UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFECTO DE PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS SOBRE LOS TROFOZOITOS DE *Giardia lamblia*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

Yanet Martínez Padilla

MÉXICO, D.F. **2013**

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	**Profesor: Q.F.B. Abel Gutiérrez Ramos**
VOCAL:	**Profesor: Dr. Abraham Landa Piedra**
SECRETARIO:	**Profesor: Q.F.B. Eduardo Bonilla Espinosa**
1er. SUPLENTE:	**Profesor: Dra. Ruth Edith Martín Fuentes**
2° SUPLENTE:	**Profesor: Q.F.B José Cordero Hernández**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DE *Taenia solium*, FACULTAD DE MEDICINA UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

_____

Dr. Abraham Landa Piedra

SUSTENTANTE:

_____

Yanet Martínez Padilla

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS SE REALIZÒ EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE *Taenia solium* DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICIA, UNAM. BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA. ESTE TRABAJO DE INVESTIGACION FUE APOYADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÌA (CONACyT) CON LOS CONTRATOS 80134-M y 176925, (DESARROLLO DE FÁRMACOS BIOLÓGICOS CONTRA LA *Taenia solium*). LA ALUMNA YANET MATÍNEZ PADILLA RECIBIÒ BECA DEL PROYECTO (CONACyT 80134M CON NÚMERO DE BECARIO 14956).

INDICE

RESUMEN……... 6

1.- INTRODUCCION

1.1 *Giardia lamblia*……. 6

1.2 Epidemiologìa……... 8

1.3 Diagnóstico…….. 9

1.4 Tratamiento…….. 10

1.5 Péptidos antimicrobianos…….. 10

1.6 Clasificación de péptidos antimicrobianos…….. 11

1.7 Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos……. 12

2.-HIPOTESIS…… 17

3.- OBJETIVOS…… 18

4.1 MATERIALES Y METODOS

4.2 Estrategia experimental…… 19

4.3 Material biológico…… 20

4.2 Reactivos……. 20

4.3 Modelo experimental

4.3.1 Cultivo de cepas……. 21

4.3.2 Curvas de crecimiento…….. 21

4.3.3 Ensayos de péptidos *In vitro*……. 22

4.3.4 Ensayos de microscopía electrónica…….. 22

5.- **RESULTADOS**……. 23

6.- **DISCUSÌON**…….. 31

7.- **CONCLUSIONES**……. 34

8.- **REFERENCIAS**……... 35

RESUMEN

Giardia lamblia es un parásito protozoario que infecta al humano, se aloja en el intestino delgado y causa la giardiasis, una enfermedad caracterizada por diarrea y síndrome de mala absorción. Presenta una distribución mundial con mayor incidencia en las regiones tropicales y subtropicales, su infección puede transmitirse por agua contaminada con quistes, así como de persona a persona en grupos con deficiente higiene. Existen varios tratamientos para la giardiasis, siendo el metronidazol la primera elección, aunque también se utilizan el albendazol y el mebendazol.

Una propuesta para el tratamiento de la giardiasis son los péptidos antimicrobianos. Estos péptidos son secretados por células epiteliales y leucocitos como los macrófagos y neutrófilos en mamíferos, poseen propiedades quimiotácticas, modulan el sistema inmune y son un puente entre la inmunidad innata y la adaptativa. Se clasifican de acuerdo a su tamaño, conformación estructural, ubicación de sus puentes disulfuro, tipo de aminoácidos, carga e hidrofobicidad. Su papel principal es causar daño a los organismos por medio de su unión a membranas y la lisis de los mismos.

Nosotros evaluamos el efecto de varios péptidos en cultivo determinando la viabilidad del trofozoito. El péptido Palm-Lys-Lys-NH_2 es un péptido sintético, derivado del ácido palmítico de acuerdo con nuestros resultados, fue el mejor para destruir la membrana de los trofozoitos de *G. lamblia* , según la literatura este péptido es activo en Gram + y algunos hongos.

Para el ensayo con los péptidos implementamos una curva de crecimiento para elegir cantidad de trofozoitos con la que se realizarían todas las curvas de viabilidad con los diferentes péptidos. Se determinó la movilidad y morfología a nivel macroscópico, asimismo también observamos el daño en los trofozoitos a nivel de microscopia electrónica. Los ensayos mostraron que los péptidos Palm-KK y Palm-KGK fueran los más efectivos disminuyendo la viabilidad (mayor a ~80%) y destruyendo a los trofozoitos, lo que sugiere que estos péptidos utilizan el mecanismo de lisis.

INTRODUCCIÒN

La *Giardia lamblia* también conocida como *Giardia intestinalis* o *Giardia duodenalis* es un parásito cosmopolita que causa la giardiasis. Se aloja en el intestino delgado y se multiplica por división binaria, un pH ligeramente alcalino favorece su desarrollo. El ciclo de vida tiene dos fases el trofozoito o forma vegetativa y el quiste, este último es la forma infecciosa. El trofozoito es periforme, mide 12 a 15 µm por 5 a 9 y 1 a 2 de espesor, tiene disco suctor, axostilo, dos núcleos con cromatina central, cuerpo parabasal, vacuolas en el citoplasma, borde y surco paradiscal, ribosomas microtúbulos, endomembranas y depósitos de glucógeno, flagelos y blefaroplastos. El quiste es ovalado y mide aproximadamente 15 µm de longitud y 10 µm de ancho con una morfología ovalada en su citoplasma contiene núcleos, microtubulos, un cuerpo parabasal, vacuolas, axonemas, fragmentos del disco suctor y un cuerpo medio[6].

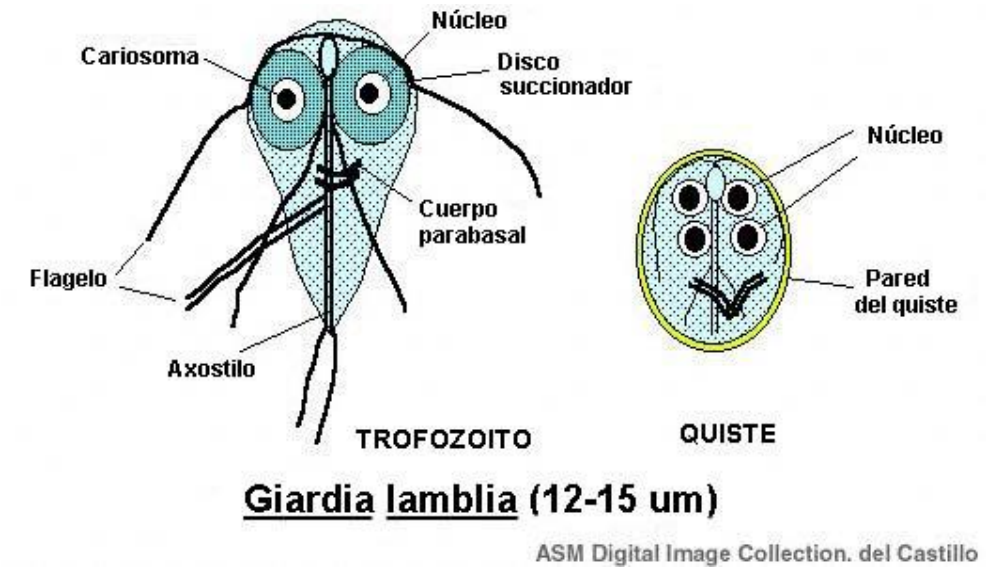


Figura 1. Morfología del trofozoito y quiste de *Giardia lamblia*. Tomado de www. giardiasis-g2.blogspot.com.

Las infecciones por Giardia son causadas por alimentos o agua contaminada, de forma directa por el contacto ano-mano-boca. Como mínimo es necesario ingerir 10 quistes para que la infección se establezca [14]. También puede tomarse en cuenta la contaminación por medio de los animales infectados surgida por la convivencia con éstos [33].

La infección se inicia cuando accidentalmente se ingiere el quiste a su entrada por el tracto digestivo es expuesto al contenido ácido gástrico provocando la ruptura del quiste que se transforma en trofozoitos, estos llegan al intestino delgado donde el pH es favorable, se adhieren al epitelio intestinal y se multiplican por fisión binaria. Los trofozoitos pasan a través del intestino delgado y llegan al colon en donde ocurre el enquistamiento este se produce cuando los trofozoitos entran en contacto con las sales biliares, cuando el quiste se forma sale de la persona infectada por medio de las heces. La mayoría de las infecciones son asintomáticas pero en algunos casos la infección puede cursar con diarrea o síndrome de mala absorción después de un periodo de incubación de aproximadamente de 12-19 días [4,11,14,16,22].

