLOGIA

En su ciclo biológico *Giardia duodenalis* presenta dos entidades morfológicas: la forma vegetativa que es el trofozoíto, entidad responsable de la patogenia de la enfermedad y que existe exclusivamente dentro del tracto intestinal, y el quiste que es la forma infectiva que puede sobrevivir fuera del hospedero.

El *trofozoíto*, es un organismo binucleado con forma de pera, mide aproximadamente 12-15 μm de largo y 5-9 μm de ancho. Tiene dos núcleos y cuatro pares de flagelos dispuestos en posiciones anterior, lateral, posterior y caudal. Su superficie dorsal es convexa y la ventral cóncava, tiene un disco adherente ventral. El disco es una estructura rígida, que tiene una plataforma de microtúbulos ordenados en espiral, con una muesca posterior que sirve para que al moverse, los flagelos expulsen el líquido del disco y el parásito se adhiera a las



microvellosidades intestinales. *Giardia duodenalis* tiene proteínas específicas llamadas *giardinas*, que tienen un peso de 29-38 kDa (Holberton y Col., 1988). El flagelo tiene un arreglo típico de microtúbulos 9+2, es decir, que los flagelos se originan en los axónemas citoplásmicos constituidos por 9 hileras periféricas de microtúbulos pareados que rodean a 2 microtúbulos centrales y están revestidos por la unidad de membrana superficial. Este parásito contiene pocos organelos citoplásmicos definidos y no tiene mitocondrias. Existen vacuolas que aparecen para la función lisosomal conteniendo una gran variedad de hidrolasas (ácido fosfatasa, proteinasas dependientes e independientes de tior, DNasas y RNasas). La función de estas estructuras se ve involucrada en el ciclo de vida del parásito y en la patogénesis (Figura 1a).

La fase del *quiste* es la entidad infecciosa, con alto grado de resistencia a factores externos adversos y es la responsable de la transmisión de la infección. El *quiste* tiene forma oval y mide de 7-12 μm de largo y 7-10 μm de ancho y está rodeado por una pared compuesta por carbohidratos y proteínas formando una malla, cuyo espesor es de aproximadamente 0.3 μm (Erlandsen y Col., 1990). Dentro del quiste se pueden observar de 2-4 núcleos, junto con cuerpos medianos, cuerpos basales y componentes citoesqueléticos (Figura 1b).

1.4 CICLO DE VIDA

El ciclo biológico de *G. duodenalis* es de tipo directo con migración simple. Este se inicia cuando un hospedero ingiere agua o alimentos contaminados con quistes expulsados por reservorios humanos, otras especies o transportados por vectores como la mosca doméstica (Doiz O y Col., 2000), los cuales bajo condiciones ácidas del estómago sufren el proceso de desenquistamiento donde



por cada quiste se originan 4 trofozoítos que se adhieren al epitelio microvelloso del intestino delgado (duodeno) mediante su disco adherente ventral y se reproducen asexualmente por fisión binaria longitudinal incrementando así la concentración de trofozoítos, además de causar la sintomatología clásica de la enfermedad. Hacia la parte distal del intestino delgado (yeyuno e íleon), éstos se redondean y bajo la influencia de sales biliares y el pH local (7.8), se induce al fenómeno de enquistamiento, para posteriormente ser eliminados en las excretas (Bingham y Col., 1979). Estos últimos maduran en horas y permanecen viables por períodos prolongados (días a semanas) hasta que un nuevo hospedero los ingiere a través de agua contaminada, ya que resisten la cloración y pueden sobrevivir en el agua por semanas (Kramer M. Y Col., 1996; Jarroll E. y Col., 1981; De Regnier D. y Col., 1989), alimentos contaminados (Boreham, 1987), ser transmitidos directamente vía fecal-oral (Boreham y Shepherd, 1984) o por contacto con fómites (Adam, 1991).

La múltiple formación de células a partir de un quiste se debe a la presencia de la ploidia genómica celular y nuclear de una nueva célula enquistada conocida con el termino de excizoito que contiene 4 núcleos (ploidia celular 16N), el cual se divide en dos trofozoítos que por fisión binaria se transforman en 4 trofozoítos con 2 núcleos diploides cada uno, esta es la principal razón de infecciones ocurridas con bajas dosis de quistes de *G. duodenalis* (Bernarder y Col., 2001).

**Tabla 1.** Especies conocidas en el Género *Giardia*

Especies	Hospedero	Características Morfológicas	Dimensiones del trofozoíto	
			Largo (µm)	Ancho(µm)
<i>G. duodenalis</i>	Mamíferos salvajes y domésticos incluyendo humanos	Trofozoítos en forma de pera, con cuerpos medianos en forma de tenaza	12-15	6-8
<i>G. agilis</i>	Anfibios	Trofozoítos largos y estrechos, con cuerpos medianos en forma de palo	20-29,31	4-5
<i>G. muris</i>	Roedores	Trofozoítos redondos, con cuerpos medianos pequeños y redondos	9-12	5-7
<i>G. psittaci</i>	Pájaros	Trofozoítos en forma de pera, con cuerpos medianos en forma de tenaza y un disco ventrolateral	~14	~6
<i>G. ardeae</i>	Pájaros	Trofozoítos redondos con prominente disco ventral y flagelo rudimentario caudal. Cuerpos medianos redondos, ovalados	~10	~6.5

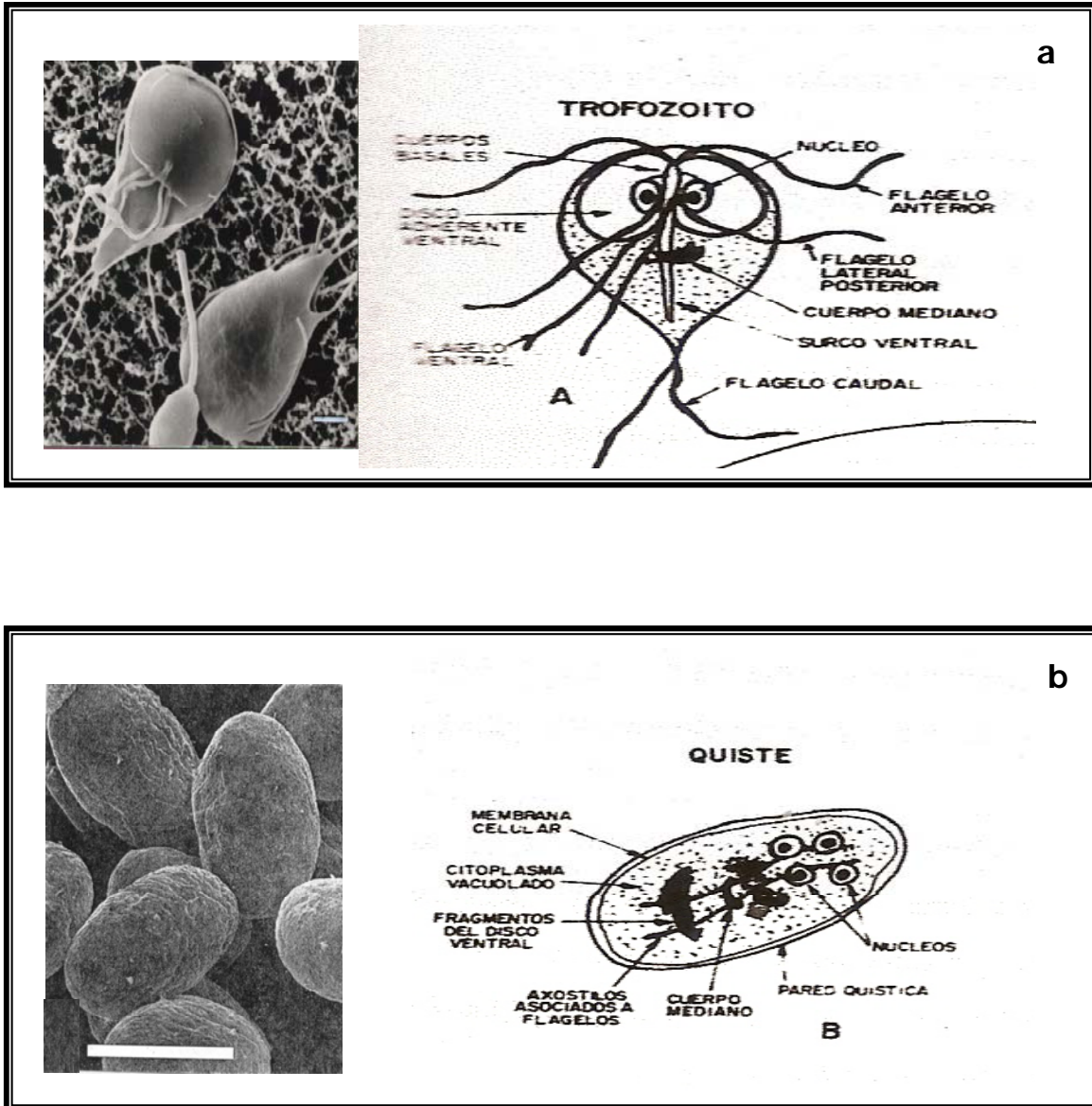


Figura 1. Entidades morfológicas del parásito *G. duodenalis*. a) Trofozoíto, b) Quiste.

CICLO DE VIDA

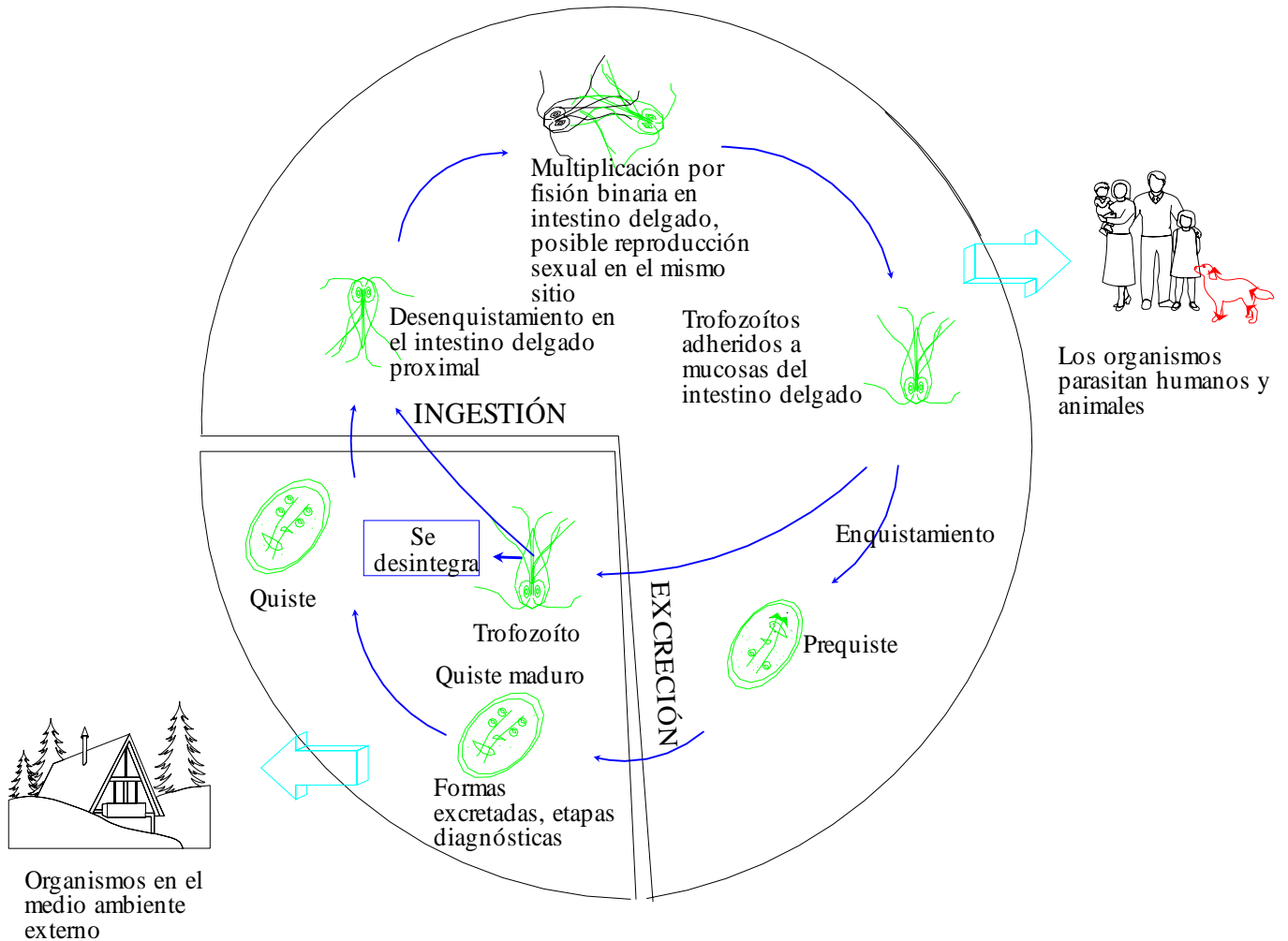


Figura 2. Ciclo de vida del parásito *G. duodenalis* en humanos. Reproducido de A.E. Meyer. Microorganisms and human disease N.Y., Appleton-Century-Crofts, 1974.



1.5 EPIDEMIOLOGIA

La giardiosis es la infección más común del intestino en humano. La giardiosis tiene un período de prepatencia de 6 a 15 días y un período de incubación de 7 a 21 días con una duración desde 2 a 3 meses hasta varios años en casos crónicos (Knight, 1980). En todo el mundo, *Giardia* infecta aproximadamente al 2% de adultos y el 6-8% de niños en diferentes países tanto desarrollados como en vías de desarrollo, además de ser el agente causal de un gran número de casos de diarrea en E.U.A. (Kramer y Col., 1996; Craun G.F., 1996). Las dosis infectivas son de 10-15 quistes, y las tasas de incidencia y prevalencia varían de acuerdo a la región geográfica de un 3 a un 68%, y países desarrollados como Estados Unidos e Inglaterra han presentado brotes epidémicos. Existen numerosas regiones endémicas en Asia, Africa y América en donde las tasas de infección varían de un 8 a un 24%. La insuficiencia nutricional en niños puede ser un factor de riesgo adicional, contribuyendo a la cronicidad de la enfermedad. La giardiosis también se conoció como la enfermedad de los viajeros, debido a que una gran proporción de individuos que migraban hacia regiones endémicas adquirirían la infección. La transmisión de la enfermedad se lleva a cabo por la vía fecal-oral y debido a la gran resistencia de los quistes fuera del hospedador, las fuentes de infección son importantes, entre ellas también se incluyen los individuos portadores asintomáticos.

Los mecanismos de infecciones, involucran consumo directo o indirecto de aguas de bebida o riego contaminadas y de alimentos con mala calidad sanitaria, contacto directo ano-mano-boca, así como la participación de portadores sanos, ya sean humanos o animales, que entren en contacto con el hospedero o las bebidas y alimentos que éste consume. Los niveles de infección son más elevados en la



población pediátrica principalmente en las etapas preescolar y escolar, y las tasas se abaten conforme a la edad (Rendtorff, 1954).

1.6 PATOGENIA

La patogénesis de la giardiasis es compleja y esta condicionada a varios factores coexistentes. El factor inicial es el mecanismo de adhesión de los trofozoítos mediado por el disco ventral y proteínas de superficie a las microvellosidades de los enterocitos, bloqueando así la acción de las enzimas digestivas, particularmente disacaridasas como la lactasa (Erlandsen y Feely, 1984), y el mecanismo de transporte para monosacáridos y absorción de aminoácidos, así como d-xilosa, grasas y vitamina B12 (Wright, 1977). La severidad de este daño es proporcional al número de trofozoítos adheridos a la mucosa intestinal y es reversible cuando el hospedero sigue un tratamiento adecuado contra éste parásito (Wright, 1980). La adhesión del mismo a las vellosidades intestinales provoca la alteración de éstos y su atrofia (Farthing, 1992) con la consecuente alteración en la absorción.

Es probable que la producción de enfermedad sea la resultante de la conjunción de varios factores tanto del parásito como el hospedero como son variabilidad de cepas, tamaño de inóculo, edad en la que se adquiere la primera infección, estado nutricional e inmunológico del hospedero, entre otros.

1.7 ASPECTOS CLINICOS

La giardiosis puede presentarse como una infección asintomática o con síntomas tales como la diarrea crónica severa con mala absorción intestinal. La combinación de algunos factores es importante, entre ellos: la susceptibilidad del



hospedero, la respuesta a la infección y posiblemente la virulencia del parásito. La presentación sintomática aguda es autolimitante y se resuelve espontáneamente, caracterizándose por síntomas que incluyen náusea, anorexia, hiperperistaltismo intestinal superior, malestar con fiebre moderada y escalofrío (Knight, 1980). También se puede presentar diarrea explosiva con flatulencia, malestar epigástrico, pérdida de peso y talla baja con posible esteatorrea e intolerancia a la lactosa. La presentación sintomática subaguda y crónica implica típicamente episodios diarreicos recurrentes breves, con flatulencia y distensión abdominal. La presentación asintomática involucra probablemente a la mayor parte de la población infectada, formada por portadores aparentemente sanos que expulsan quistes en heces; pero con absorción intestinal subclínica deficiente (Coello-Ramírez, 1981).

1.8 DIAGNÓSTICO

Los métodos de diagnóstico tienen la finalidad de identificar y cuantificar trofozoítos o quistes para el caso de *Giardia* y conocer que existen diferentes métodos con ciertas ventajas y desventajas.

El diagnóstico clínico de la giardiosis se basa en los datos clínicos del individuo a nivel preliminar y la confirmación de la infección se determina rutinariamente mediante la observación microscópica de quistes y/o trofozoítos a partir de muestras fecales acuosas recién colectadas del paciente. En heces de consistencia semisólida a sólida predominan los quistes. En todos estos casos se deben analizar las muestras primero en examen fresco directo y con tinción de lugol, y después por observación del material concentrado por flotación en sulfato de zinc (Faust). Para el diagnóstico coproparasitológico de la giardiosis se requiere procesar al menos 3 muestras fecales consecutivas. En el examen

microscópico se detectan quistes, pero dado que estos se eliminan intermitentemente, la técnica resulta ser inadecuada en una proporción alta de casos (30-50%)(Kamath y Murugasu, 1974), aunque también influyen otros factores como la administración de antibióticos o antiácidos que inhiben su excreción (Wolfe, 1984).

Existen procedimientos alternativos que pueden ser practicados, aunque son más traumáticos e invasivos. En estos se incluyen: examen de fluido intestinal con sonda (enterotest), análisis de biopsias intestinales y radiología intestinal. Las dos primeras técnicas identifican principalmente trofozoítos (Geraltz y Col., 1985).

En la actualidad se hace también el inmunodiagnóstico empleando reactivos biológicos para la detección de anticuerpos específicos contra *G. duodenalis* en suero y secreciones. Entre las pruebas serológicas que se han empleado tenemos la inmunodifusión (Vinayac, 1978; Jokipii y Jokipii, 1982), hemaglutinación indirecta (Ganguly y Mahajan, 1981), ensayos de inmunoabsorbente acoplado a enzima (ELISA) la cual se ha empleado para muestras como la leche materna (Miotti, 1986), contraelectroforesis (CIE) la cual detecta antígenos de quistes en heces usando ELISA en protocolos comerciales (Janoff y Col., 1989). Estas técnicas se han usado como una alternativa o complemento importante en la detección del contacto con el parásito y para fines epidemiológicos, ya que los anticuerpos séricos persisten por meses o años después de la terapia curativa (Janoff y Col., 1989).

A nivel experimental se han empleado pruebas alternativas como: el sistema fluorescente usando anticuerpos monoclonales (García y Col., 1992), sistemas de diagnóstico molecular que se basan en ensayos de hibridación empleando sondas de ADN complementario y sondas con secuencias amplificadas mediante la reacción en cadena de polimerasa (RCP) (Abbaszadegan y Col., 1991).



1.9 TRATAMIENTO

Una forma de control en la mayoría de las enfermedades parasitarias, es el uso de compuestos químicos con actividad antiprotozoaria. El control terapéutico debe ser apropiado para cada infección a una dosis correcta manteniéndose un equilibrio entre la efectividad y toxicidad del fármaco.

En una breve reseña histórica describiremos como se han empleado diversas sustancias o fármacos para el control de esta enfermedad parasitaria: las primeras sustancias que se usaron en el tratamiento de la giardiosis, aunque demasiado tóxicas fueron: tetracloruro de carbono (CCl_4), mercurio (Hg^{2+}) y bismuto (Bi^{3+}), posteriormente se uso quinacrina (mepacrina) un derivado de acridina usado tradicionalmente como agente antimalárico (Medelson, 1980). Pero al ser este fármaco poco tolerable y presentar efectos tóxicos, se buscaron nuevos fármacos alternativos como la furazolidona (nitrofuranos), paramomicina (aminoglucósidos). Después en los 60's se emplearon los 5- nitroimidazoles como el metronidazol, tinidazol y secnidazol, sin embargo la presencia de casos refractarios con el empleo de estos fármacos ocasionó que en los 90's se usarán fármacos como los bencimidazoles los cuales presentan una actividad de amplio espectro tal es el caso de mebendazol y albendazol. Recientemente se emplea la nitazoxanida (nitrofuranos) para estos casos ya que ha resultado ser efectiva contra *Giardia duodenalis* (Crouch y Col.,1986; Al-Waili y Col.,1988; Gascon y Col., 1989; Meloni y Col., 1990).(Tabla 2).

A continuación se describen los mecanismos de acción y características de los fármacos de interés para el desarrollo de este trabajo:

La quinacrina (N4-(6-cloro-2-metoxi-9-acridinil)-N1,N1-dietil-1,4-pentanendiamina dihidrocloruro) tiene una eficacia similar a los derivados de nitroimidazoles, pero algunos estudios sugieren que no es muy tolerada, además

de tener diversos efectos adversos como la generación de malestar gastrointestinal, dolor de cabeza, náusea, vómito, dermatosis crónicas, hepatitis y anemia aplásica. Los mecanismos de acción de fármacos como la quinacrina que se emplea en el tratamiento de la giardiasis implican la interferencia con enzimas de flavina, causando depresión en el consumo de oxígeno y ésta puede incorporarse en el ADN, o bien en la síntesis de proteínas (Upcroft J.A. y Col., 1996) (Figura 7). Este fármaco tiene una eficacia de > 90% en adultos; el esquema de uso es de 100 mg tres veces al día por 5-7 días y en niños 2 mg/ kg tres veces al día por 5-7 días (Blaser M.J., 1995). La quinacrina es poco tolerada en niños y ha sido eficaz en combinación con un nitroimidazol en infecciones resistentes (Gardner T.B. y Hill D.R., 2001).

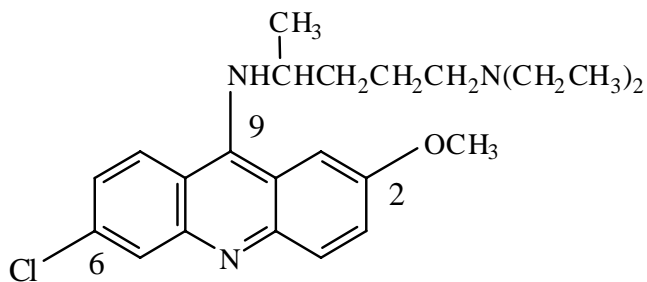


Figura No.3. Estructura química de quinacrina

La furazolidona (3-[(5-nitro-2-furanil) metileno]-amino]-2-oxazolidona) es un derivado del nitrofurano con actividad antiprotozoaria y antibacteriana. Actúa dañando el ADN directamente o por vía radicales libres (Thompson y Reynoldson, 1993). Sus efectos adversos más comunes involucran el tracto gastrointestinal e incluyen náusea y vómito, es hepatotóxica, produciendo anemia hemolítica en pacientes con deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; puede ser carcinogénica y mutagénica, por ello es limitado su uso en algunos países como sucede en Australia, donde no se comercializa este fármaco. Es un fármaco comúnmente usado en niños por ser bien tolerado ya que existen presentaciones farmacéuticas adecuadas para esa población.

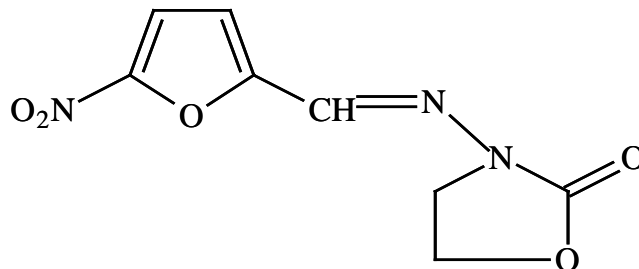


Figura No.4. Estructura química de furazolidona

El metronidazol (2-metil-5-nitroimidazol-1-etanol) ha sido usado en infecciones provocadas por bacterias y protozoarios anaeróbicos y es altamente eficiente en el tratamiento contra la giardiosis. El mecanismo de acción de este 5-nitroimidazol en *G. duodenalis* es completamente bioquímico, involucrando a la enzima piruvato ferredoxina oxidoreductasa conocida también como piruvato sintasa (PFOR), la cual promueve la reducción del grupo nitro mediada por la ferredoxina para formar varios intermediarios tóxicos, como el radical anión, el

nitroso, la hidroxilamina y el amino (Finegold, 1980; Ings y Col., 1974). Al ser reducido dentro de las células da lugar a intermediarios reactivos con la formación de radicales libres, los cuales son responsables de la actividad del fármaco al causar ruptura en las cadenas de ADN y a los enlaces cruzados en estas mismas.

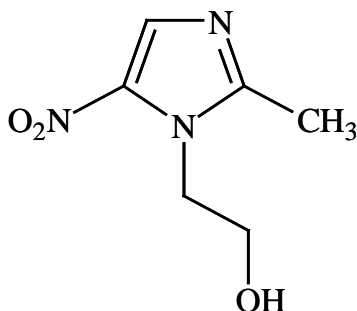


Figura No.5. Estructura química de metronidazol

La resistencia a metronidazol es un problema clínico creciente y puede resultar en una disminución en la incorporación de metronidazol por las líneas resistentes, o bien por la acumulación de metronidazol libre dentro de las células resultado de las fallas en la formación de intermediarios reactivos por la oxidoreductasa PFOR y por las fallas de los intermediarios reactivos del metronidazol para actuar con el ADN (Boreham y Col., 1988). Asimismo se ha asociado la tolerancia al metronidazol con cambios en el ADN a nivel cromosomal y niveles de ADN repetitivos (Upcroft y Col., 1989; 1990). El régimen de tratamiento requiere de 5-7 días y ha presentado una efectividad del 80-90% mientras que las reacciones adversas están relacionadas directamente con la dosis empleada, siendo los más comunes: náusea, anorexia, vómito, molestias gástricas y sabor metálico.

En fechas recientes se están implementando regímenes a base de bencimidazoles, los cuales tienen una actividad antihelmíntica de amplio espectro y también son empleadas en el tratamiento de la giardiosis. Su actividad probablemente está relacionada a su interacción con β -tubulina. Se ha demostrado que el mebendazol tiene *in vitro* una actividad contra *Giardia*, mientras que el albendazol a través de pruebas clínicas es más eficaz en la giardiosis humana. Este último se ha usado también en niños por su acción antihelmíntica de amplio espectro (Farthing M., 1995).

Los bencimidazoles son fármacos diseñados a partir de la estructura química base de la vitamina B12 (1,6-dimetol-1-(α -1)-ribofuranosil)bencimidazol). En el caso del albendazol su mecanismo de acción propuesto es la unión a la β -tubulina (proteína contráctil de aproximadamente 50 kDa) y giardinas (que son localizadas en el disco ventral), y se ha observado en estudios *in vitro* que estos fármacos deterioran la adhesión de los trofozoítos a substratos biológicos (células epiteliales) o inertes (vidrio, plástico) y ocasiona cambios dramáticos en la morfología del parásito (Meloni y Col., 1990; Chávez y Col., 1992). El albendazol y otros bencimidazoles producen embriotoxicidad y teratogénesis en animales de laboratorio por lo que no es recomendable para mujeres gestantes.

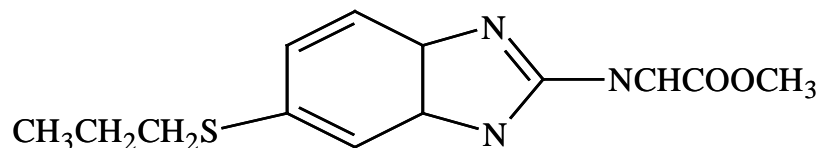


Figura No. 6. Estructura química de albendazol



1.10 PROFILAXIS

El riesgo de contraer la giardiosis es alto debido a la presencia de numerosos factores relacionados con las condiciones socioeconómicas precarias de grandes núcleos de la población afectada. La prevención de la giardiosis depende en gran medida del mejoramiento de hábitos de higiene del individuo a nivel personal y a nivel de la preparación de alimentos y agua, así como de un desecho adecuado de las excretas por drenajes o letrinas y no fecalismo al aire libre, en combinación a campañas sanitarias con recursos publicitarios y materiales que involucren una correcta potabilización del agua de consumo doméstico. A nivel del control de la infección, se deben optimizar los sistemas de detección del parásito en individuos portadores y proporcionarles tratamiento eficaz, ya sea de elección o alternativo, además de implementar sistemas de monitoreo medio ambiental específicos como los que ya existen en Estados Unidos de América, en los que podemos mencionar el monitoreo de agua con anticuerpos monoclonales (5-3C) nomenclatura asignada por el Dr. Henry Stibbs de Tulane University en E.UA., los cuales reconocen a la proteína CWP1 que se encuentra en la pared del quiste de *Giardia* y vacunas en perros y gatos (Giardiavax ®) (Olson y Col., 2000).



Tabla 2. Fármacos comúnmente usados para el tratamiento de la Giardiosis.

FARMACO	NOM.COM.	DOSIS	EFICACIA	REFERENCIA
DERIVADOS DE ACRIDINA				
Quinacrina	Atebrina®	2mg/Kg 3xDx5D	>90%	Davidson (1984)
5-NITROFURANOS				
Furazolidona	Furoxona®	2.7 mg/Kg 3xDx10D	>80%	Davidson (1984)
5-NITROIMIDAZOLES				
Metronidazol	Flagyl®	250mg 3xDx7D	>90%	Davidson (1984)
Tinidazol	Fasigyn®	50 mg/Kg 2g máximo	95%	Jokipii y Jokipii (1979)
Secnidazol	Flagentyl®	30mg/KgX1D	70%	Speelman (1985) Chacón y Col. (1991)
BENCIMIDAZOLES				
Albendazol	Zentel®	400mg 1 dosis	81%	Hall y Nakar (1983)
Mebendazol	Vermox®	600 mgXDX5D	95%	Al-Waili y Col. (1988)
5-NITROTIAZOLES				
Nitazoxanida	Daxón®	1gXDX3D	87%	Romero y Col. (1997)

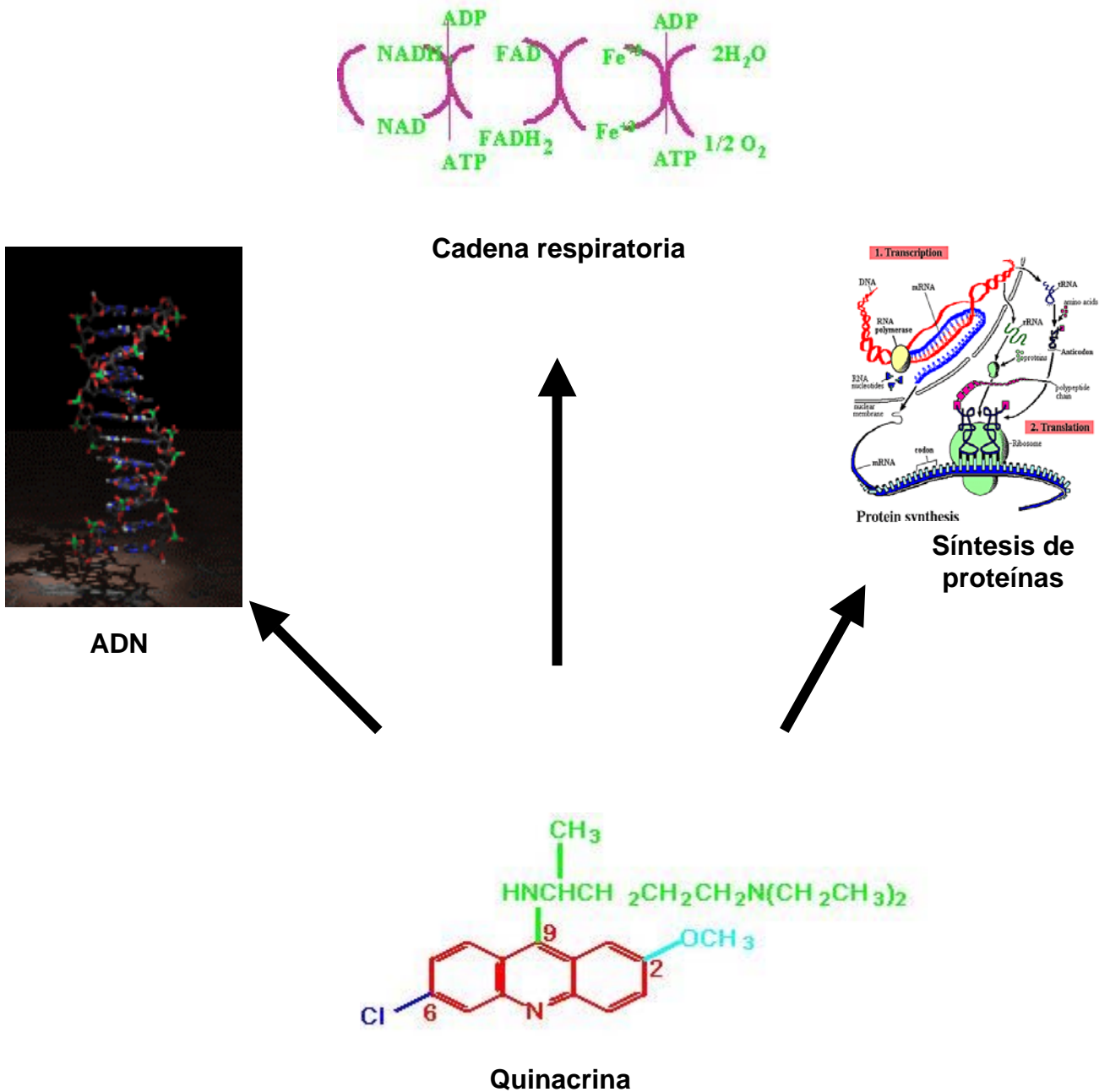


Figura 7. Mecanismo de acción propuesto para la quinacrina.

2. ANTECEDENTES GENERALES

La *giardiosis* es una parasitosis muy frecuente en México y otros países tanto en vías de desarrollo como desarrollados, se presenta principalmente en la población infantil debido a la falta de higiene y estado inmunológico de los niños.

Una de las principales formas de controlar la giardiosis es con el uso de agentes quimioterápicos. Antiguamente en un inicio se usaron sustancias demasiado tóxicas como tetracloruro de carbono (CCl_4), mercurio (Hg^{2+}), bismuto (Bi^{3+}) (Mendelson, 1980) para el tratamiento. Posteriormente los fármacos de mayor uso en el control quimioterápico en la giardiosis, pertenecen a grupos principales como: la quinacrina, una acridina, la furazolidona, un 5-nitrofurano, el metronidazol, un 5-nitroimidazol, el albendazol, un bencimidazol y la nitazoxanida, un 5-nitrotiazol.

Sin embargo, actualmente el problema es que los fármacos son empleados periódicamente de manera indiscriminada, lo cual repercute en posibles fallas en el tratamiento. Esto se debe tal vez a la inconformidad del paciente con el régimen de fármacos prescritos y por lo tanto a un mal seguimiento en el tratamiento, que el fármaco no sea tolerado por el paciente, una posible re-infección, cambios en la farmacocinética del paciente, posible escape de organismos a sitios donde el fármaco no actúa, pero la más importante es la existencia de cepas resistentes al fármaco (Boreham y Col., 1988) y la heterogeneidad en la respuesta de poblaciones de *Giardia* a los fármacos (Majewska y Col., 1991).

La resistencia a fármacos sucede cuando hay un incremento en la capacidad de parásitos individuales dentro de una cepa para tolerar dosis de un compuesto el cual es letal para la mayoría de los casos en una población normal de la misma especie.



Por lo anterior, actualmente se presentan mayores tasas de casos refractarios al tratamiento de la giardiosis, incidiendo probablemente en la ineficacia de los agentes quimioterápicos utilizados, o bien a la presencia de parásitos resistentes en un hospedero. La resistencia a fármacos y la gran cantidad de fármacos disponibles para este tipo de infecciones ocasionadas por protozoarios nos conduce a muchos problemas de salud humana.

3. JUSTIFICACION

En base a lo anterior, el uso adecuado de los fármacos nos ayudarán a erradicar o bien controlar esta parasitosis, sin embargo la resistencia a los fármacos de mayor uso aunado a sus efectos adversos reportados en nuestro país implican buscar nuevas alternativas en la terapia.

Sabemos que fármacos como la quinacrina que fue inicialmente usada contra la malaria y que posiblemente su mecanismo de acción es a nivel de componentes involucrados en la respiración celular, síntesis de proteínas o bien unirse a ADN. Este fármaco ha sido altamente efectivo contra *G. duodenalis*, mientras que la furazolidona es un fármaco muy bien tolerado por los niños, se cree que actúa dañando al ADN del parásito a través de radicales libres de oxígeno, aunque su desventaja es que sus efectos adversos son similares a quinacrina.

En tanto fármacos como metronidazol y albendazol, son altamente eficientes para el tratamiento de la giardiosis debido a su amplio espectro de actividad contra protozoarios y bacterias anaerobias. El primero actúa a través de la reducción del grupo nitro para formar varios intermediarios tóxicos a través de moléculas tipo ferredoxina y estos probablemente se pegan al ADN inhibiendo su síntesis, en tanto que el segundo se une a la β -tubulina del parásito.

La resistencia al metronidazol ha sido reportada en la cepa *B. fragilis*, la cual es propiciada por disminuidos niveles de la enzima piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) (Britz y Col., 1979).

Sin embargo se ha observado que la quinacrina resulta ser eficaz en combinación diádica con metronidazol en casos de resistencia a este último (Smith y Col., 1982).

Recientemente se ha propuesto que la resistencia a fármacos en *Giardia duodenalis* es debido a la presencia de un gen que codifica para una proteína asociada en diferentes etapas de crecimiento y con su núcleo, la pérdida de este gen se asocia al crecimiento anormal, división celular y resistencia en el parásito (Upcroft y Col., 1991).

Existe un estudio sobre un caso clínico en donde se emplearon métodos como marcaje con S³⁵-metionina, impresión digital de ADN, análisis de isoenzimas y radioiodinación de proteínas de superficie evaluando los perfiles fenotípicos y genotípicos en trofozoítos obtenidos del paciente antes y después del tratamiento con metronidazol, y se observaron diferencias en los perfiles de las dos cepas axenizadas del mismo paciente, sugiriendo un proceso de selección por la quimioterapia (Butcher y Col., 1994).

También se han encontrado casos de resistencia ocasionados por el metronidazol *in vivo* en donde los pacientes se encuentran con giardiosis asintomática, lo que indica que el tratamiento resulta no ser efectivo. Si bien, la quinacrina tiene poco uso en México, se ha empleado en casos de resistencia a metronidazol (Upcroft, J.A. y Col., 1996).

En un estudio *in vitro* para comprobar la multiresistencia al albendazol se obtuvieron trofozoítos de *G. duodenalis* tolerantes a Metronidazol, Prazicuantel, Furazolidona y Mebendazol, pero sensibles a quinacrina (Cruz-Soto y Col., 1998).

Con base a lo anterior, sería posible que la quinacrina fuera un fármaco que induzca resistencia *in vitro* por algún mecanismo muy particular, además de que potencialmente ésta podría ser un tratamiento alternativo contra la gran variedad de casos refractarios a nivel clínico y con ello abriría la posibilidad de diseñar nuevos fármacos para el tratamiento de la giardiosis.

Por consiguiente, en el presente proyecto inicialmente se indujo la resistencia de *Giardia duodenalis* a quinacrina en un medio con exposición constante al fármaco para posteriormente incrementar las concentraciones de este hasta llegar a la obtención de una cepa resistente *in vitro*. Posteriormente se realizó un análisis estructura-actividad entre los derivados de acridina, determinando los grupos activos que potencian el efecto contra el parásito, con la finalidad de hacer un diseño racional de fármacos, que tengan ciertas ventajas como disminuir sus efectos colaterales, mayor efectividad y un menor costo, o bien se pueda disminuir la dosis en el tratamiento. También se realizó un estudio *in vitro* comparando cepas resistentes y sensibles a quinacrina observando a que nivel afecta esta diferencia, esto es, si la resistencia a quinacrina se da de manera espontánea e involucra un proceso de adaptación fisiológica, o bien si se pueden presentar eventos de selección de organismos con características fenotípicas particulares.

Los datos obtenidos de este trabajo podrían sentar algunas bases para el desarrollo de nuevas herramientas para la investigación y la Farmacología que finalmente genere métodos de control quimioterápicos alternativos y fármacos con un mecanismo de acción semejante aunque con ventajas como: no presentar efectos colaterales, tener toxicidad muy baja o nula y ser de fácil administración a fin de poder racionalizar su uso en gran escala.



4. OBJETIVOS

Con la finalidad de comprender el fenómeno de resistencia del parásito *G. duodenalis* a diferentes fármacos usados rutinariamente en el tratamiento de esta parasitosis, se plantearon los siguientes objetivos.

4.1 OBJETIVO GENERAL

- 4.1.1. Determinar la eficacia de los derivados de acridina sobre trofozoítos de *Giardia duodenalis* evaluando su sensibilidad *in vitro* y comparando su caracterización fenotípica parcial de las cepas resistentes a quinacrina, furazolidona, metronidazol y albendazol empleándose el marcaje metabólico con ^{35}S -metionina y marcaje de antígenos de superficie con ^{125}I .

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 4.2.1 Seleccionar el método óptimo para la estimación de viabilidad *in vitro* de parásitos expuestos a quinacrina, empleándose subcultivo en medio líquido (SML), reducción de colorantes fluorogénicos (MTT), incorporación de timidina tritiada (^3H -TdR) e incorporación de colorantes fluorogénicos (DAF-IP).
- 4.2.2 Evaluar la sensibilidad de trofozoítos de *G. duodenalis* a derivados de acridina *in vitro* para analizar la relación estructura-actividad por medio de la CLM de cada fármaco y determinar así el orden de efectividad contra el parásito.



- 4.2.3 Determinar la sensibilidad *in vitro* de trofozoítos de *Giardia duodenalis* expuestos a combinaciones diádicas de fármacos pertenecientes al mismo grupo químico (derivados de acridina), encontrándose la interacción farmacológica de cada combinación.
- 4.2.4 Obtener cultivos de *Giardia duodenalis* resistentes a quinacrina por cultivo continuo en concentración ascendente subletal del fármaco.
- 4.2.5 Analizar el efecto de la resistencia a quinacrina en trofozoítos de *G. duodenalis* sobre los perfiles fenotípicos por medio de marcaje de antígenos de superficie con ^{125}I y marcaje metabólico con ^{35}S -metionina y compararlos con los trofozoítos resistentes a furazolidona, metronidazol y albendazol.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1 Parásitos

Para el desarrollo de este trabajo, se emplearon trofozoítos de *G. duodenalis* de la cepa WB proporcionada por el Dr. E. Weinbach del National Institutes of Health en Bethesda, Md. (E.U.A.). Esta cepa fue aislada por Gillin y Col. (1982) a partir del fluido intestinal de un paciente de 27 años con giardiosis sintomática refractaria a tratamientos de metronidazol y quinacrina, quien adquirió la enfermedad en Afganistán y la manifestó por dos años y medio (Smith y Col., 1982). Asimismo se utilizaron trofozoítos de la cepa Portland-1 (P1)(PO American Type Culture Collection No. 30888) obtenida por el Dr. G. Vivesvara y el Dr. G. Healy (Center for Disease Control Atlanta, GA). Esta cepa fue aislada de una paciente sintomática de 36 años de edad en Portland, Oregón (Meyer, 1976).

También se emplearon cepas de *G. duodenalis* resistentes a albendazol (5.6 μM), metronidazol (21 μM) y furazolidona (5.2 μM), las cuales fueron proporcionadas por Cruz-Soto M., Romero-Montoya L. y Molina-Aguilar N. del Depto. de Genética y Biol. Mol.(CINVESTAV-IPN). Estos trofozoítos resistentes fueron expuestos a concentraciones ascendentes de los fármacos manteniendo a los trofozoítos en cultivos continuos.

5.2 Compuestos derivados de acridina

Los fármacos empleados fueron: 8 compuestos derivados de acridina con sustituciones en las posiciones de C₂, C₃, C₆, C₇ y C₉ por grupos -NH₂, -CH₃ y -NH-R (R= tipo alifático) o bien, diferencias estructurales en los anillos bencénicos de la acridina con sustituciones en C₄, C₆, C₇ y C₈ de esta estructura (Sigma Chemical Co., St Louis, USA). Las estructuras químicas de los fármacos empleados

se muestran en la figura 8. Todos ellos fueron almacenados a temperatura ambiente (TA) y protegidos de la luz. Algunos fármacos fueron disueltos en solventes como: dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), agua (H₂O) o en una solución de trizma base 1M (Tabla 4). Estos se conservaron en pequeñas alícuotas a TA. Para evaluar su capacidad de solubilización y toxicidad al cultivo, se realizó previamente una prueba de solubilidad, en la cual se determinó el disolvente óptimo considerando también la miscibilidad del compuesto cuando este era líquido.

5.3 Cultivo, cosecha y criopreservación de trofozoítos de *G. duodenalis*.

Cultivo y cosecha de trofozoítos de *G. duodenalis*

Los trofozoítos se cultivaron en medio de TYI-S-33 (desarrollado por Diamond, 1978 y modificado por Keister, 1983) suplementado con suero bovino descomplementado al 10% v/v y antibióticos (penicilina 50 U.I/ml y estreptomicina 50 g/ml) (Anexo I). Los cultivos se realizaron en tubos de plástico de 15 ml, en viales de borosilicato de 4.5 ml, o en botellas de plástico de 60 ml de acuerdo a los requerimientos experimentales. Estos cultivos se incubaron a 37 °C (Incubadora Precision Modelo 4EG) hasta que se observó una confluencia, es decir, que las células adheridas cubrieran toda la superficie de las paredes del recipiente.

Las resiembras y cosechas de los cultivos confluentes se realizaron en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar. Los recipientes de los cultivos se enfriaron por 30 min. en un baño agua-hielo, posteriormente se agitaron suavemente con el fin de despegar los trofozoítos de las paredes del recipiente. En algunos ensayos se requirió un mayor número de trofozoítos, por lo

que se propagaron las cepas en botellas de plástico de 60 ml a partir de un vial stock de parásitos. Estos se contaron en una cámara de Neubauer (Marienfield Superior Germany) para efectuar cálculos teniendo como referencia que por cada ml se alcanza una densidad máxima aproximada de 2×10^6 de trofozoítos y el tiempo de duración promedio del ciclo de replicación (≈ 8 h).

Para evaluar la esterilidad de los cultivos se realizaron pruebas de crecimiento bacteriano u hongos empleando cajas petri con Medio Agar Luria, donde se agregaron alícuotas de 15 μ l de los cultivos y estas se incubaron por 24 hrs. a 37 °C (Incubadora Precision Modelo 4EG) (Anexo I). Esta prueba se realizó en períodos de tiempo variable con la finalidad de mantener a los cultivos exentos de contaminaciones.

Criopreservación de trofozoítos de *G. duodenalis* en N₂ líquido.

En la criopreservación de los trofozoítos, estos se crecieron en medio TYI-S-33 hasta obtener la fase logarítmica de crecimiento, enseguida se enfriaron los tubos de cultivo por 30 minutos en un baño de agua-hielo. Posteriormente se centrifugaron a 840 xg durante 10 minutos a 4 °C. Una vez realizado esto, se retiró el sobrenadante y se contaron los parásitos en la cámara de Neubauer.

Posteriormente se agregó medio fresco adicionado con dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% (en razón 1:1 por cada 5×10^6 trofozoítos) y las células se resuspendieron. El contenido se transfirió a criotubos Nunc^{MR} de 1.8 ml de capacidad y se transportaron en un baño de hielo-agua, para almacenarlos en un ultracongelador a -70 °C una noche. Una vez transcurrido este tiempo, se transfirieron los criotubos a inmersión en un tanque con N₂ líquido y se almacenaron hasta su descongelación bajo estas condiciones los trofozoítos pueden permanecer viables hasta por tres años (Argüello, 1991).

Para descongelar trofozoítos de *Giardia duodenalis*, se colocaron los criotubos a temperatura ambiente (TA) ó en un baño a 37 °C hasta su fusión. Inmediatamente se transfirió el medio con células a un tubo de fondo cónico de 15 ml conteniendo 1 ml de medio TYI-S-33 fresco. Posteriormente se centrifugaron a 840 xg durante 10 minutos a 4 °C y se decantó el sobrenadante, para después adicionar 15 ml de medio fresco adicionado con suero de ternera al 10%. Se revisaron los trofozoítos al microscopio óptico y se incubaron a 37 °C (Incubadora Precision Modelo 4EG). Después de 24 hrs. de cultivo, se decantó el medio de cultivo y se reemplazó con medio fresco para eliminar células muertas.

5.4 Clonación

La finalidad de esta técnica es obtener la homogeneidad poblacional de un cultivo, lo cual nos permitió realizar estudios de comparación entre clonas con diferente grado de sensibilidad a quinacrina. Con este fin, se empleo la técnica reportada por Baum y Col. (1988), la cual se basa en diluciones limitantes.

Así, se cultivaron trofozoítos resistentes a quinacrina (Qnc) 12.5 µM en tubo Falcon de 50 ml hasta fase logarítmica, se desechó el sobrenadante y se adicionó medio fresco, posteriormente se llevo el tubo a un baño de agua-hielo por 30 min. Enseguida se hizo un recuento en la cámara de Neubauer y después se realizaron las diluciones progresivas con medio de cultivo fresco y frío, con la finalidad de obtener los trofozoítos de *G. duodenalis* requeridos. En este caso se utilizó una dilución 1:10 hasta tener 12.5 células/ml en un inóculo de 47.62 µl. Este último se adicionó a una botella con medio de TYI-S-33 frío en agitación suave e inmediatamente se agregaron a 25 viales de borosilicato con tapa de rosca de 4.5 ml teniendo inoculadas una razón de 0.5 cel/vial. Los viales se incubaron a 37 °C (Incubadora Precision Modelo 4EG). Estos cultivos se tuvieron bajo observación

durante una semana, utilizando un microscopio invertido (Olympus Tokyo Modelo BHA).

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

5.5 Pruebas de susceptibilidad a fármacos

Para evaluar eficazmente la viabilidad de los trofozoítos de *Giardia duodenalis* cultivados axénicamente en presencia de la quinacrina, se utilizó la cepa de referencia WB.

Los ensayos de viabilidad se llevaron a cabo, en botellas de plástico de 60 ml a las que se agregaban 1×10^6 trofozoítos de *G. duodenalis* y se ajustó el volumen total a 60 ml con medio completo TYI-S-33. Estas células se incubaron inicialmente a 37 °C hasta obtener confluencia. Una vez obtenido el cultivo se decantó el medio de cada recipiente y se agregó medio fresco, para trabajar células en las mejores condiciones. Para ello los recipientes de cultivos se enfriaron en un baño con agua-hielo por espacio de 30 min. Una vez despegadas las células, se hizo el conteo de trofozoítos en la cámara de Neubauer y se inocularon 1×10^6 de trofozoítos de *G. duodenalis* en viales de borosilicato de 4.5 ml y se aforaron con medio completo TYI-S-33. Posteriormente se adicionó el fármaco dentro de un intervalo determinado de concentraciones ascendentes de quinacrina para evaluar su efecto en la viabilidad celular. Enseguida estas células se incubaron por 24 h a 37 °C. Pasado este tiempo se enfriaron los viales en un baño de agua-hielo y el contenido se transfirió a tubos de plástico de fondo cónico de 15 ml y estos se centrifugaron (centrifuga con sistema de refrigeración acoplado Beckman TJ-6/TJR) por 30 min a

840 xg. El sobrenadante se decantó eliminando los residuos de fármaco y se adicionaron 2 ml de medio fresco a cada tubo.

Las suspensiones celulares así obtenidas se evaluaron con las siguientes técnicas:

5.5.1. Subcultivo en medio líquido (SML): los trofozoítos fueron tratados como se describió anteriormente y se resuspendió la pastilla para cuantificarlos en cada uno de los viales en la cámara de Neubauer. Se inocularon 100,000 trofozoítos/ml en viales de vidrio de borosilicato de 4.5 ml, a estos se les adicionó medio fresco completo de TYI-S-33 y se incubaron a 37 °C durante 48 h. Pasado este tiempo, los viales se enfriaron en un baño de agua-hielo durante 1 hora y enseguida se hizo el recuento celular de cada vial. Para la obtención del número inicial de parásitos inoculados en cada uno al tiempo cero, se tomó el número final de trofozoítos obtenidos después de 48 h. Durante la exposición al fármaco se hizo a la par una curva de calibración colocando en el eje de las ordenadas el número de trofozoítos inoculados inicialmente en un rango de 5,000 hasta 200,000 trofozoítos, y en el eje de las abscisas el número de trofozoítos obtenidos después de 48 h. El número inicial de parásitos viables se extrapoló de la curva de calibración usando el número total corregido a la hora 48. Para conocer el porcentaje de viabilidad se utilizó la siguiente formula:

$$\% \text{ viabilidad} = 100 - (\% \text{ de mortalidad})$$

$$\text{donde } \% \text{ de mortalidad} = 100 \times n$$

$$n = 1 - (\text{no. de trofozoítos obtenidos a partir de la curva de calibración} / \text{no. de trofozoítos inoculados inicialmente})$$

5.5.2. Incorporación de timidina tritiada ($^3\text{H-TdR}$): En este método, se emplearon los trofozoítos que fueron cuantificados para SML, inoculándose 1×10^6 trofozoítos en viales de vidrio de borosilicato de 4.5 ml y enseguida se les adicionó medio TYI-S-33 fresco hasta su volumen total. Estos se incubaron por 2 h a 37°C . Posteriormente se adicionó a cada vial $12.5 \mu\text{Ci/ml}$ ($56.3 \mu\text{l}$) de timidina tritiada ($^3\text{H-TdR}$) con una actividad específica de 4.33 TBq/mmol (Amersham Int. PLC), y éstos se incubaron por 4 h. más. Pasado este tiempo la incorporación de $^3\text{H-TdR}$ se paró colocando los viales en un baño de hielo-agua, inmediatamente los trofozoítos fueron cosechados y se lavaron dos veces con una solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) (Anexo I) mediante centrifugaciones a 840 xg durante 10 minutos a 4°C . Después de realizar el segundo lavado, se retiró el sobrenadante empleando pipetas pasteur hasta dejar 1 ml, enseguida se resuspendió perfectamente la pastilla en PBS y se transfirieron $5 \mu\text{l}$ de cada muestra a 5ml de una solución para emisión de centelleo (Orniflúor al 0.4% y tritón 100X al 30% en tolueno) (Anexo I) y se contaron las células en un contador de centelleo (Beckman Modelo 6000).

En los métodos descritos a continuación se lavaron los trofozoítos tres veces con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) mediante centrifugaciones a 840 xg durante 10 min. a 4°C para cada lavado. Los trofozoítos cosechados se contaron y se ajustó su concentración a una densidad celular adecuada.

5.5.3. Reducción de sales de tetrazolio (MTT): El método empleado fue el reportado por Mosmann (1983) con algunas modificaciones. A los trofozoítos cosechados se les adicionaron $50 \mu\text{l}$ de metasulfato de fenazina (PMS) (5 mg/ml de PBS 1X) y una solución de MTT (0.05% p/v en PBS 1X) hasta tener un volumen de aforo de 1.3 ml. Posteriormente se agitó cada tubo eppendorff suavemente empleando un agitador de contacto (Vortex Genie 2) y se incubaron éstos a 37°C

durante 45 minutos. Pasado este tiempo se centrifugaron por 10 min., se decantó el sobrenadante y se adicionaron 0.75 ml de HCl fumante/isopropanol dejando reposar durante 1 min. con la finalidad de romper la célula y liberar el colorante. Enseguida se centrifugaron 35 seg a 15, 600 xg. de manera paralela se realizó a la par una curva de calibración. Posteriormente, se hicieron las lecturas en un espectrofotómetro (Beckman Modelo DU-40) a una $\lambda=510$.

5.5.4. Tinción con colorantes fluorogénicos (DAF-IP): A las células que se cosecharon y lavaron con PBS se les adicionaron 50 μ l de una solución de diacetado de fluoresceína (DAF) (10 mg/ml en PBS1X) y 50 μ l de una solución de yoduro de propidio (IP) (30 mg/ml en PBS). Los tubos se agitaron y se dejaron reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA). La reacción se detuvo al meter los tubos en hielo. El recuento de las células se hizo en un microscopio óptico con sistema de epifluorescencia (Zeiss) a una λ de 499 nm para el caso del DAF y 520-610 nm para el IP. Debido a que la quinacrina presenta propiedades de autofluorescencia, se utilizó un filtro de rodamina. Para la interpretación de esta prueba, se asumió que los trofozoítos teñidos de color verde, amarillos o no teñidos, pero que presentaron movimiento flagelar, se consideraron viables (DAF-positivos) y los trofozoítos con coloración rojiza fueron considerados como trofozoítos no viables (IP-positivos). La detección del número de estas células se hizo en 300 células por cada muestra para obtener el porcentaje de viabilidad.

Cada una de las evaluaciones mencionadas se realizó en cuatro ensayos independientes. Con los resultados obtenidos en cada ensayo, se realizó el análisis de regresión lineal para determinar el valor de las concentraciones inhibitorias (CI_{25} , CI_{50} , CI_{75}) y la concentración letal mínima (CLM).

5.6 Determinación de CI_{50} y CLM de compuestos derivados de acridinas sobre trofozoítos de *G. duodenalis in vitro*.

Para determinar la CI_{50} (Concentración Inhibitoria se define como la concentración de fármaco que produce la inhibición del 50% de células) y CLM (Concentración letal mínima es aquella en la cual se observa a todas las células afectadas por el fármaco) de cada uno de los fármacos empleados en este trabajo, fue necesario realizar curvas concentración-respuesta de los derivados de acridina mencionados anteriormente. Los parámetros que planteamos para evaluar la susceptibilidad de *Giardia duodenalis* hacia estos fármacos fueron la CI_{50} y la CLM, haciendo un análisis de regresión lineal para obtener estos valores. Inicialmente se prepararon varias diluciones de los fármacos en los diferentes solventes (dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), agua (H_2O)) y en una solución de trizma base 1M (Tabla 4) hasta tener un rango de concentraciones que permitieran observar el 100% de viabilidad y 100% mortalidad sobre el parásito. Para ello, se cultivaron trofozoítos de la cepa WB de *G. duodenalis* hasta fase logarítmica de crecimiento, es decir a 100% de confluencia. Una vez obtenido el cultivo, se enfriaron las células por 30 min. en un baño agua-hielo, y enseguida se hizo un recuento en una cámara de Neubauer. En viales de vidrio de borosilicato de 4.5 ml se adicionaron 1×10^6 trofozoítos y se expusieron a cada uno de los derivados de acridina (acridina, 9-amino-acridina, acridina naranja, acridina amarilla, 9-carboxi-acridina, primaquina, quinina, cloroquina)(Figura 8) en las concentraciones respectivas, posteriormente se aforaron con medio de TYI-S-33 y se incubaron durante 24 h. a $37^\circ C$. Después se enfriaron las células y se cosecharon para determinar la viabilidad por el método SML descrito anteriormente. Esta evaluación se hizo en cuatro ensayos independientes. Con la

obtención de curvas concentración-respuesta para cada fármaco, se calcularon tanto la CI_{50} y la CLM correspondientes.

5.7 Determinación de sensibilidad *in vitro* de trofozoítos de *Giardia duodenalis* a combinaciones de derivados de acridina

Una vez obtenida la CI_{50} y CLM de cada fármaco, se hizo una clasificación de su eficacia contra *G. duodenalis* (Tabla 5 y 6), y así proponer algunas combinaciones diádicas en base a su CLM entre los derivados de acridina con el interés de observar el efecto farmacológico entre fármacos pertenecientes a una misma familia.

Una vez elegidas las combinaciones a evaluar, se consideraron las CLM's de los fármacos en combinación y se dividieron empleando múltiplos de la dilución inicial=X ($X/2$, $X/4$, $X/8$, $X/16$, $X/32$, $X/64$, $X/128$ y $X/256$). En base a lo anterior se prepararon los fármacos en las diluciones a usar. En esta fase experimental se cultivaron trofozoítos de la cepa de referencia WB de *Giardia duodenalis* hasta tener 100% de confluencia y éstos se enfriaron por al menos 30 min. Una vez obtenidas estas células, se hizo un recuento en la cámara de Neubauer y se inocularon 1×10^6 células en viales de vidrio de borosilicato de 4.5 ml, éstos se incubaron por 24 h a 37°C . Posteriormente, estos cultivos se enfriaron y los trofozoítos se cosecharon en tubos de 15 ml e inmediatamente se centrifugaron 10 min. a $840 \times g$ 4°C . Posteriormente se determinó la viabilidad celular por el método de subcultivo en medio líquido (SML). Una vez expuestos los trofozoítos de *G. duodenalis* a los fármacos en combinación (Tabla 6), se obtuvieron curvas concentración-respuesta de cada combinación y por medio de un análisis de regresión lineal se calculó una nueva CLM de combinación y en base a estos resultados, se calculó el ICF (Índice

de Concentración Fraccional) con la formula propuesta por Li y Rinaldi (1999), que es:

$$ICF = \frac{CLM \text{ de AB (combinación)}}{CLM \text{ de A (s\acute{o}lo)} + \frac{CLM \text{ de BA (combinaci3n)}}{CLM \text{ de B (s\acute{o}lo)}}$$

Para realizar la evaluaci3n de interacciones farmacol3gicas de combinaciones di3dicas entre derivados de acridina, se determinaron los ICF's y de acuerdo con los siguientes par3metros se clasific3 como: sinergismo ($ICF < 0.5$), antagonismo ($ICF > 2$), aditividad ($0.5 < ICF < 1$) o indiferencia ($1 < ICF < 2$).

5.8 Obtenci3n de cultivos resistentes a quinacrina por subcultivo en medio l3quido (SML) en concentraci3n ascendente de f3rmaco.

5.8.1 Selecci3n inducida por el f3rmaco

Con la finalidad de obtener un cultivo de trofozo3itos de la cepa WB resistente a quinacrina, fue necesario mantener constante el cultivo en concentraciones ascendentes del f3rmaco, permitiendo el crecimiento del par3sito en su presencia hasta llegar a un valor superior a la CLM (Concentraci3n letal m3nima).

Para ello, se cultivaron trofozo3itos de la cepa WB de *G. duodenalis* hasta su fase logar3tmica y se fueron adicionando concentraciones ascendentes del f3rmaco, tomando como base la CI_{25} , CI_{50} y CLM obtenidas en la curva concentraci3n-respuesta para quinacrina (Qnc). Estos cultivos comenzaron a inducirse con $3 \mu M$ de Qnc y una vez adaptados, se increment3 la concentraci3n de f3rmaco hasta obtenerlos confluentes en el subcultivo continuo.

Los cultivos se incubaron a 37 °C y se observaron en el microscopio óptico invertido (Olympus Tokyo Modelo BHA) periódicamente para verificar su crecimiento, con la finalidad de resembrarlos cuando fuese necesario, como se describe en cultivo y cosecha de trofozoítos.

5.9 Evaluación de perfiles fenotípicos de trofozoítos de *G. duodenalis* sensibles y resistentes a quinacrina, furazolidona, metronidazol y albendazol

5.9.1. Marcaje de proteínas de superficie de trofozoítos de *G. duodenalis* con ¹²⁵I. Las proteínas de superficie fueron marcadas con ¹²⁵I utilizando el método de la lactoperoxidasa reportado por Marchalonis (1969) y adaptado por Ortega Pierres y Col.(1988).

Para realizar este método fue necesario lavar 3 veces los trofozoítos cosechados con PBS1X pH 7.2 y centrifugando a 840 xg/10 min en cada lavado. Posteriormente se hizo un recuento celular, enseguida se adicionaron 50,000,000 células en un tubo de plástico de 15 ml y se centrifugaron nuevamente por 10 minutos a 840 xg. La pastilla resultante se resuspendió en 685 µl de PBS1X, y enseguida la suspensión de trofozoítos se transfirió a tubos de ensaye de plástico desechables y en un baño de hielo, para agregar a la alícuota las siguientes mezclas: 0.5 mCi de Na ¹²⁵I con actividad específica de >0.6 TBq/mg, > 15 Ci/ mg (Amersham farmacia biotech), 11 µl KI 0.27mM, 100µl LPO 1mg/ml , y un volumen de PBS 1X suficiente para completar 1 ml. La reacción fue inducida con 2 adiciones de 25 µl de H₂O₂ 0.03% en PBS y agitación suave del tubo durante 2.5 min. para cada adición. Después de marcar los trofozoítos, se removió la mezcla de reacción del contenido celular mediante centrifugación en tubos Falcon cónicos de

15 ml a 840 xg por 10 min.(centrifuga clínica modelo IEC). El ^{125}I libre residual se eliminó lavando los trofozoítos 4 veces (mínimo) con 10 ml de PBS1X-KI 0.1mM y estos se centrifugaron a 840 xg/10 min. Durante el procedimiento de marcaje se determinó la radiactividad remanente tanto del sobrenadante como el contenido celular con un contador Geiger (Technical Associates Modelo Pug 1). El contenido celular se resuspendió en 750 μl de una solución de inhibidores de proteasas (trizma base 10 mM , fluoruro de fenil metilsulfonilo (PMSF) 1 mM, N-etilmaleimida (NEM) 25 mM.) (Anexo I) y se almacenó en tubos eppendorf contenidos en viales de plomo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Estas muestras se trabajaron posteriormente empleando el método de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS en gradiente de 5-15% del monómero, bajo condiciones reductoras, con la finalidad de separar las proteínas. Los componentes accesibles al marcaje se revelaron por autorradiografía (Anexo I). Los geles fueron secados por una película para secado (Promega Gel Drying Film) y expuestos en obscuridad a películas de rayos X (Kodak X-O mat XK-1) en cassettes especiales equipados con pantallas intensificadoras de teflón tungstato de calcio (dupont lightning plus GL) a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por tiempo determinados. Las placas se revelaron según la técnica descrita en el Anexo I.

5.9.2.- Marcaje metabólico con ^{35}S -metionina: Para el empleo de este método, los trofozoítos se incubaron en medio inductor en presencia de metionina marcada con ^{35}S con la finalidad de cuantificar e identificar las proteínas sintetizadas metabólicamente . Para iniciar esta técnica fue necesario enfriar los viales de la cepa resistente y se transfirieron a un tubo de 15 ml, posteriormente se centrifugaron a 840 xg/10 minutos (centrifuga refrigerante Sorvall RT7). Se desechó el sobrenadante y el contenido celular se resuspendió en 5 ml de medio incompleto (libre de suero), enseguida se hizo un conteo celular en la cámara de Neubauer. En

un tubo eppendorff se transfirieron 2×10^6 trofozoítos, los cuales fueron resuspendidos en 500 μ l de medio de TYI-S-33 sin suero y se adicionaron 5 μ l de 5 μ Ci de S^{35} -metionina con actividad específica de 37TBq/mM(1000 Ci/mM) (Amersham pharmacia biotech). Inmediatamente se incubaron por 4 horas a 37 °C (Incubadora GCI Modelo 4EG). Pasado este tiempo, se hicieron 2 lavados con PBS1X-metionina 0.1 mM. La pastilla final se resuspendió en 75 μ l de una solución de inhibidores de proteasas (trizma base 10 mM , fluoruro de fenil metilsulfonilo (PMSF) 1 mM, N-etilmaleimida (NEM 25 mM) (Anexo I) y se almacenó a -20 °C hasta su uso. La cuantificación de la marca incorporada en las células se hizo resuspendiendo 5 μ l de la muestra en 5 ml de solución de centelleo (Anexo I) contenida en un vial de vidrio de 20 ml, el cual se analizó en un contador de centelleo (Beckman Modelo 6000). Posteriormente, se empleó el método de electroforesis y autorradiografía para identificar las proteínas sintetizadas.

5.9.3 Análisis electroforético de extractos solubles marcados con ^{125}I y con ^{35}S -metionina. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

Con la finalidad de caracterizar perfiles proteínicos de cada uno de los extractos de trofozoítos de *G. duodenalis* resistentes a quinacrina, furazolidona, metronidazol y albendazol obtenidos en los procedimientos descritos, se efectuó la siguiente técnica electroforética:

En el análisis por SDS-PAGE se prepararon geles con un gradiente continuo del 5-15% p/v de concentración del monómero en el gel resoledor (Anexo I). Para el caso de marcaje de Ag's con ^{125}I se empleó una cámara de electroforesis de 15.8 X 17.8 cm y para el marcaje metabólico con ^{35}S se utilizó una cámara para minigeles de 7.3 X 10.1cm, debido al tipo de emisión radiactiva que presentan cada uno de los radioisótopos. El gel concentrador tuvo una concentración de 5% de acrilamida

y un pH de 6.8, mientras que el gel separador se uso con un gradiente de concentraciones de 5-15% de acrilamida y un pH de 8.8. Las soluciones de 5 y 15% para el gel separador (Anexo I) se prepararon y se vertieron en los reservorios de un formador de gradiente que con la ayuda de una bomba peristáltica se vació el contenido en el montaje de vidrios y separadores hasta llegar a una altura considerada e inmediatamente se le adicionó 1 ml de isopropanol o 500 μ l en un minigel. Una vez que polimerizó el gel separador (aproximadamente 2 h.), se retiró el isopropanol. Enseguida se colocó un peine formador de pozos de teflón de 1.5 mm de grosor a una distancia de 1.5 cm del gel separador y luego se preparó la solución para el gel concentrador (Anexo I), la cual se aplicó y se dejó polimerizar (aproximadamente 1 h), posteriormente se retiró el peine. Los geles preparados se montaron en una cámara para electroforesis vertical (Bethesda Research Laboratories, Modelo V16) y adaptados a una fuente de poder (Bio-Rad Modelo 250/2.5) usando además un amortiguador de corrimiento (solución de Trizma base 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0.1% p/v a pH de 8.3)(Anexo I). A las muestras en solución de inhibidores de proteasas se les adicionó buffer de muestra 5X, enseguida se incubaron 5 min. en un baño maría, para evitar una posible activación de proteasas ante la adición de β -mercaptoetanol para una concentración final de 5% v/v, después se incubaron nuevamente 1 min. en un baño maría con la finalidad de desdoblar las moléculas proteínicas. En estos ensayos se utilizaron como referencia marcadores de alto y bajo peso molecular (Pharmacia) previamente disueltos en agua bidestilada y se les aplicó el mismo tratamiento que a las muestras. Una vez formado el gel, se cargaron las muestras en los diferentes pozos y se efectuó la electroforesis con el siguiente patrón: para geles grandes (15.8 X17.8 cm) a 200 voltios durante 20 min. y 100 voltios durante 8.5 hrs. y para los minigeles (7.3X10.1 cm) a 80 voltios durante 6-7 hrs. o

prácticamente hasta que el colorante trazador (pironina Y) llegó al borde inferior del gel separador.

Una vez transcurrido el tiempo de corrida, y con la finalidad de observar las proteínas separadas electroforéticamente en el gel se procedió a teñirlas y fijarlas. Así, el gel se retiró de las placas y se sumergió en una solución de tinción con azul de Coomassie R-250 al 0.1% en metanol 50%, ácido acético 10%, H₂O 40% v/v por un lapso de 1 h. Inmediatamente se removió el exceso de colorante con una solución decolorante A (Metanol 50%, ácido acético 10%, H₂O 40% v/v) durante media hora con agitación suave (agitador giratorio New Brunswick Scientific Co. Modelo G2). Posteriormente se reemplazo por otra solución decolorante B (metanol 10%, ácido acético 5%, H₂O 85% v/v) 2 veces más por lapsos de media hora, hasta que se observaron en el gel las bandas de proteína y un fondo claro.

5.10 Métodos Estadísticos

Los métodos estadísticos que se emplearon para tener una mayor confiabilidad de los resultados, fueron el análisis de regresión lineal a partir de las curvas concentración-respuesta para la determinación de CI₅₀ y CLM requeridos como parámetro de sensibilidad en cada método.

También se empleó el análisis de regresión lineal para el ajuste de las determinaciones de pesos moleculares en las bandas visualizadas en los diversos geles de SDS-PAGE y placas autorradiográficas.

6. RESULTADOS

6.1 Cultivo de trofozoítos de *G. duodenalis*.

Los trofozoítos de la cepa WB que se emplearon en este trabajo fueron cultivados axénicamente en medio de TYI-S-33 como se describió en material y métodos, en el cual crecieron eficientemente en períodos de 2 a 4 días y se realizaron sus respectivas resiembras. Las resiembras de los cultivos se hicieron sometiendo estos a enfriamiento en un baño de hielo-agua durante 30 min. aproximadamente. Este medio se caracteriza por ser altamente complejo ya que contiene agentes reductores como cisteína, ácido ascórbico, dextrosa, sales, antibióticos, amortiguadores de pH, suero y bilis. Con este medio se han realizado evaluaciones de tipo farmacológico como la determinación del mecanismo de acción del fármaco, terapia alternativa en casos refractarios al tratamiento y sensibilidad del parásito a fármacos (Smith y Col., 1982). Por esta razón, el medio TYI-S-33 resultó fundamental para el mantenimiento de cultivos *in vitro* empleados en este trabajo, pues los parásitos crecen y se multiplican en buenas condiciones.

Los trofozoítos que fueron expuestos a concentraciones ascendentes de quinacrina crecieron entre 4 a 5 días y también se resembraron como se describió en material y métodos. Con el objetivo de preservar estos cultivos, los trofozoítos se congelaron y se almacenaron en N₂ líquido, una vez que se mantuvieron estables a la concentración del fármaco. Asimismo se clonaron las cepas para obtener cultivos resistentes con características homogéneas. Así se obtuvieron clonas que se definen como un grupo de células las cuales derivan de una célula inicial. Para evaluar si realmente una clona se derivó de una célula se llevó a cabo la obtención de % CFE (porcentaje de eficiencia de formación de colonias) cuyo valor máximo es del 100%, empleándose el método de dilución limitante. Las clonas resistentes a quinacrina

obtenidas fueron obtenidas en ausencia de fármaco y con una eficiencia de crecimiento del 84% de estos cultivos.

Las cepas resistentes a furazolidona, metronidazol y albendazol que se emplearon en la evaluación de perfiles fenotípicos se mantuvieron según las condiciones ya establecidas anteriormente en el laboratorio 2 del Depto. de Genética y Biología Molecular (CINVESTAV-IPN).

Algunas cepas empleadas en este trabajo pasaron por el proceso de congelación y descongelación en las condiciones descritas en material y métodos.

Por último, es importante mencionar que a todos los cultivos se les realizó con frecuencia pruebas de esterilidad en medio de Luria (Anexo I), para descartar la presencia de algún tipo de contaminación que alterara los resultados en la evaluación de la susceptibilidad a fármacos en este parásito.

6.2 Evaluación de métodos para estimar la viabilidad celular de trofozoítos de *G. duodenalis* expuestos a quinacrina.

Para tener parámetros confiables de viabilidad que mostrarán sensibilidad a los derivados de acridina, se realizaron ensayos empleando trofozoítos de la cepa WB expuestos a concentraciones ascendentes que permitieran observar el rango de letalidad de la quinacrina, fármaco representativo del grupo de acridinas.

Los métodos que se emplearon fueron previamente estandarizados por Romero-Montoya L. (1996) y Cruz-Soto M. (1998).

Los ensayos que se emplearon para estimar la viabilidad celular *in vitro* y su efecto farmacológico sobre *Giardia*, se clasificaron en: a) Métodos que miden de modo directo la sensibilidad del cultivo considerando su nivel de replicación celular y que se conocen como parámetros fisiológicos (SML), y b) Métodos bioquímicos (DAF-IP, MTT y ³H-TdR), los cuales evalúan la viabilidad del parásito a nivel de

rutas metabólicas. Esto a su vez permitió seleccionar el método que fue el óptimo en término de costos, confiabilidad, facilidad, reproducibilidad y sensibilidad.

6.2.1 Subcultivo en medio líquido (SML).

El SML, es un ensayo fisiológico que evalúa la capacidad de un sistema biológico al seguir realizando sus funciones vitales como es la replicación celular al ser expuesto a un agente citotóxico (Hill y Col., 1986). Para este método se siguió la metodología descrita en material y métodos. De acuerdo con la curva concentración-respuesta obtenida para la quinacrina representada en la Figura 9, se realizó el análisis de regresión lineal donde por extrapolación se obtuvo la CI_{50} y la CLM. En este caso para la quinacrina (Qnc) podemos apreciar que en la Tabla 3 la CI_{50} y la CLM fueron de 0.36 y 11.4 μM respectivamente con un coeficiente de correlación ($r=0.95$), estos datos fueron bajos en comparación con los otros ensayos probados.

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

Otro método empleado fue $^3\text{H-TdR}$, el cual estima si el parásito se replica y esto se puede medir con la timidina ($^3\text{H-TdR}$) que fue incorporada al ADN, y ésta se cuantificó en un contador de centelleo (Beckman Modelo 6000). Esta incorporación de timidina ($^3\text{H-TdR}$) la realiza la célula a lo largo de su fase S del ciclo celular como una preparación para la duplicación del genoma antes de la mitosis (Inge y Farthing, 1987; Boreham y Col., 1984). En la Figura 9 y la Tabla 3, se observan los resultados que se obtuvieron una CI_{50} de 21.59 y la CLM de 1768.23 μM con un coeficiente de correlación de ($r=0.96$).