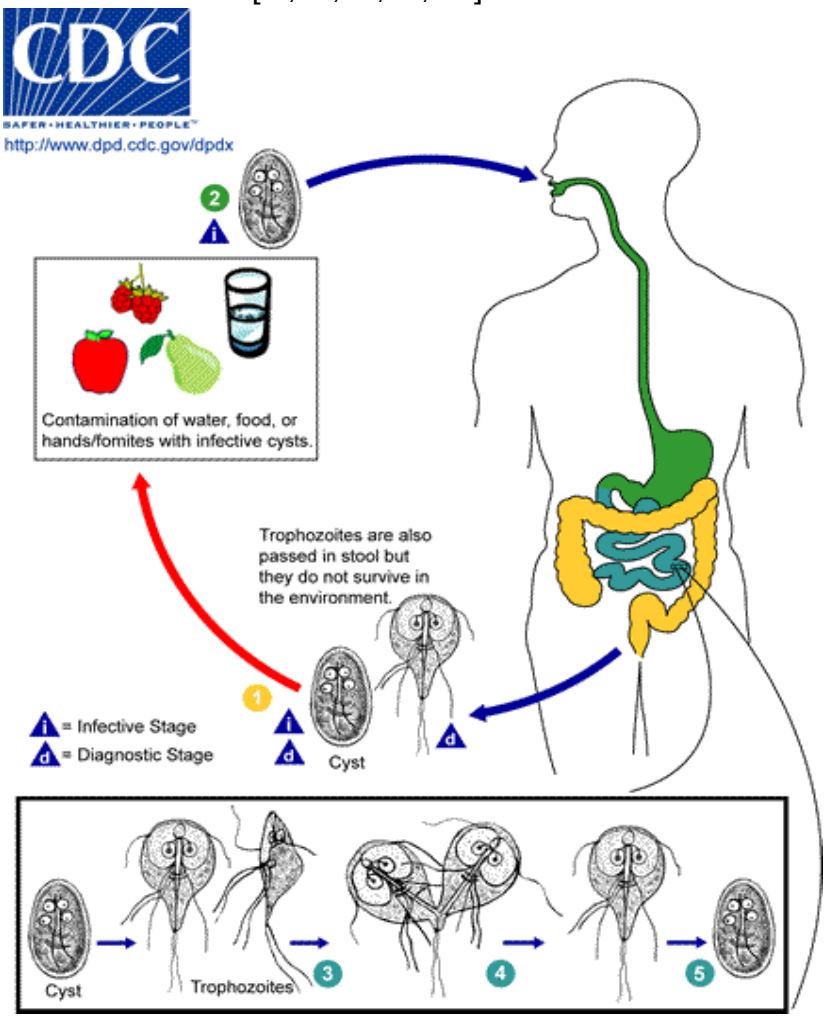


Figura 2. Ciclo de vida de *Giardia lamblia*. El quiste entra en el hospedero pasa por el estómago y continua hasta el intestino delgado, donde se transforma en trofozoitos, se divide y pasa al colon donde se enquista. Los quistes salen del hospedero en las heces (tomada de www.cdc.gov/parasites/giardia).

Epidemiología

Anton Van Leeuwenhoek fue el primero en observar un trofozoito de *Giardia* en 1681, analizando al microscopio sus propias heces diarreicas. Sus observaciones fueron retomadas más tarde por Brian J. Ford [57]. La distribución mundial de *Giardia lamblia* tiene mayor prevalencia en las regiones con clima tropical. Se estima que alrededor de 200 millones personas presentan la enfermedad en Asia, Africa y Latinoamérica, cada año aumentan a 500,000 los casos nuevos [14, 38, 52]. En México se calcula que hay 9 millones de personas parasitadas por *Giardia*. Según algunos reportes la infección depende de factores como la edad, aproximadamente solo 2% de los adultos están infectados mientras que en los niños de 1-5 años las cifras fluctúan entre 4-42%[41].

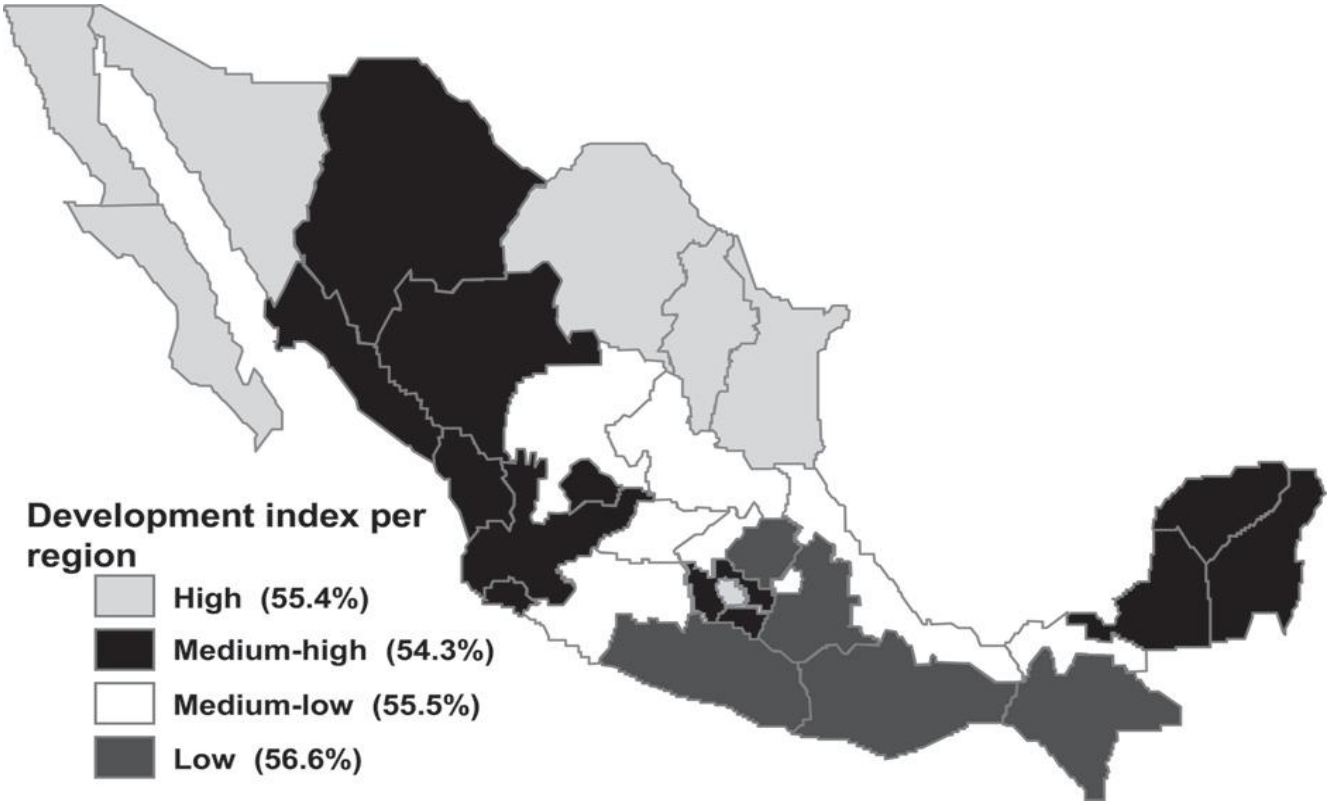


Figure 3. Seroprevalencia de *Giardia lamblia* basada en la clasificación regional de desarrollo económico [41].

Diagnóstico.

El diagnóstico de la giardiasis debe ser considerado en pacientes con diarrea aguda, persistente especialmente si se trata de niños de 1 a 5 años o en aquellos pacientes con antecedentes de viajes a zonas endémicas. No existe el método que permita detectar con un 100 % de eficacia a *G. lamblia*, se cuenta con algunas pruebas, la más utilizada es el examen directo o en fresco que se basa en detectar los quistes en las heces sin embargo, aproximadamente en un 50% de los casos no se pueden detectar los quistes en las heces. Además del examen en fresco, dentro de los estudios de rutina se incluyen los coproparasitoscòpicos (CPS) que se basan en la concentración del parásito en heces. Estos procedimientos de concentración de las heces son los más empleados y permiten observar muestras con pequeñas cantidades de organismos que pueden ser omitidos en las observaciones directas. Básicamente existen dos técnicas fundamentales:

- Concentración por flotación centrifugación (método de Willis)
- Concentración por sedimentación centrifugación (método de Faust).

Ambos permiten separar y observar formas parasitarias entéricas, cabe mencionar que de estas dos técnicas se derivan una serie de metodologías con variantes diferentes, pero con un mismo fin que es identificar parásitos.

En el caso de pacientes que presentan diarrea crónica, malabsorción y los exámenes de heces son negativos, puede ser necesario recurrir al estudio del contenido duodenal o una biopsia del duodeno, sin embargo estos métodos son poco empleados.

Actualmente, se está usando la serología como diagnóstico, algunas de las técnicas que se usan son:

- Reacción de inmunofluorescencia indirecta (RIFI) utiliza anticuerpos monoclonales en la detección del antígeno GSA 65 o CWP1, alcanza una sensibilidad del 82,3% y una especificidad de 86,9%.