6.2.3 Reducción de sales de tetrazolio (MTT)

El MTT es una prueba colorimétrica que mide la actividad glicolítica de los parásitos viables, por medio de una reducción metabólica de la sal de tetrazolio, la cual forma un precipitado en el interior del citoplasma debido a una bio-reducción del

tetrazolio, donde el formazán se vuelve insoluble (Mossman 1983). Estas sales de formazán que se forman dentro de los trofozoítos pueden ser observadas al microscopio como pequeños gránulos de color café oscuro. En este trabajo se hicieron modificaciones al método reportado por Mossman (1983), en el cual el ensayo tradicional implica lisar las células para liberar el formazán insoluble en H₂O y solubilizarlo en alcohol-ácido (isopropanol-HCl), para posteriormente efectuar lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro. En la Figura 9 y Tabla 3, se observó que la CI₅₀ y CLM para este método fueron 1644.48 y 8.4×10^5 μ M respectivamente. En este caso sólo reportamos los resultados del método espectrofotométrico ya que el método microscópico no fue tan sensible al observar la presencia o ausencia de gránulos dentro de la célula resultando ser poco eficiente.

6.2.4 Incorporación de colorantes fluorogénicos (DAF-IP)

En el método DAF-IP se originan dos reacciones en donde el diacetato de fluoresceína (DAF) es una molécula no fluorescente que sirve como sustrato en ciertas reacciones enzimáticas, donde las esterasas intracelulares inespecíficas se unen a dos grupos mediante un enlace éster con el sustrato y se origina la fluoresceína, la cual es una molécula que emite una fluoresceína verde a una $\lambda=499$ nm. Para llevar a cabo esta reacción se necesita que la bicapa lipídica de la célula no tenga algún daño y pueda retener el fluorocromo resultante y así se detectaron células vivas. Por otra parte el fluorocromo fenantrínico (IP) penetra al parásito y se ubica en la doble cadena de los ácidos nucleicos debido a una alteración en la estructura membranal del parásito, evaluándose así células muertas (Schupp y Erlandsen, 1987). Por este ensayo se obtuvo el porcentaje de viabilidad sobre recuentos celulares directos, empleando el microscopio de epifluorescencia después de haber expuesto los trofozoítos a quinacrina. Los parásitos viables con DAF presentaron una fluorescencia verde-amarillenta debido a la actividad enzimática de

las esterasas que hidrolizaron al substrato fluorogénico para generar la fluoresceína en el parásito (DAF-positivas). En ocasiones se observaron trofozoítos que no se teñían con DAF ni con IP, pero al observarse en el microscopio de campo claro, los parásitos tenían una morfología y motilidad flagelar normal, por lo que se consideraron viables. Las células dañadas o células muertas mostraron un color rojizo al incorporar el IP (IP-positivas). Los valores obtenidos con este método fueron una CI_{50} y CLM de 4.92×10^8 y $2.89 \times 10^{16} \mu M$ respectivamente (Figura 9 y Tabla 3).

Este método fue el menos sensible debido a su valores, lo cual no sucedió con las otras metodologías, por lo que se considera como un método analítico poco confiable en la determinación de la viabilidad celular de trofozoítos expuestos a quinacrina. En base a lo anteriormente reportado, se sugiere que el método óptimo para evaluar la viabilidad de trofozoítos de *G. duodenalis* que fueron expuestos a un agente citotóxico como la quinacrina fue el SML y un posible método alternativo es la 3H -TdR como se muestra en la Tabla 3. Los resultados obtenidos fueron reproducibles, sugiriéndose con esto un probable mecanismo de acción citotóxico de este fármaco a nivel bioquímico.

Para el desarrollo de las siguientes estrategias experimentales se seleccionó el ensayo de SML debido a su sensibilidad y reproducibilidad en la viabilidad celular de los trofozoítos al ser expuestos a quinacrina.

6.3 Análisis del efecto de las distintas concentraciones de derivados de acridina en trofozoítos de *Giardia duodenalis*.

Se realizaron diluciones de los derivados de acridina a probar para determinar el límite de solubilidad que muestran los fármacos en los diferentes solventes o soluciones, seleccionando el más conveniente para disminuir la toxicidad



en el cultivo. Se emplearon algunos solventes polares tales como el agua y no polares como el dimetilsulfoxido (DMSO). La mayoría de los derivados de acridina se disolvieron bien en este último, por ello se uso como solvente óptimo ya que presento los mejores resultados. En todos los casos se consideró que la concentración del solvente no sobrepasará un límite de 0.5% en el medio de cultivo. El límite de solubilidad nos permitió elaborar soluciones patrón con cantidades de fármaco que fuesen disueltas para posteriormente usarse en otras diluciones (soluciones de trabajo)(Tabla 4).

Una vez establecidos los límites de solubilidad se hizo la evaluación de viabilidad de los trofozoítos de *Giardia duodenalis* que fueron expuestos a los diferentes derivados de acridina, determinándose así el rango de letalidad para cada uno los fármacos (Tabla 5).

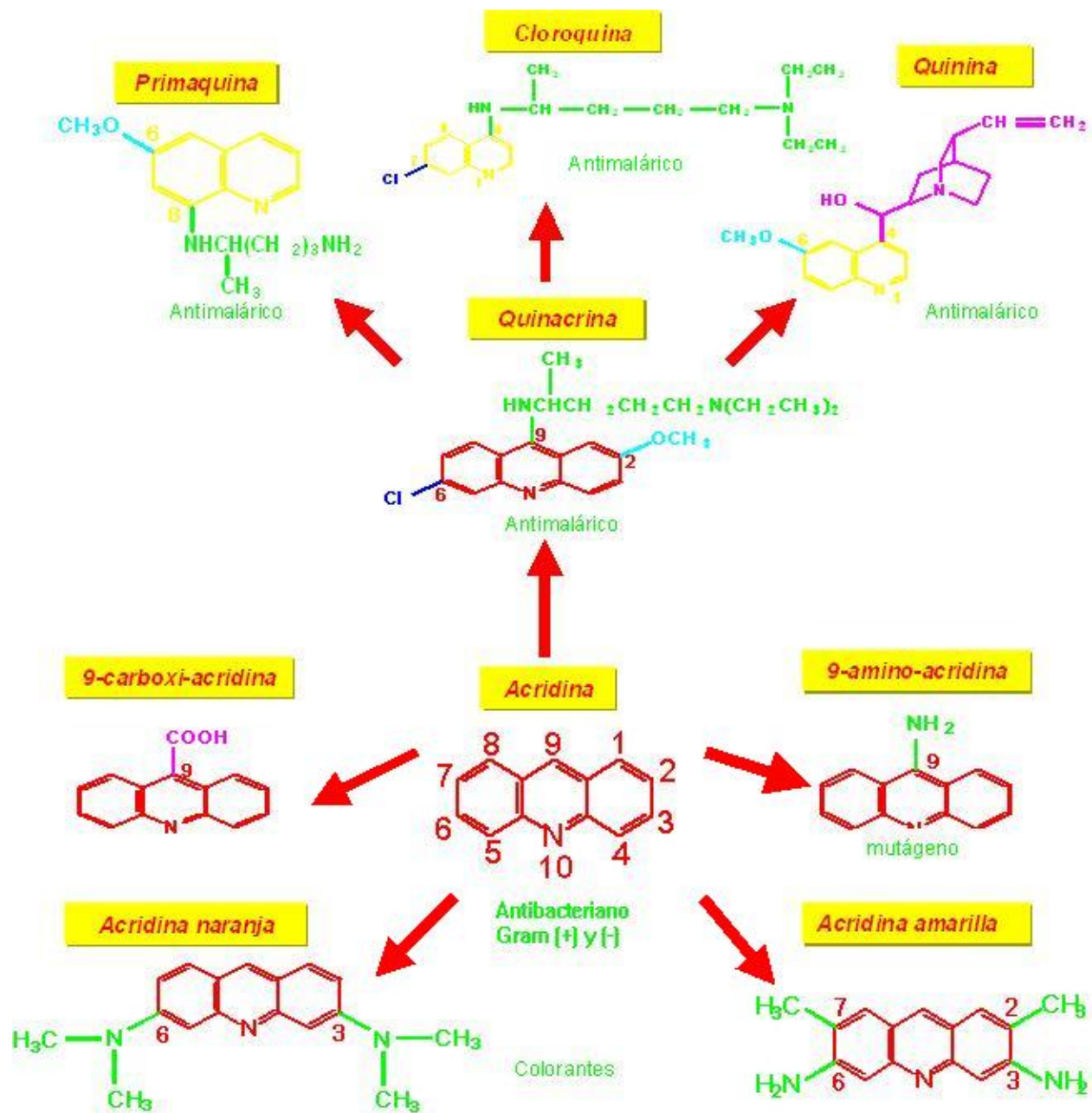


Figura 8. Estructuras químicas de los compuestos derivados de acridina empleados en este trabajo. Se indican los sustituyentes ubicados en sus diferentes posiciones, así como sus aplicaciones.

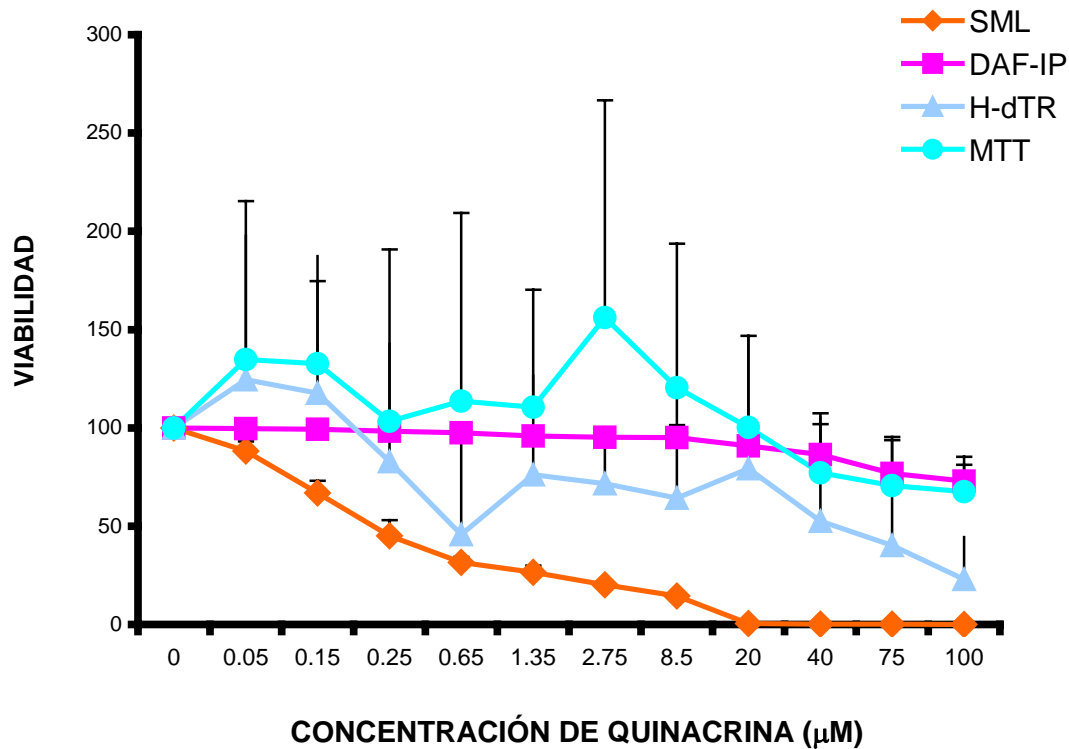


Figura 9. Determinación de la viabilidad en trofozoítos de *G. duodenalis* de la cepa WB expuestos a quinacrina empleando diferentes métodos. Se inocularon 1×10^6 trofozoítos/ml y se les adicionaron diferentes concentraciones de quinacrina, posteriormente se incubaron a 37°C durante 24 h. La determinación de viabilidad se realizó con el procedimiento seguido en cada técnica que se describe en material y métodos. DAF-IP (Tinción con colorantes fluorogénicos), MTT (Reducción de sales de tetrazolio), $^3\text{H-TdR}$ (Incorporación de timidina tritiada) y SML (Subcultivo en medio líquido). Todas las evaluaciones muestran el promedio de ensayos realizados en 4 ensayos independientes. El método SML resultó ser el más sensible y reproducible al evaluar la viabilidad de los trofozoítos en presencia de fármaco en comparación con los otros métodos, ya que se observó un decremento gradual en la viabilidad celular en función del incremento de concentración de quinacrina.

Tabla 3. Valores de CI's y CLM's obtenidos empleando los métodos de evaluación de viabilidad sobre trofozoítos de la cepa WB expuestos a quinacrina.

METODO	CI₂₅+D.E.(μM)	CI₅₀+D.E.(μM)	CI₇₅+D.E.(μM)	CLM+D.E.(μM)	r
SML	0.063±0.02	0.36±0.05	2.01±0.12	11.4±1.44	0.95
³ H-TdR	2.38±0.27	21.59±2.27	195.36±22.4	1768.23±41.6	0.96
MTT	72.74±15.25	1644.48±41.4	3.7X10 ⁴ ±6.69X10 ³	8.4X10 ⁵ ±1.14X10 ³	0.93
DAF-IP	2029.54±42.6	4.92X10 ⁸ ±9.4x10 ²	1.19X10 ¹² ±2.0X10 ²	2.89X10 ¹⁶ ±4X10 ²	0.86

Para el cálculo de estos parámetros se emplearon los datos mostrados en las curvas concentración-respuesta de la Figura 9, siguiéndose el procedimiento de mínimos cuadrados. Las concentraciones inhibitorias (CI₂₅, CI₅₀, CI₇₅) y la concentración letal mínima (CLM) se expresan en concentración μM.

6.4 Obtención de CI_{50} y CLM de derivados de acridina

Para realizar este estudio se hizo la evaluación de la eficacia farmacológica de los fármacos pertenecientes al grupo de derivados de acridina ya mencionados, los cuales fueron evaluados *in vitro* empleando la cepa de referencia WB de *Giardia duodenalis*. Se expusieron durante 24 h 1×10^6 trofozoítos de *G. duodenalis* a diferentes derivados de este grupo de fármacos (9-amino-acridina, 9-carboxi-acridina, acridina naranja, acridina amarilla, cloroquina, primaquina, quinina y quinacrina) en un intervalo de concentraciones que no sobrepasara el límite de solubilidad y con ello determinar la viabilidad, obteniéndose los valores de los parámetros de CI_{50} (Concentración inhibitoria al 50%- es la concentración de fármaco que produce la inhibición del 50% de la población) y CLM (Concentración letal mínima- es la concentración en la que se observa a todas las células muertas).

En la Figura 10 se muestran los resultados obtenidos a través de curvas concentración-respuesta para los derivados, en donde por interpolación matemática se determinaron las CI_{25} , CI_{50} , CI_{75} y la CLM de cada uno de ellos (Tabla 5), lo cual indicó las diferencias en la eficacia de los fármacos probados en este trabajo.

Los resultados mostraron que el fármaco más efectivo de este grupo fue la quinacrina con una CI_{50} de $0.36 \mu\text{M}$ y una CLM de $11.4 \mu\text{M}$. de efectividad intermedia resultaron acridina naranja, 9-amino-acridina, acridina amarilla y acridina con rangos de CI_{50} de $28.1\text{-}840.5 \mu\text{M}$ y CLM's de $1206.68\text{-}2079.63 \mu\text{M}$, en tanto que los menos efectivos fueron quinina, primaquina, cloroquina y 9-carboxi-acridina cuyos rangos de CI_{50} fueron de $99.96\text{-}1.28 \times 10^6 \mu\text{M}$ y CLM's de $8904.42\text{-}7.70 \times 10^{12} \mu\text{M}$. Por otra parte al determinar el índice citotóxico (CLM/CI_{50}) de los derivados, se observó un rango estrecho en esta relación con todos los derivados excepto con la quinacrina, cloroquina y 9-carboxi-acridina, ya que presentaron una relación (CLM/CI_{50}) de 31.58, 321.46 y 5.98×10^6 respectivamente (Tabla 5). Este parámetro es útil para determinar la potencia parasiticida de los fármacos.

Tabla 4. Características de solubilidad para los derivados de acridina empleados.

DERIVADOS DE ACRIDINA	PESO MOLECULAR (PM)	SOLVENTE	LIMITE DE SOLUBILIDAD (SOLN. PATRON)	SOLUCION DE TRABAJO
QUINACRINA	472.9 g/ml	DMSO	9 mM	4.5 mM
9-AMINO ACRIDINA	248.71 g/ml	DMSO	190 mM	95 mM
ACRIDINA AMARILLA	273.8 g/ml	DMSO	27 mM	13.5 mM
PRI MAQUINA	455.3 g/ml	DMSO	886 mM	443 mM
ACRIDINA NARANJA	370 g/ml	DMSO	362 mM	181 mM
QUININA	324.4 g/ml	DMSO	770 mM	77 mM
COROQUINA	515.9 g/ml	H ₂ O	710 mM	305 mM
ACRIDINA	215.7 g/ml	H ₂ O	237.36 mM	23.8 mM
9-CARBOXI-ACRIDINA	223.2 g/ml	TRIZMA BASE	158 mM	79 mM

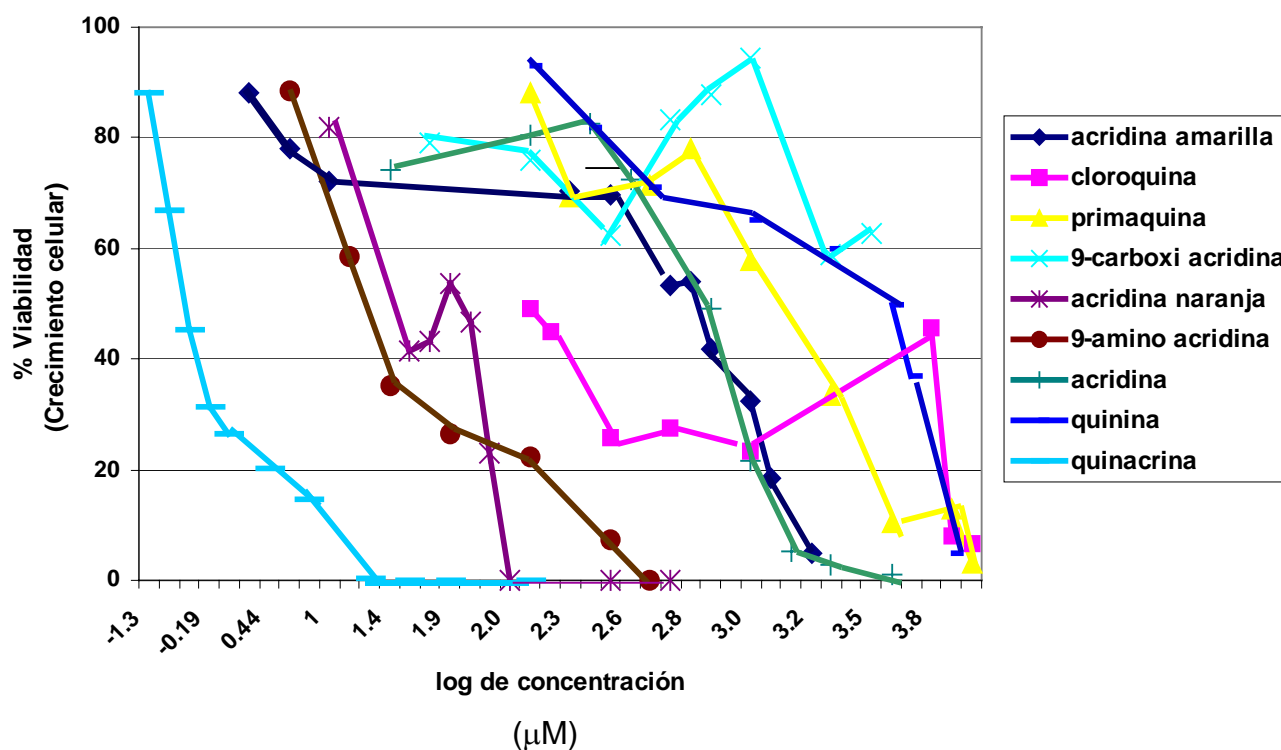
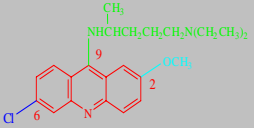
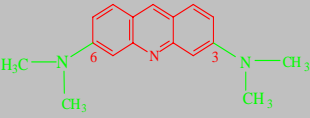
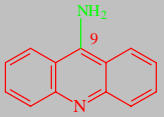
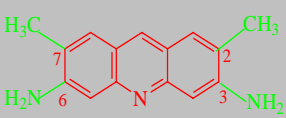
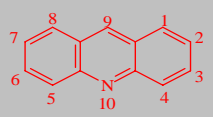
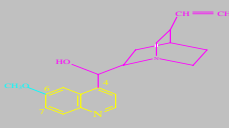
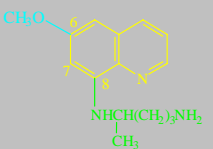
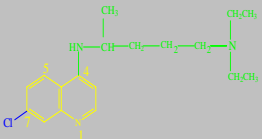
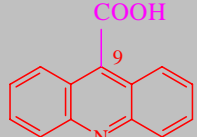


Figura 10. Curvas de viabilidad para medir la concentración-respuesta de los derivados de acridina en trofozoítos de *G. duodenalis* de la cepa WB. Se emplearon inóculos de 1×10^6 trofozoítos/ml los cuales se incubaron a 37°C en presencia de diversas concentraciones de cada uno de los fármacos por 24 h. Posteriormente se determinó su viabilidad por el método de SML. Todos los puntos de las gráficas corresponden a promedios de 4 experimentos independientes. En esta figura se observó que la quinacrina a menor concentración tiene mayor efectividad sobre el parásito mientras que los demás derivados de acridina requieren una mayor concentración de fármaco para causar efecto sobre la viabilidad de trofozoítos de *G. duodenalis*.

Tabla 5. Valores de CI's y CLM's obtenidos por SML de trofozoítos de la cepa WB expuestos a los derivados de acridina.

DERIVADOS DE ACRIDINA	CI₂₅(μM)	CI₅₀(μM)	CI₇₅(μM)	CLM (μM)	CLM/CI₅₀	r
QUINACRINA	0.06	0.36	2.01	11.4	31.58	0.95
ACRIDINA NARANJA	11.45	30.04	78.79	206.68	6.88	0.94
9-AMINO-ACRIDINA	98.09	28.1	154.4	280.58	9.97	0.76
ACRIDINA AMARILLA	126.3	646.9	1167.7	1688.4	2.61	0.98
ACRIDINA	220.9	840.5	1460.07	2079.63	2.47	0.98
QUININA	657.9	3406.77	6155.5	8904.42	2.61	0.97
PRIMAQUINA	231.66	883.80	3371.72	12863.21	14.55	0.97
COLORQUINA	5.27	99.96	1792.20	32133.37	321.46	0.82
9-CARBOXI-ACRIDINA	525.55	1286080	3.14x10 ⁹	7.70x10 ¹²	5.98x10 ⁶	0.49

Tabla 6. Clasificación del efecto farmacológico de los derivados de acridina en base a las CLM's obtenidas experimentalmente.

NOMBRE	ESTRUCTURA	CI ₅₀ (μM)	CLM(μM)	EFICACIA
QUINACRINA		0.36	11.4	<i>MUY EFICIENTE</i> (+)
ACRIDINA NARANJA		30.04	206.68	<i>MEDIANA EFICIENCIA</i> (±)
9-AMINO-ACRIDINA		28.1	280.58	<i>MEDIANA EFICIENCIA</i> (±)
ACRIDINA AMARILLA		646.9	1688.4	<i>MEDIANA EFICIENCIA</i> (±)
ACRIDINA		840.5	2079.63	<i>MEDIANA EFICIENCIA</i> (±)
QUININA		3406.77	8904.42	<i>BAJA EFICIENCIA</i> (-)
PRIMAQUINA		883.80	12863.21	<i>BAJA EFICIENCIA</i> (-)
COLORQUINA		99.96	32133.37	<i>BAJA EFICIENCIA</i> (-)
9-CARBOXI-ACRIDINA		1286080	7.70x10 ¹²	<i>BAJA EFICIENCIA</i> (-)

Se muestran características de efectividad relativa de los fármacos empleados [(+) muy eficiente, (±) mediana eficiencia, (-) baja eficiencia)].

6.5 Análisis de relación estructura-actividad *in vitro* de trofozoítos de *G. duodenalis* entre los derivados de acridina.

La finalidad de realizar un estudio *in vitro* de relación e estructura-actividad fue el aportar datos para un futuro diseño racional de fármacos anti-*Giardia*, determinándose el efecto de algunas modificaciones definidas en las estructuras químicas de los compuestos de derivados de acridina.

Para este estudio la estructura base de este grupo de fármacos fue la acridina cuya estructura es similar a un antraceno fusionado con un nitrógeno en C₁₀, además de ser una estructura no substituida (Figura 8) y la cual como se observó anteriormente, resultó ser de efectividad intermedia contra *Giardia duodenalis*.

Otros fármacos que se emplearon del grupo de acridinas, presentan tres anillos bencénicos y la fusión en el C₁₀ de la estructura por un nitrógeno que los caracteriza, además de estar substituidos en los C₂, C₃, C₆, C₇ y C₉ por grupos como -NH₂, -COOH, -CH₃ y -NHR (R= substituyente alifático). También se usaron fármacos como primaquina, cloroquina y quinina que si bien son conocidas como quinolinas, éstas también pertenecen al grupo de acridinas debido a que su estructura base es un heterociclo formado por 2 anillos bencénicos fusionados por un nitrógeno. Estos se caracterizan por estar substituidos en C₄, C₆, C₇ y C₈ por grupos -NHR (R= substituyente alifático), -OCH₃ y -Cl.

En base a lo anterior, los resultados obtenidos mostraron que los derivados de acridina que tienen un grupo como -NHR (R= substituyente alifático) en el C₉ incrementan su actividad farmacológica y su efecto fue potenciado con la presencia de grupo -NH₂ en C₃ y C₆ de la acridina, por lo cual fármacos como quinina, 9-carboxi-acridina y cloroquina fueron poco eficaces. Por su parte, la quinacrina al ser la más efectiva necesita de un grupo -NHR en C₉, además de la presencia del grupo

metoxi (-OCH₃) en C₂ y un halógeno (-Cl) en C₆ para incrementar su efectividad (Tabla 6).

6.6 Análisis de sensibilidad *in vitro* de *G. duodenalis* a combinaciones de derivados de acridina

Una vez evaluada la efectividad de los derivados de acridina, se hizo una clasificación teniendo como parámetro la CLM (Concentración letal mínima, es la concentración en la que se observa a todas las células muertas) obtenida, clasificándolos como muy eficiente, de mediana eficiencia y baja eficiencia.

Para el estudio de análisis de combinaciones, se realizaron una serie de combinaciones diádicas posibles entre los derivados de acridina. Estas se eligieron según la efectividad de cada fármaco por separado en base a su CLM como se observa en la Tabla 6, para posteriormente obtener una nueva CLM de combinación y mediante un análisis estadístico se calculó el índice de concentración fraccional (ICF). Con este último parámetro se determinó el tipo de interacción farmacológica de las combinaciones propuestas.

Estos ensayos fueron realizados con trofozoítos de la cepa WB y la técnica de subcultivo en medio líquido, las combinaciones propuestas se observan en la Tabla 7. Se determinó la CLM tanto para el fármaco sólo como para la combinación correspondiente, con la finalidad de observar efectos de mortalidad independientes y sumatorias entre estos fármacos. Con el análisis estadístico de estos, se determinaron los índices de concentración fraccional (ICF) para cada caso, empleando la fórmula propuesta por Li y Rinaldi, 1999. Posteriormente se clasificó el efecto farmacológico en cada combinación como sinergismo ($ICF < 0.5$), antagonismo ($ICF > 2$), aditividad ($0.5 < ICF < 1$) o indiferencia ($1 < ICF < 2$).

En base a lo anterior, los resultados mostraron que las combinaciones propuestas de los derivados de acridina con modificaciones de los sustituyentes en las posiciones de C₃, C₆ y C₉ presentaron índices de concentración fraccionales (ICF) con un rango entre 0.09-0.47 y debido a que fueron menores a 0.5. Así esta interacción se consideró como sinergismo, mientras que combinaciones que incluyeron derivados con diferencias estructurales en los anillos bencénicos de la acridina mostraron rangos de 2.69-8.94 presentando antagonismo debido a que su ICF es mayor a 2 (Tabla 7).

6.7 Obtención de cultivos resistentes a quinacrina

En esta parte de nuestro trabajo, se hizo la inducción de resistencia a quinacrina *in vitro* y para ello se utilizó el método de selección inducida por el fármaco, un método que fue probado anteriormente dentro de nuestro grupo de trabajo como el más adecuado y confiable para la inducción de resistencia *in vitro* para una gran diversidad de fármacos. Sin embargo, la desventaja que presenta este método es que requiere de tiempos prolongados de cultivo continuo para obtener el fenotipo deseado.

En la figura 11 podemos observar que se obtuvo una cepa resistente hasta 12.5 μM de quinacrina, la cual es superior a la CLM de quinacrina obtenida experimentalmente en este trabajo para la cepa de referencia WB fue de 11.4 μM . En la figura 12, se observa que la cepa resistente a 12.5 μM presentó un crecimiento mayor en comparación con la cepa sensible, por lo que se considera resistente aunque la confluencia al 100% se obtuvo hasta las 120 h. Esta cepa resistente fue obtenida en aproximadamente 80 semanas de inducción a concentraciones ascendentes del fármaco (Figura 11). Es importante mencionar que fue muy complicado aumentar la concentración y mantener la estabilidad de los cultivos,

estos no presentaron cambios drásticos en su morfología, pero al concentrar células para algún ensayo la pastilla siempre se observó de color amarillo.

Debido a que la cepa WB fue aislada de un paciente con giardiosis sintomática refractaria a tratamientos con metronidazol y quinacrina, tratamos de descartar la posibilidad de que la CLM obtenida experimentalmente y los cultivos resistentes hayan resultado afectados por esa “resistencia” tal vez conferida al paciente. Por ello, se realizó la determinación de viabilidad celular en trofozoítos de *G. duodenalis* de la Cepa P1 por el método de SML, obteniéndose una curva concentración-respuesta y por extrapolación la CLM resultó de 12.27 μM con un $r=0.96$ (Figura 13 y Tabla 8).

Por otra parte, en la inducción de resistencia cuando los trofozoítos de *G. duodenalis* se adaptaron a 12.5 μM de quinacrina se consideraron resistentes al fármaco y tomando en cuenta el carácter autofluorescente de la quinacrina, estos cultivos fueron observados por microscopía fluorescente y comparados con trofozoítos sensibles a quinacrina a la misma concentración de fármaco. La quinacrina fue rápidamente absorbida por los trofozoítos sensibles expuestos durante 24 h al fármaco. (Figura 14a y 14b), observándose en campo claro que las células viables (Figura 14a) fluorescen más a nivel de núcleos o en toda la célula (Figura 14b). Por su parte en los trofozoítos resistentes a quinacrina (Figura 14c), el fármaco se difundió hacia la membrana de la célula y su fluorescencia fue nítida, lo cual dificultó visualizar otros trofozoítos viables (Figura 14d).

Tabla 7. Interacciones farmacológicas resultantes entre los derivados de acridina en base a sus ICF's

COMBINACIONES	EFFECTIVIDAD RELATIVA	ICF'S	INTERACCION FARMACOLOGICA
9-AMINOACRIDINA-ACRIDINA AMARILLA 	(+/-)	0.09±0.02	SINERGISMO
QUINACRINA-CLOROQUINA 	(+/-)	0.14±0.1	SINERGISMO
ACRIDINA-ACRIDINA AMARILLA 	(+/-)	0.18±0.07	SINERGISMO
QUINACRINA-9-AMINOACRIDINA 	(+/-)	0.19±0.08	SINERGISMO
QUINACRINA-ACRIDINA 	(+/-)	0.47±0.01	SINERGISMO
CLOROQUINA-ACRIDINA AMARILLA 	(-/+)	2.69±0.4	ANTAGONISMO
QUINACRINA-ACRIDINA AMARILLA 	(+/-)	8.94±2.62	ANTAGONISMO

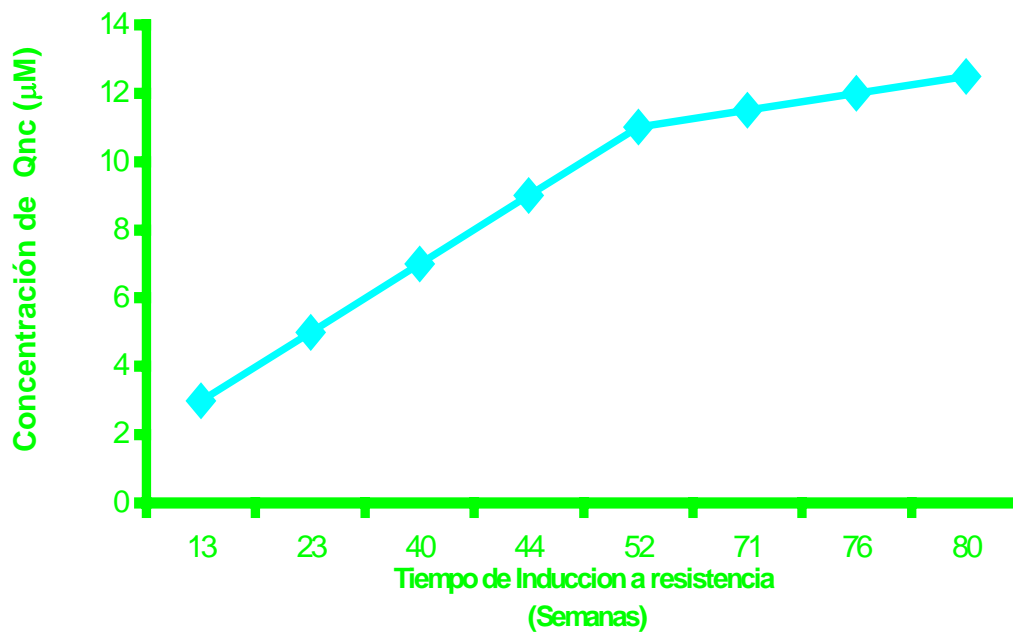


Figura 11. Cinética de resistencia a quinacrina de la cepa WB de *G. duodenalis* inducidas por selección al fármaco. Se emplearon trofozoítos de la cepa WB de referencia y un stock de quinacrina 4.5 mM. La concentración inicial en el cultivo continuo de trofozoítos de *G. duodenalis* a quinacrina fue de 3 μM y una vez estable cada cultivo, se hicieron incrementos de 0.5 μM de concentración hasta superar la CLM experimental obtenida en este trabajo. En la figura se observó que a partir de la semana 13 la cepa WB comenzó a generar resistencia a quinacrina 3 μM , posteriormente a la semana 52 se hizo más lenta su inducción y al llegar a la semana 80 se obtiene la mayor concentración de resistencia al fármaco.

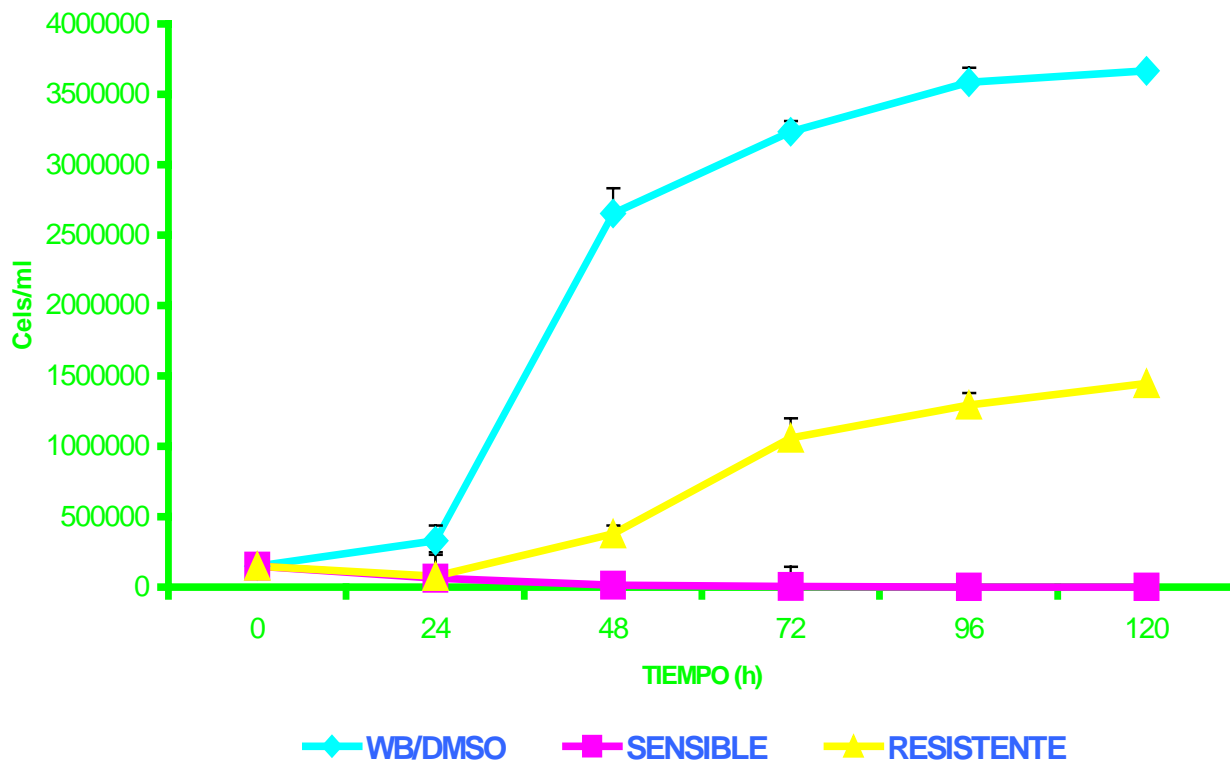


Figura 12. Evaluación de resistencia de trofozoítos de *G. duodenalis* sensibles y resistentes expuestos a 12.5 μ M de quinacrina. Se utilizó un inóculo inicial de 150,000 células/ml que fueron colocados en un vial de vidrio de borosilicato de 4.5 ml, después se adicionó DMSO para el control y para la cepa sensible o resistente 12.5 μ l de un Stock 4.5 mM de quinacrina. Posteriormente se hicieron los conteos celulares en una cámara de Neubauer a diferentes días. En esta figura la cepa WB control (WB/DMSO) descartó que la viabilidad haya sido afectada por el DMSO, la cepa resistente a las 48 h comienza a aumentar la viabilidad de las células en presencia del fármaco mientras que en la cepa sensible se observó a las 24 h que los trofozoítos de *G. duodenalis* mueren.

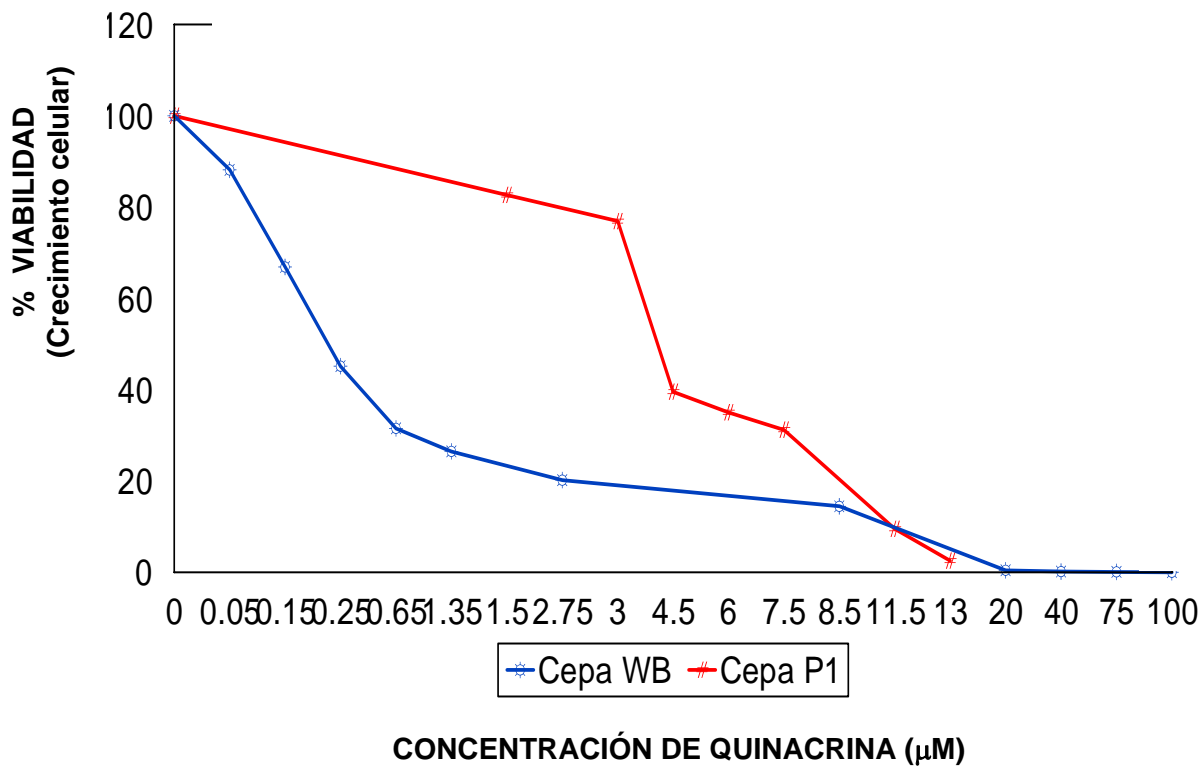


Figura 13. Determinación de viabilidad celular por el método de SML de trofozoítos de *G. duodenalis* expuestos a quinacrina empleando 2 cepas diferentes. Se inocularon 1×10^6 trofozoítos /ml de la cepa WB y P1, se les adicionaron diferentes concentraciones de quinacrina, posteriormente se incubaron a 37°C durante 24 h . La determinación de viabilidad se realizó con el método de SML que se describe en material y métodos. Todas las evaluaciones muestran el promedio de 4 ensayos independientes. En esta figura la cepa WB y la cepa P1 no mostraron diferencias significativas en la viabilidad celular de los trofozoítos al ser expuestos a quinacrina.



Tabla 8. Valores de CI's y CLM's obtenidos empleando el método de SML sobre trofozoítos de la cepa WB y P1 expuestos a quinacrina.

CEPA	CI₂₅+D.E.(μM)	CI₅₀+D.E.(μM)	CI₇₅+D.E.(μM)	CLM+D.E.(μM)	r
WB	0.063±0.02	0.36± 0.05	2.01±0.12	11.4±1.44	0.95
P1	2.10 ±0.07	5.49 ±0.09	8.88±0.08	12.27± 0.8	0.88

Para el cálculo de estos parámetros se emplearon los datos mostrados en las curvas concentración-respuesta de la Figura 13, siguiéndose el procedimiento de mínimos cuadrados. Las concentraciones inhibitorias (CI₂₅, CI₅₀, CI₇₅) y concentración letal mínima (CLM) se expresan en concentración μM.

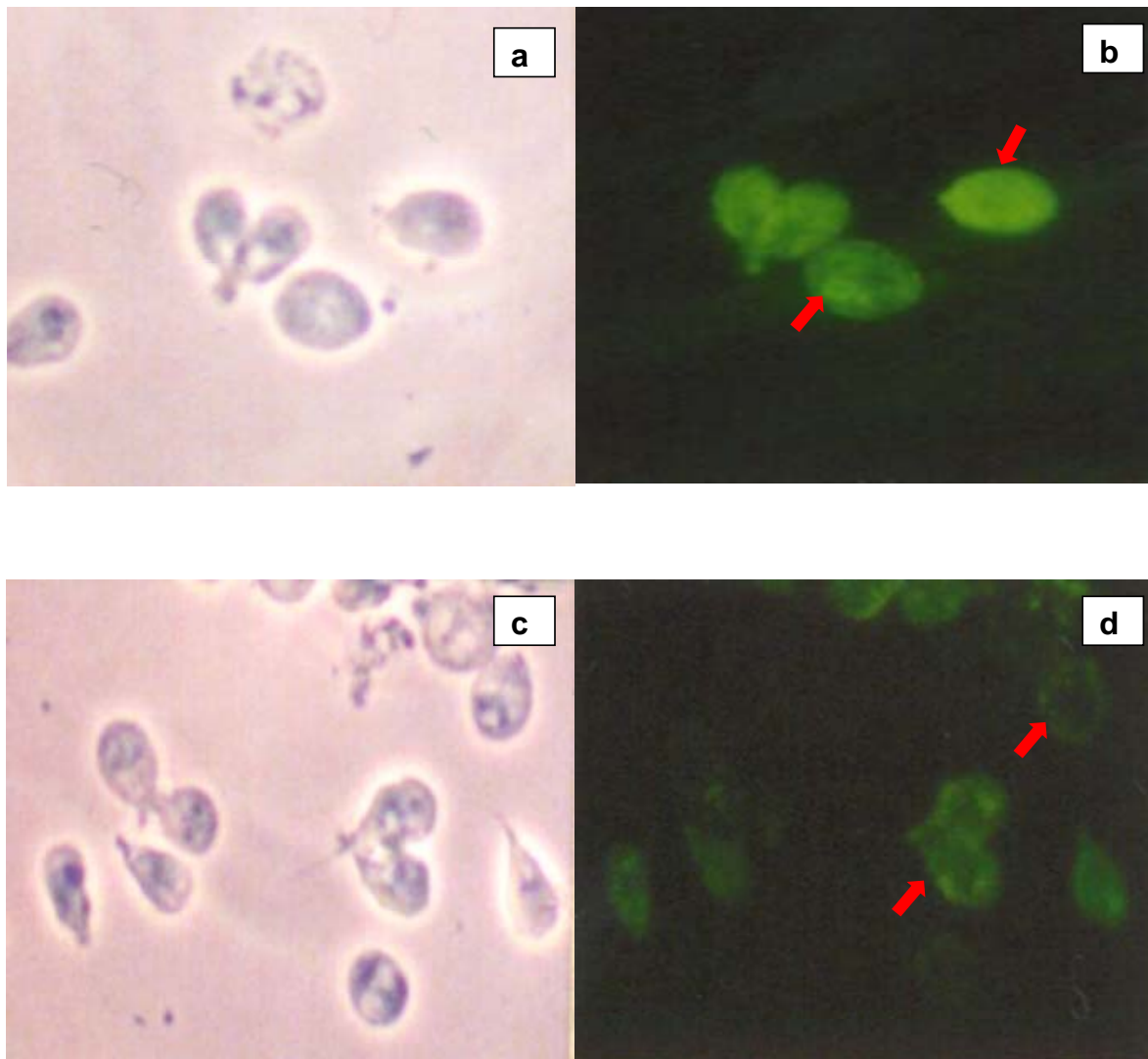


Figura 14. Análisis por microscopía con sistema de epifluorescencia de trofozoítos de *G. duodenalis* sensibles y resistentes a quinacrina. Los trofozoítos sensibles (cepa WB) (Figura 14a y 14b) y trofozoítos resistentes (Figura 14c y 14d) fueron expuestos a quinacrina durante 24 h, posteriormente se cosecharon y se lavaron 3 veces con PBS 1X. Una vez obtenidas las células, se observaron en un microscopio de fluorescencia (Zeiss MC 80) bajo campo de luz clara (paneles a y c) y bajo luz U.V. (paneles b y d). En el estudio bajo campo de luz clara (figura 14a y 14c) se observan células vivas sensibles y resistentes a Qnc respectivamente y bajo luz U.V. (figura 14b) se observa que los trofozoítos sensibles al ser expuestos a quinacrina se sitúa en el núcleo o en toda la célula, mientras que en los trofozoítos resistentes el fármaco se difunde hacia a la membrana (figura 14d).

6.8 Determinación de perfiles fenotípicos en trofozoítos sensibles y resistentes a quinacrina, furazolidona, metronidazol y albendazol

6.8.1 Marcaje de antígenos de superficie con ¹²⁵I

Se marcaron con ¹²⁵I los componentes de membrana celular de trofozoítos de *G. duodenalis* mediante la técnica de lactoperoxidasa (Material y Métodos). La eficiencia en el marcaje selectivo de la superficie del parásito se basó en el hecho de que el catalizador de la reacción de ionización en el sistema, la enzima lactoperoxidasa (PM 78 kDa), no puede atravesar membranas celulares intactas. Por otro lado, no hubo daño aparente a los trofozoítos ya que su morfología y motilidad permanecieron normales. Esto se corroboró al observar en el microscopio a las células durante su marcaje. Por lo anterior, consideramos estos criterios como válidos.

En esta parte del estudio se abordaron dos aspectos principales: por un lado determinar la complejidad del perfil proteínico del parásito y por otro, identificar sus componentes más significativos con base a criterios cualitativos y cuantitativos.

Caracterización electroforética. Con el objeto de analizar los antígenos de superficie de trofozoítos de *Giardia duodenalis* resistentes y sensibles a quinacrina en comparación con otros fármacos como furazolidona, metronidazol y albendazol, se establecieron las condiciones electroforéticas experimentales más adecuadas y confiables. Para ello, se emplearon geles en gradiente del 5-15% de acrilamida de acuerdo con lo descrito en la sección de material y métodos.

En la figura 15, se ilustran los resultados obtenidos para la cepa WB con algunas variantes como el medio de cultivo (caseína o biosate) o bien diferentes solventes (DMSO, DMF, H₂O) usados según fuese el fármaco a trabajar, esto con la finalidad de abarcar las variantes significativas del experimento. Este gel presentó

una curva de calibración de masa relativa (M_r) de formula $y=mx+b$ ($m= 2.74$, $b=-1.70$ donde $X=R_f$, $y= \log_{10} PM$) y $r=-0.99$. También se observó una buena definición en las bandas de proteína en el patrón electroforético resuelto en este gel de gradiente. El perfil proteínico consistió de aproximadamente 30-35 bandas con PM comprendido entre los 15 y 280 kDa, desde el punto de vista cualitativo no hubo grandes diferencias en el patrón electroforético.

En el caso de las cepas resistentes y sensibles a quinacrina (Qnc), furazolidona (Fzd), metronidazol (Mtz) y albendazol (Alb) en la figura 16, podemos observar una buena definición en el patrón electroforético, el cual comprende de aproximadamente 25-30 bandas con PM en un rango de 12-265 kDa y desde el punto de vista cualitativo sin ninguna diferencia. Este gel presenta una curva de calibración de masa relativa (M_r) de formula $y=mx+b$ ($m= 2.65$, $b=-1.63$ donde $X=R_f$, $y= \log_{10} PM$) y $r=-0.99$.

Con lo que respecta al gel de la figura 17, se observa que el patrón electroforético de las concentraciones ascendentes de quinacrina esta constituido de aproximadamente 30-35 bandas con PM que se encuentran entre los 13-305 kDa y que cualitativamente no hubo un cambio drástico entre los carriles. Este gel presentó la curva de calibración de masa relativa (M_r) de formula $y=mx+b$ ($m= 2.74$, $b=-1.73$ donde $X=R_f$, $y= \log_{10} PM$) y $r=-0.99$.

Por otra parte, se realizó el análisis de antígenos de trofozoítos de *Giardia duodenalis* por medio del marcaje de proteínas de membrana celular externa del parásito con ^{125}I . En la figura 18, se muestran los patrones de radiomarcaje de la cepa WB con las variantes ya mencionadas de medio de cultivo o solvente. Este gel se corrió bajo condiciones reductoras con lo cual se evitó el "efecto de escalera" que se produce por artefactos relacionados a un desdoblamiento gradual o no completo de una o varias proteínas complejas. En esta figura no existe diferencia alguna en el patrón de expresión, el cual consistió de aproximadamente de 30-35 bandas con PM

entre 15-260 kDa. La curva de calibración de masa relativa (M_r) cuya formula es $y=mx+b$ ($m=2.64$, $b= -1.65$ donde $X=R_f$, $y= \log_{10} PM$) y $r=-0.99$.

En la figura 19 se observa el patrón de expresión para las cepas WB sensibles y aquellas resistentes a Qnc 12.5 μM , Fzd 5.2 μM , Mtz 21 μM y Alb 5.6 μM . En el panel A se puede observar que el patrón de radiomarcaje de cada carril de WB/biosate, Qnc, WB/biosate y Fzd presentan aproximadamente 5-7 bandas con un PM de 27-207 kDa, mientras que en panel B los carriles con WB/caseína, Mtz, WB/Caseína y Alb presentaron 4-6 bandas con un PM estimado de 29-223 kDa. Con lo anterior, se determinó que en el panel A se presentó la ausencia de una banda de alto peso molecular (207 kDa) en ambas cepas (Qnc 12.5 μM y Fzd 5.2 μM), que Qnc presenta de 3-4 bandas de PM menor (aproximadamente 27, 56, 90 kDa), mientras que en Fzd no observan estas proteínas. Con lo que respecta al panel B, las diferencias principales que se observan fueron las bandas que tiene el Alb 5.6 μM en las regiones de 29, 56, 70 y 90 kDa estas dos ultimas en mayor proporción, además de la ausencia de dos bandas de 82 y 151 kDa en comparación con las cepas control y Mtz, en el caso del Mtz 21 μM el perfil que presenta es muy parecido al control excepto en la presencia de una banda de aproximadamente 151 kDa. También se aprecia en el panel B la ausencia de una banda de peso molecular de 207 kDa en la cepa resistente a Alb 5.6 kDa. La curva de calibración para el panel A que presentó de masa relativa (M_r) es $y=mx+b$ ($m=2.68$, $b= -1.62$ donde $X=R_f$, $y= \log_{10} PM$) y $r=-0.99$ y para el panel B la curva de calibración de masa relativa (M_r) fue $y=mx+b$ ($m=2.65$, $b= -1.62$ donde $X=R_f$, $y= \log_{10} PM$) y $r=-0.99$.

En la figura 20 se presenta el patrón de expresión resultante para las concentraciones ascendentes de quinacrina, en éste las diferencias significativas que fueron notorias con el incremento de fármaco fue en la desaparición de bandas de mayor PM (169-297 kDa), observándose esto a partir de la menor concentración de fármaco. También se presentaron otras diferencias en las bandas cuyo PM es 14 kDa

en Qnc 3 μM y 70, 81 kDa en Qnc 12.5 μM en comparación con WB/DMSO. En este caso la curva de calibración de masa relativa (M_r) fue ($m= 2.74$, $b=-1.73$ donde $X=R_f$, $y= \log_{10} \text{PM}$) y $r=-0.99$.

Análisis densitométrico. Este método permitió observar espectros de absorbancia de cada componente antigénico en una mezcla compleja de ellos, aún en pequeñas cantidades, permitiéndose determinar con precisión y reproducibilidad, las diferencias en los patrones antigénicos de *G. duodenalis* accesibles al marcaje de membrana externa con ^{125}I .

En la figura 21 se presentan los resultados de las cepas resistentes de Qnc y Fzd con sus controles, observándose que las bandas de 27, 56, 90 y 207 kDa en la cepa de Qnc fueron cuantitativamente más importantes, ya que estos antígenos se presentan con mayor abundancia en el pico correspondiente de acuerdo a la intensidad de la bandas (21a), al comparar estos cultivos Alb con su control, se observaron antígenos de menor PM y dos bandas de 70 y 90 kDa como los componentes más abundantes (21d). Para el caso de los cultivos de Fzd y Mtz no se detectaron diferencias considerables (21b y 21 c).

En las figuras 22 y 23 se ilustran los resultados del análisis densitométrico de las cepas resistentes a Qnc en concentraciones ascendentes, que con respecto a su control pierden bandas de mayor peso molecular por lo que es menor la intensidad de estas bandas que las que se muestran en WB/DMSO. Otra diferencia importante es que existe una banda común en todas las cepas que se presentan en mayor o menor intensidad (22a, 22b, 22c, 22d, 23e, 23f y 23g). Al hacer la comparación entre las cepas resistentes se muestra una diferencia en la intensidad de sus picos pero cabe destacar la presencia de una banda en mayor intensidad que estas tienen en común (23h).

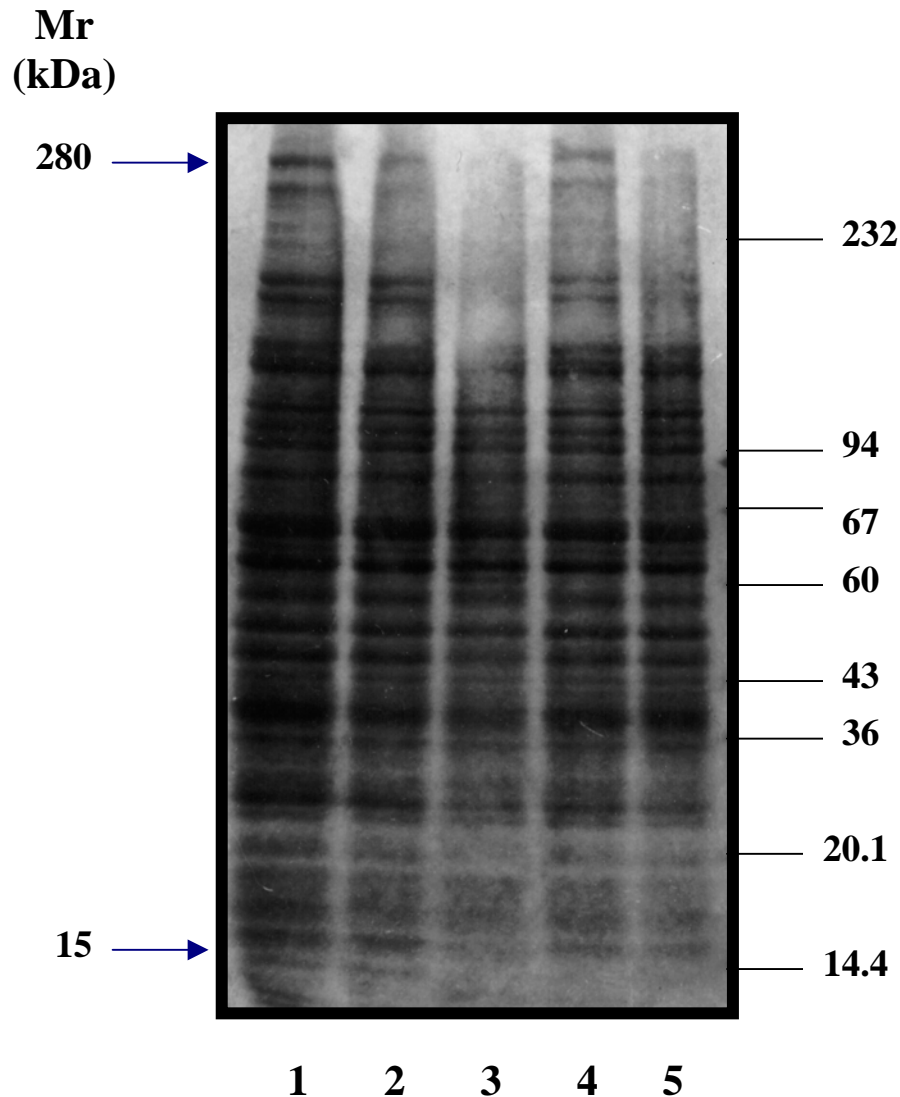


Figura 15. Análisis electroforético de antígenos solubles totales de trofozoítos de *G. duodenalis*. Los extractos obtenidos de los trofozoítos se resolvieron en geles con gradiente continuo del 5-15% de acrilamida en condiciones reductoras con β -mercaptoetanol al 5% de concentración v/v con las muestras. Posteriormente las proteínas separadas se tiñeron con Azul de Coomassie y se decoloraron con una solución A y B de metanol. Después de la hidratación de los geles, estos se secan. Se indica en la parte inferior el Carril 1: WB/Biosate; Carril 2 : WB/B/DMSO; Carril 3: WB/Caseína, Carril 4: WB/C/H₂O y el Carril 5: WB/C/DMF. La masa relativa (Mr) se expresa en daltones $\times 10^{-3}$. Las flechas denotan cualitativamente el rango de las bandas (15-280 kDa) entre los carriles y en el lado derecho se tienen los marcadores de peso molecular (PM).

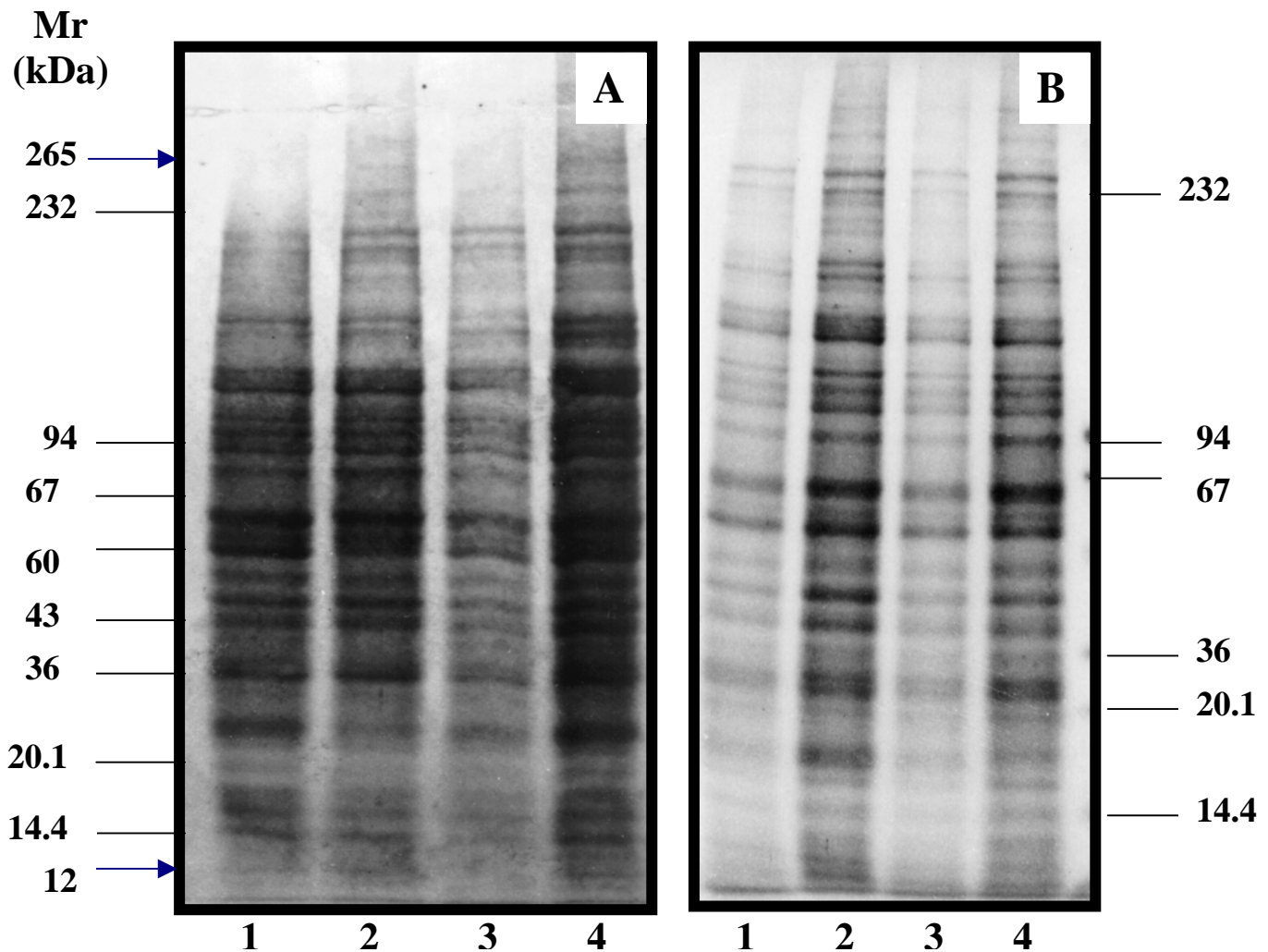


Figura 16. Análisis electroforético de antígenos solubles totales de trofozoítos de *G. duodenalis* resistentes a diferentes fármacos. Los extractos obtenidos de los trofozoítos se resolvieron en geles con gradiente continuo del 5-15% de poliacrilamida en condiciones reductoras con β -mercaptoetanol al 5% de concentración v/v. Posteriormente las proteínas separadas se tiñeron con Azul de Coomassie y se decoloraron con una solución A y B de metanol. Después de la hidratación de los geles, estos se secan. Se indica en la parte inferior del panel A el Carril 1: WB/Biosate; Carril 2: resistente a Qnc 12.5 μ M; Carril 3: WB/Biosate; Carril 4: resistente a Fzd 5.2 μ M y en el panel B el Carril 1: WB/Caseína, Carril 2 : resistente a Mtz 21 μ M; Carril 3: WB/Caseína; Carril 4: resistente a Alb 5.6 μ M. Las flechas denotan cualitativamente el rango de bandas (12-265 kDa) entre los carriles y en ambos extremos se indican los marcadores de peso molecular para cada panel. La masa relativa (Mr) se expresa en daltones $\times 10^{-3}$.

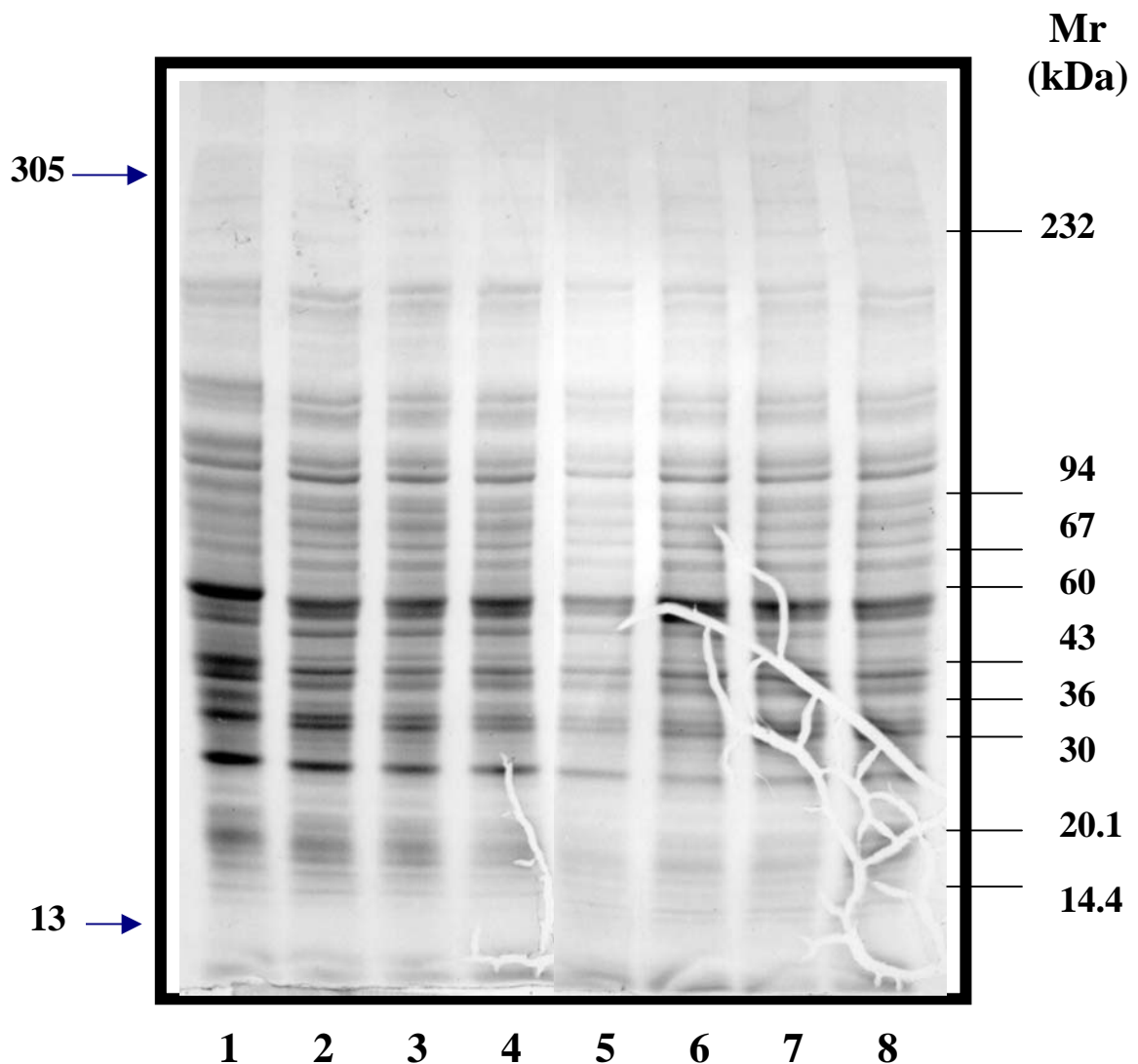


Figura 17. Análisis electroforético de antígenos solubles totales de trofozoítos de *G. duodenalis* resistentes a concentraciones ascendentes de quinacrina. Los extractos obtenidos de los trofozoítos se resolvieron en geles con gradiente continuo del 5-15% de poliacrilamida, en condiciones reductoras con β -mercaptoetanol al 5% de concentración v/v. Posteriormente las proteínas separadas se tiñeron con Azul de Coomassie y se decoloraron con una solución A y B de metanol. Después de la hidratación de los geles, estos se secan. Se indica en la parte inferior el Carril 1: WB/Biosate/DMSO; Carril 2 : resistente a Qnc 3 μ M; Carril 3: resistente a Qnc 5 μ M; Carril 4: resistente a Qnc 7 μ M; Carril 5: resistente a Qnc 9 μ M; Carril 6 : resistente a Qnc 11 μ M; Carril 7: resistente a Qnc 11.5 μ M; Carril 8: resistente a Qnc 12.5 μ M. En el lado derecho se tienen los marcadores de peso molecular y en el izquierdo se denotan con flechas el rango de bandas (13-305 kDa) entre cada carril. La masa relativa se expresa en daltones $\times 10^3$.

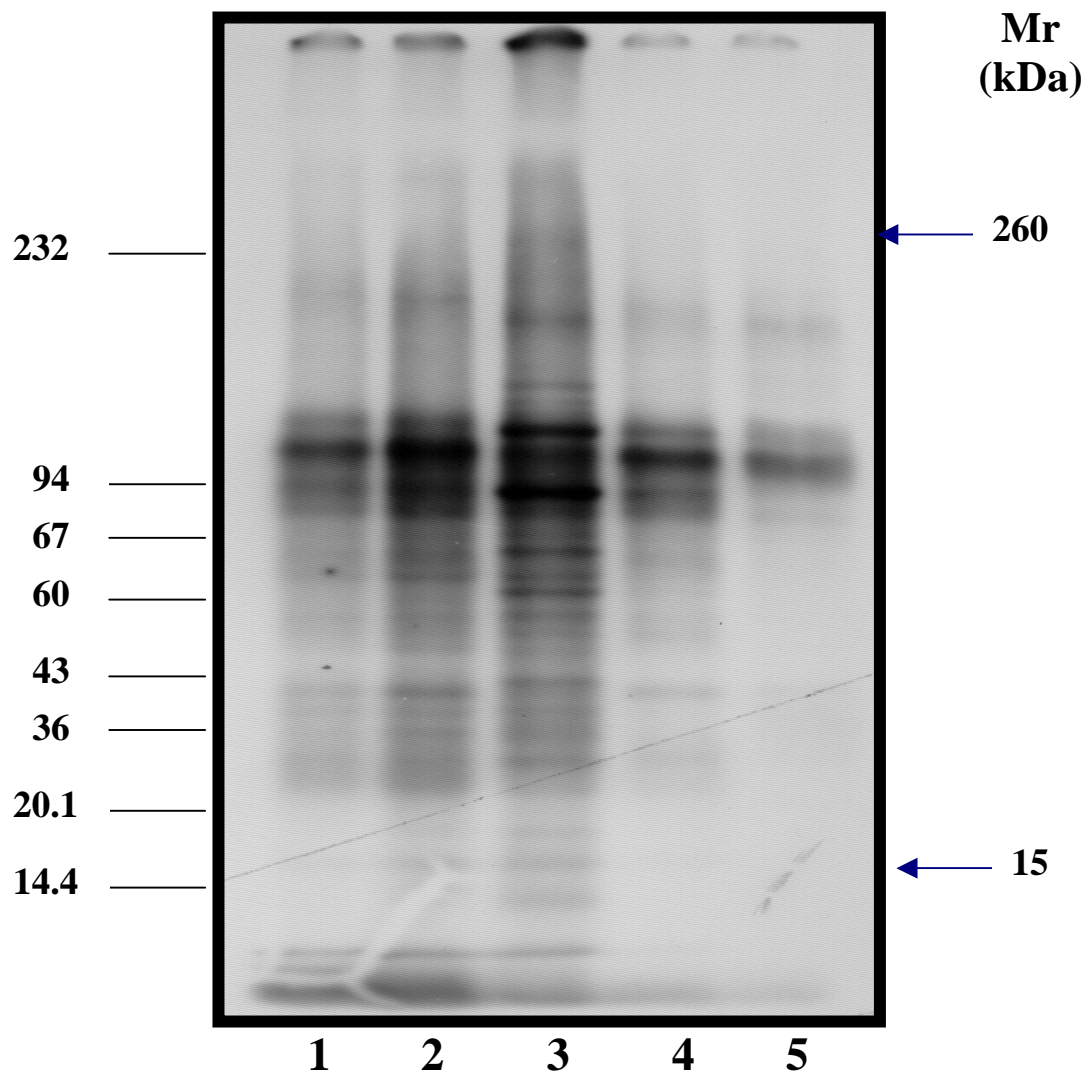


Figura 18. Análisis autorradiográfico de antígenos de superficie de trofozoítos de *G. duodenalis*. Los trofozoítos de la cepa WB fueron marcados con Na ¹²⁵I por la técnica de lactoperoxidasa y se procesaron para la obtención de extractos solubles totales. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida-SDS con 5-15% del monómero. El gel se tiñó y se secó por la técnica de drying film, posteriormente se expuso a una placa de autorradiografía durante 24 h. Se indica en la parte inferior el Carril 1: WB/Biosate; Carril 2 : WB/B/DMSO; Carril 3: WB/Caseína; Carril 4: WB/C/H₂O y en el Carril 5: WB/C/DMF. Las acotaciones son idénticas a las del gel de la figura 15. En esta figura se denota que no hay diferencias significativas entre los carriles ya que el patrón expresión de proteínas es similar y en el lado izquierdo se tienen los rangos de marcadores de PM. Las flechas indican el rango de PM de las bandas (15-260 kDa). La masa relativa (Mr) es expresada en daltones x10⁻³.

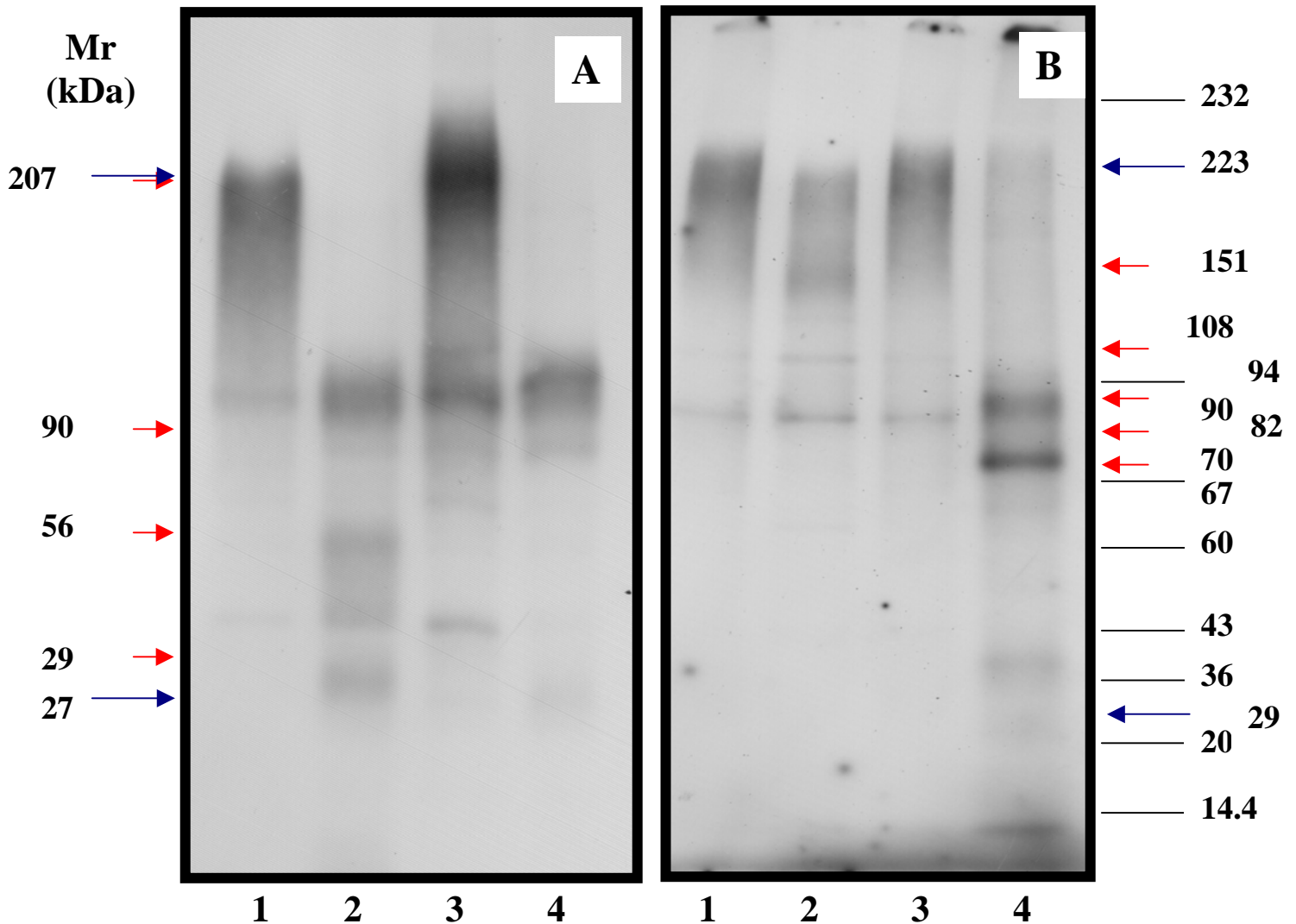


Figura 19. Análisis autorradiográfico de antígenos de superficie de trofozoítos de *G. duodenalis* resistentes a diferentes fármacos. Los trofozoítos de la cepa WB fueron marcados con Na ¹²⁵I por la técnica de lactoperoxidasa y se procesaron para la obtención de extractos solubles totales. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida-SDS con 5-15% del monómero. Se indica en la parte inferior en el Panel A, el Carril 1: WB/Biosate; Carril 2 : resistente a Qnc 12.5 μ M; Carril 3: WB/Biosate, Carril 4: resistente a Fzd 5.2 μ M y en el Panel B, Carril 1: WB/Caseína; Carril 2 : resistente a Mtz 21 μ M; Carril 3: WB/Caseína; Carril 4: resistente a Alb 5.6 μ M. Las acotaciones son idénticas a las del gel de la figura 16. Las flechas cortas denotan variaciones observadas en el patrón de expresión de proteínas entre las cepas, siendo las más significativas las resistentes a quinacrina y albendazol. En el lado izquierdo se tienen los marcadores de PM y las flechas largas indican el rango de PM de las bandas para el panel A (29-223) y para el panel B (27-207). La masa relativa (Mr) es expresada en daltones $\times 10^{-3}$.