- El método de ELISA utiliza el antígeno de superficie GSA-65 para detectar quistes y trofozoitos, posee un 95% de sensibilidad y un 99% de especificidad [49].

- La aplicación del PCR en el diagnóstico de giardiasis utiliza distintos iniciadores que amplifican secuencias específicas del gen de la giardina, gen HSP o el gen de la subunidad 18S-rRNA, comparado con la microscopía óptica, el PCR tiene una mayor sensibilidad [50,44].

Otros tipos de diagnóstico utilizan sueros que detectan antígenos parasitarios en las heces mediante pruebas de inmunoprecipitación.

El diagnóstico resulta más preciso si varios de los métodos se combinan.

Tratamiento

Para esta parasitosis existen varios tratamientos siendo el de primera elección el metronidazol [34,14]. El metronidazol actúa en los trofozoitos, cuando la piruvato ferredoxin oxido reductasa (presente en la vía anaeróbica de *Giardi*a lamblia), dona electrones a el grupo nitro del metronidazol, reduciéndose este y generando radicales tóxicos para los trofozoitos causándole daño en su estructura [34]. También pueden usarse algunos Benzimidazoles como albendazol y mebendazol, estos medicamentos actúan inhibiendo la polimerización de tubulina dando como resultado un deficiente ensamble de los microtúbulos provocando una falla en la unión de los trofozoitos a la pared intestinal [14].

Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son una de las primeras barreras de defensa contra los patógenos, en los últimos años han sido investigados como posibles alternativas en tratamientos de infecciones ocasionadas por bacterias, hongos y virus, solos o en combinación con antibióticos [28,5,44].

Los AMPs son parte del sistema inmune innato de diferentes organismos vertebrados e invertebrados (bacterias, hongos, y animales) y pueden producirse de forma sintética [45,40,5]. Generalmente los AMPs están compuestos aproximadamente de 15 a 45 residuos de aminoácidos, se han identificado más de

750 péptidos antimicrobianos con diferentes blancos de acción muchos de estos tienen efecto contra bacterias, parásitos, hongos y virus [28], además de propiedades antitumorales, lo que los hace buenos candidatos como alternativa de tratamientos.

Actualmente, existen varias maneras de clasificarlos, de acuerdo a su conformación estructural, composición de aminoácidos y carga, también pueden ser clasificados por su modo de acción [28,40,39]. Los péptidos catiónicos son ricos en arginina y lisina, mientras que los péptidos a aniónicos son ricos en ácidos aspártico y glutámico. Algunos péptidos aniónicos contienen metales como el zinc. La carga de los péptidos catiónicos va a depender de su composición y se cree que los de mayor carga + son más activos que los péptidos menos cargados o neutros. La hidrofobicidad característica de algunos péptidos, les permite insertarse dentro de la bicapa lipídica, y mediante la amfipaticidad pueden interactuar con las regiones polares y apolares de la bicapa. La tabla 1 presenta algunas características de varios péptidos, origen y su efectividad contra algunos organismos. En cuanto a su conformación y estructura, los péptidos antimicrobianos pueden clasificarse, por sus estructuras secundarias, como son α-hélices y láminas β.

Tabla 1. Péptidos antimicrobianos y sus características más importantes.

Nombre	Carga	Estructura	Origen	Efectividad
Citropin	+	α-hélice	Rana *litoria citropa*	Contra *S. aureus* Gram +
Histatin 5	+		Saliva humana	*C. albicans,* HIV.
Palm-KGK, Palm-KK Palm-KKK	+		Derivados sintéticos del ácido palmítico conjugado a residuos de aminoácidos.	*S. aureus*. Dermatofitos. Cocos Gram+ multiresistentes *(S. aureus, E. fecalis, R. equi, S. pyogenes. C. albicans. C. neoformans*
Omiganan	+	α-hélice	Análogo de la Indolicidina. Aislado de gránulos de neutrófilos en bovinos.	Bacterias Gram + y Gram – *Candida sp.*
Temporinas A y B	+	α-hélice	Secretado en la piel de la rana temporaria	*Leishmania*
LFH	+	Proteína transferrina	Saliva humana. Leche	*Streptococcus mutans Vibrio cholerae*, *E. coli*

El papel principal de los péptidos antimicrobianos es la lisis directa de microorganismos, sin embargo también se les han descrito propiedades quimiotácticas y moduladoras en el sistema inmune y de esta forma constituir un puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa.

Existen diferentes modelos de actividad antimicrobiana dentro de los cuales están

- Formación de poros transmembrana
- Ataque a componentes intracelulares.

El más estudiado actualmente es la formación de poros a través del cual se enlazan los péptidos a la bicapa lipídica de la membrana este enlace puede ser de tres formas diferentes:

“Barrel stave” En este modelo los péptidos se insertan en la membrana, la parte hidrofobica, se alinea con los ácidos grasos presentes en la membrana y la parte hidrofílica queda expuesta al centro de la bicapa, esta forma de alinearse en la membrana asemeja un barril [3,39].

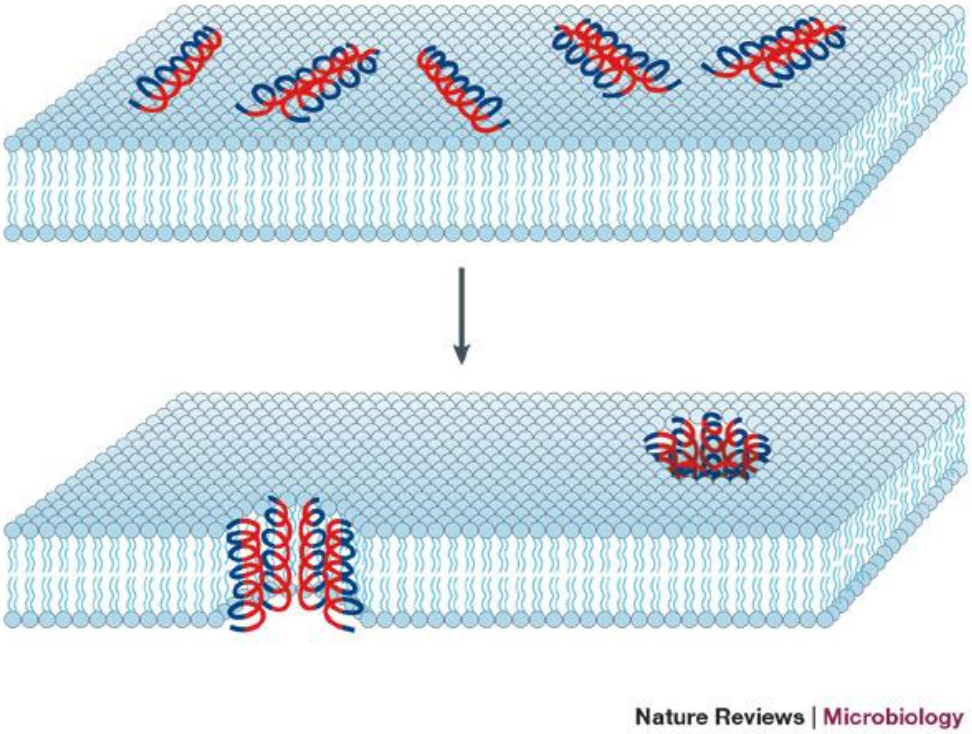


Figura 3. El Modelo de barril (Barrel stave) que muestra la inserción de los péptidos antimicrobianos (Tomada de Brogden, Kim 2005).

Modelo carpeta”, en este los péptidos se acumulan en la superficie de la bicapa cubriendo la superficie de la membrana celular como una carpeta. En altas concentraciones estos péptidos interrumpen la continuidad de la membrana y se insertan en la membrana en paralelo a la bicapa lipídica, mediante sus regiones hidrofóbicas. Las regiones polares de los péptidos quedan expuestas al exterior, de modo que actúan de manera similar a los detergentes formando micelas [3,39].

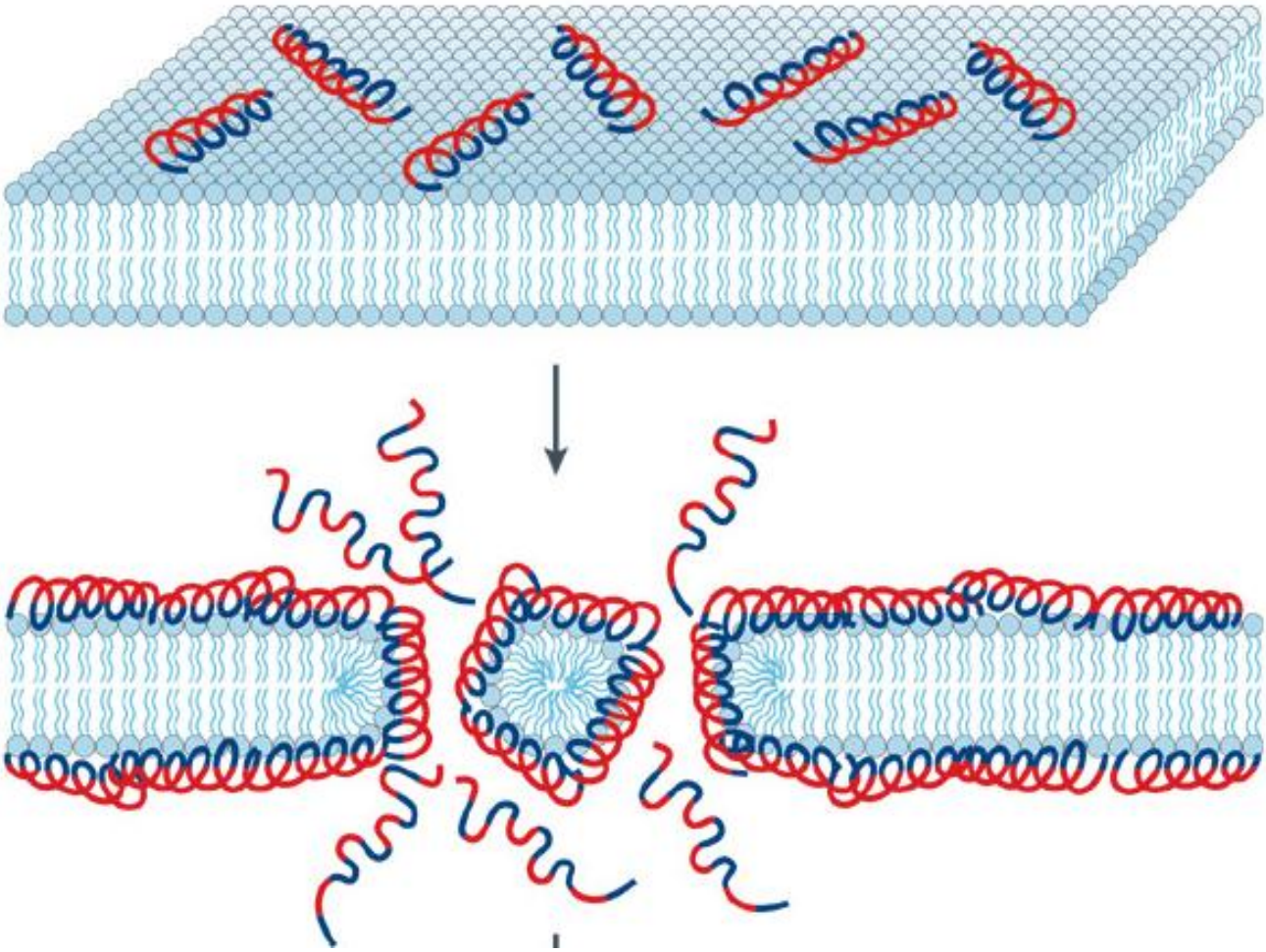


Figura 4. Modelo de carpeta donde se observa que los péptidos antimicrobianos se acumulan en la membrana formando una superficie parecida a una carpeta (Tomada de Brogden, Kim 2005).

“Poro toroidal” Este modelo es muy similar al modelo de barril con la diferencia que los péptidos se insertan en la membrana permitiendo que las regiones polares de ambas capas de la membrana se unan, así los lípidos de la membrana forman una curva alrededor de los péptidos [3,39].

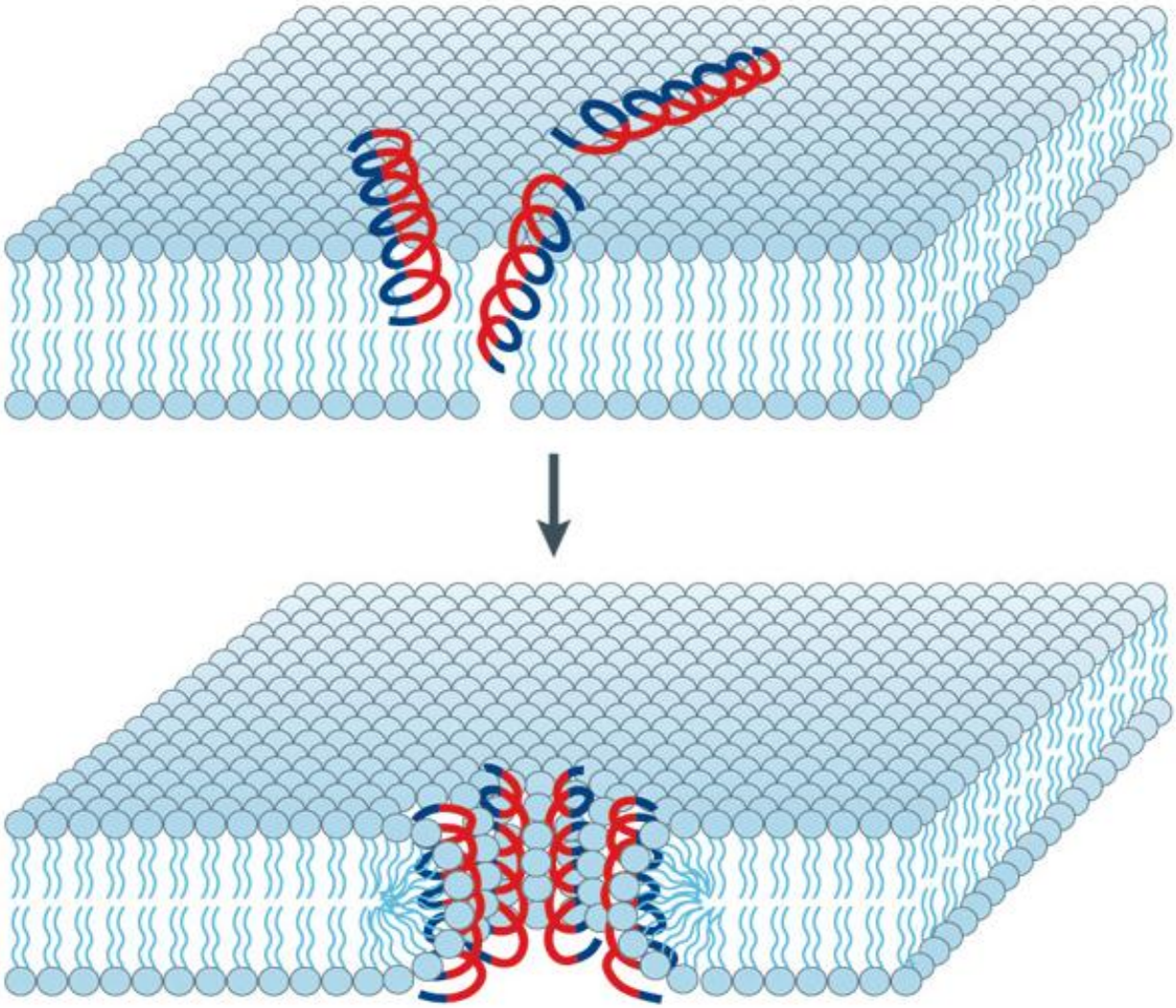


Figura 5. Modelo de poro toroidal, se observa como los péptidos antimicrobianos se insertan en la membrana mientras que los lípidos de la membrana forman una curva alrededor de ellos (Modificada de Brogden, Kim 2005).

Algunos autores refieren que los AMPs activan cascadas intracelulares, inhiben síntesis de proteínas, incluso degradan proteínas requeridas en la síntesis del ADN [3,39].