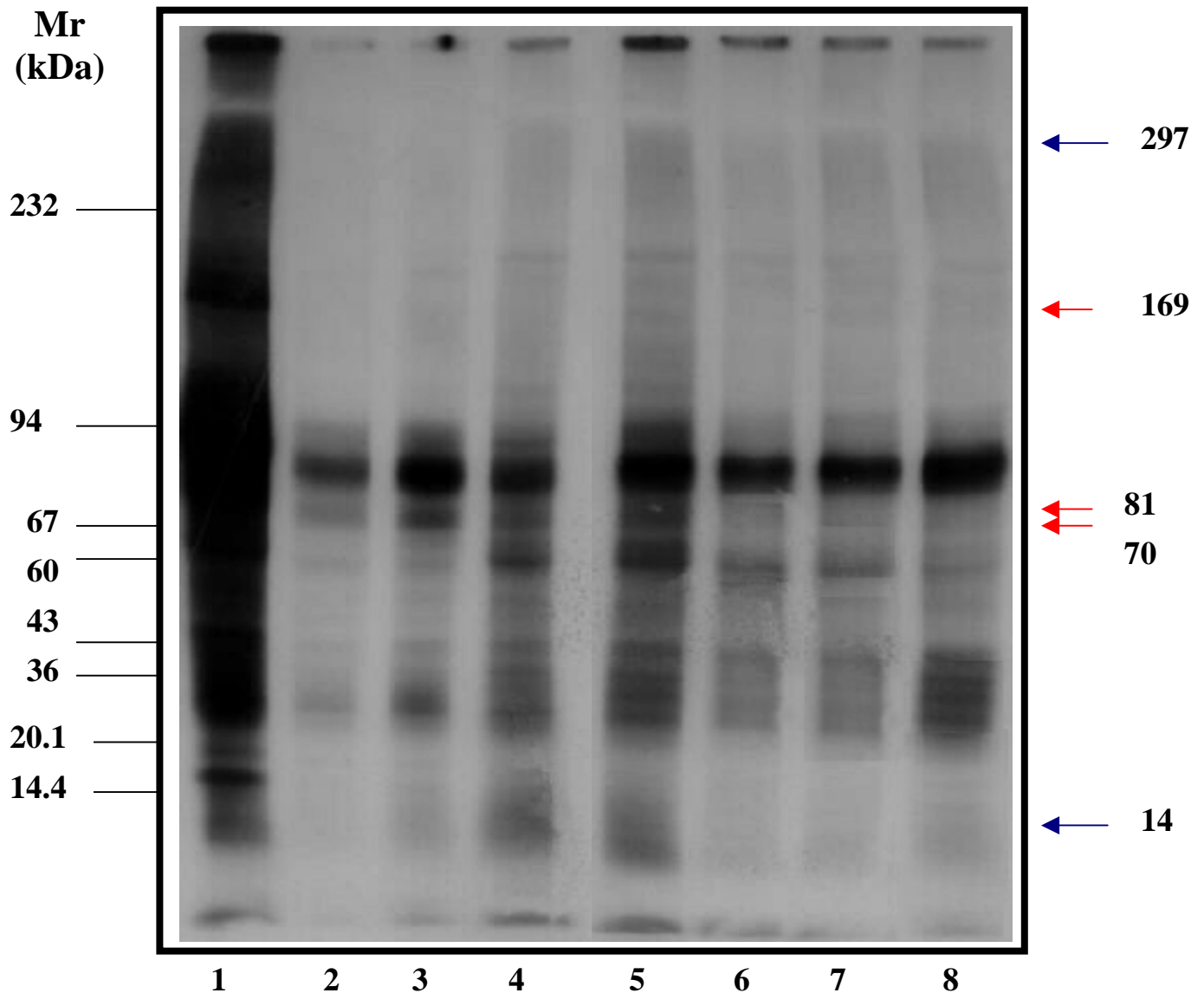


Figura 20. Análisis autorradiográfico de antígenos de superficie de trofozoítos de *G. duodenalis* resistentes a concentraciones ascendentes de quinacrina. Los trofozoítos de la cepa WB fueron marcados con Na 125 I por la técnica de lactoperoxidasa y se procesaron para la obtención de extractos solubles totales. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida-SDS con 5-15% del monómero. Se indica en la parte inferior el Carril 1: WB/Biosate/DMSO; Carril 2 : resistente a Qnc 3 μ M; Carril 3: resistente a Qnc 5 μ M; Carril 4: resistente a Qnc 7 μ M; Carril 5: resistente a Qnc 9 μ M; Carril 6 : resistente a Qnc 11 μ M; Carril 7: resistente a Qnc 11.5 μ M; Carril 9: resistente a Qnc 12.5 μ M. Las acotaciones son idénticas a las del gel de la figura 17. Las flechas cortas denotan variaciones en el patrón de expresión de proteínas de mayor PM que desaparecen en los carriles resistentes a quinacrina, también se observan algunas otras diferencias significativas en Qnc 3 μ M y 12.5 μ M. En el lado izquierdo se tienen los marcadores de PM y las flechas largas indican el rango de PM entre las bandas (14-227). La masa relativa (Mr) es expresada en daltones $\times 10^{-3}$.

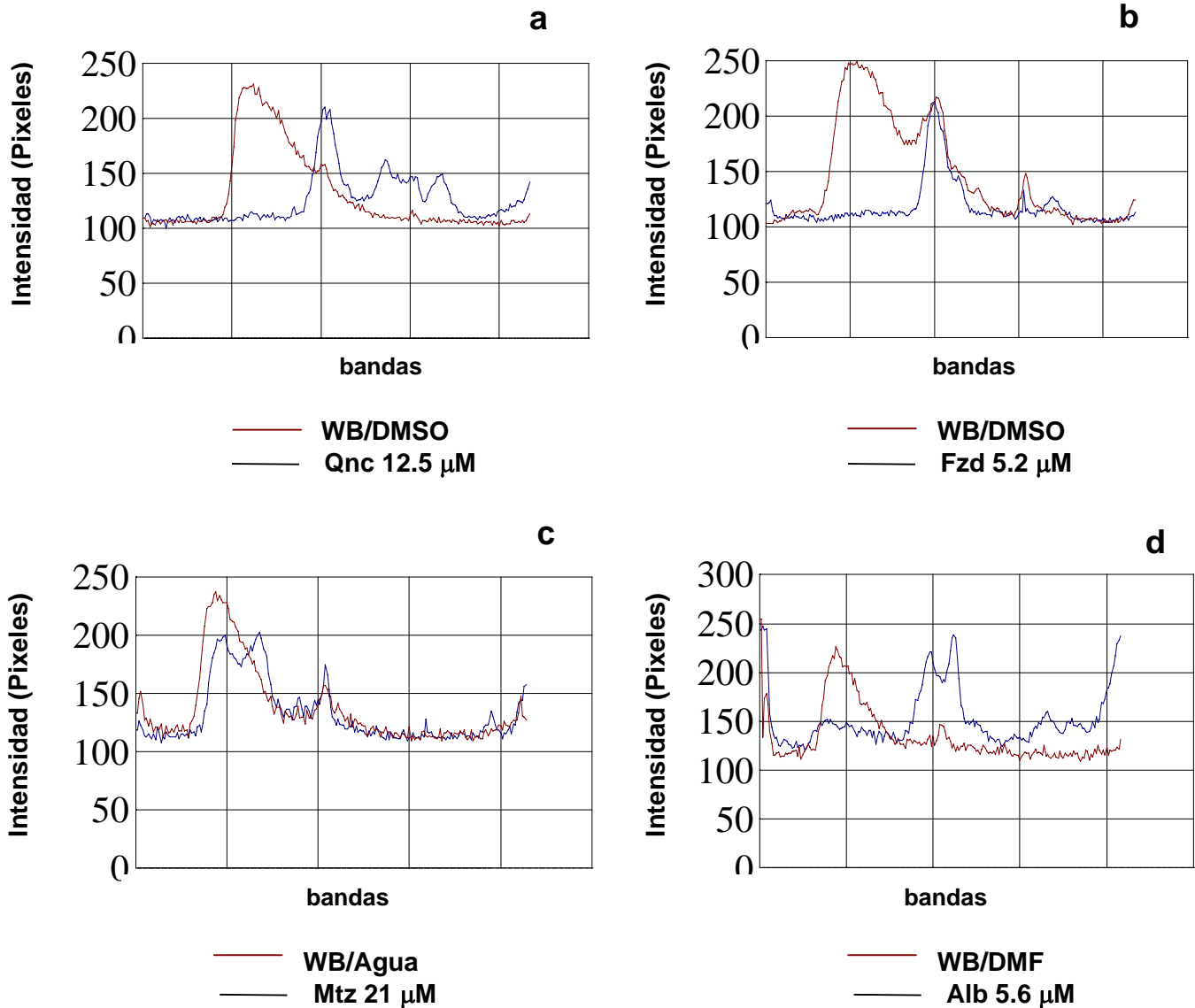


Figura 21. Análisis densitométrico de antígenos de superficie de cepas de *G. duodenalis* resistentes a diferentes fármacos. Trofozoítos de las cepas resistentes a Qnc 12.5 μM , Fzd 5.2 μM , Mtz 21 μM y Alb 5.6 μM se marcaron con Na^{125}I por la técnica de lactoperoxidasa y se analizaron autorradiográficamente después de su separación electroforética (Figura 19). En los perfiles se denotan los picos de absorbancia en base a su intensidad. Las diferencias más significativas se observan en la figura 21a y 21d de las cepas resistentes a quinacrina y albendazol ya que los picos de absorbancia difieren de la cepa control, mientras que en la figura 21b y 21c los picos de absorbancia de las cepas resistentes tienen una tendencia similar a su control.

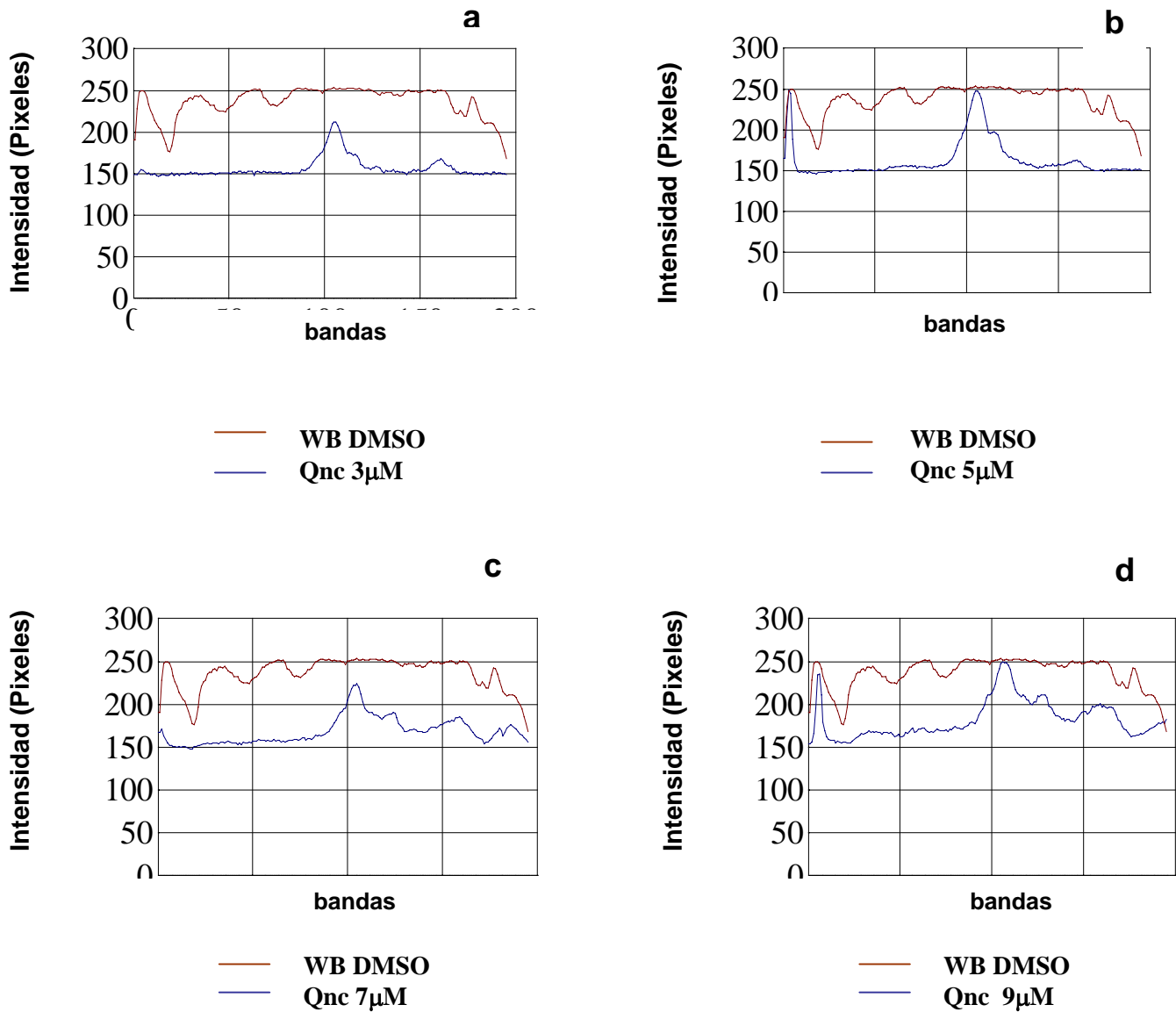


Figura 22. Análisis densitométrico de antígenos de superficie de cepas de *G. duodenalis* resistentes a concentraciones ascendentes de quinacrina. Trofozoítos de las cepas resistentes a concentraciones ascendentes de quinacrina se marcaron con Na^{125}I por la técnica de lactoperoxidasa y se analizaron autorradiográficamente después de su separación electroforética (Figura 20). En los perfiles se denotan los picos de absorbancia en base a su intensidad. En las figuras 22a, 22b, 22c y 22d las cepas resistentes muestran al inicio picos de absorbancia menos intensos que el control, ya que estas carecen de algunas bandas de mayor PM. También se observa que la tendencia es muy parecida excepto en una banda que tiene un pico común en todas las cepas resistentes al fármaco.

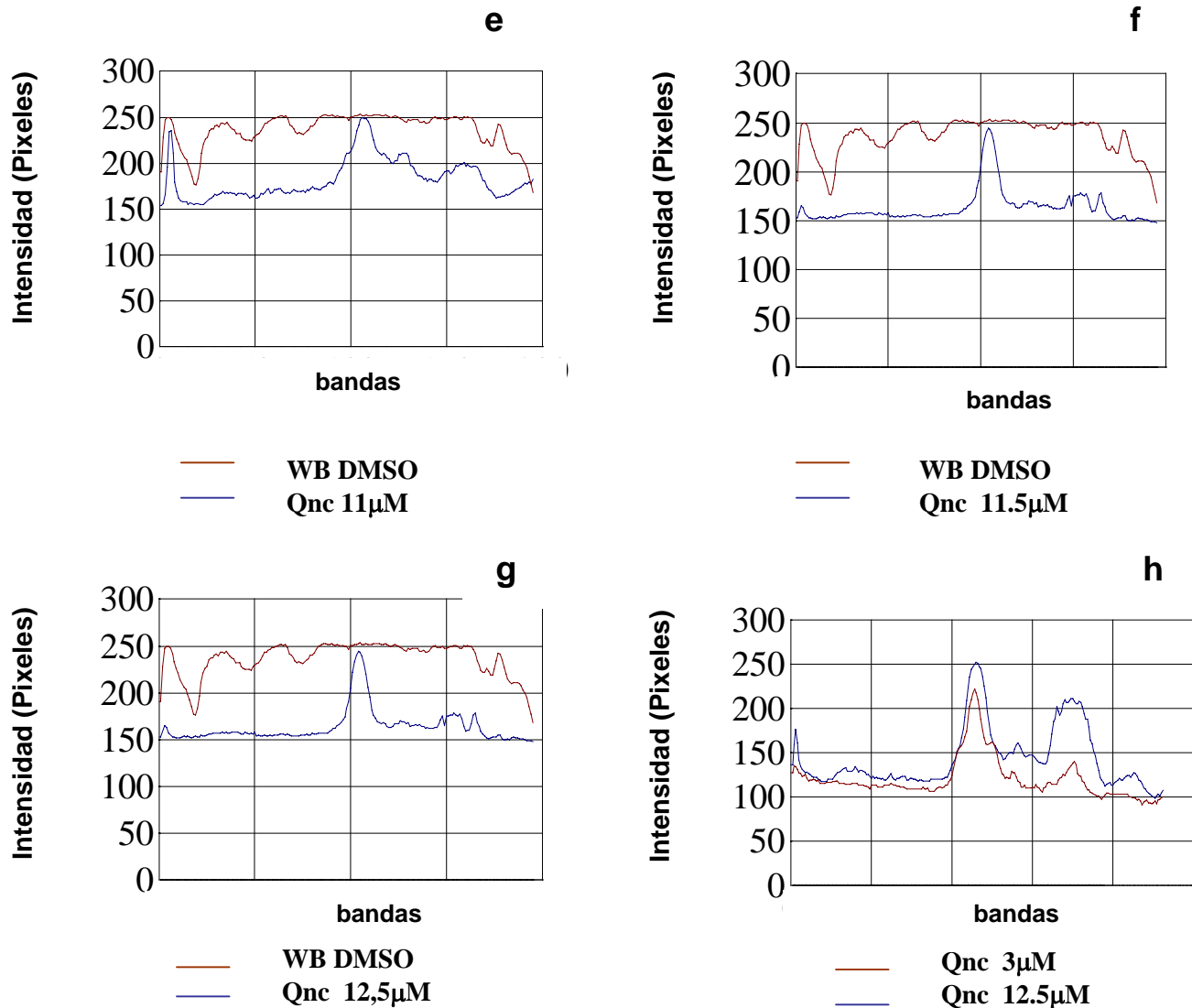


Figura 23. Análisis densitométrico de antígenos de superficie de cepas de *G. duodenalis* resistentes a concentraciones ascendentes de quinacrina. Trofozoítos de las cepas resistentes a concentraciones ascendentes de quinacrina se marcaron con Na¹²⁵I por la técnica de lactoperoxidasa y se analizaron autorradiográficamente después de su separación electroforética (Figura 20). En los perfiles se denotan los picos de absorbancia en base a su intensidad. En la figura 23e, 23f y 23g las cepas resistentes muestran al inicio picos de absorbancia menos intensos que el control, ya que estas carecen de algunas bandas de mayor PM. La tendencia en los picos de absorbancia que presentan las cepas resistentes son similares en comparación al control, excepto en una banda que se observa en la figura 23h que tienen todas las cepas resistentes al tener la misma tendencia en la intensidad de los picos .

6.8.2 Marcaje metabólico con ^{35}S -metionina

La técnica de la incorporación de precursores radiactivos se utilizó para rastrear las proteínas que fueron sintetizadas por los trofozoítos de *G. duodenalis*. Esta se basa en que los procesos de traducción o síntesis de proteínas en cualquier microorganismo el codon de iniciación (AUG) codifica para metionina, y así este aminoácido está presente en forma virtual en el proceso biosintético. De esta forma tiene lugar a la unión de metionina marcada con el radionucleótido ^{35}S .

En base a lo anterior se determinaron de la misma forma que las proteínas de superficie dos puntos importantes: primero el perfil proteínico de parásito y posteriormente se identificaron los componentes más significativos.

Caracterización electroforética para ^{35}S -metionina: Con la finalidad de hacer un sondeo de proteínas sintetizadas por los trofozoítos de *Giardia duodenalis* resistentes y sensibles a quinacrina y comparar estas con otros fármacos comúnmente usados como Fzd, Mtz y Alb. En esta parte del trabajo se emplearon las condiciones electroforéticas experimentales ya establecidas anteriormente, y se usaron nuevamente geles con un gradiente continuo de concentración 5-15% de acrilamida siguiendo el formato para geles pequeños descrito en el Anexo 1. Se utilizaron este tamaño de geles ya que la emisión radiactiva β del ^{35}S fue fácilmente detectable.

En la misma forma que en el corrimiento para proteínas de superficie, se muestran en la figura 24, los resultados obtenidos para la cepa WB con algunas variantes en el medio de cultivo (caseína o biosate) y los diferentes solventes (DMSO, DMF, H_2O) usados según fuese el fármaco a trabajar. Este gel presentó una curva de calibración de masa relativa (M_r) de fórmula $y=mx+b$ ($m=2.79$, $b=-1.74$ donde $X=R_f$, $y=\log_{10} PM$) y $r=-0.99$. También se observó una buena definición en las bandas de proteína en el patrón electroforético resuelto en este gel de gradiente. El perfil

proteínico consistió de aproximadamente 25-30 bandas con PM comprendido entre los 17-343 kDa desde el punto de vista cualitativo con la tinción de azul de Coomassie no se observaron diferencias.

En la figura 25, los resultados obtenidos para las diferentes cepas resistentes a fármacos como Qnc, Fzd, Alb y Mtz presentaron una curva de calibración de masa relativa (Mr) de formula $y=mx+b$ ($m= 2.95$, $b=-1.89$ donde $X=R_f$, $y= \log_{10} PM$) y $r=-0.95$. También se observó una buena definición en las bandas de proteína en el patrón electroforético resuelto en este gel de gradiente. El perfil proteínico consistió de aproximadamente 25-30 bandas con PM comprendido entre 13-590 kDa . Al igual que el gel anteriormente descrito, no se observaron diferencias significativas.

En el caso de los cultivos con concentraciones ascendentes de quinacrina que se observan en la figura 26, éstos presentaron una curva de calibración de masa relativa (Mr) de formula $y=mx+b$ ($m= 2.71$, $b=-1.64$ donde $X=R_f$, $y= \log_{10} PM$) y $r=-0.99$. Se obtuvo una buena resolución en las bandas de proteína en el patrón electroforético resuelto en este gel de gradiente. El perfil proteínico consistió de aproximadamente 25-30 bandas con PM comprendido entre los 14-289 kDa. En este gel teñido con azul de Coomassie no se observan diferencias en el perfil proteínico.

Por otro lado, cabe mencionar que el análisis de proteínas totales de trofozoítos de *Giardia duodenalis* se realizó con ^{35}S -metionina al hacer el marcaje de síntesis proteínas del parásito. Por lo anterior, en la figura 27, se ilustran los patrones de marcaje de la cepa WB con algunas variantes en el medio de cultivo o bien diferente solvente, bajo condiciones reductoras. No existieron diferencias en los patrones de expresión, donde se observan aproximadamente 25 bandas con PM entre los 26-646 kDa. La curva de calibración de masa relativa (Mr) que presentó este gel es $y=mx+b$ ($m=3.41$, $b= -2.57$ donde $X=R_f$, $y= \log_{10} PM$) y $r=-0.98$.

En la figura 28, se muestra el patrón de expresión para las cepas resistentes y sensibles a Qnc, Fzd, Mtz y Alb, observándose que en el patrón de radiomarcaje se tienen aproximadamente 10-15 bandas entre 14-262 kDa de PM, y que las principales diferencias que se presentan se localizan en el carril 2 de Qnc ya que se observó una banda en mayor abundancia de aproximadamente 56 kDa y la ausencia de una banda de 68 kDa que aparece en las otras cepas. Por otra parte en el carril 3 de Fzd se observaron bandas más intensas en las regiones de aproximadamente 42, 68 y 87 kDa y un doblete de bandas de 55 y 56 kDa. En el carril de Mtz y Alb no hubieron diferencias considerables. Para este gel se obtuvo la siguiente curva de calibración de masa relativa (M_r) $y=mx+b$ ($m=3$, $b= -1.96$ donde $X=R_f$, $y= \log_{10} PM$) y $r=-0.96$

El patrón de radiomarcaje de la figura 29 que resultó en las concentraciones ascendentes de quinacrina se observan de 15-20 bandas que se encontraron entre los 14-237 kDa. En este caso la curva de calibración de masa relativa (M_r) fue ($m= 2.72$, $b= -1.64$ donde $X=R_f$, $y= \log_{10} PM$) y $r=-0.99$. En este gel se observó que los carriles de las cepas resistentes a Qnc 7 μM , 11 μM , 11.5 μM y 12.5 μM perdieron ligeramente bandas de alto peso molecular (159-188 kDa), bajo peso molecular (23, 27, 48 kDa) y una banda de 95 kDa perteneciente a un doblete en los mismos carriles.

Análisis densitométrico. De manera similar a lo realizado con los patrones antigénicos de *G. duodenalis* accesibles al marcate de membrana externa con ^{125}I y con la finalidad de caracterizar en forma densitométrica las proteínas marcadas con ^{35}S -metionina, se obtuvieron los siguientes resultados.

En la figura 30 se presentan los resultados del análisis densitométrico de las cepas resistentes a Qnc 12.5 μM , Fzd 5.2 μM , Mtz 21 μM y Alb 5.6 μM y se observó que los picos sobresalientes en Fzd es debido a la intensidad de las bandas de



aproximadamente 55 y 56 kDa al compararse con el control (30b), mientras que las otras cepas no presentaron diferencia alguna (30a, 30c y 30 d).

En la figura 31 se observan los resultados de las cepas resistentes a concentraciones ascendentes de quinacrina que en comparación con el control, este resultó con el mismo perfil de bandas pero en mayor intensidad. Esto explicó la presencia de picos más grandes que los picos de las cepas resistentes (31a, 31b, 31c, 31d, 32e, 32f y 32g). Ahora bien, en las cepas resistentes a diferentes concentraciones el análisis se hizo comparando todas cepas entre sí, observándose que Qnc 3 μM y Qnc 5 μM tienen picos similares, pero al comparar a Qnc 7 μM , 9 μM , 11 μM , 11.5 μM y 12.5 μM se muestran patrones similares y su diferencia fue principalmente en la intensidad de las bandas (datos no reportados).

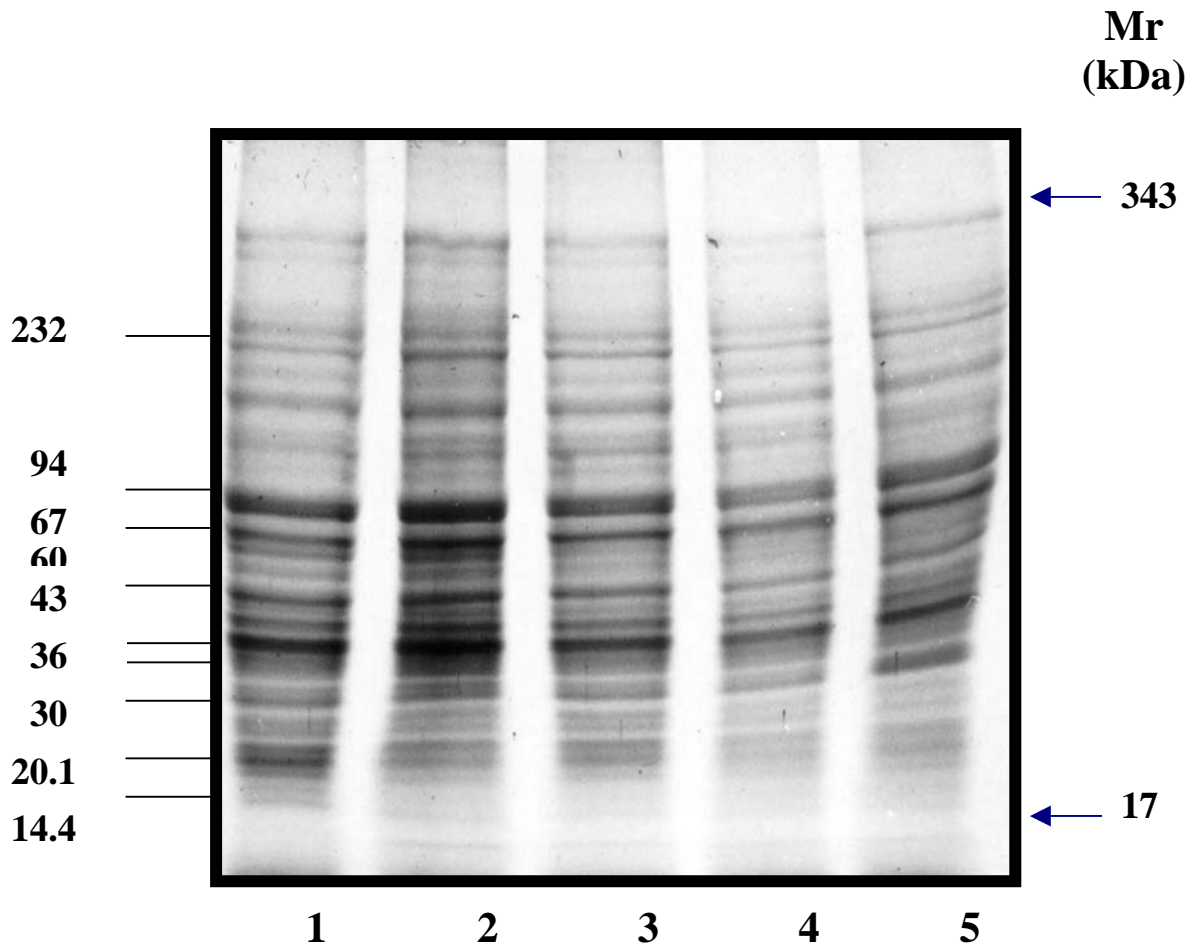


Figura 24. Análisis electroforético de extractos de proteínas totales de trofozoítos de *G. duodenalis*. Los extractos obtenidos de los trofozoítos se resolvieron en geles con gradiente continuo del 5-15% de poliacrilamida, en condiciones reductoras con β -mercaptoetanol al 5% de concentración v/v. Posteriormente las proteínas separadas se tiñeron con Azul de Coomassie y se decoloraron con una solución A y B de metanol. Después de la hidratación de los geles, estos se secan. Se indica en la parte inferior el Carril 1: WB/Biosate; Carril 2 : WB/B/DMSO; Carril 3: WB/Caseína; Carril 4: WB/C/H₂O y en el Carril 5: WB/C/DMF. Las flechas denotan el rango de PM de las bandas entre los carriles (17-343) y en el lado izquierdo se indican los marcadores de PM. La masa relativa se expresa en daltones $\times 10^{-3}$. En esta figura se muestra que el patrón de expresión de proteínas en todos los carriles es muy semejante.

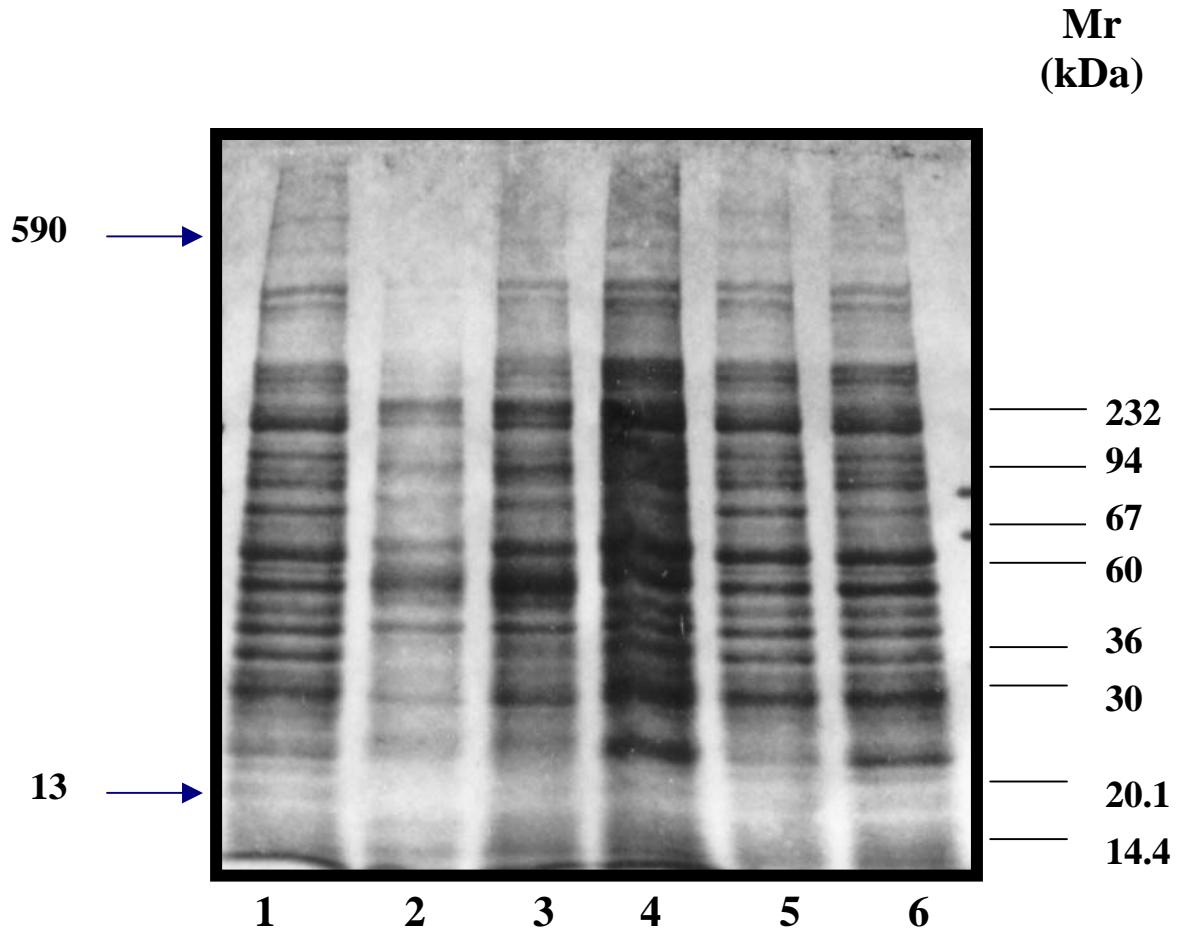


Figura 25. Análisis electroforético de extractos de proteínas totales de trofozoítos de *G. duodenalis* resistentes a diferentes fármacos. Los extractos obtenidos de los trofozoítos se resolvieron en geles con gradiente continuo del 5-15% de poliacrilamida, en condiciones reductoras con β -mercaptoetanol al 5% de concentración v/v. Posteriormente las proteínas separadas se tiñeron con Azul de Coomassie y decoloraron con una solución A y B de metanol. Después de la hidratación de los geles, estos se secan. Se indica en la parte inferior el Carril 1: WB/Biosate; Carril 2 : resistente a Qnc 12.5 μ M; Carril 3: resistente a Fzd 5.2 μ M; Carril 4: WB/Caseína, Carril 5 : resistente a Mtz 21 μ M; Carril 6: resistente a Alb 5.6 μ M. Las flechas denotan el rango de PM de las bandas entre los carriles (13-590) y en el lado derecho se tienen los marcadores de PM. La masa relativa se expresa en daltones $\times 10^{-3}$. En esta figura se observa que el perfil proteínico entre cada carril no tiene diferencias significativas.

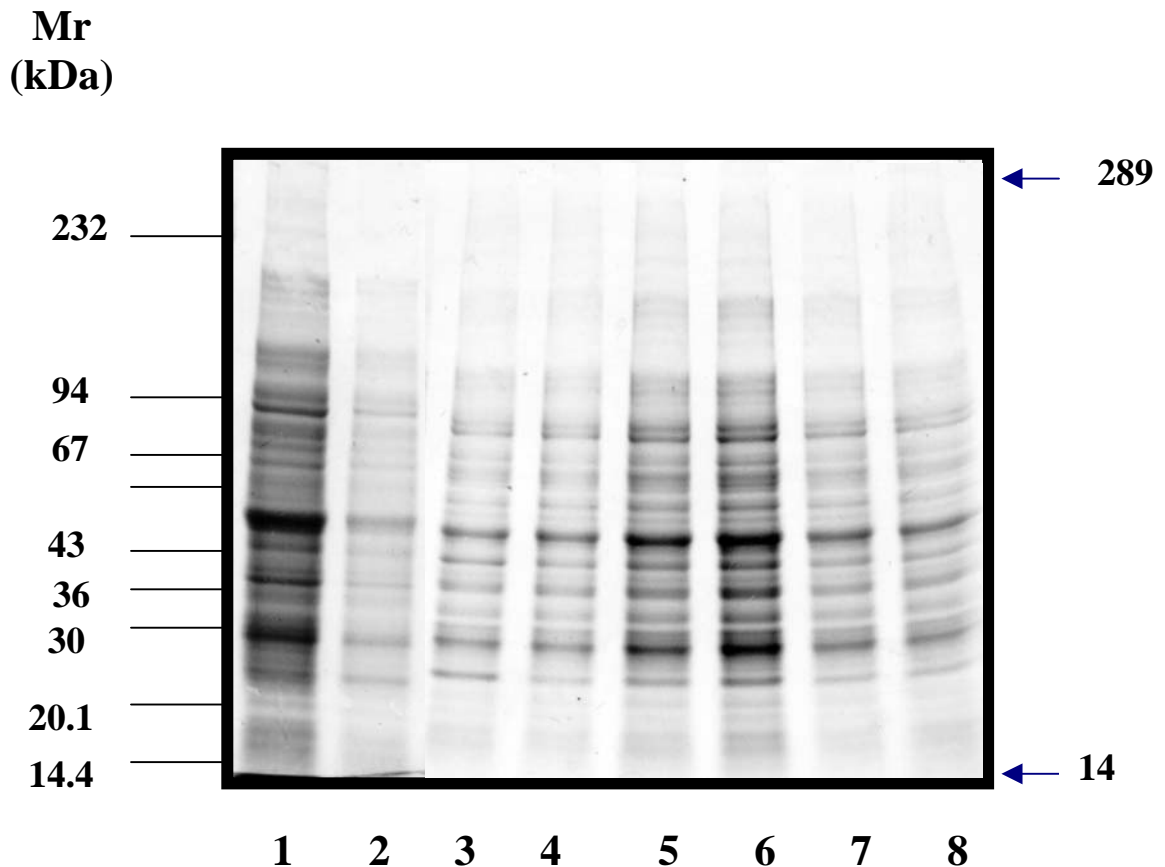


Figura 26. Análisis electroforético de extractos de proteínas totales de trofozoítos de *G. duodenalis* a concentraciones ascendentes de quinacrina. Los extractos obtenidos de los trofozoítos se resolvieron en geles con gradiente continuo del 5-15% de poliacrilamida, en condiciones reductoras con β -mercaptoetanol al 5% de concentración v/v. Posteriormente las proteínas separadas se tiñeron con Azul de Coomassie y decoloraron con una solución A y B de metanol. Después de la hidratación de los geles, estos se secan. Se indica en la parte inferior el Carril 1: WB/Biosate/DMSO; Carril 2 : resistente a Qnc 3 μ M; Carril 3: resistente a Qnc 5 μ M; Carril 4: resistente a Qnc 7 μ M; Carril 5: resistente a Qnc 9 μ M; Carril 6 : resistente a Qnc 11 μ M; Carril 7: resistente a Qnc 11.5 μ M; Carril 9: resistente a Qnc 12.5 μ M. Las flechas denotan el rango de PM de proteínas expresadas entre los carriles (14-289) y en el lado izquierdo se tienen los marcadores de PM. La masa relativa se expresa en daltones $\times 10^3$. En esta figura no se muestran diferencias significativas en el perfil proteínico expresado en cada cepa.