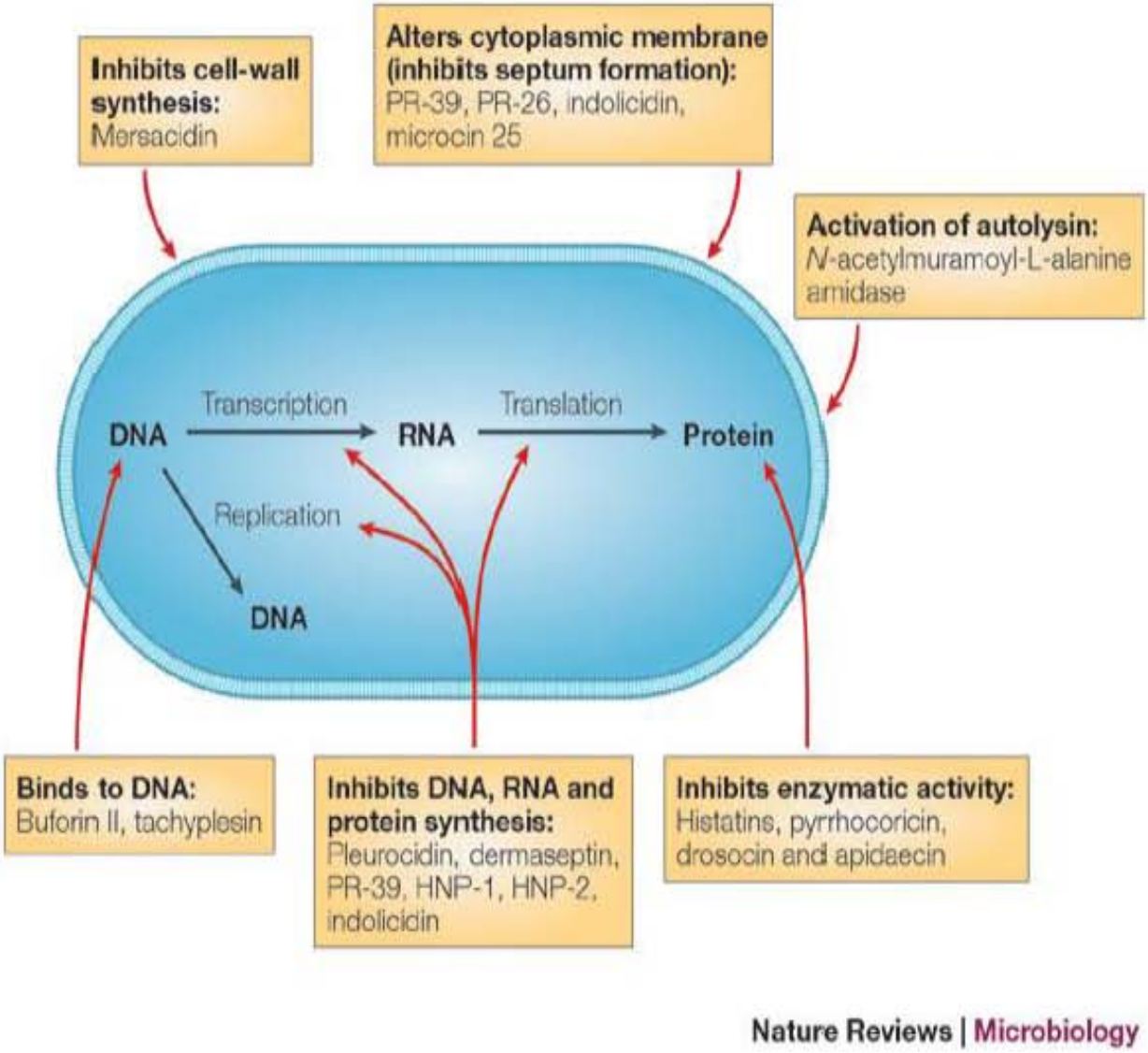


Figura 6. Mecanismos de acción intracelulares de los péptidos antimicrobianos (Tomada de Brogden, Kim 2005).

Recientemente, se han identificado cepas de *G. lamblia* resistentes al metronidazol y albendazol. Esto hace necesario la búsqueda de nuevas opciones de tratamiento. Existe una gran variedad de fármacos en fase de investigación, que han demostrado tener efecto *in vitro*, algunos de ellos son: la rifampicina, bitionol, diclorofeno, pirimetamina, fusidato de sodio, la cloroquina y la mefloquina. Sin embargo su eficacia ha sido limitada por su rápida absorción en el intestino.

Los AMPs por sus propiedades antes mencionadas abren una opción para generar nuevos fármacos en contra de la giardiasis.

HIPOTESIS

De acuerdo con las características de los péptidos antimicrobianos, tendrán un efecto tóxico sobre los trofozoitos de *G. lamblia*.

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar el efecto de varios péptidos sobre los trofozoitos de *Giardia lamblia* cultivados *in vitro*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

Implementar la técnica de cultivo para el protozoario *G. lamblia*

Determinar la curva de crecimiento de los trofozoitos.

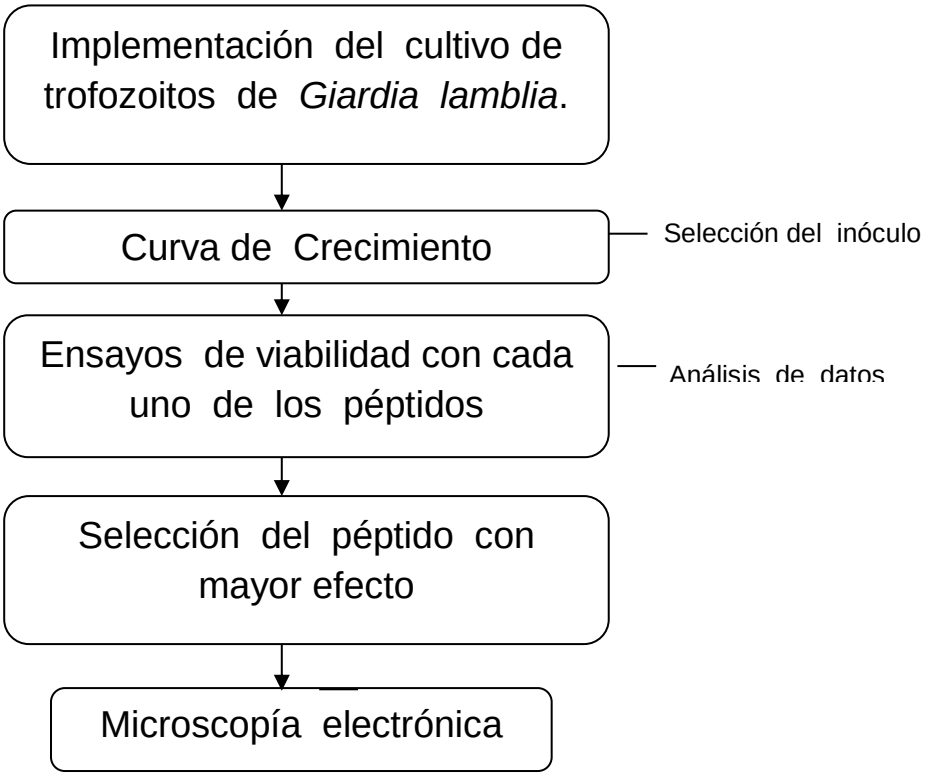
Observar el efecto de varios péptidos antimicrobianos sobre trofozoitos *in vitro*.

Microscopía electrónica del efecto del péptido antimicrobiano Palm-KK sobre los trofozoitos.

Determinar la DL_{50} del Palm-KK

MATERIALES Y MÈTODOS

Estrategia experimental



Material biológico

La cepa WB de *Giardia lamblia* fue proporcionada por el CINVESTAV, IPN, la cepa fue cultivada en medio TYI-S-33 a pH 6.8, complementado con 10 % de suero bovino adulto.

Reactivos

Péptidos antimicrobianos. Todos los péptidos antimicrobianos fueron sintetizados químicamente usando el método Fmoc/But en fase solida. Los péptidos fueron analizados por cromatografía de líquidos. Los péptidos fueron liofilizados y secados. Soluciones de 1mg/ml del péptido fueron preparadas en agua destilada.

Colorante azul tripan. Para preparar la solución de azul tripan, se utilizaron 0.4 g del mismo en 10 mL de agua destilada. Se esteriliza por filtración en membranas 0.22µm.

Mezcla de antibióticos. Un vial comercial que contiene penicilina (1000,000 UI/ml) y otro vial que contiene estreptomicina a 100000 mg/mL.

Medio de cultivo: Para 1,000 mL de medio se agregan las siguientes cantidades:

Peptona biotriptasa	30g
Dextrosa	10g
K2HPO4	1.0g
KH2PO4	0,6g
NaCl	2.0g
Cisteína	2.0g
Ac. Ascórbico	0,2g
Citrato férrico de amonio	22,8mg

Ajustar el pH dentro entre 6.8-6.9, esterilizar en autoclave o por filtración 0.22µm.

Al final se añade el suero bovino fetal al 10% y bilis bovina al 0.1 %.

Solución de Paraformaldehído 4%. Este reactivo se prepara al momento de realizar el ensayo de fijación. Para 5 mL se pesan 0.2 g en un matraz Erlenmeyer con tapa y se agregan 5 mL de agua destilada, se calienta la solución a 60°C, hasta que se vea transparente, esta solución no debe dejarse hervir. Cuando la solución este transparente se enfría a 4°C por 10 min.

Glutaraldehído: Este reactivo comercial se toma directo de su empaque, debe estar protegido de la luz.

Solución fijadora: se prepara agregando 3mL de la solución de paraformaldehído al 4% y 108µL de glutaraldehído al 70%, guardar a 4°C.

Modelo experimental.

Cultivo de la cepa: Colocar un tubo con un cultivo de trofozoitos sumergido en hielo por 10 minutos aproximadamente, posteriormente dentro de una campana de flujo laminar, tomar 200 µL del cultivo con una pipeta y adicionarlos a un tubo estéril, tomar aproximadamente 7 mL el medio de cultivo TYI-S-33, incubar a 37º C.

Curva de crecimiento

Para elegir el inóculo a usar en el experimento se realizaron curvas de crecimiento con diferentes inóculos del parásito.

De un cultivo de 48 horas se obtienen los trofozoitos, el cultivo (tubo) se coloca a 4°C por 10 min con la finalidad de que los trofozoitos se despeguen del vidrio. Posteriormente en condiciones de esterilidad tomar 1 mL del cultivo y centrifugarlo a 735 Xg/5min, desechar el sobrenadante y resuspender el botón en 450 µL de PBS, agitar con la pipeta, tomar 50 µL de esta dilución y agregar 50µL de la solución de azul de tripan, resuspender y tomar aproximadamente 15 µL para llenar la cámara Neubawer. Realizar el conteo en el microscopio con el objetivo de 10$_{X}$, únicamente los trofozoitos muertos se tiñen de azul. Después de obtener la cantidad de trofozoitos que hay en 1 mL, se realizan el cálculo para los inóculos que se probarán (50,000, 100,000, 150,000, 200,000 trofozoitos). Colocar cada

inoculó en viales estériles posteriormente agregar la cantidad necesaria de medio de cultivo para obtener un volumen final de 1.5 mL, en total serán 16 tubos, 4 por cada inóculo. Realizar la primera cuenta a las 24 horas de cada inóculo, tomar un tubo y desprender los trofozoitos como se explicó anteriormente, la cuenta de los trofozoitos se realiza a las 48, 72, 96, 120 h.

Ensayo con los péptidos: Tomando del mismo cultivo de 48 horas, se inoculó con 100,000 trofozoitos (150 µL) en un tubo ependorff estéril de 0.6 mL. Agregar 150 µL de cada una de las diluciones del péptido, para el control se cambian los 150 µL el péptido por H_2O estéril. El experimento se llevará a cabo con 3 concentraciones a los tiempos (3, 6, 24, 24,48,72,96 hrs) cada una de las concentraciones será por duplicado más el control. Al término de cada uno de los diferentes tiempos , centrifugar a 735 Xg/5min al finalizar la centrifugación colocar el tubo en la campana de flujo laminar, tomar 50 µL de cada una de las diferentes concentraciones colocarlos en un tubo ependorf y agregar 50 µl de azul tripan, resuspender, llenar la cámara de Neubawer, observar al microscopio ótico con el objetivo de 10X, contar la cantidad de trofozoitos vivos, muertos, inmóviles y redondeados, Las cantidades restantes de cada uno de los tubos se utilizaran posteriormente para el ensayo de fijación para microscopia electrónica.

Microscopía electrónica: Terminado el experimento, centrifugar los parásitos a 735 Xg por 5 min en condiciones de esterilidad, retirar el sobrenadante de y realizar 3 lavados con PBS de 10 min. Se adicionan 0.5 mL de la solución fijadora a los parásitos y se incuba 1 h a temperatura ambiente para finalmente guardarlos a $4^{o}C$. Finalmente, las muestras se incluyen en epón 812 para realizar los cortes para la microscopía.

RESULTADOS:

En el primer experimento se realizó una curva de crecimiento con diferentes inóculos para determinar el crecimiento óptimo de los trofozoitos en un volumen de 0.6 mL. En la figura 1 puede observarse que todos los inoculos probados siguen una cinética de crecimiento en forma de campana de Gauss. El inoculó de 100,000 trofozoitos fue el mejor para obtener una curva de crecimiento, puesto que comparado con los otros, muestra el mayor crecimiento ($5X10^6$) de trofozoitos en 72 horas en un cultivo de 0.6 mL, en contraste el menor crecimiento fue observado para los otros inóculos de 5000, 15000 y 200000 y donde su crecimiento máximo se alcanzó a las 96, 72 y 48 horas respectivamente. Asimismo, en todos los casos se determinó la viabilidad de los parásitos, observando la movilidad en microscopia óptica y tiñéndolos con azul tripan. Los trofozoitos fueron tomados de tres puntos de las curvas, a la mitad de la curva ascendente, punto máximo y a la mitad de la curva descendente de crecimiento. Se observó una viabilidad que fue de 49, 100 y 33%.

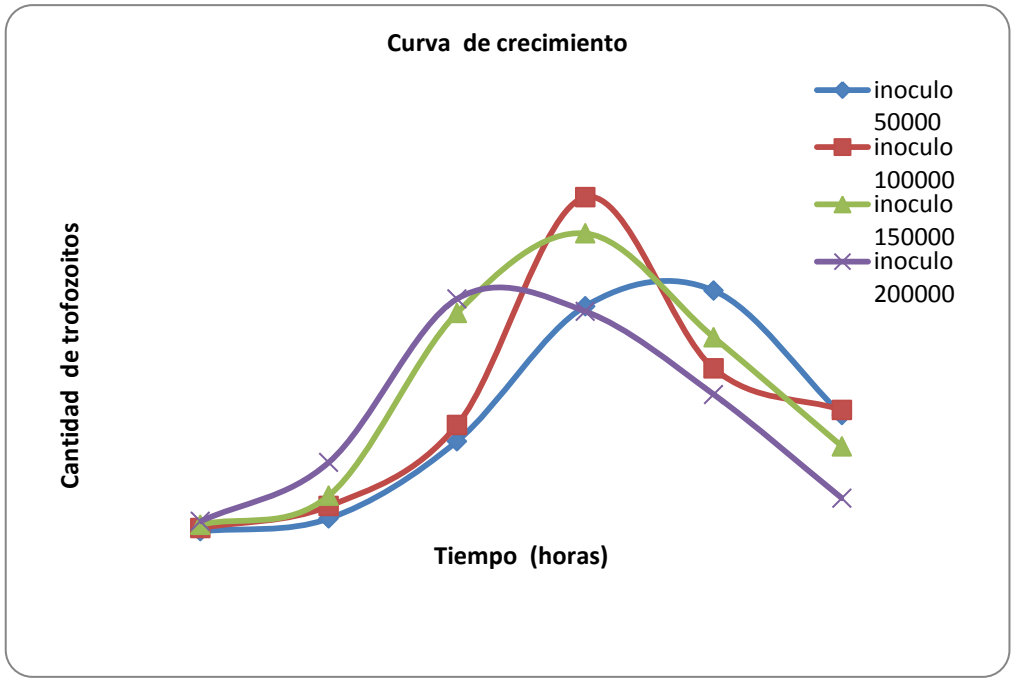


Fig.1.El grafico muestra el crecimiento de los trofozoitos de *Giardia lamblia* uilizando diferentes inoculos a través del tiempo (0-120 h) en cultivo de 0.6 ml.

Determinado el inoculo, la curva de crecimiento y el punto donde se tomarian los trofozoitos, se realizaron los ensayos de incubación de los trofozoitos con 10 péptidos antimicrobianos a las concentraciones de 0, 100, 200 y 300 µg/mL (Tabla I). En cada ensayo se determinó la viabilidad del parásito, la movilidad y el daño que sufre el trofozoito. La movilidad de cada uno de los ensayos realizados con los péptidos fue calculada comparando el número de los trofozoitos móviles en el control y en cada uno de los trofozoitos de los ensayos tratados con los péptidos. Se calculo él porcentaje de viabilidad tomando al control como 100%. El daño fue determinado por la presencia o ausencia de las deformaciones de la morfología del trofozoito, mediante la microscopia óptica y tinción con azul tripan.

En la tabla 1 se puede observar que, comparado con el control, todos los péptidos antimicrobianos disminuyen la viabilidad en diferentes porcentajes así como la movilidad. Se observó que el Omiganan presentó una disminución en la movilidad mayor del 50% a las concentraciones de 100 y 200 mg/mL y una disminución de la viabilidad en 50% a estas concentraciones, el Citropin presenta una movilidad de aproximadamente 40% a 300 mg/mL y una viabilidad de 80 % a las concentraciones de 200 y 300 mg/mL, mientras que el Palm-KGK presentó una disminución en la movilidad del 70% y una viabilidad mayor al 90% a las concentraciones de 200 y 300 mg/mL, y por último para el Palm-KK al igual que el caso anterior existe una disminución de la movilidad y la viabilidad mayor al 90% en todas las concentraciones de péptido usadas.

Tabla 1. Resumen de la viabilidad de los trofozoitos de *G. lamblia* con los diferentes péptidos antimicrobianos a 24 h.