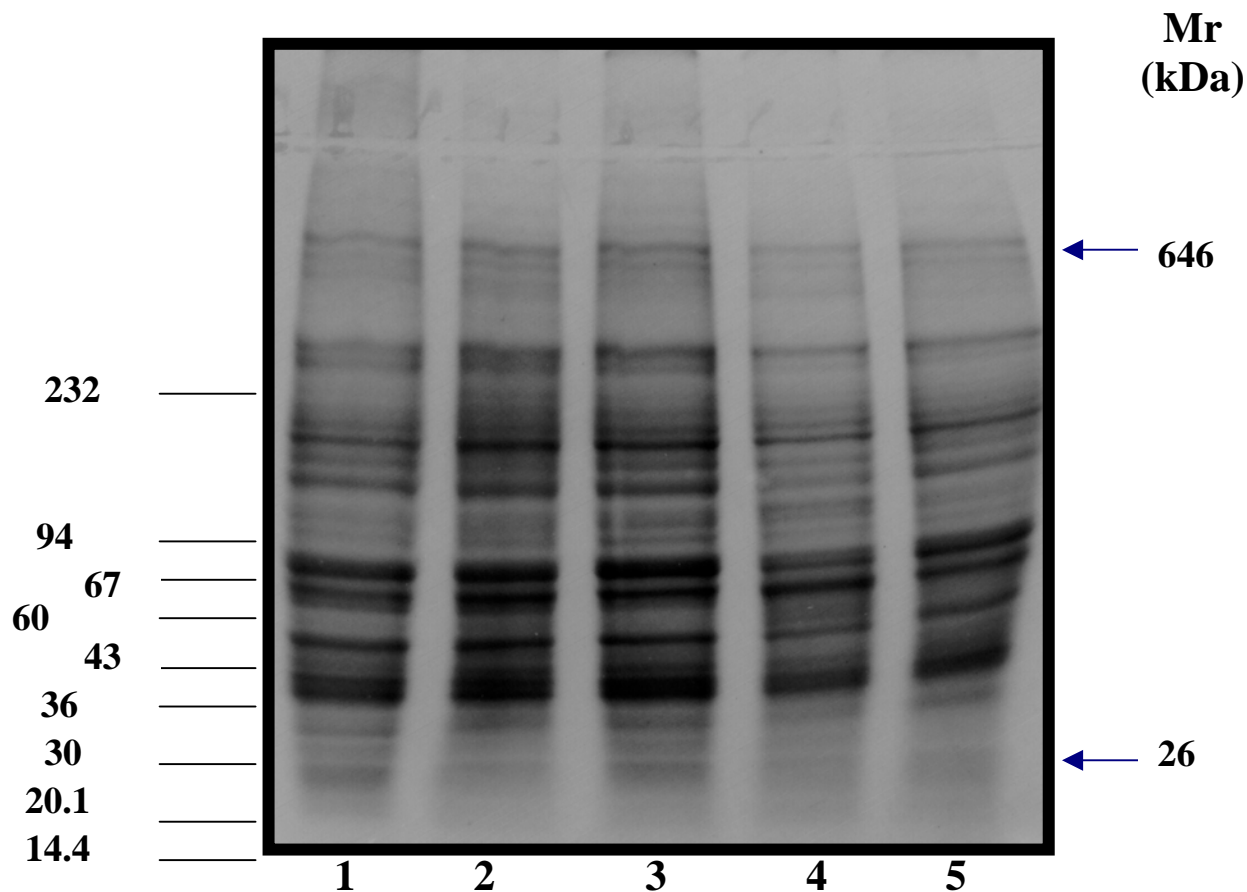


Figura 27. Análisis autorradiográfico de proteínas marcadas con ^{35}S -metionina de trofozoítos de *G. duodenalis*. Los trofozoítos de la cepa WB fueron marcados con ^{35}S -metionina por la técnica de marcaje biosintético y se procesaron para la obtención de extractos solubles totales. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida-SDS con 5-15% del monómero. Se indica en la parte inferior el Carril 1: WB/Biosate; Carril 2 : WB/B/DMSO; Carril 3: WB/Caseína; Carril 4: WB/C/ H_2O y en el Carril 5: WB/C/DMF. Las acotaciones son idénticas a las del gel de la figura 24. Las flechas denotan los rangos de PM de las bandas (26-646) y el lado izquierdo se tienen los marcadores de PM. La masa relativa (Mr) es expresada en daltones $\times 10^{-3}$. En esta figura no se observan proteínas diferentes entre cada carril, las bandas son muy similares.

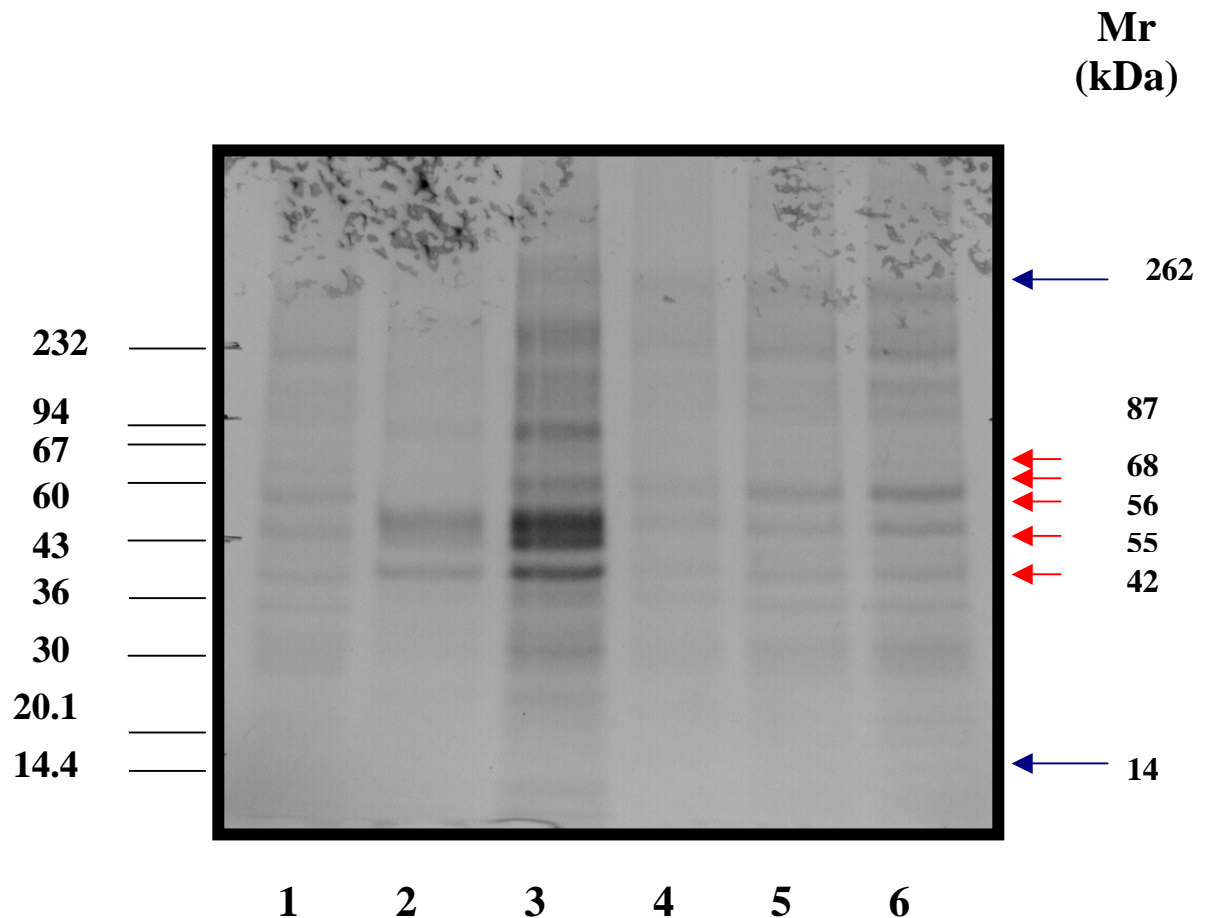


Figura 28. Análisis autorradiográfico. de proteínas marcadas con ^{35}S -metionina de trofozoítos de *G. duodenalis* resistentes a diferentes fármacos. Los trofozoítos de la cepa WB fueron marcados con ^{35}S -metionina por la técnica de marcaje biosintético y se procesaron para la obtención de extractos solubles totales. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida-SDS con 5-15% del monómero. Se indica en la parte inferior el Carril 1: WB/Biosate; Carril 2 : resistente a Qnc 12.5 μM ; Carril 3: resistente a Fzd 5.2 μM ; Carril 4: WB/Caseína; Carril 5 : resistente a Mtz 21 μM ; Carril 6: resistente a Alb 5.6 μM . Las acotaciones son idénticas a las del gel de la figura 25. Las flechas cortas denotan variaciones observadas principalmente entre las cepas resistentes a quinacrina y furazolidona, mientras que la cepa resistente a metronidazol y albendazol no tienen ninguna diferencia. Las flechas largas muestra el rango de PM en las bandas (14- 262) y en el lado izquierdo se tiene el rango de marcadores de PM. La masa relativa (Mr) es expresada en daltones $\times 10^{-3}$.

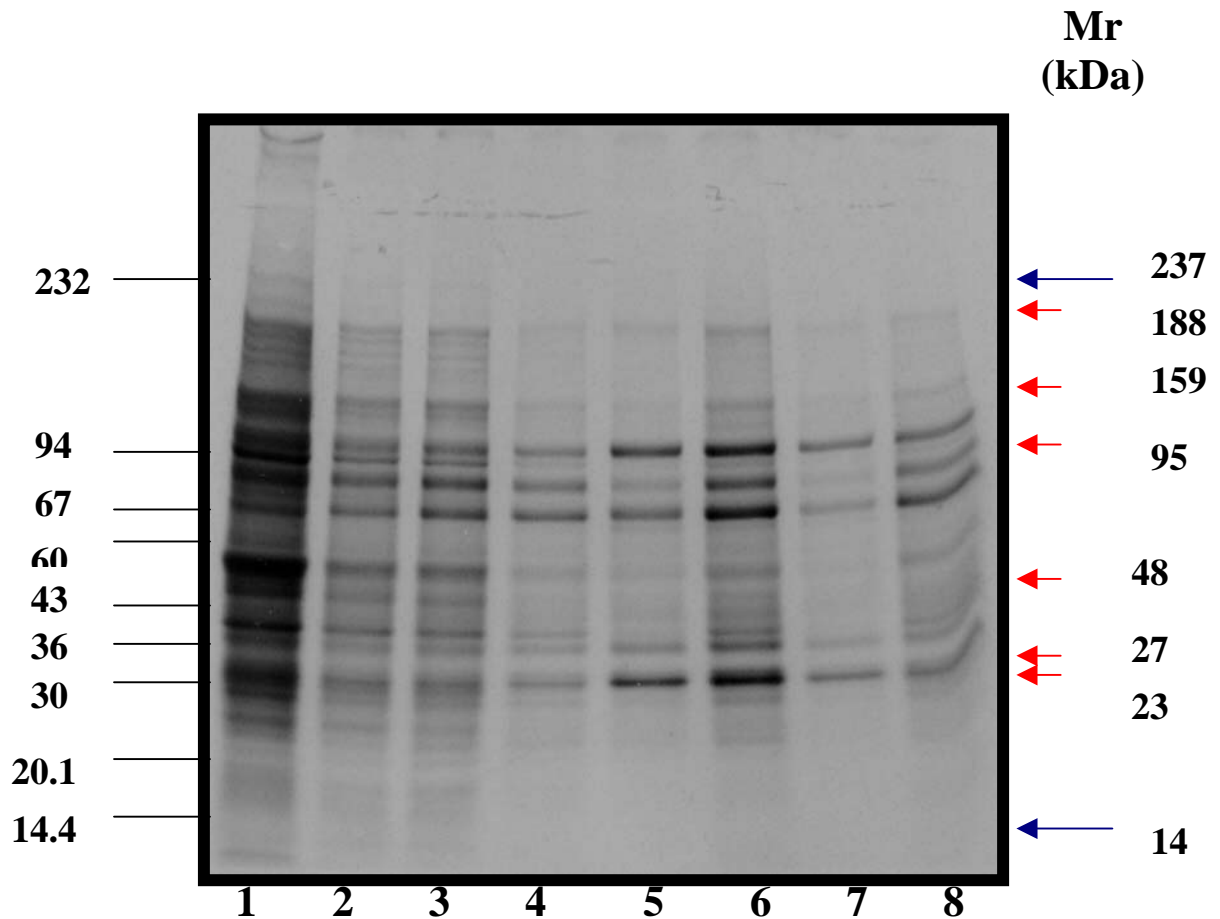


Figura 29. Análisis autorradiográfico de proteínas marcadas con ^{35}S -metionina de trofozoítos de *G. duodenalis* resistentes a concentraciones ascendentes de quinacrina. Los trofozoítos de la cepa WB fueron marcados con ^{35}S -metionina por la técnica de marcaje biosintético y se procesaron para la obtención de extractos solubles totales. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida-SDS con 5-15% del monómero. Se indica en la parte inferior el Carril 1: WB/Biosate/DMSO; Carril 2 : resistente a Qnc 3 μM ; Carril 3: resistente a Qnc 5 μM ; Carril 4: resistente a Qnc 7 μM ; Carril 5: resistente a Qnc 9 μM ; Carril 6 : resistente a Qnc 11 μM ; Carril 7: resistente a Qnc 11.5 μM ; Carril 9: resistente a Qnc 12.5 μM . Las acotaciones son idénticas a las del gel de la figura 26. Las flechas cortas denotan las variaciones más significativas observadas entre las cepas resistentes a Qnc 7, 11, 11.5 y 12.5 μM en comparación a la cepa control. En el lado izquierdo se encuentran los marcadores de peso molecular, las flechas largas muestra el rango de PM de las bandas presentes (14-237). La masa relativa (Mr) es expresada en daltones $\times 10^{-3}$.

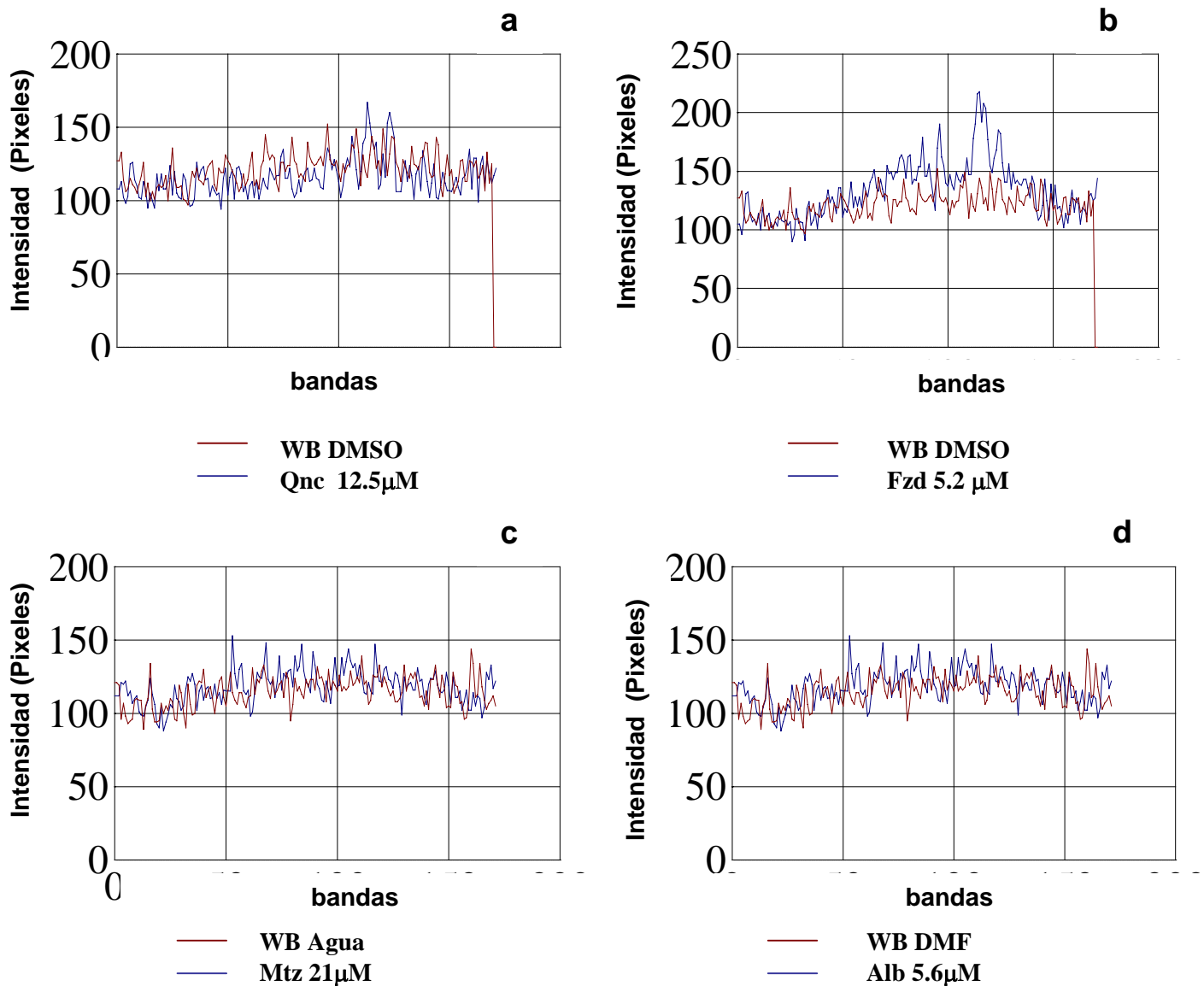


Figura 30. Análisis densitométrico de síntesis de proteínas de cepas de *G. duodenalis* resistentes a diferentes fármacos. Trofozoítos de la cepa Qnc 12.5 μ M, Fzd 5.2 μ M, Mtz 21 μ M y Alb 5.6 μ M se marcaron con 35 S-metionina por la técnica de marcaje biosintético y analizaron autorradiográficamente después de su separación electroforética (Figura 28). En los perfiles se denotan los picos de absorbancia de acuerdo a la intensidad de las bandas. En la figura 30b se observan diferencias entre la cepa resistente a Fzd y el control, ya que presentan picos de mayor intensidad en algunas bandas; mientras que en las figuras 30a, 30c y 30d no se muestran diferencias entre ellos, la intensidad de los picos son similares.

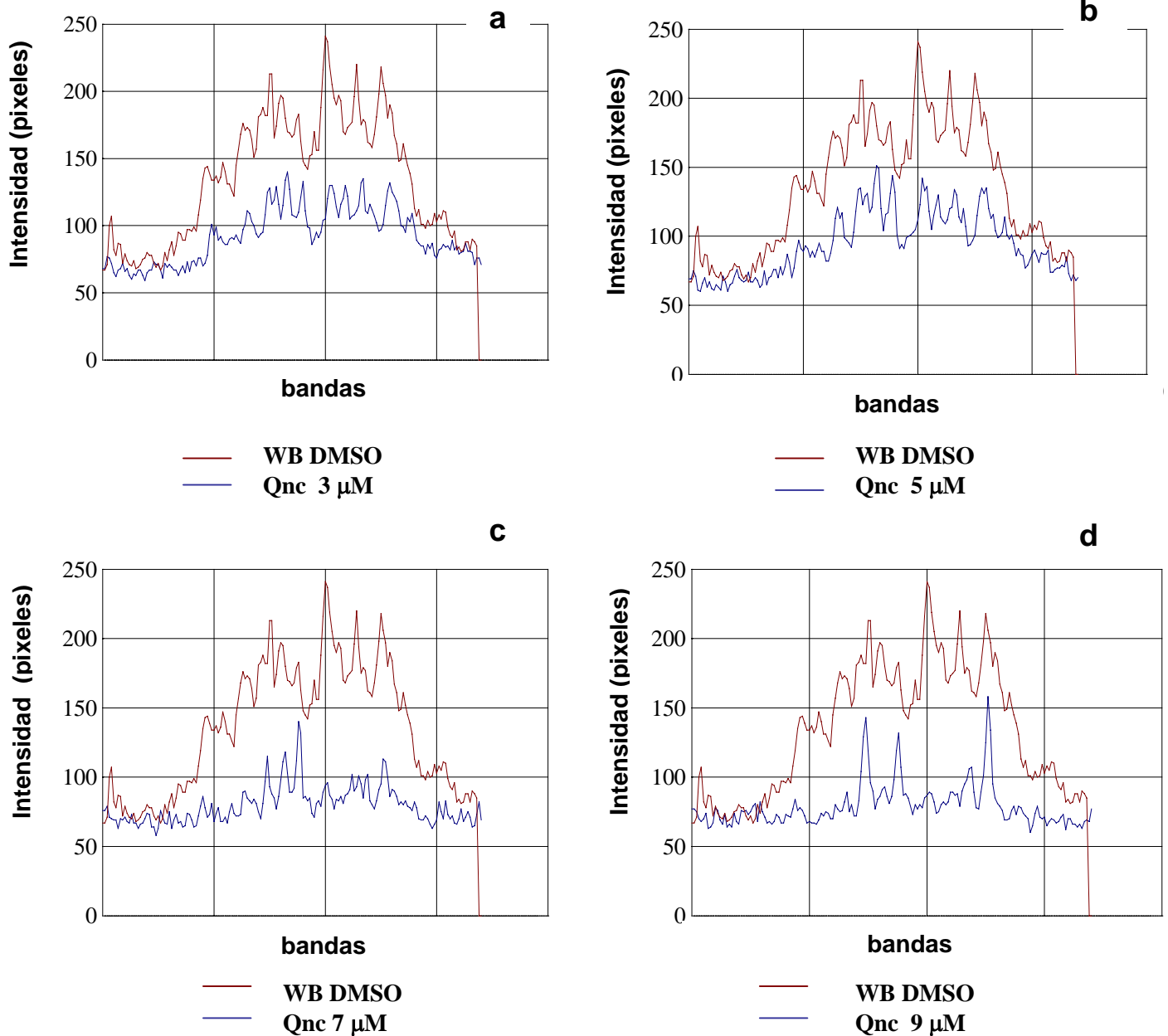


Figura 31. Análisis densitométrico de síntesis de proteínas de cepas de *G. duodenalis* resistentes a concentraciones ascendentes de quinacrina. Trofozoítos de las cepas resistentes a concentraciones ascendentes de quinacrina, se marcaron con ^{35}S -metionina por la técnica de marcaje biosintético y analizaron autorradiográficamente después de su separación electroforética (Figura 29). En los perfiles se denotan los picos de absorbancia de acuerdo a la intensidad de las bandas. En las figuras 31a, 31b, 31c y 31d no se observan diferencias significativas en la tendencia de los picos de absorbancia ya que siguen un patrón semejante, solo se muestra diferencia en la intensidad de los picos.

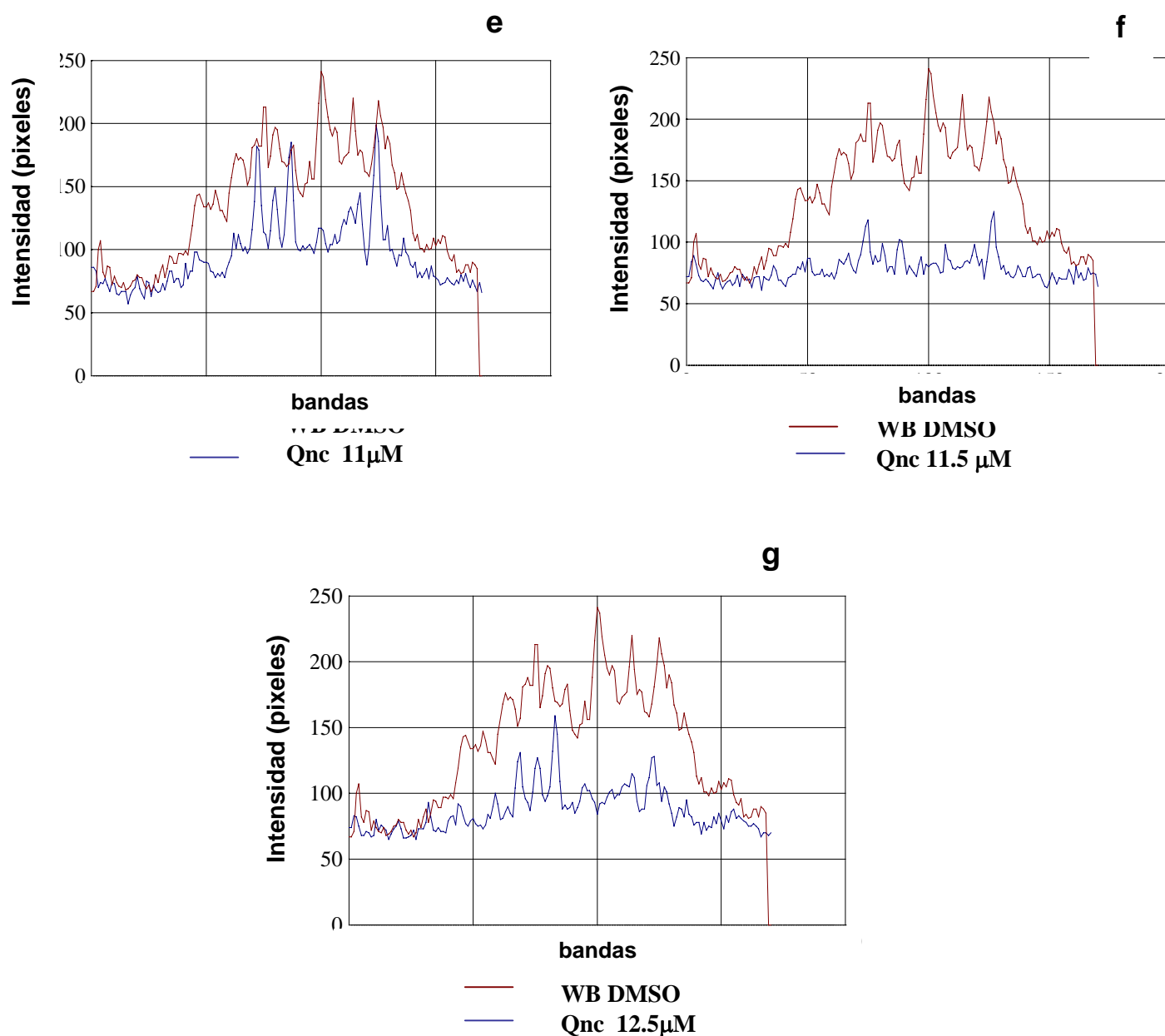


Figura 32. Análisis densitométrico de síntesis de proteínas de cepas de *G. duodenalis* resistentes a concentraciones ascendentes de quinacrina. Trofozoítos de las cepas resistentes a concentraciones ascendentes de quinacrina se marcaron con ^{35}S -metionina por la técnica de marcaje biosintético y analizaron autorradiográficamente después de su separación electroforética (Figura 29). En los perfiles se denotan los picos de absorbancia de acuerdo a la intensidad de las bandas. En las figuras 32e, 32f y 32g no se observan diferencias significativas en la tendencia de los picos de absorbancia ya que siguen un patrón semejante, solo se muestra diferencia en la intensidad de los picos.

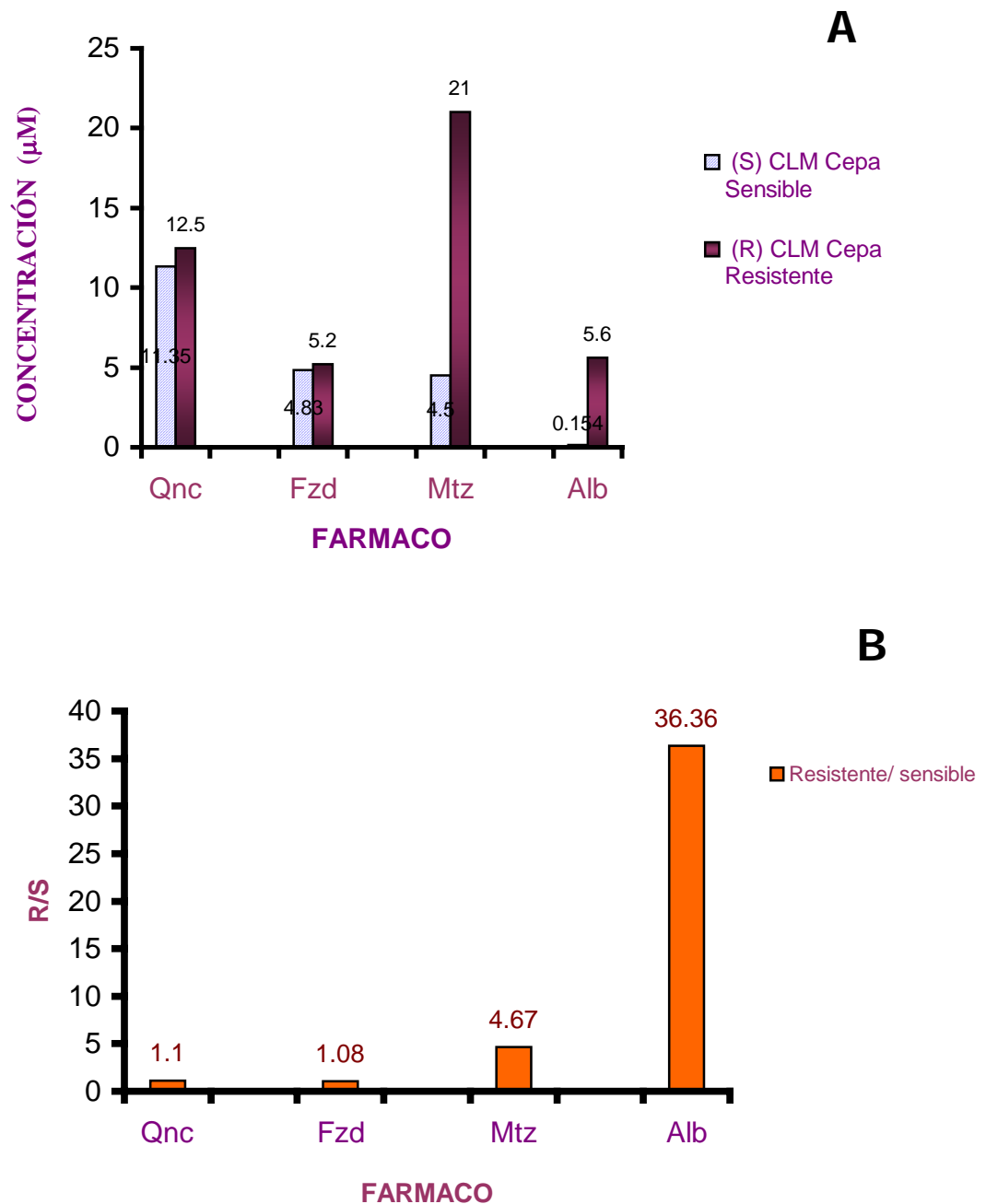


Figura 33. Análisis comparativo de CLM's de cepas sensibles y resistentes a quinacrina, albendazol, furazolidona y metronidazol. (A) y el Factor R/S de cada uno de los fármacos (B). En el panel A se observan las diferencias de CLM entre la cepa sensible y resistente en cada fármaco, pero las diferencias más significativas están en las cepas resistentes a metronidazol y albendazol, mientras que en el panel B se muestra que la cepa resistente al albendazol ha generado una mayor resistencia ya que tiene el mayor factor R/S.

7. DISCUSION

Giardia duodenalis, es un protozooario que habita en el intestino delgado de humanos y otros mamíferos. La giardiosis es una de las infecciones que ocupa uno de los principales aspectos de estudio en el área de salud pública (Bryan, 1994) y una de las principales formas de control individual es el empleo de agentes quimioterápicos.

Para realizar estudios a nivel básico de esta parasitosis, es necesario primeramente conocer la relación hospedero-parásito que nos ayude a comprender el cuadro clínico a través de los factores involucrados tanto en el hospedero como de su entorno, entre los que destacan: la edad del paciente, su fondo genético, estado nutricional e inmunológico, educación higiénica y condiciones socioeconómicas. Todo esto debe relacionarse con los factores del parásito infectante como son su hábitat, virulencia de cepas, mecanismos de patogenicidad, variaciones moleculares y la susceptibilidad a fármacos (Mc Intyre y Col., 1986).

En base a lo anterior, en el presente trabajo nos enfocamos a la susceptibilidad que presenta el parásito hacia los fármacos, particularmente al grupo de derivados de acridina y de forma específica a la quinacrina. Por lo que al cotejar los resultados de las diversas técnicas empleadas podemos deducir lo siguiente:

1) La técnica de subcultivo en medio líquido (SML), resultó ser el ensayo idóneo por ser la más sensible, reproducible y confiable; debido a que se obtuvieron los valores de CI_{50} y CLM más bajos (0.36 y 11.4 μ M

respectivamente), además de contar con una buena correlación de $r = 0.95$ (Tabla 3). Esto indica que la capacidad de los trofozoítos de *Giardia duodenalis* se vio afectada una vez expuestos a la quinacrina (agente citotóxico), por lo que el efecto farmacológico pudo haberse producido al darse la interacción fármaco-molécula blanco, donde el sitio blanco del fármaco posiblemente fue a nivel de ADN, ARN, material genético, proteínas o vías metabólicas. Este método no requiere de equipo sofisticado y material costoso, por lo que resulta ser una prueba útil en lugares que carecen de infraestructura. Sin embargo, una de sus limitantes es el tiempo que se requiere en la técnica para la obtención de resultados, ya que se realiza en aproximadamente 4 días (Hill y Col., 1986).

2) Por otra parte, en la técnica de incorporación de timidina tritiada ($^3\text{H-TdR}$) la CI_{50} y la CLM obtenidas (21.59 y 1768.23 μM respectivamente) sugieren que la $^3\text{H-TdR}$ al incorporarse en el ADN indica que el parásito esta siendo capaz de replicarse y en un menor grado, que existe una pequeña reparación de este. Dado que se conoce que la quinacrina actúa a nivel de ADN, este ensayo corroboró que el fármaco interactúa con el material genético y esto se observó con una inhibición del crecimiento celular, tal efecto se denota usando concentraciones mayores a las del SML. Los valores entre ambas técnicas no son comparables ya que presentaron una variación de 60 y 154 veces respectivamente, la enorme variación se debe quizás a que la técnica de $^3\text{H-TdR}$ es poco sensible para el fármaco y por ello no se observa tan drástico el efecto farmacológico. Otra posible causa la describe Wieseahn y Col. (1984) que observó por este método que los núcleos de las células no incorporan la marca en la misma proporción debido a la fase S del ciclo celular en la que ocurre la replicación celular. Es

necesario mencionar que en esta técnica se empleó, el contador de centelleo que es un aparato que cuenta con un paquete computacional que proporciona ciertas ventajas, ya que el procesamiento y la cuantificación son automatizados, permitiendo hacer más práctica y eficiente esta técnica, sobre todo en caso de reportar un mayor número de muestras para la entrega de resultados completos en un día. Esto proporcionó una mayor rapidez en la cuantificación de la viabilidad y confiabilidad, ya que el procesamiento de la muestra fue en menos tiempo (aprox. 2 min. en cada muestra), aunque el tiempo de incubación de los trofozoítos con la marca fuese de 4 h. Sin embargo, a pesar del costo del equipo y los nucleótidos, este ensayo resultó ser alternativo al SML para evaluar la viabilidad *in vitro* de quinacrina.

3) En el caso de la técnica reducción de sales de tetrazolio (MTT), dicho ensayo careció de sensibilidad con este fármaco ya que se obtuvieron valores muy altos de CI_{50} y CLM (1644.48 y $8.4 \times 10^5 \mu M$ respectivamente), por lo que se descarta como un método confiable y reproducible para nuestros estudios, pues resulta evidente que este ensayo mostró grandes variaciones. Otra desventaja fue que el método microscópico no fue tan sensible al observar la presencia o ausencia de gránulos dentro de la célula, lo cual se debe a que las células recién muertas todavía podían tener actividad enzimática y dar lugar a falsos positivos. Por tal motivo, en esta técnica se hizo una variante al romper o lisar células para que se pudiese determinar por espectrofotometría esta prueba, además de conocer un estudio precedente elaborado por Pérez y Col., (1990) donde se observó que las subpoblaciones de *Giardia* en cultivo, esto es células adheridas, no adheridas totalmente presentan variaciones metabólicas en su capacidad para reducir la sal de

tetrazolio (MTT) siendo las no adheridas las que presentan una mayor tasa metabólica. Una posible alternativa sea quizás el empleo de la técnica de XTT utilizada específicamente con estos fines (Wright y Col., 1992), la cual tiene la ventaja de que se genera un producto naranja hidrosoluble que permite realizar varias determinaciones en un mismo cultivo sin necesidad de lisar células y se requieren cantidades mínimas de muestra para la obtención de resultados.

4) Por último, la técnica de incorporación de colorantes fluorogénicos (DAF-IP) careció de sensibilidad ya que los resultados obtenidos presentaron la mayor variación en la CI_{50} y la CLM (4.92×10^8 y 2.89×10^{16} μM respectivamente) respecto a las otras técnicas empleadas. La razón es que la quinacrina no afecta la bicapa lipídica de los trofozoítos ya que resultó estar intacta y por ello se observaron en su mayoría células viables (DAF-positivas), pero no se descarta que el fármaco se hubiese acumulado en la membrana de la célula y al tener propiedades autofluorescentes estas células se tomaron como (DAF-positivas) falsos positivos. Con la finalidad de verificar que estas células fueran viables se observaron en el microscopio de campo claro que no presentaran algún daño celular. Por otra parte, si la quinacrina no daña la membrana celular entonces el colorante fluorocromo fenantrínico (IP) no penetra al trofozoíto y por eso no se observaron muchas células muertas (IP-positivas). Es importante mencionar que la tinción con DAF-IP no ha sido utilizada en reportes precedentes para medir la viabilidad en trofozoítos de *Giardia* expuestos a quinacrina y en nuestro caso el método no es adecuado, pues la técnica no es reproducible pero si tiene algunas ventajas como su rapidez, ya que los resultados se obtienen en aproximadamente 5 minutos. Además en aquellos lugares que cuentan con una infraestructura

adecuada, se puede utilizar la citometría de flujo (FACS ó separador de células activadas por fluorescencia) agilizando con este equipo el análisis de un gran número de muestras y sensibilidad en la medición de incorporación de los colorantes dentro del parásito. Esta técnica resulta relativamente económica en comparación con el precio de nucleótidos radiactivos (Romero, 1996).

Ahora bien al comparar las concentraciones de CI_{50} y CLM obtenidas para quinacrina en este trabajo no se parecen a las reportadas en la literatura por otros investigadores como Gillin y Diamond (1981) que utilizaron la Cepa P1 y reportaron la CI_{50} en un intervalo de concentraciones de 0.021-0.19 μM utilizando el crecimiento clonal y la CLM de 0.5 μM , Smith y Col. (1982) reportaron un intervalo de 0.055-0.097 μM empleando el crecimiento clonal, Boreham y Col. (1984) utilizando los aislados de Portland-1 BRIS/82/HEPU/41, BRIS/83/HEPU/99, BRIS/83/HEPU/106, BRIS/83/HEPU/120 Y BRIS/83/HEPU/136 reportaron CI_{50} de 1.51, 1.09, 2.85, 1.18, 1.59, y 4.02 μM respectivamente. Constance y Col. (1991), utilizando la cepa WB (ATCC 30957) reportaron una CI_{50} de $0.03 \pm 0.02 \mu M$ empleando el método de incorporación de timidina tritiada (3H -TdR). Wright y Col. (1992) reportaron que la quinacrina produce una curva concentración-respuesta bifásica empleando el método de XTT y evaluando por conteo visual encontrándose dos valores de CI_{50} de 0.816 y 6.83 μM . En la literatura, también se reporta que la CLM de quinacrina varía de 0.5 μM (Gillin y Diamond, 1981) a 50 μM (Inge y Farthing, 1987) posiblemente como resultado de la duración de los ensayos, 6-7 días y 24 h en ambos casos, respectivamente. La posible explicación de estas variaciones experimentales son: a) el empleo de diferentes cepas que se caracterizan por tener sensibilidad diferencial a fármacos

lo que ocasiona variaciones en los valores de CI_{50} ó CLM, b) el uso de diferentes métodos que determinan el efecto citotóxico de los fármacos que como en este trabajo se emplearon 4 diferentes y en el que se observó que no todos los métodos son adecuados para este fin, lo cual está en función del mecanismo de acción que presenten los fármacos a evaluar y c) las adaptaciones realizadas a las metodologías ya reportadas, así como la concentración de las diversas sustancias utilizadas .

De manera general, podemos inferir que lo reportado en las diversas técnicas para evaluar la viabilidad en *Giardia*, sugieren que el SML determina que el mecanismo de acción de la quinacrina es inicialmente fisiológico, ya que al haber un daño serio en el material genético (ADN), los trofozoítos son incapaces de realizar sus funciones vitales como la replicación y el crecimiento celular, para producir la muerte del parásito y subsecuentemente bioquímico ya que se intercala en el ADN para propiciar la interacción fármaco-receptor que conduzca al efecto farmacológico deseado, observándose esto por la técnica de 3H -TdR. Cabe resaltar que las diferencias estructurales de un fármaco permiten sugerir cuál es el modo de acción, es decir, si es a nivel bioquímico (involucrando reacciones químicas principalmente oxidaciones propiciadas por enzimas), fisiológico (alteraciones en el funcionamiento celular a nivel genómico) o bien, de ambos tipos dependiendo de su respuesta (Hill y Col., 1986).

Otra parte del trabajo, consistió en comparar la actividad farmacológica de 8 derivados de acridina, entre los que podemos mencionar a la quinina, primaquina, cloroquina, acridina, 9-amino acridina, 9-carboxi acridina, acridina naranja y acridina amarilla, que si bien no tienen actividad farmacológica contra

Giardia, algunos de ellos se han usado como antimaláricos, antibacterianos y colorantes.

En este ensayo, los resultados mostraron que la actividad anti-*Giardia* de estos derivados variaron ampliamente, ya que los valores de CLM se encuentran en un intervalo de $11.4 - 7.70 \times 10^{12} \mu\text{M}$, por lo que la efectividad en orden decreciente fue: quinacrina > acridina naranja > 9-amino acridina > acridina amarilla > acridina >> quinina >> primaquina >> cloroquina >> 9-carboxi acridina. En base a estos resultados y a las estructuras químicas de los compuestos derivados de acridina descritos en la Tabla 6, se descarta la posibilidad de que el incremento en el peso molecular (PM) no incrementa la actividad farmacológica contra *Giardia*. Sin embargo, en este estudio relación estructura-actividad de los derivados de acridina se observó que la quinacrina resultó ser la única de mayor eficacia farmacológica contra *Giardia*, al tener en su estructura una amina terciaria terminal en C₉; mientras que la acridina naranja que tiene 2 grupos amino en la posición 3 y 6 respectivamente y la 9-aminoacridina, la cual tiene un grupo amino en la posición 9 de la estructura base, no fueron tan eficaces como la quinacrina ya que resultaron de mediana eficiencia, debido a que estos grupos amino les confieren ciertas propiedades farmacológicas contra el parásito. En este contexto, lo anterior se relaciona con un estudio relación estructura-actividad realizado con antimaláricos por Thompson y Werbel (1972); Webster (1991), donde encontraron que una disubstitución de cloro en el anillo heterocíclico reduce la actividad; que la presencia de la cadena amino en C₉ es esencial para la actividad debido a que en la estructura básica de la acridina existe un átomo de nitrógeno débilmente básico y que el movimiento de esta cadena a posiciones en

C₄, C₃ o C₂ no es tan favorable. Esto confirma la importancia del grupo amino en C₉ dentro de la estructura básica de la acridina que de manera similar al caso de los antimaláricos beneficia la actividad farmacológica contra *Giardia*. En la literatura, en estudios realizados por Thompson y Werbel, 1972; Steck, 1972; Slater, 1993; se ha observado que en la estructura química de la quinina, la pérdida o alteración de un grupo 6-metoxi en el anillo de la quinolina reduce la actividad. Si bien, este grupo es importante para la actividad farmacológica, en nuestro caso la quinina y la primaquina resultan de baja eficiencia como fármacos anti-*Giardia*, a pesar de tenerlo en la misma posición.

En algunos estudios realizados en antimaláricos, se mostró que cuando estos tienen una modificación química de la posición o naturaleza de los sustituyentes sobre el anillo de la quinolina tienen un mayor impacto en su actividad farmacológica que aquellas modificaciones hechas en la cadena; en tanto que un compuesto substituido en C₇ con un halógeno en las 4-aminoquinolinas aumenta la actividad, en este trabajo aunque la cloroquina tiene un halogeno (-Cl) en C₇ este no incrementa su actividad farmacológica contra *Giardia*, por lo que resulta ser un fármaco de baja eficiencia en comparación con la quinina y primaquina, los cuales son estructuralmente semejantes excepto en sus grupos funcionales. Thompson y Werbel, 1972; Slater, 1993 encontraron con respecto a la amina terminal de la cadena, que los compuestos con una amina terciaria son generalmente antimaláricos más efectivos que los que tienen aminas primarias o secundarias y por último que la eliminación de una amina terciaria puede abolir la actividad. Esto se corrobora también en los fármacos empleados contra *Giardia*, ya que la quinacrina tiene una amina terciaria en C₉, que en

comparación con fármacos como acridina naranja, 9-amino acridina, acridina amarilla que tienen aminas primarias o secundarias su efecto farmacológico se ve disminuido.

Retomando lo anterior, cabe resaltar la importancia de que un sustituyente -NHR (R = tipo alifático) en la posición C₉ incrementa el efecto farmacológico, potenciándose el efecto con la presencia de grupos NH₂ en la posición de C₃ y C₆ en este grupo de fármacos, pero que ese grupo alifático debe ser una amina terciaria primordialmente, resultando así la quinacrina como el fármaco con mayor actividad farmacológica *in vitro* contra trofozoítos de *Giardia* sin descartar que exista alguna otra parte de la molécula que incremente tal efecto. Por tal razón, las diferencias existentes de efectos farmacológicos entre los derivados de acridina o bien al actuar contra *Giardia*, se debe quizás a la relación existente entre la estructura química y la actividad farmacológica de estos derivados de acridina, por lo que se requiere analizar ciertos aspectos como: 1) la lipofilicidad (es la capacidad que tiene una molécula para preferir un ambiente no polar (hidrofóbico)), la cual es requerida para que el fármaco llegue al sitio de acción (receptor) y por otra parte los factores electrónicos en la interacción con el sitio de acción entre los que están contemplados los enlaces débiles (fuerzas electrostáticas, enlaces de hidrógeno), fuertes de tipo covalente (que hacen irreversible el efecto y persiste más tiempo) y uniones en los que intervienen fuerzas nucleares (Enlaces de Vander Waals), lo cual propicia que se genere la acción farmacológica, 2) el tiempo de vida media (t_{1/2}) de los derivados de acridina (es el tiempo que tarda en ser eliminado el 50% de la concentración plasmática de un fármaco. También se considera como el tiempo requerido para

que la cantidad de fármaco en el organismo se reduzca a la mitad durante el proceso de eliminación. Este parámetro es útil para determinar los intervalos de dosificación del fármaco.), el cual no se ha estudiado *in vitro*. Si extrapolamos lo anterior a nuestro caso, la quinacrina se adicionaba a los cultivos *in vitro* a una concentración alta lo que provocó un efecto sobre la viabilidad de los trofozoítos y contrariamente, cuando transcurría el tiempo probablemente disminuía la concentración del fármaco en el medio, lo que originó un incremento celular de *Giardia*. Los $t_{1/2}$ de algunos derivados de acridina reportados en la literatura en humanos fueron para la quinacrina de 6-7 días, quinina 5-9 h y primaquina 52 h (Desjardins y Trenholme, 1992), 3) los farmacóforos (la parte activa de la molécula del fármaco) son responsables de la eficacia de un agente farmacológico y 4) la relación $\frac{CLM}{DL_{50}}$ que se presenta en la Tabla No. 5 indica el índice citotóxico, es decir, los efectos deseables e indeseables de un fármaco o su margen de seguridad, por lo que cuando se tienen valores altos de este índice hay un margen de seguridad más grande, en tanto que los valores pequeños indican lo contrario, ya que un margen estrecho nos lleva fácilmente a los efectos adversos del fármaco. En este trabajo, la quinacrina, cloroquina y 9-carboxi acridina presentaron valores mayores en el margen de seguridad al compararse con los otros derivados, sin embargo el valor de $\frac{CLM}{DL_{50}}$ de quinacrina es el menor (31.58) entre ellos por lo que puede llegar más fácilmente a la toxicidad, además se conoce que la quinacrina es altamente tóxica debido a sus efectos adversos. Esto último provocó que fuera retirada del mercado en E.U.A. en 1992 (Farthing, 1992; Gardner y Col., 2001). Por otra parte se ha observado que la toxicidad de mepacrina puede ser disminuida por la inclusión de un grupo

amino en la posición 7 del cromóforo de acridina (Grigorovsky y Col., 1956; Wainwright, 2001). También que los efectos mutagénicos están relacionados con la posición del grupo nitro en el cromóforo de acridina (Ferguson y Denny, 1990). En un estudio donde la finalidad era buscar un nuevo fármaco más tolerable al paciente, se probó que la acridina el núcleo de la quinacrina (atebrina®) resulta ser más tóxica que el derivado 4,5-dimetil, el cual fue sólo sintetizado para este fin (Newman, 1987). Esto indica que la acridina estructura base de la quinacrina, confiere ciertas propiedades tóxicas al fármaco. En este sentido, en investigaciones previas se ha observado que la variación de toxicidad en los antimaláricos se debe a las diferencias químicas estructurales de los componentes, por lo tanto la quinina y la cloroquina resultan altamente tóxicas en sobredosis, en tanto que la primaquina es menos tóxica (Jaeger y Col., 1987), sin embargo en el caso de *Giardia* la cloroquina es la que presenta un mayor margen de seguridad (relación CLM/CI₅₀= 321.46).

Entre otras de las perspectivas de este trabajo se puede considerar, que la resistencia a fármacos continua siendo el mayor impedimento en el tratamiento y control de enfermedades de origen parasitario. Y aunque se ha demostrado que el tratamiento de dosis única con tinidazol, metronidazol y quinacrina son generalmente efectivos, también han presentado fallas (Mc Intyre y Col., 1986). Esto lleva a la necesidad de buscar nuevos fármacos e investigar la quimioterapia en combinación como una herramienta para el tratamiento contra la giardiosis. Crouch y Col. (1990) observaron sinergismo *in vitro* sobre la adhesión de este parásito empleando algunas combinaciones diádicas de azitromicina, doxiciclina, mefloquina, tinidazol y furazolidona. Por otra parte la combinación de

albendazol-metronidazol ha presentado alta eficacia en casos de giardiosis refractaria al tratamiento con metronidazol (Cacopardo y Col., 1995).

Estos antecedentes nos llevaron a realizar un estudio utilizándose compuestos pertenecientes a una misma familia, lo cual puede ser bastante útil a nivel clínico principalmente en casos de giardiosis refractaria al tratamiento tradicional, sin descartar la posibilidad de realizar combinaciones con fármacos diferentes en su estructura química y sitio de acción para controlar dicha infección. Para ello, se realizó una evaluación de las interacciones farmacológicas entre los derivados de acridina, planteando una serie de combinaciones diádicas entre ellos.

Los resultados de este ensayo mostraron que las siguientes combinaciones diádicas (9-aminoacridina-acridina amarilla, quinacrina-cloroquina, acridina-acridina amarilla y quinacrina-9-aminoacridina) entre los compuestos derivados de acridina fueron sinérgicas al evaluarse mediante su Índice de Concentración Fraccional. La combinación 9-aminoacridina-acridina amarilla presenta el mayor sinergismo ($ICF=0.09\pm 0.02$), es decir, que ambos fármacos maximizan el efecto farmacológico que individualmente no pueden dar. Esto resultó al incluir compuestos con modificaciones en los substituyentes de las posiciones C₃, C₆ y C₉ potenciándose así el efecto farmacológico en la combinación diádica. El uso de acridina amarilla y quinacrina en las diferentes combinaciones diádicas ofrecen buenos resultados al llevar a una interacción farmacológica de sinergia. Si bien, no se tienen aun estudios de comparación que nos permitan corroborar nuestros ensayos para estas combinaciones diádicas de la misma familia, el sinergismo presentado abre una posible alternativa de tratamiento en casos de resistencia a

los fármacos existentes, para que puedan ser estudiadas en un futuro en modelos animales determinándose así su eficacia *in vivo* y su toxicidad, pero lo más rescatable de este estudio es que las combinaciones pertenecen a la misma familia. Es importante mencionar que se obtuvieron sólo dos combinaciones diádicas (cloroquina-acridina amarilla y quinacrina-acridina amarilla) con una interacción farmacológica de antagonismo (ICF=2.69 e ICF=8.94 respectivamente), lo que indica que la acridina amarilla no beneficia sino que interfiere en el efecto farmacológico cuando se combina con fármacos que tienen una amina terciaria en su estructura química, o bien al incluir derivados con diferencias estructurales en los anillos bencénicos de la acridina.

Con ello, podemos inferir que la quinacrina es un fármaco efectivo en combinación con fármacos de la misma familia contra trofozoítos de *Giardia in vitro*, lo cual puede beneficiar para reducir su toxicidad; pero también en combinación con fármacos de diferente familia continua siendo eficaz como se demuestra en investigaciones realizadas en donde la cepa de referencia WB de *G. duodenalis* que se obtuvo de un paciente con giardiosis refractaria a quinacrina o metronidazol, fue resuelta con la combinación de estos fármacos (Smith y Col., 1982). Actualmente se ha reportado que las combinaciones diádicas usadas *in vivo* han resultado ser bastante efectivas, como el caso de seis pacientes que a pesar de sus deficiencias en el sistema inmune fueron tratados con metronidazol o tinidazol en combinación con quinacrina, en donde los resultados fueron satisfactorios ya que cinco de los seis pacientes fueron curados totalmente, mientras que en el paciente restante fue erradicada parcialmente la infección (Nash y Col., 2001). De forma similar, se ha observado en algunos estudios *in*

vitro el efecto de aditividad entre metronidazol y quinacrina al combinarse y esto sugiere que ambas puedan combinarse cuando la giardiosis es refractaria al tratamiento convencional (Nash y Col., 2001). Si bien, la quinacrina se usa con menos frecuencia, esto demuestra que las combinaciones con quinacrina y metronidazol tanto *in vivo* como *in vitro* siguen siendo efectivas y con los resultados de nuestro estudio se presenta una nueva posibilidad de combinaciones. Sin embargo, se ha reportado un caso de cura con un derivado de acridina, la epsilon-9-aminoacridina, lo que implica que también solos pueden ser efectivos algunos de ellos (Leonhardt y Col., 1992).

Con lo que respecta a la importancia de conocer el mecanismo de resistencia que presenta la quinacrina *in vitro* en *Giardia duodenalis*, en este trabajo se evaluó parcialmente empleándose trofozoítos de WB de *G. duodenalis*, para tratar de inferir si el ingreso es a través de membrana mediante difusión simple, proteínas membranales, por canales de proteínas o bien mediante el reconocimiento específico de un sitio receptor.

Inicialmente se hizo una selección de resistencia a Qnc empleándose la técnica de cultivo continuo en presencia de fármaco en concentraciones ascendentes, considerada por nuestro grupo de trabajo como la más adecuada y eficiente, para tener a estas células en resistencia total (Romero,1996). Además en la literatura Upcroft y Col.(1996) reportan la obtención de cultivos resistentes a quinacrina *in vitro* por exposición continua del fármaco en cepas sensibles y resistentes a otros fármacos como metronidazol y furazolidona, observándose que las cepas resistentes a furazolidona, aisladas de oveja y gato, fueron inducidas en menos tiempo a resistencia con quinacrina en comparación con las

cepas resistentes a metronidazol. Por lo que en este trabajo, al emplear la técnica mencionada los resultados obtenidos confirman que la resistencia anaeróbica de *G. duodenalis* a la quinacrina puede ser inducida *in vitro*. Esto fue logrado mediante el cultivo continuo del parásito (cepa WB) en medio TYI-S-33 ante la presión continua de concentraciones ascendentes a quinacrina por varios meses (Figura 11). En este proceso de desarrollo de resistencia se observó una replicación disminuida cuando los parásitos eran expuestos a quinacrina y conforme se iban adaptando estos al fármaco, había una estabilidad en el crecimiento; pero cuando se exponían a concentraciones mayores se observó retardamiento en la replicación sin llegar a confluencia presentando este fenotipo sólo una población muy reducida de trofozoítos. Durante la realización de este experimento y al observarse microscópicamente, los cultivos no exhibieron alteraciones en la capacidad adhesiva del parásito a superficies inertes o diferencias morfológicas considerables, es decir, que los trofozoítos que entraron en división celular y fueron capaces de completar su citocinesis, sugieren que la quinacrina no ejerce a este nivel un arresto en el ciclo celular de *Giardia* (Romero, 1996). La etapa de adaptación fue muy importante en este proceso, ya que los parásitos tuvieron cambios quizá en algunos procesos bioquímicos lo cual les permitió soportar y eliminar los efectos adversos del fármaco viéndose reflejado en una normalización de su velocidad replicativa.

Una vez obtenida la cepa resistente (12.5 μM) de quinacrina, se realizaron ensayos de microscopía con sistema de epifluorescencia de una cepa sensible y resistente al fármaco. En esta técnica se utiliza a la quinacrina como el colorante

fluorescente, ya que sus propiedades fisicoquímicas conferidas le permiten emitir su propia fluorescencia dentro de la célula, esta se une selectivamente a las macromoléculas que reconoce en las células o en la matriz extracelular, y es estimulado por un haz de luz emitiendo parte de la energía absorbida como rayos luminosos. En los resultados que se obtuvieron, bajo luz U.V. se observó que los trofozoítos de *G. duodenalis* sensibles acumularon rápidamente la quinacrina en el núcleo o en toda la célula, por lo que quizás consideramos que este sea el sitio de acción primario *in vitro*, lo cual coincide con que la quinacrina tiene afinidad por el ADN (Warhurst, 1986). Sin embargo, Warhurst y Thomas (1975) han reportado que éste parece no ser el modo de acción primario pues la fluorescencia de quinacrina no ha sido localizada en el núcleo de plasmodios expuestos al fármaco. Por otra parte, Upcroft y Col.(1996) realizó un estudio de microscopía de epifluorescencia, en el cual demostró que la quinacrina es absorbida y acumulada en trofozoítos sensibles de *G. duodenalis* pero el núcleo no parece el sitio blanco del fármaco, sino que se observó una fragilidad en la membrana al exponer a las células con quinacrina, lo que sugiere que la membrana podría ser el sitio de acción del fármaco. Esto concordaría con los estudios realizados en *Plasmodium* (Warhurst y Thomas, 1975) no así con nuestros resultados en el caso de *Giardia*. Sin embargo, Zidovetzki (1989) reportó que la quinacrina y la cloroquina presentan interacciones débiles con los lípidos de la membrana en comparación con la quinina y mefloquina sugiriendo que la quinacrina no es completamente lipofílica. También han demostrado que la quinacrina tiene propiedades flavoantagonistas que inhiben la actividad de una oxidasa de NADH citoplásmica de *Giardia* (Brown, Upcroft y Upcroft, 1995), pero

que esto es aún confuso en los estudios de microscopía de epifluorescencia en cuanto a que el citoplasma sea el sitio blanco del fármaco.

En cuanto a los trofozoítos de *G. duodenalis* resistentes a quinacrina, bajo luz U.V. se observó que el fármaco se localiza aparentemente en la membrana celular. Esto implica la capacidad de los trofozoítos de adaptarse a condiciones ambientales desfavorables provocadas por la quinacrina, lo que provoca que el parásito desarrolle vías o mecanismos bioquímicos alternos sumado quizás a cambios genéticos capaces de evitar el efecto citóxico del fármaco. Con esto, el parásito tiende a disminuir o bloquear ciertas funciones enzimáticas para adquirir la capacidad de generar un mecanismo de resistencia cuyo origen puede ser genético o fenotípico a fin de eliminar o soportar los efectos del fármaco (Kelly y Hall, 1979). En la literatura, se ha observado que las cepas resistentes a metronidazol y que posteriormente fueron inducidas a resistencia con quinacrina, este fármaco está aparentemente excluido de la célula y de la membrana celular. Estas observaciones sugieren que los cambios de transporte están involucrados como mecanismos generales de resistencia a fármacos en *G. duodenalis*, como bloqueo de membrana o flujo activo y en base a los cambios que se observaron en el flujo de colorantes en *G. duodenalis* (Upcroft, 1994). En bacterias estos cambios se atribuyen a transportadores de multiresistencia de fármacos (Ni Kaido, 1994).

Lo anterior implica que quizás la quinacrina pueda tener diferentes sitios de acción, es decir, un multimecanismo. Aunque también cabe la posibilidad de que en la cepa WB haya influido el haber tenido contacto con metronidazol y quinacrina, ya que se conoce que la cepa WB proviene de un paciente con

giardiosis refractaria a quinacrina y a metronidazol, la cual posteriormente fue resuelta con una combinación de ambos fármacos. El uso de esta cepa en este trabajo para generar resistencia quizás no había sido la mejor selección para usarlo como un control debido a la posibilidad de presentar cierta resistencia previa al tener contacto durante los tratamientos. Sin embargo, esta posibilidad se descartó al realizar un ensayo de sensibilidad a quinacrina empleándose la cepa P-1, en la cual no se encontraron diferencias significativas respecto a la cepa WB.

La cepa resistente a quinacrina en una concentración de 12.5 μM obtenida presentó un factor R/S menor con este fármaco en comparación con las otras cepas inducidas a resistencia en nuestro grupo de trabajo, como fue el caso del albendazol, metronidazol y furazolidona (Figura 29). Con un factor resistencia/sensibilidad =1 podemos inferir que son cepas con una mayor estabilidad en su resistencia al fármaco, esto se debe quizás a que llevan más tiempo de inducción al fármaco y un número mayor de clonas aisladas. A partir de la cepa resistente a quinacrina a 12.5 μM , se realizó la clonación de la línea resistente en ausencia del fármaco mediante el método de dilución limitante propuesto por Baum y Col. (1988), con la finalidad de obtener una población genéticamente homogénea a partir de una célula progenitora a diferencia de una cepa silvestre, la cual esta compuesta de una población heterogénea de parásitos. Uno de los parámetros que permitió evaluar si realmente una clona se derivó de una célula fue mediante la obtención del %CFE (Porcentaje de eficiencia de formación de colonias) cuyo valor máximo es del 100%, que para nuestro caso fue el 86.4% obteniéndose un buen número de clonas. Las clonas pueden

presentar variación en su sensibilidad *in vitro* cuando se cultivan en forma continua en ausencia del fármaco debido posiblemente a la plasticidad biológica del parásito (Romero, 1996).

La inducción de resistencia a quinacrina y a otros fármacos, si bien difieren su estructura y mecanismo de acción, también fue importante para obtener material biológico de estudio suficiente para caracterizar el fenotipo de resistencia a diferentes fármacos. Se ha reportado a nivel clínico, que los pacientes con cuadros bien definidos de giardiosis sufren una infección por poblaciones mixtas de parásitos y en que estos son sometidos a un tratamiento quimioterápico, en el que están contemplados fármacos tales como el albendazol, metronidazol, furazolidona, y quinacrina por lo que es obvio que decline la replicación de algunos parásitos, especialmente las cepas sensibles permaneciendo las resistentes, las cuales conforme transcurre el tiempo pueden expandir su población generando casos refractarios a dichas parasitosis o bien cronicidad de la misma (Romero, 1996). Asimismo estos estudios enfatizan el hecho de que un aislado esta constituido por una población heterogénea genotípica y fenotípica de parásitos, los cuales promueven diferencias en la susceptibilidad a fármacos que son usados indiscriminadamente debido a una falta de agentes alternativos. En la literatura se ha reportado que este parásito presenta un grado considerable de variabilidad biológica o heterogeneidad en sus características fenotípicas y genotípicas incluyendo antígenos de superficie (Smith y Col., 1982; Nash y Keister, 1985; Nash, 1992), isoenzimas (Bertram y Col., 1983; Baveja y Col., 1986; Meloni y Col., 1988, 1989; Abbaszadegan y Col., 1991), patrones de restricción de DNA (Adam y Col., 1988; Upcroft y Col., 1989;

Campbell y Col., 1990; De Jonckheere y Col., 1990) y sensibilidad a agentes quimioterapicos (Boreham y Col., 1987; Upcroft y Col., 1990).

En este trabajo se abordó la caracterización fenotípica parcial de cultivos de *G. duodenalis* resistentes a diferentes fármacos (furazolidona, metronidazol, albendazol y quinacrina), empleándose dos técnicas: marcaje de antígenos de superficie con ^{125}I -lactoperoxidasa y marcaje metabólico con ^{35}S -metionina, como marcadores altamente sensibles para detectar cantidades mínimas de macromoléculas específicas.

Con respecto al análisis cuantitativo y cualitativo de los perfiles electroforéticos para las cepas de WB que sirvieron como controles, es decir, con diferente medio de cultivo (caseína o biosate), estos visualmente no tuvieron diferencias entre ellos, lo que implica que el medio de cultivo en el que se mantiene a las células no influye en la expresión de antígenos de superficie o en la síntesis de proteínas, así mismo esto se observó con los solventes empleados (DMSO, DMF y H_2O). Al analizar visualmente los patrones electroforéticos de las cepas resistentes a los diferentes fármacos y el perfil de las concentraciones ascendentes a quinacrina, no se observaron diferencias. Asimismo no existió degradación proteínica en ningún caso.

Los patrones de componentes de superficie de cepas con diferente medio de cultivo o solvente accesibles al marcaje con ^{125}I , no presentaron diferencias entre ellos. Es necesario considerar que el tamaño en el repertorio de antígenos de superficie de la cepa WB se ha estimado entre 20-184 kDa (Nash y Col., 1990). En cuanto a los patrones de expresión de las cepas resistentes a fármacos, las cepas resistentes a quinacrina y furazolidona tuvieron un patrón muy

semejante pero en comparación con el control carecieron de una banda de alto peso molecular (207 kDa). Desde el punto de vista cuantitativo, las diferencias más significativas se encontraron principalmente en la cepa resistente a 5.6 μM de albendazol donde resultaron sólo dos bandas (70 y 90 kDa) las que incorporaron mayoritariamente el isótopo en esta cepa, similar caso resultó en la cepa resistente a quinacrina existiendo 3 bandas más intensas (27, 56 y 90 kDa). Asimismo, en el patrón de expresión de las cepas resistentes a concentraciones ascendentes de quinacrina se mostró la ausencia de bandas de mayor PM (169-297 kDa) cuando la cepa se expuso inmediatamente al fármaco, esto sucede a partir de la concentración más baja (3 μM de quinacrina). Por otra parte, cuantitativamente no existió alguna relevancia importante entre las bandas, ya que el control presentó una mayor intensidad.

Cabe resaltar que en el marcaje biosintético de proteínas con ^{35}S -metionina se observó que en las cepas controles no existió diferencia alguna, pero en las cepas resistentes de los fármacos antes mencionados, se encontraron diferencias en las proteínas sintetizadas por las células principalmente en los componentes de quinacrina y furazolidona, aunque cuantitativamente sólo furazolidona presentó diferencias en dos bandas intensas (55 y 56 kDa). En el patrón de expresión de las cepas resistentes a concentraciones ascendentes a quinacrina (Qnc 7, 11, 11.5 y 12.5 μM) se muestra la ausencia de bandas de mayor PM (159-188 kDa), bajo peso molecular (23, 27 y 48 kDa) y una banda perteneciente a un doblete en los mismos carriles.

Con los resultados obtenidos en ambos marcajes, podemos inferir que las cepas resistentes a la quinacrina y al albendazol presentan diferencias

cualitativas y cuantitativas en los antígenos de superficie en la membrana del parásito, mientras que la cepa resistente a furazolidona presenta diferencias cualitativas y cuantitativas en las proteínas sintetizadas por el parásito. Estas diferencias cualitativas expresadas en los perfiles fenotípicos de las cepas resistentes dependen de la naturaleza del fármaco, es decir, que quizás se debe a una adaptación fisiológica de la cepa al fármaco. Sin embargo, deberá considerarse un estudio de perfiles fenotípicos pero en clonas aisladas de las cepas resistentes descartándose la heterogeneidad genética, ya que la variación de las proteínas de superficie también está relacionada con múltiples funciones biológicas en la superficie del parásito, incluyendo respuestas inmunes y la interacción con células hospederas (hospedero-parásito). Las respuestas inmunes a *G. duodenalis* son importantes para el control de las infecciones. Por ello, las infecciones por *G. duodenalis* están asociadas con la variación antigénica del parásito la cual es generada por un cambio continuo de las proteínas de superficie (VSP's) ricas en cisteína (Bienz y Col., 2001). La heterogeneidad puede ocurrir por dos razones: la primera son las diferencias hereditarias entre los aislados y la segunda, los aislados con variación antigénica resultan de la heterogeneidad si son poblaciones derivadas de una clonación. Entonces los aislados de *Giardia* pueden cambiar su perfil antigénico *in vitro* e *in vivo* (Aggarwal y Col., 1988; Nash y Col., 1988; Adam y Col., 1988). Esto se puede comprobar en un análisis de 29 aislados y clonas de *Giardia*, donde los aislados revelaron una marcada variabilidad de antígenos de superficie (Nash y Col., 1985).

En lo que respecta a los perfiles fenotípicos del parásito al ser expuesto a concentraciones ascendentes de quinacrina, se observó que cualitativamente los patrones de expresión de los antígenos de superficie son diferentes al exponerse a quinacrina y cuantitativamente existe un antígeno de superficie en mayor expresión. Si bien, la presencia de quinacrina en las cepas resistentes afecta el perfil fenotípico, también las proteínas sintetizadas por el parásito son diferentes. Esto indica que la quinacrina actúa sobre la membrana celular del parásito y no se descarta la posibilidad de que también actúe a nivel de síntesis de proteínas aunque el efecto sea en menor proporción para generar la resistencia, ya que en los procesos de traducción o síntesis proteica de cualquier microorganismo (procarionte o eucarionte) el codon de iniciación (AUG) codifica para metionina y, así, el aminoácido está presente virtualmente en todas las cadenas polipeptídicas de las células en proceso biosintético.

Otra posible explicación a la variabilidad en los perfiles, es que la disminución en la sensibilidad podría ser causada por cambios genéticos o no genéticos en la célula blanco, es decir, que si un cambio en la sensibilidad no involucra un cambio en el ADN cromosomal o extracromosomal, entonces es el resultado de una adaptación fenotípica. Esto ocurre en cultivos después de una larga exposición al fármaco bajo condiciones favorables para las células o el organismo. La resistencia fenotípica no es estable y generalmente se pierde cuando las células después de haberse cultivado en un largo tiempo en presencia del fármaco se transfieren a un medio libre de fármaco (Kelly y Hall, 1979). Boreham y Col. (1987) y Majewska y Col. (1991) mostraron la heterogeneidad en la sensibilidad del parásito a fármacos además de las diferencias fenotípicas y

genotípicas aun en cultivos obtenidos a partir de pacientes refractarios al tratamiento. Las diferencias fenotípicas y genotípicas de aislados obtenidos antes y después de tratamiento con metronidazol.

Nuestros resultados corroboran lo obtenido en otras investigaciones ya que muestran que las variaciones en los perfiles fenotípicos *in vitro* de las cepas resistentes a diferentes fármacos se debe posiblemente a la activación y/o encendido de genes que codifican para proteínas específicas de *Giardia* relacionadas con el stress ejercido por el fármaco. Esto podría asociarse a su vez con cambios en los sacáridos de la superficie celular, tal como sucede en *T. vaginalis* en la cual han encontrado diferencias en D-galN, D-Gal y residuos parecidos a manosa entre cepas sensibles y resistentes (Dias y Col. 1992). Si bien, el estudio realizado por nosotros fue *in vitro*, podemos comparar con lo obtenido por Butcher y Col. (1994) ya que realizaron un estudio sobre un caso clínico en donde se emplearon métodos como marcaje con S-metionina, impresión digital de ADN, análisis de isoenzimas y radioiodinación de proteínas de superficie evaluando los perfiles fenotípicos y genotípicos en trofozoítos obtenidos del paciente antes y después del tratamiento con metronidazol, y se observaron diferencias en los perfiles de las dos cepas axenizadas del mismo paciente, sugiriendo un proceso de selección por la quimioterapia, lo cual coincide con nuestros resultados, pero sin descartar la posibilidad de realizar estudios para evaluar perfiles genotípicos *in vitro* que arrojen mayor información.

Actualmente en nuestro país se desarrolla la evaluación de nuevas sustancias, pero se requiere de períodos prolongados hasta lograr la completa evaluación químico-biológica del fármaco que comprende el diseño molecular,

establecer la relación estructura-actividad, la síntesis orgánica, pruebas biológicas, toxicológicas, clínicas, etc. Esto se hace mediante modelos computacionales que sirven para simular e insertar nuevos radicales a los farmacofóros para incrementar su actividad citotóxica (Angeles-Anguiano, Comunicación Personal, 2001). Por este método, se realizó un estudio con las acridinas y se observó que al ser moléculas planas tienen una mayor superficie de potencia, es decir, que presentan una mayor actividad biológica, por lo que pueden actuar a nivel de ADN causando mutagénesis.

En la actualidad, la Industria Farmacéutica tiene la pauta para continuar con el diseño de fármacos, a través de estudios que como el anterior reemplacen a los obsoletos.





8. CONCLUSIONES

- ❖ El método óptimo para evaluar la sensibilidad de *Giardia duodenalis* a fármacos en los derivados de acridina especialmente la quinacrina resultó ser el SML, debido a que resultó reproducible, sensible, económico y sencillo.
- ❖ Las curvas concentración-respuesta mostraron que el orden de efectividad de los derivados de acridina fue el siguiente: quinacrina > acridina naranja>9-amino acridina>acridina amarilla>acridina>>quinina>>primaquina>> cloroquina>>9-carboxi-acridina de acuerdo a su CLM.
- ❖ Si bien la quinacrina no tiene uso clínico actualmente, nuestros resultados ofrecen la posibilidad de utilizar algunos derivados de acridina que sean eficaces sobre *Giardia duodenalis* y sugerir a través de los grupos activos identificados, un diseño racional de nuevos fármacos que presenten menos efectos colaterales o bien, proponer el estudio detallado de las combinaciones diádicas de este grupo que resultaron sinérgicas
- ❖ Los cultivos obtenidos por dilución limitante a partir de la cepa WB resistente a 12.5 μM de quinacrina satisficieron el criterio estadístico de clonalidad.
- ❖ Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el posible modo de acción de la quinacrina sobre trofozoítos de *Giardia duodenalis* podría ser a nivel de la disminución de la tasa de síntesis de ADN.



- ❖ La presencia del fármaco determina el patrón de expresión, por lo que en este trabajo se sugiere que la variabilidad en los perfiles fenotípicos de *G. duodenalis* que presentan las cepas resistentes dependen de la naturaleza química del fármaco y de su mecanismo de acción.

**AMORTIGUADOR DE GEL CONCENTRADOR (BGC 8X)**

Trizma base 2M, pH 6.8.....	50 ml
SDS 20%.....	4 ml
H ₂ O bidestilada.....	100 ml

AMORTIGUADOR DE GEL RESOLVEDOR (BGE 5X)

Trizma base 2M, pH 8.8.....	187.5 ml
SDS 20%.....	5 ml
H ₂ O bidestilada c.b.p.....	200 ml

SOLUCION ACRILAMIDA-BISACRILAMIDA-GLICEROL (ABG)

Acrilamida	60 g
N,N'-metilen-bisacrilamida.....	1.6g
H ₂ O bidestilada c.b.p.....	80 ml
Glicerol	60 ml
H ₂ O bidestilada c.b.p.....	200 ml

❖ Filtrar en Millipore o Whatman No.1

Nota: Se debe manejar con precaución (neurotóxica). Todas las soluciones deben almacenarse a 4 °C excepto el APS a -72 °C y el SDS 20% a TA

SOLUCION APS: persulfato de amonio 10% en H₂O bidestilada .