Péptido	Concentración µg/mL	Concentración µm	Viabilidad %	Movilidad %	Trofozoitos dañados
Control	0	0	99	100	-
omiganan	100	26	32	44	-
	200	53	35	50	-
Control	0	0	99	100	-
Histatin 5	100	15	77	122	++
	200	30	83	152	++
	300	45	83	149	+++
Control	0	0	99	100	-
Temporina B	100	60	90	93	-
	200	119	83	91	-
	300	179	80	91	-
Control	0	0	99	100	-
Temporina A	100	31	75	81	-
	200	61	81	90	-
	300	92	82	90	-
Control	0	0	99	100	-
Citropin	100	26	85	108	-
	200	52	80	59	-
	300	79	81	42	-
Control	0	0	99	100	-
Palm-kk	100	89	71	9	++
	200	177	10	4	+++
	300	265	3	3	+++
Control	0	0	99	100	-
Palm-kgk	100		61	43	-
	200	78	40	29	-
	300		27	23	-

* (-) Ausencia de daño en los trofozoitos, (++) Daño en la mitad de los trofozoitos, (+++) Daño en todos los trofozoitos.

Por otro lado, sólo los péptidos Histatin a 300 mg/mL y Palm-KK y Palm-KGK a 200 mg/mL y 300 mg/mL dañaron a los trofozoitos, observando al microscopio se encontraron trofozoitos muy redondeados y sin movimiento, y para el caso de los péptidos Palm-KK y Palm-KGK , se observaron sólo restos de orgánelos.

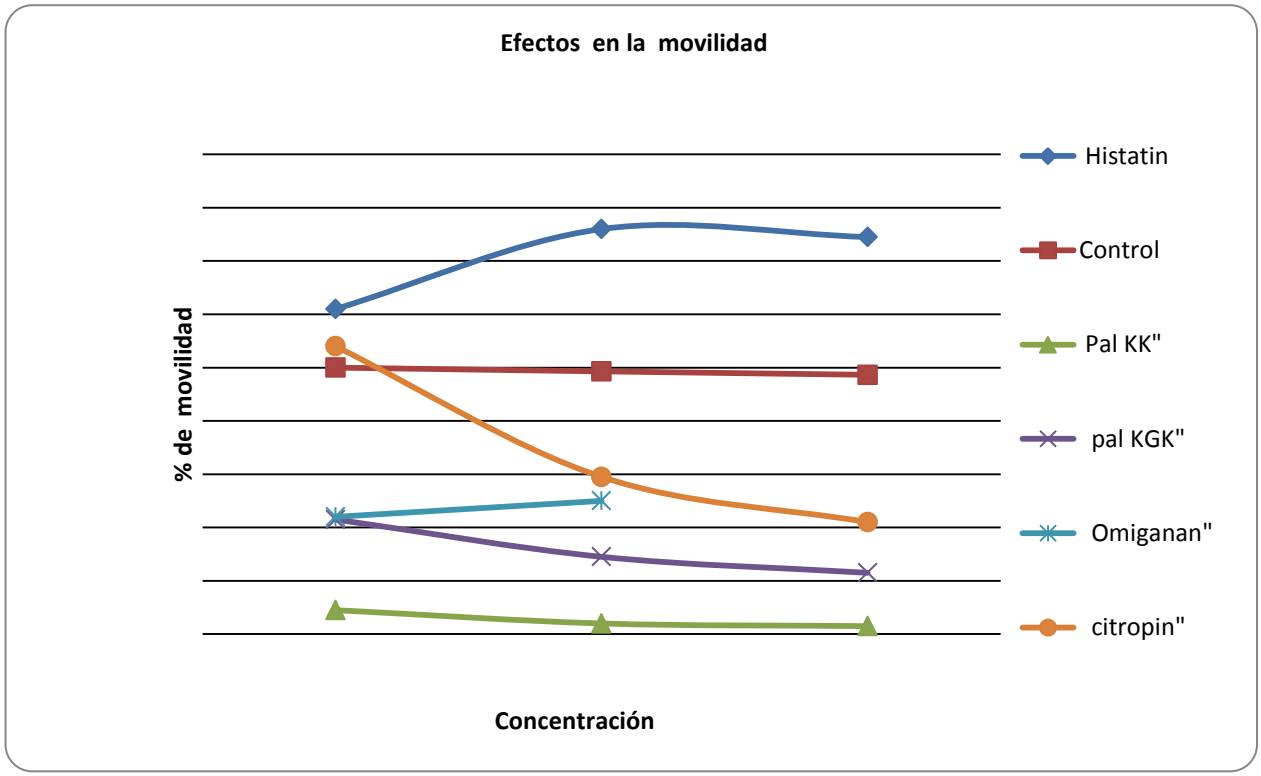
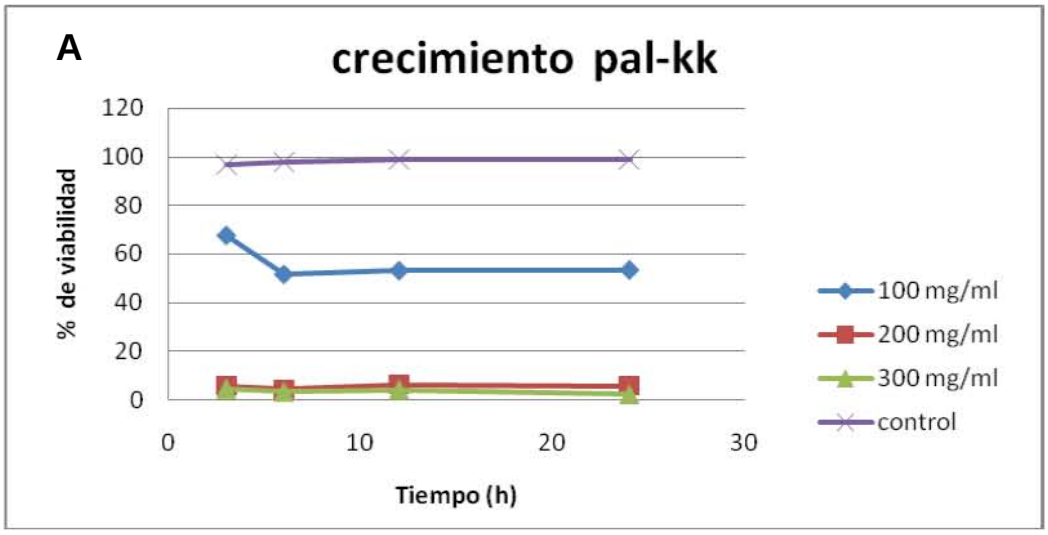
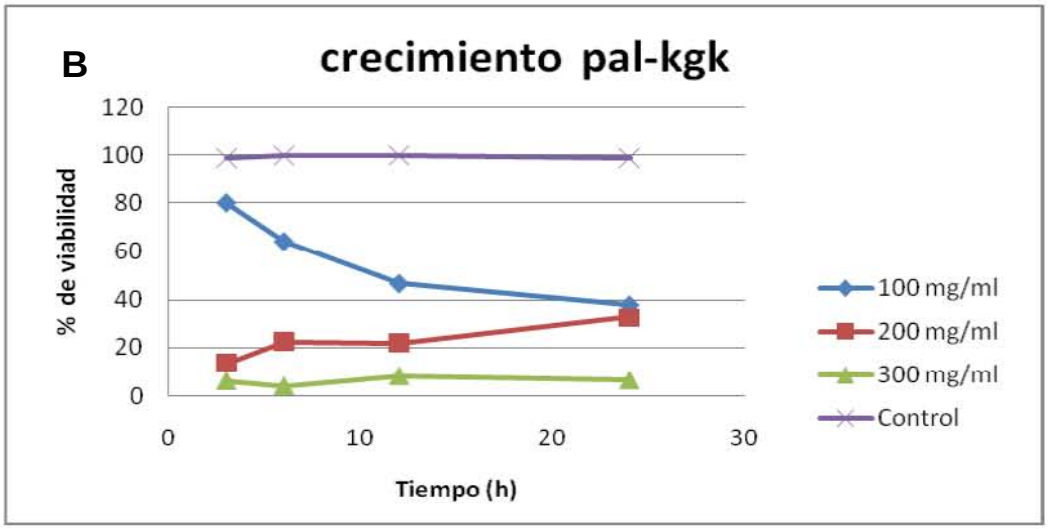


Figura 2. Efecto en la movilidad de los trofozoitos de *Giardia lamblia* al ser incubados por 24 h con diferentes péptidos a las concentraciones de 100, 200 y 300 mg/mL. Omiganan se probó sólo a las concentraciones de 100 y 200 mg/ml. Un grupo de trofozoitos sin péptido, se utilizó como control del experimento.

Debido a los resultados anteriores continuamos los experimentos utilizando únicamente los péptidos Histatin, Palm-KK y Palm-KGK. Se realizaron curvas de crecimiento a tiempos de (3, 6, 12 y 24 h) para Palm-KK y KGK, así como de (24, 48, 72 y 96 h) para Histatin 5 con la meta de observar el efecto que causan en el crecimiento de los trofozoitos de *Giardia lamblia*.