AMORTIGUADOR DE MUESTRA (Para geles con gradiente continuo o de concentración constante de acrilamida)



	2X	5X
Trizma base 2M, pH 6.8	312 μ l	780 μ l
SDS 20%	1 ml	2.5 ml
Glicerol	388 μ l	970 μ l
Colorante(Azul de bromofenol o pironina Y)	0.00002% (c.f.)	0.00002% (c.f.)
H ₂ O bidestilada c.b.p	5 ml	5 ml

Preparar geles grandes de acuerdo con el siguiente formato:

	GEL RESOLVEDOR (30ml)		GEL CONCENTRADOR 10 ml
	5%	15%	
BGE 5X	3.4 ml	3.4 ml	-----
BGC 8X	--	---	1.25 ml
H ₂ O bidestilada	10.85 ml	5.15 ml	7.085 ml
ABG	2.85 ml	8.55 ml	1.66 ml
TEMED	4 μ l	4 μ l	5 μ l
APS	17 μ l	17 μ l	50 μ l

Preparar geles pequeños de acuerdo al siguiente formato:

	GEL RESOLVEDOR		GEL CONCENTRADOR
	5%	15%	
BGE5X	940 μ l	940 μ l	-----
BGC8X	-----	-----	250 μ l
H ₂ O bidestilada	3.15 ml	1.43 ml	1.41ml
ABG	695 μ l	2.375 ml	330 μ l
TEMED	2.5 μ l	2.5 μ l	1.5 μ l
APS	10 μ l	10 μ l	12 μ l

**Amortiguador de electrodo 10X**

Trizma base	5.1 g
Glicina	72.05 g

- Agregar H₂O bidestilada hasta 300 ml
- Ajustar pH 8.3
- Adicionar 25 ml de SDS al 20%
- Aforar a 500 ml con H₂O bidestilada

Solución colorante de Azul de Coomassie

Azul de Coomassie	0.3 g
Metanol absoluto	150 ml
Ácido acético	30 ml

- Aforar a 300 ml con H₂O bidestilada

Solución decolorante A

Metanol absoluto.....	136.2 ml
Ácido acético.....	22.5 ml

- Aforar a 300 ml con H₂O bidestilada

Solución decolorante B

Metanol absoluto.....	30 ml
Ácido acético.....	15 ml

- Aforar a 300 ml con H₂O bidestilada

Nota: las soluciones mencionadas a partir del amortiguador de muestra se almacenan a TA



MARCAJE DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE CON ¹²⁵I-LACTOPEROXIDASA

PBS2X-HCL 0.1N

PBS 10X.....	200µl
H ₂ O.....	800µl
HCl fumante.....	8.3 µl

H₂O₂ 0.03%

PBS10X	100 µl
H ₂ O bidestilada.....	900µl
H ₂ O ₂ (30%)	1µl
H ₂ O ₂ (3%)	10µl

Solución lactoperoxidasa (LPO) 1mg/ml

Lactoperoxidasa.....	1mg
PBS10X	100µl
H ₂ O bidestilada	900µl

KI 0.27 mM

KI(PM 16.60)	4.482mg
PBS10X	10ml
H ₂ O bidestilada	90ml

**0.5 mCi de Na¹²⁵I neutralizado**

0.5 mCi de Na ¹²⁵ I	1 volumen
PBS1X-HCl 0.1N.....	1 volumen

Buffer para solubilización (Trizma Base)

Trizma base.....	10 mM
Agua bidestilada c.b.p.....	aforo

❖ Ajustar a pH de 8.3

Inhibidores de proteasas

Solución A. N-etil-maleimida (NEM) 10 mM.....	1.25 g
Agua bidestilada.....	100ml

Solución B. Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) 200 mM.....	0.69 g
Isopropanol c.b.p.....	20 ml

**SECADO DE GELES, AUTORRADIOGRAFIA INDIRECTA Y
REVELADO DE PLACAS DE RAYOS X PARA GELES EN LOS QUE
SE SEPARAN PROTEINAS RADIOMARCADAS POR SDS-PAGE .**

Autorradiografía indirecta:

1. Correr electroforéticamente los antígenos radiomarcados como se acostumbra.
2. El gel obtenido se sumergió en Azul de Coomassie 0.1% durante 1 h con suave agitación.



3. Posteriormente se decoloró el gel con una mezcla de H₂O-Metanol-Ácido Acético (5:4:1).
4. Una vez decolorado el gel, se lavó 3 veces con H₂O bidestilada por espacio de 30 min. en agitación, para remover residuos de ácido acético y evitar la fragmentación.
5. Posterior a la hidratación, se sumergió el gel en una solución con glicerol 3%, metanol 30% durante 15-30 min. en agitación suave
6. Inmediatamente se procedió al secado del gel empleando una película para secado (Gel Drying Film, Promega)
7. En un recipiente con agua destilada se sumergió una placa de plástico de dimensiones (15X19.5 cm) y sobre ella fue adherida una hoja (25.5X28 cm) de película para secado.
8. El gel se colocó sobre la hoja ya mencionada y fueron eliminadas todas las burbujas que se presentan sobre el gel.
9. Inmediatamente fue sobrepuesto la película de secado previamente humedecida y encima se coloca el marco de plástico (15X19.5 cm).
10. Para inmovilizar la placa con el gel se colocan pinzas en los extremos hasta el secado del gel. El secado se realizó a TA o cerca de un ventilador.

Para el revelado de las placas:

1. Se colocó el gel seco y una película sobre un cassette a -72°C por espacio de 1-2 hrs.



2. En condiciones de oscuridad o bajo luz con filtro para fotografía, se sumergió la placa en la solución reveladora (revelador y reforzador Kodak GBX ó Kodak Dektol 1:2 en agua) durante 1.5 min.
3. Posteriormente se sumergió en agua por 3 min.
4. Inmediatamente la placa se introduce en solución fijadora (fijador y reforzador Kodak GBX) por espacio de 3 min.
5. Enseguida se enjuagó la placa extensivamente con agua corriente.



ANEXO I: REACTIVOS Y SOLUCIONES COMPLEMENTARIAS

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

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

- ❖ Disolver en agua destilada hasta 800 ml
- ❖ Ajustar el pH de 6.8-6.9 y aforar a 900 ml
- ❖ Filtrar en membrana de 0.22 mm de diámetro de poro
- ❖ Realizar la prueba de esterilidad
- ❖ Completar con 100 ml de suero bovino descomplementado (HyClone) y 1 ml de stock de penicilina (80,000 U.I.), estreptomycin (50mg). Almacenar a 4° C hasta su uso .

Es estable por dos semanas una vez completado.



AMORTIGUADOR DE FOSFATOS-SALINA (PBS) STOCK 10X

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

- ❖ Disolver en agua destilada hasta 800ml
- ❖ Ajustar pH a 7.2 y aforar a 1 litro

Para su uso a 1X disolver 1:10 en agua destilada

Es estable varias semanas

PREPARACION DE COLORANTES FLUOROGÉNICOS (DAF-IP)

Solución Stock de DAF

DAF	10 mg
CH ₃ COCH ₃	1 ml

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

**Solución de trabajo de DAF (40 mg/ml)**

Solución Stock de DAF	40 µl
PBS pH 7.2	10 ml

Solución Stock de IP

IP	1.5 mg
PBS pH 7.2	50 ml

Se almacena a -4 °C en oscuridad

Solución de trabajo de IP

Igual a la solución stock (30mg/ml)

PREPARACIÓN DE (3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENIL BROMURO DE TETRAZOLIO) (MTT)

PMS	5 mg/ml de PBS1X
MTT	0.05% en PBS 1X

SOLUCIÓN PARA EMISIÓN DE CENTELLEO

Para preparar 200 ml de dicha solución:

Orniflúor al 0.4%	0.8 g
Tritón 100X al 30%	60 ml

❖ Se afora con tolueno a 200 ml



PREPARACIÓN DE MEDIO DE LURIA PARA PRUEBA DE ESTERILIDAD

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

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

DETERMINACIÓN DE PROTEINAS CON EL REACTIVO DE FENOL DE FOLIN (METODO DE LOWRY)

Preparar las siguientes soluciones :

Solución A : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5% en H_2O

Solución B : Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N

Solución C: Tartrato de Na y K al 2% en H_2O

Solución D: Mezclar 1 vol. de A con 1 vol. de C

Solución E: Mezclar 50 vol. de B con 1 vol. de D

Reactivo de Folin-Ciocalteu: Diluir 1:2 con H_2O antes de iniciar la técnica.



Curva Estándar : para proteínas en solución o rápidamente solubles en álcali diluido.

Se adiciono 10µl de solución de proteína problema (5-100µg) en un tubo de ensayo

Se procesa con el patrón de albúmina (20, 40, 60, 80 y 100µg/ml) según la siguiente tabla.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Albúmina (1 mg/ml)		5	10	20	40	60	80	100	
H₂O destilada	500	495	490	480	460	440	420	400	490µl
Solución Problema	----	----	----	----	----	----	----	----	10µl
Solución E	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5 ml

- ❖ Se agitó cada tubo y se dejó reposar 10 min. a temperatura ambiente (TA).
- ❖ Posteriormente se adicionó a cada tubo 250 µl de SDS 5%. Enseguida se agitó en el Vortex y se dejó reposar 30 min. a TA
- ❖ Pasado este tiempo, se hizo la lectura a cada tubo a una $\lambda = 750 \text{ nm}$



ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES CON UN GRADIENTE CONTINUO DE ACRILAMIDA (5-15%)

Preparar las siguientes soluciones:

TRIZMA BASE 2M pH 6.8

Trizma base	12.1 g
H ₂ O bidestilada.....	80 ml
Ajustar pH 6.8 con HCl 12 N ó CH ₃ COOH	
H ₂ O bidestilada c.b.p.....	100 ml

TRIZMA BASE 2M pH 8.8

Trizma base	12.1 g
H ₂ O bidestilada.....	80 ml
Ajustar pH 8.8 con HCl 12 N ó CH ₃ COOH	
H ₂ O bidestilada c.b.p.....	100 ml

Solución de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 20%

SDS.....	10 g
H ₂ O bidestilada.....	40 ml
❖ Disolver en agitación suave	
H ₂ O bidestilada.....	50 ml

**AMORTIGUADOR DE GEL CONCENTRADOR (BGC 8X)**

Trizma base 2M, pH 6.8.....	50 ml
SDS 20%.....	4 ml
H ₂ O bidestilada.....	100 ml

AMORTIGUADOR DE GEL RESOLVEDOR (BGE 5X)

Trizma base 2M, pH 8.8.....	187.5 ml
SDS 20%.....	5 ml
H ₂ O bidestilada c.b.p.....	200 ml

SOLUCION ACRILAMIDA-BISACRILAMIDA-GLICEROL (ABG)

Acrilamida	60 g
N,N'-metilen-bisacrilamida.....	1.6g
H ₂ O bidestilada c.b.p.....	80 ml
Glicerol	60 ml
H ₂ O bidestilada c.b.p.....	200 ml

❖ Filtrar en Millipore o Whatman No.1

Nota: Se debe manejar con precaución (neurotóxica). Todas las soluciones deben almacenarse a 4 °C excepto el APS a -72 °C y el SDS 20% a TA

SOLUCION APS: persulfato de amonio 10% en H₂O bidestilada .

AMORTIGUADOR DE MUESTRA (Para geles con gradiente continuo o de concentración constante de acrilamida)



	2X	5X
Trizma base 2M, pH 6.8	312 µl	780 µl
SDS 20%	1 ml	2.5 ml
Glicerol	388 µl	970 µl
Colorante(Azul de bromofenol o pironina Y)	0.00002% (c.f.)	0.00002% (c.f.)
H ₂ O bidestilada c.b.p	5 ml	5 ml

Preparar geles grandes de acuerdo con el siguiente formato:

	GEL RESOLVEDOR (30ml)		GEL CONCENTRADOR 10 ml
	5%	15%	
BGE 5X	3.4 ml	3.4 ml	-----
BGC 8X	--	---	1.25 ml
H ₂ O bidestilada	10.85 ml	5.15 ml	7.085 ml
ABG	2.85 ml	8.55 ml	1.66 ml
TEMED	4 µl	4 µl	5µl
APS	17 µl	17 µl	50 µl

Preparar geles pequeños de acuerdo al siguiente formato:

	GEL RESOLVEDOR		GEL CONCENTRADOR
	5%	15%	
BGE5X	940µl	940µl	-----
BGC8X	-----	-----	250µl
H ₂ O bidestilada	3.15 ml	1.43 ml	1.41ml
ABG	695µl	2.375 ml	330µl
TEMED	2.5µl	2.5µl	1.5µl
APS	10µl	10µl	12µl

**Amortiguador de electrodo 10X**

Trizma base	5.1 g
Glicina	72.05 g

- Agregar H₂O bidestilada hasta 300 ml
- Ajustar pH 8.3
- Adicionar 25 ml de SDS al 20%
- Aforar a 500 ml con H₂O bidestilada

Solución colorante de Azul de Coomassie

Azul de Coomassie	0.3 g
Metanol absoluto	150 ml
Ácido acético	30 ml

- Aforar a 300 ml con H₂O bidestilada

Solución decolorante A

Metanol absoluto.....	136.2 ml
Ácido acético.....	22.5 ml

- Aforar a 300 ml con H₂O bidestilada

Solución decolorante B

Metanol absoluto.....	30 ml
Ácido acético.....	15 ml

- Aforar a 300 ml con H₂O bidestilada

Nota: las soluciones mencionadas a partir del amortiguador de muestra se almacenan a TA



MARCAJE DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE CON ¹²⁵I-LACTOPEROXIDASA

PBS2X-HCL 0.1N

PBS 10X.....	200µl
H ₂ O.....	800µl
HCl fumante.....	8.3 µl

H₂O₂ 0.03%

PBS10X	100 µl
H ₂ O bidestilada.....	900µl
H ₂ O ₂ (30%)	1µl
H ₂ O ₂ (3%)	10µl

Solución lactoperoxidasa (LPO) 1mg/ml

Lactoperoxidasa.....	1mg
PBS10X	100µl
H ₂ O bidestilada	900µl

KI 0.27 mM

KI(PM 16.60)	4.482mg
PBS10X	10ml
H ₂ O bidestilada	90ml

**0.5 mCi de Na¹²⁵I neutralizado**

0.5 mCi de Na ¹²⁵ I	1 volumen
PBS1X-HCl 0.1N.....	1 volumen

Buffer para solubilización (Trizma Base)

Trizma base.....	10 mM
Agua bidestilada c.b.p.....	aforo

❖ Ajustar a pH de 8.3

Inhibidores de proteasas

Solución A. N-etil-maleimida (NEM) 10 mM.....	1.25 g
Agua bidestilada.....	100ml

Solución B. Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) 200 mM.....	0.69 g
Isopropanol c.b.p.....	20 ml

**SECADO DE GELES, AUTORRADIOGRAFIA INDIRECTA Y
REVELADO DE PLACAS DE RAYOS X PARA GELES EN LOS QUE
SE SEPARAN PROTEINAS RADIOMARCADAS POR SDS-PAGE .**

Autorradiografía indirecta:

1. Correr electroforéticamente los antígenos radiomarcados como se acostumbra.
2. El gel obtenido se sumergió en Azul de Coomassie 0.1% durante 1 h con suave agitación.



3. Posteriormente se decoloró el gel con una mezcla de H₂O-Metanol-Ácido Acético (5:4:1).
4. Una vez decolorado el gel, se lavó 3 veces con H₂O bidestilada por espacio de 30 min. en agitación, para remover residuos de ácido acético y evitar la fragmentación.
5. Posterior a la hidratación, se sumergió el gel en una solución con glicerol 3%, metanol 30% durante 15-30 min. en agitación suave
6. Inmediatamente se procedió al secado del gel empleando una película para secado (Gel Drying Film, Promega)
7. En un recipiente con agua destilada se sumergió una placa de plástico de dimensiones (15X19.5 cm) y sobre ella fue adherida una hoja (25.5X28 cm) de película para secado.
8. El gel se colocó sobre la hoja ya mencionada y fueron eliminadas todas las burbujas que se presentan sobre el gel.
9. Inmediatamente fue sobrepuesto la película de secado previamente humedecida y encima se coloca el marco de plástico (15X19.5 cm).
10. Para inmovilizar la placa con el gel se colocan pinzas en los extremos hasta el secado del gel. El secado se realizó a TA o cerca de un ventilador.

Para el revelado de las placas:

1. Se colocó el gel seco y una película sobre un cassette a -72 °C por espacio de 1-2 hrs.



2. En condiciones de oscuridad o bajo luz con filtro para fotografía, se sumergió la placa en la solución reveladora (revelador y reforzador Kodak GBX ó Kodak Dektol 1:2 en agua) durante 1.5 min.
3. Posteriormente se sumergió en agua por 3 min.
4. Inmediatamente la placa se introduce en solución fijadora (fijador y reforzador Kodak GBX) por espacio de 3 min.
5. Enseguida se enjuagó la placa extensivamente con agua corriente.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Abbaszadegan M., Gerba C.P. and Rose J.B. (1991).** Detection of *Giardia* cyst with a cDNA probe and applications to water samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 927-931.
2. **Adam R.D. (1991).** The biology of *Giardia spp.* *Microbiological Reviews* , 55(4) : 706-732.
3. **Adam R.D., Nash T.E. and Wellems T.E. (1988).**The *Giardia lamblia* trophozoite contains sets of closely related chromosomes. *Nucleic Acids Research*, 16:4555-4567.
4. **Adam R.D., Aggarwal A., Lal A.A., De la Cruz V.F., McCutchan T., Nash T.E. (1988).** Antigenic variation of a cystein rich protein in *Giardia lamblia*. *The Journal of Experimental Medicine*, 167:109-18.
5. **Aggarwal A., Nash T.E.(1988).** Antigenic variation of *Giardia lamblia in vivo*. *Infection and Immunity*, 56:1420-3.
6. **Al-Waili N.S., Al-Waili B.H. y Salmo K.Y. (1988).** Therapeutic use of mebendazole in giardial infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82: 438.
7. **Angeles A.E. (2001).** Comunicación Personal.
8. **Argüello-García R. (1991).** Aislamiento y caracterización de antígenos relevantes del protozoario parásito *Giardia lamblia*. Tesis UNAM, México.
9. **Baum K.F., Berens R.L., Jones R.H. and Marr J.J.(1988).** A new method for cloning *Giardia lamblia*, with a discussion of the statistical considerations of limiting dilution. *Journal of Parasitology*, 74(2):267-269.
10. **Baveja U.K., Jyoti A.S., Kaur M., Aggarwal D.S., Anand B.S. and Nanda R. (1986).** Isoenzyme studies of *Giardia lamblia* isolated from symptomatic cases. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 64: 119-126.
11. **Bernarder R., Palm J.E. and Svard S.G. (2001).** Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cellular Microbiology*, 3(1):55-62.
12. **Bertram M.A., Meyer E.A., Lile J.D. and Morse S.A. (1983).** Comparison of isoenzymes of five axenic *Giardia* isolates. *Journal of Parasitology*, 69: 793-801.
13. **Bienz M., Wittwer P., Zimmermann V. and Muller N. (2001).** Molecular characterisation of a predominant antigenic region of *Giardia lamblia* variant surface protein H7. *International Journal of Parasitology* 31(8):827-32
14. **Bingham A.K., Jarrol E.L. Jr., Meyer E.A. and Radulescu S. (1979)** Induction of *Giardia* excystation and the effect of temperature on cyst viability as compared by eosin-exclusion and *in vitro* excystation. *En Waterbone*



- Transaction and Transmission of giardiasis. Edited by Jakubowski W., and Hoff J.C., U.S. Environmental Protection Agency, Ohio: 217-226.
15. **Blaser, M.J., Smith P.D., Ravdin J.I., Greenberg H.B. and Guerrant R.I. (1995).** Infections of the Gastrointestinal Tract. Raven Press. Ltd., New York Cap. 71:1081-1105.
 16. **Boreham P.F.L., Smith N.C. and Shepherd R. W. (1988).** Drug resistance and treatment of giardiasis. Advances in *Giardia* Research, P.M. Wallis & B.R. Hammond (eds). University of Calgary Press, Calgary: 3-7.
 17. **Boreham P.F.L., Phillips R.E. and Shepherd R.W. (1987).** Heterogeneity in the responses of clones of *Giardia intestinalis* to anti-giardial drugs. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 81: 406-407.
 18. **Boreham, P.F.L., Phillips, RE. and Shepherd R.W. (1984).** The sensitivity of *Giardia intestinalis* to drugs *in vitro*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 14: 449-461.
 19. **Britz M.L. and Wilkinson R.G. (1979).** Isolation and properties of metronidazole- resistant mutants of *Bacteroides fragilis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 16: 19-27
 20. **Brown D.M., Upcroft J.A. and Upcroft P.(1985).** Free radical detoxification in *Giardia duodenalis*. Molecular and Biochemical Parasitology, 72: 47-56.
 21. **Bryan R.T, Pinner R.W. and Berkelman R.L.(1994)** Emerging infectious diseases in the United states improved surveillance a requisite for prevention. Ann. N.Y. Academy Science. 740: 346-361
 22. **Butcher P.D., Cevallos A.M., Carnaby S., Alstead E.M., Swarbrick E.T. and Farthing M.J.G. (1994).** Phenotypic and genotypic variation in *Giardia lamblia* isolates during chronic infection. Gut, 35: 51-54.
 23. **Cacopardo B., Patania I., Bonacorso V., Di Paola O., Bonforte S. and Brancati G.(1995).** Efficacia sinergica dell'associazione albendazole-metronidazolo nella giardiasi refrattaria a monoterapia con metronidazolo. La Clinica Terapeutica, 146: 761-767.
 24. **Campbell S.R., Van Keulen H., Erlandsen S.L., Senturia J.B. and Jarroll E.L. (1990)** *Giardia spp.* Comparison of electrophoresis karyotypes. Experimental Parasitology, 71: 470-482.
 25. **Chacón R.A., Chio M.W. and Sosa C.E.C. (1991)** Eficacia de la furazolidona, metronidazol y secnidazol en el tratamiento de la giardiasis en niños. En. Compendium. Laboratorios Columbia, II (2).



26. **Chavéz B., Cedillo R.R. and Martínez P.A. (1992).** *Giardia lamblia*: ultrastructural study of the *in vitro* effect of benzimidazoles. *Journal of Protozoology*, 39 (4):510-515.
27. **Craun G.F. (1996).** Waterborne outbreaks of giardiasis: current status, p. 243-261. In S L. Erlandsen and E.A. Meyer (ed.), *Giardia and giardiasis: biology, pathogenesis and epidemiology*. Plenum Press, New York, N.Y.
28. **Crouch A.A., Seow W.K. and Thong Y.H. (1986).** Effect of twenty-three chemotherapeutic agents on the adherence and growth of *Giardia lamblia in vitro*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80:893-896.
29. **Crouch A.A., Seow W.K., Whitman L.M. and Thong H.Y. (1990).** Sensitivity *in vitro* of *G. intestinalis* to dyadic combinations of azytromycin doxycycline, mefloquine, tinidazole and furazolidone. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84:246-248.
30. **Cruz M. (1998).** Caracterización parcial de mecanismos de resistencia a benzimidazoles en trofozoítos de *Giardia duodenalis*. Tesis de Maestría en Ciencias. CINVESTAV-IPN.
31. **Coello P.(1981).** Giardiasis. *Revista Médica del IMSS (México)*19 (2):243.
32. **Daniel W.W.(1995).** Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Primera edición. Ed. Limusa, México: 345-360, 367-369, 467-477.
33. **Davidson RA. (1984).** Issues in clinical parasitology: the treatment of Giardiasis. *American Journal of Gastroenterology*, 79:256-261.
34. **De Jonckheere J.F., Majewska A.C. and Kasprzak W. (1990)** *Giardia* isolates from primates and rodents display the same molecular polymorphism as human isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 39:23-29.
35. **De Regnier D.P., Cole L., Schupp D.G. y Erlandsen S. L. (1989).** Viability of *Giardia* cysts suspended in lake, river and tap water. *Applied and Environmental Microbiology*, 55:1223-1229.
36. **Desjardins y Trenholme .(1992).** Antimalarial Chemotherapy.
37. **Dias Filho B.P., Andrade A.F., de Souza W., Esteves M.J. Angluster J.(1992).** Cell Surface saccharide differences in drug-susceptible and drug-resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. *Microbios*, 71(286):55-64.
38. **Diamond L.S., Harlow D. and Cunnick C.C.(1978).** A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.*, 4: 431-432.
39. **Doiz O., Clavel A., Morales S., Varea M., Castillo F.J., Rubio C. and Gomez-Lus R. (2000).** *Folia Parasitology (Praha)*, 47(4): 330-1



40. **Erlandsen S.L., Bemrick W.J., Wells C.L., Feely D.E., Knudsen L., Campbell S.R., Van Keulen H. y Jarroll E.L.(1990).** Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great heron (*Ardeae herodias*). *Journal of Parasitology*, 76: 717-724.
41. **Erlandsen S.L. and Bemrick W.J. (1987).** SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. *Journal of Parasitology*, 73:623-629.
42. **Erlandsen S.L. and Feely D.E. (1984).** Trophozoite motility and the mechanism of attachment, p. 33-63. In S.L. Erlandsen y E.A. Meyer (ed.9) *Giardia* and Giardiasis: biology, pathogenesis and epidemiology. Plenum Press, New York.
43. **Farthing M.J.G.(1992)** *Giardia* comes of age: progress in epidemiology, immunology and chemotherapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 30:563-566.
44. **Farthing M.J.G. (1995).** Giardiasis. *Gastroenterology. Clinics of North American*. 25: 493-515.
45. **Faubert G.M., Bemrick W.J. and Erlandsen S.L.(1988).** Is Giardiasis a true zoonosis? (Debate). *Parasitology Today*, 4 :66-71.
46. **Ferguson L.R. and Denny W.A.(1991).** The genetic toxicity of acridines. *Mutation Research*, 258: 123-60.
47. **Filice F.P.(1952).** Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *University of California Publications in Zoology*, 57:53-143.
48. **Finegold S.M.(1980).** Metronidazole. *Annals of Internal Medicine*, 93:585-587.
49. **Ganguly N.K. and Mahajan R.C.(1981).** Comparative evaluation of indirect haemagglutination and immunofluoresce tests in sero-diagnosis of giardiasis. *The Indian Journal of Medical Research*, 73 (suppl.):111-113.
50. **García, LS.(1992).** Giardiasis. *Biochemistry Molecular Biology and Genetics*. Chapter 10:193-202.
51. **Gardner T.B. and Hill D.R. (2001).** Treatment of giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(1):114-28.
52. **Gascon J., Moreno A., Valls M.E., Miro J.M. and Corachan M. (1989).** Failure of mebendazole treatment in *Giardia lamblia* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83: 647.
53. **Gillin F.D. and Reiner D.S. (1982).** Effects of oxygen tension and reducing agents on sensitivity of *Giardia lamblia* to metronidazole *in vitro*. *Biochemical Pharmacology*, 31(22): 3694-7.
54. **Gillin F.D. and Diamond L.S. (1981).** *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* growth responses to reducing agents. *Experimental Parasitology*, 51:382-391.



55. **Goodman A.G. and Theodore W.A. (1990).** The pharmacological basis of therapeutics. 9ed. Editorial Pergamon Press.:999-1000.
56. **Hall A. and Nahar Q.(1983).** Albendazole as a treatment for infections with *Giardia intestinalis* in children in Bangladesh. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 87:84-86.
57. **Hill, DR., Polh R., and Pearson RD. (1986).** *Giardia lamblia*: a culture method for determining parasite viability. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 35(6): 1129-1133.
58. **Holberton D.V., Baker D.A. and Marshall J. (1988)** Segmented alpha-helical coiled-coil structure of the protein giardin from the *Giardia* cytoskeleton. Journal of Molecular Biology, 204: 789-795.
59. **Inge P.M. and Farthing J.G. (1987).** A radiometric assay for anti-giardial drugs. Transactions of Royal Society Of Tropical Medicine and Hygiene, 81: 345-347.
60. **Ings R.M.J., McFadzean J.A. and Ormerod W.E.(1974).** The mode of action of metronidazole in *Trichomonas vaginalis* and other micro-organisms. Biochemical Pharmacology, 23:1421-1429.
61. **Jaeger A., Sauder P., Kopferschmitt J. and Flesch F.(1987).** Clinical features and management of poisoning due to antimalarial drugs. Medical Toxicology and Adverse Drug Experience, 2(4):242-73.
62. **Janoff E.N., Craft J.C., Pickering L.K., Novotny T., Blaser M.J., Knisley C.V. and Reller L.B. (1989).** Diagnosis of *Giardia lamblia* infections band detection of parasite-specific antigens. Journal of Clinical Microbiology, 27(3):431-435.
63. **Jaroll E.L, Bingham A.K. and Meyer E.A. (1981).** Effect of chlorine on *Giardia lamblia* cyst viability. Applied and Environmental Microbiology, 41:483-487.
64. **Jokipii L. and Jokipii A.M.M. (1979).** Single-dose metronidazole and tinidazole as therapy for giardiasis : success rates, side effects and drug absorption and elimination. Journal of Infectious Diseases, 140:984-988.
65. **Jokipii L. and Jokipii A.M.M. (1982).** Treatment of Giardiasis: comparative evaluation of ornidazole and tinidazole as a single oral dose. Gastroenterology, 83:399-404.
66. **Kamath K.R. and Murugasu R. (1974).** A comparative study of four methods for detecting *Giardia lamblia* in children with diarrheal disease and malabsorption. Gastroenterology, 66:16-21.
67. **Keister D.B. (1983).** Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 72:431-432.



68. **Kelly J.D. and Hall C.A. (1979).** Resistance of animal helminths to antihelmintics. *Advanced Pharmacology Chemotherapy*, 16:89-128.
69. **Knight R. (1980).** Epidemiology and transmission of Giardiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(4):433-436.
70. **Kramer M.H., Herwaldt B.L., Craun G.F., Calderon R.L. and Juranek D.D. (1996)** Surveillance for waterborne disease outbreaks United states 1993-1994 *Morbid Mortal Weekly Rep* 45:1-33.
71. **Lambl W. (1859).** Mikroskopische untersuchungen der darmexcrete. *Vierteljahrsschrift für die.Praktische heilkunde*, 61:1-58.
72. **Leonhardt U., Ebert R., Bommer W. and Schauer A. (1992)** Diagnostic and therapeutic problems in *lamblia* infections. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 117839. 96-100.
73. **Li, R.K. and Rinaldi, M.G. (1999).** *In vitro* antifungal activity of Nykomycin Z in combination with fluconazole or itraconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 6:1401-1405.
74. **Majewska A.C., Kasprzak W., DeJoneckeere J.F. and Kaczmarek E. (1991).** Heterogeneity in the sensitivity of stocks and clones of *Giardia* to metronidazole and ornidazole. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.*, 85: 67-69.
75. **Marchalonis, J.J. (1969).** An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. *Biochemical Journal*, 113: 299-305.
76. **Mc Intyre P., Boreham P.F.L., Phillips R.E. and Shepherd R.W. (1986).** Chemotherapy in giardiasis: clinical responses and *in vitro* drug sensitivity of human isolates in axenic culture. *Journal of Pediatrics*, 108: 1005-1010.
77. **Medelson R.M.(1980).** The treatment of giardiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74: 438-439.
78. **Meloni B.P., Lymbery A.J. and Thompson R.C.A.(1989).**Characterization of *Giardia* isolates using a non-radiolabeled DNA probe, and correlation with the results of isoenzyme analysis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 40: 629-637.
79. **Meloni B.P., Lymbery A.J. and Thompson R.C.A. (1988).** Isoenzyme electrophoresis of 30 isolates of *Giardia* from humans and felines. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 38:65-73.
80. **Meloni B.P., Thompson R.C.A., Reynoldson J.A. and Seville P. (1990).** Albendazole: a more effective anti giardial agent *in vitro* than metronidazole or tinidazole. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84: 375-379.



81. **Meyer E.A.(1990).** Human Parasitic Diseases. Vol. III Giardiasis. Elsevier Amsterdam-New York Oxford.
82. **Meyer E.A. (1976).** *Giardia lamblia* isolation and axenic cultivation. *Experimental Parasitology*, 39: 101-105.
83. **Miotti P.G., Gilman R.H., Santosham M., Randder R.W. and Yolken R.H.(1986).** Age-related rate of seropositivity of antibody to *Giardia lamblia* in four diverse populations. *Journal of Clinical Microbiology*, 24:972-975.
84. **Molina N.** Determinación de la eficacia y actividad *in vitro* de derivados del 5-nitrofurano en trofozoitos de *Giardia duodenalis*. FESC-UNAM (en proceso).
85. **Mosmann T. (1983).** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63.
86. **Nash T.E. and Keister D.B.(1985).** Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of *Giardia*. *Journal of Infectious Diseases*, 152 (6):1166-1171
87. **Nash T.E., Aggarwal A., Adam R.D., Conrad J.T. and Merrit J.W. Jr.(1988).** Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Journal of Immunology*, 15; 141(2):636-41.
88. **Nash T.E., Herrington D.A., Levine M.M., Conrad J.T. and Merrit J.W.(1990).** Antigenic variation of *Giardia lamblia* in experimental human infections. *Journal of Immunology*, 144: 4362-4369.
89. **Nash T.E., Ohl C. A., Thomas E. Subramanian G., Keiser P. and Moore T.A. (2001).** Treatment of patients with refractory Giardiasis. *Clinical Infectious Diseases*, 33:22-28.
90. **Nash, T. (1992).** Surface antigen variability and variation in *Giardia lamblia*. *Parasitology Today* , 8: 229-243.
91. **Newman M.S. (1987).** Concerning steric effects in antimalarials agents. *Drug Design and Delivery*, 1(4): 307-12.
92. **Ni Kaido H. (1994).** Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers an active efflux. *Science*, 264: 382-388.
93. **Olson M.E., Ceri H. and Morck D.W. (2000).** *Parasitol Today*, 16: 213-217.
94. **Ortega-Pierres M.G., Lascaráin R., Argüello- García R., Coral-Vázquez R., Acosta G. and Santos, J.I. (1988)** . The response of humans to antigens of *Giardia lamblia*. . *Advances in Giardia Research*: 177-180.
95. **Pérez A., Argüello R. and Ortega M.G. (1990).** Estudios sobre el ciclo celular de *Giardia lamblia*. Identificación de subpoblaciones de trofozoítos con características diferenciales en cultivos axénicos. *Memorias del XVIII*



- Congreso Nacional . Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. San Luis Potosí, S.L.P.: 172
96. **Rendtorff R.C. (1954).** The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. American Journal of Hygiene, 59:209-220.
 97. **Romero L.(1996).** Determinación de la eficacia y actividad biológica *in vitro* de fármacos de la familia de los 5-nitroimidazoles ante el protozooario *Giardia duodenalis*. Caracterización parcial de la resistencia a drogas en este parásito. Tesis Licenciatura UNAM. Cuautitlán Izcalli.
 98. **Schupp D.G. and Erlandsen S.L (1987).** A new method to determine *Giardia* cyst viability: correlation of fluorescein diacetate and propidium iodide staining with animal infectivity. Applied and Environmental Microbiology, 53(4): 704-707.
 99. **Slater A.F.G. (1993)** Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. Pharmacology and Therapeutics, 57:203-235.
 100. **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.
 101. **Sogin M.L., Gunderson J.H., Elwood H.J., Alonso R.A. and Peattie D.A. (1988).** Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. Science, 243:75-77
 102. **Speelman P.(1985).** Single dose tinidazole for the treatment of giardiasis. Agents Chemotherapeutics, 27:227-229
 103. **Steck E.A.(1972).** The Chemotherapy of Protozoan Diseases, Vol. III, Section 4. Walter Reed Army Institute of Research, Washington.
 104. **Steven M., Townson H.L. and Upcroft P.(1992).** Induction of metronidazole and furazolidone resistance in *Giardia*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 86:521-522.
 105. **Sullivan P.B., Marsh M.N., Phillips M.B., Dewit O., Neale G., Cevallos A.M., Yamson P. y Farthing M.J.G. (1991).** Prevalence and treatment of giardiasis in chronic diarrhoea and malnutrition. Archives of Disease in Childhood, 60:304-306.
 106. **Tay J., Salazar S. and de Haro I. (1978).** Frecuencia de las Protozoosis en México. Salud Publica de México XX:297-337.
 107. **Thompson P.E. and Werbel L.M. (1972).** Antimalarials Agents. Academic Press, New York.



108. **Thompson R.C.A. (2000).** Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *International Journal of Parasitology*, 30(12-13):1259-1267.
109. **Thompson R.C.A. and Reynoldson J.A.(1994).** *Giardia* y giardiasis. *Advances in Parasitology* 32:71-160. Academic Press, Gran Bretaña.
110. **Thompson R.C.A., Reynoldson J.A. and Mendis A.H.W. (1993).** *Giardia* and giardiasis. *Advances in Parasitology*, 32:70-160.
111. **Upcroft J.A., Upcroft P. and Boreham P.F.(1990).** Drug resistance in *Giardia intestinalis*. *International Journal of Parasitology*, 20(4): 489-496.
112. **Upcroft J.A., Boreham P.F.L. and Upcroft P.(1989).** Molecular mechanisms of drug resistance in *Giardia intestinalis*. *Immunological and Molecular Basis of Pathogenesis in parasitic diseases*. Ed. R.C. Ko. University of Hong Kong, Hong Kong: 141-153.
113. **Upcroft J.A., Campbell, R.W. and Upcroft P. (1996)** Quinacrine-resistant *Giardia duodenalis*. *Parasitology*. 112: 309-313.
114. **Upcroft J.A., Healy A., Murray D.G., Boreham P.F.L. and Upcroft P. (1991).** A gene associate with cell division and drug resistance in *Giardia duodenalis*. *Parasitology*, 32:71-160.
115. **Upcroft J.A. and Upcroft P. (1994).** Multiple drug resistance in the pathogenic protozoa. *Acta Tropica*, 56: 195-212.
116. **Vinayak V.K., Jain P. and Naik S.R. (1978).** Demonstration of antibodies in giardiasis using the immunodiffusion technique with *Giardia* cyst as antigen. *Annual Tropical Medicine Parasitology*, 72:581.
117. **Wainwright M. (2001).** Acridine-a neglected antibacterial chromophore. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47: 1-13.
118. **Warren K.S. (1988).** The biology of parasitism: a molecular and immunological approach, New York: 3-12
119. **Warhurst D.C. and Thomas, S.C. (1975).** Localisation of mepacrine in *Plasmodium berghei* and *Plasmodium falciparum* by fluorescence microscopy. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 69, 417-20.
120. **Warhurst D.C. (1986).** Antimalarial drugs: mode of action and resistance. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, Suppl. B:51-9.
121. **Webster R.V., Craig J.C., Shyamala V., Kirby G.C. and Warhurst D.C. (1991).** Antimalarial activity of optical isomers of quinacrine dihydrochloride against chloroquine-sensitive and resistant *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Biochemical Pharmacology*, 42 (Suppl): S225-S227



122. **Wiesehahn G.P., Jarroll E.L., Lindmark D.G., Meander E.A. and Hallick L.M. (1984).** *Giardia lamblia*: autoradiographic analysis of nuclear replication. *Experimental Parasitology*, 58: 94-100.
123. **Wolfe M.S.(1984).** Symptomatology, diagnosis and treatment. En: *Giardia* and *Giardiasis: Biology, Pathogenesis and Epidemiology* Erlandsen S.L. y Meyer E.A. (eds.) Plenum Press, New York: 147-161.
124. **Wright S.G.(1977).** Fluorescent antibody studies in giardiasis. *Abstract.Gut*, 18:986.
125. **Wright S.G. (1980).** Giardiasis and malabsorption. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(4):436-437.
126. **Wright W., Melani I., Phillipson J. and Warhurst C.(1992).** Determination of anti-giardial activity *in vitro* by means of soluble formazan production. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86: 517-519.
127. **Zidovetzki R., Sherman I.M., Atiya A., De Boeck H. (1989).** A nuclear magnetic resonance study of the interactions of the antimalarials chloroquine, quinacrine, quinine and mefloquine with dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 35(3): 199-207.