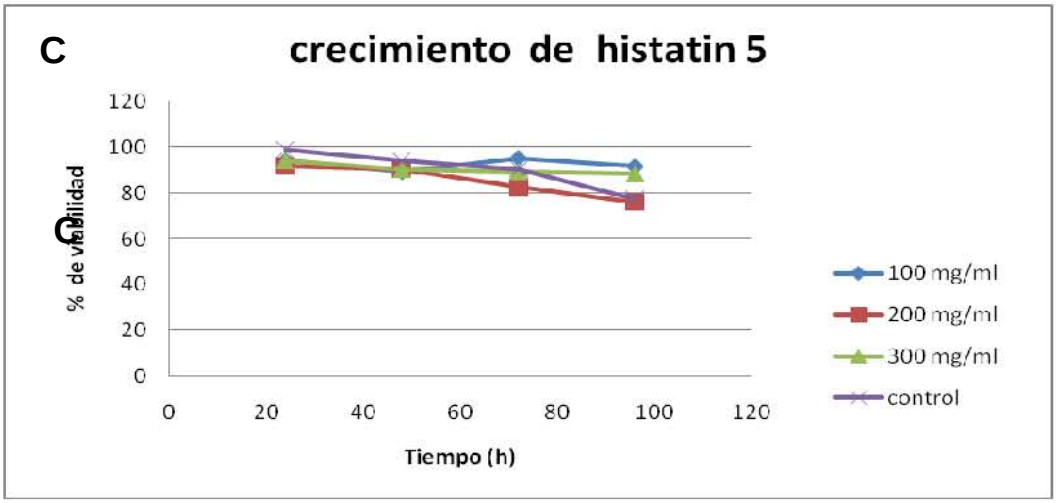


Figura 3. Efecto sobre el crecimiento de los trofozoitos de *Giardia lamblia* en presencia del péptido A) Palm-KK, B) Palm-KGK y C) Histatin 5 a las concentraciones de 0, 100, 200 y 300 mg/ml con diferentes tiempos.

La figura 3A presentan los resultados del efecto sobre el crecimiento de trofozoitos incubados con tres diferentes concentraciones del péptido Palm-KK a los tiempos de 3 a 24 horas 3 a 120 h. Las concentraciones de 200 y 300 mg/ml disminuyen el número de los trofozoitos vivos mayor al 90% a partir de las 3 horas de incubación, esta disminución se mantiene hasta las 24 horas, mientras que en el caso de 100 mg/ml la disminución de los trofozoitos vivos solo alcanza un 50% hasta las 24 h.

Para el péptido Palm-KGK se realizó el mismo ensayo (Figura 3B). Se muestra que a la concentración de 300 mg/ml hay una disminución de aproximadamente un 90% de los trofozoitos vivos a partir de las 3 h de incubación con el péptido y se mantiene constante hasta las 24 h, mientras que a 200 mg/ml disminuyen aproximadamente 80% de los trofozoitos vivos a partir de las 3 h de incubación y se observa un repunte de trofozoitos vivos dando 40%. Por el contrario, en la concentración de 100 mg/ml, el porcentaje de viabilidad inicia con un 80% a las 3 h de incubación y va disminuyendo hasta el 40% de trofozoitos vivos a las 24 de incubación.

En la Figura 3C se observa que el péptido Histanin 5 causo solo un ligera disminución en el crecimiento 5, 10 y 20% en los trofozoitos de *G. lamblia*, a las concentraciones de 100, 200 y 300 mg/ml del péptido durante 24, 48, 72 y 96 h.

Puesto que el péptido Palm-KK fue el que causó el mayor daño a los trofozoitos de *G. lamblia*, este se utilizó para realizar la microscopia electrónica de transmisión. La Figura 4A muestra un trofozoito incubado en medio de cultivo sin péptido, en el se pueden observar las estructuras características de un trofozoito de *G. lamblia*. Al comparar las imágenes de la microscopia electrónica de los trofozoito experimentales incubadas con el péptido Palm-KK y compararlas con el control incubadas sin péptido, es evidente que existen daños en la estructura de los trofozoitos, por ejemplo trofozoitos incubados a 200 mg/ml de péptido (Fig. 4B), se observa un trofozoito muy hinchado y redondeado donde resulta imposible observar claramente los componentes estructurales del mismo, en contraste la Fig. 4C muestra un trofozoito con poco daño en donde se pueden todavía observar las estructuras características de los trofozoitos de *G. lamblia*. Asimismo,

los trofozoitos incubados con la concentración de 300 µg/ml muestran que la mayoría de los trofozoitos se encuentran destruidos o hinchados (Fig. 4E), sin estructuras reconocibles y rastros de trofozoitos destruidos por la acción del péptido (Fig. 4D).

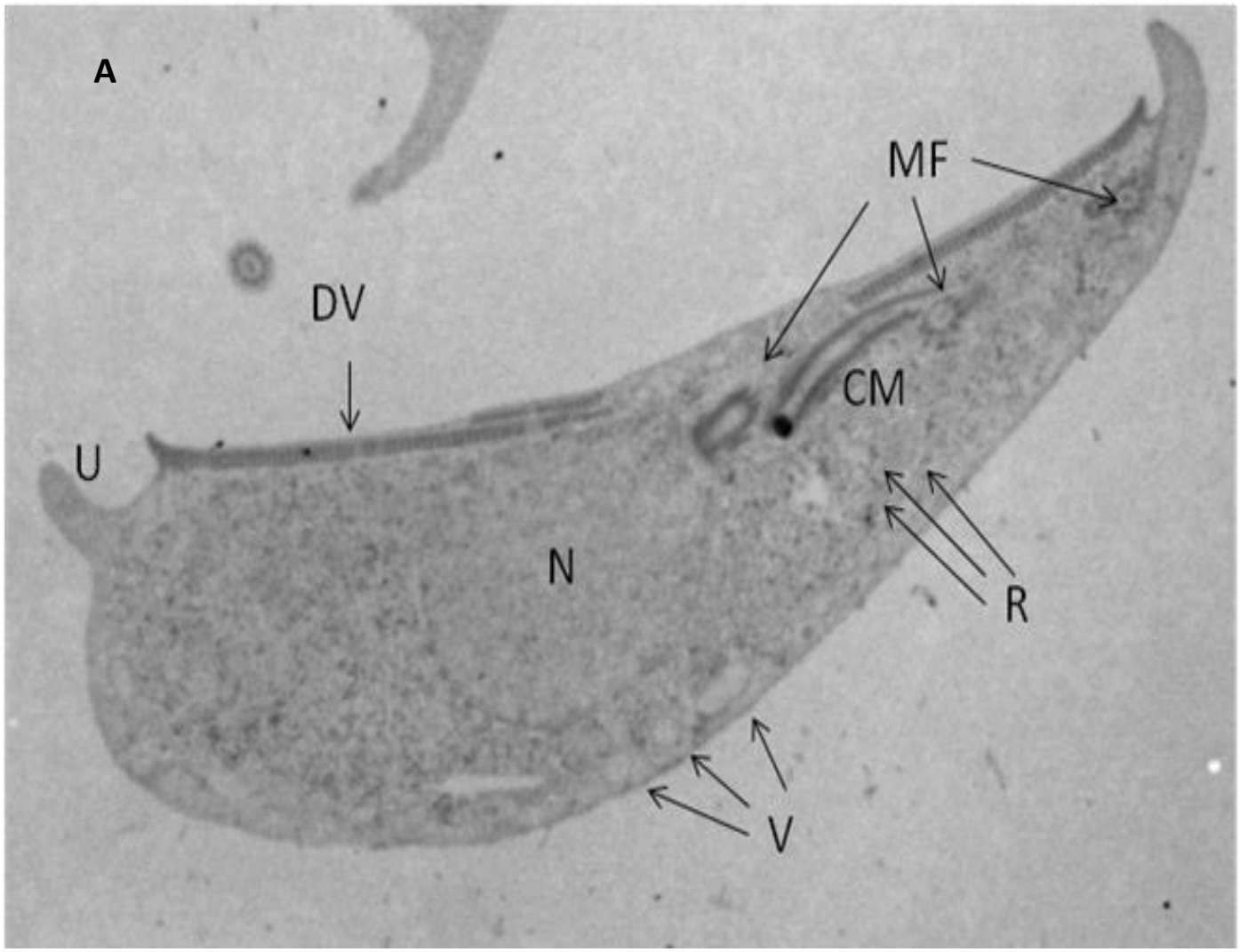


Figura 4 A. Un trofozoito del grupo control sin péptido, donde se muestran las estructuras características de la *Giardia lamblia*: Núcleo (N), retículo endoplásmico (RE), microtúbulos de los flagelos (MF), cuerpo medio (CM) , el disco ventral (DV), ribosomas (R) y uñas (U).

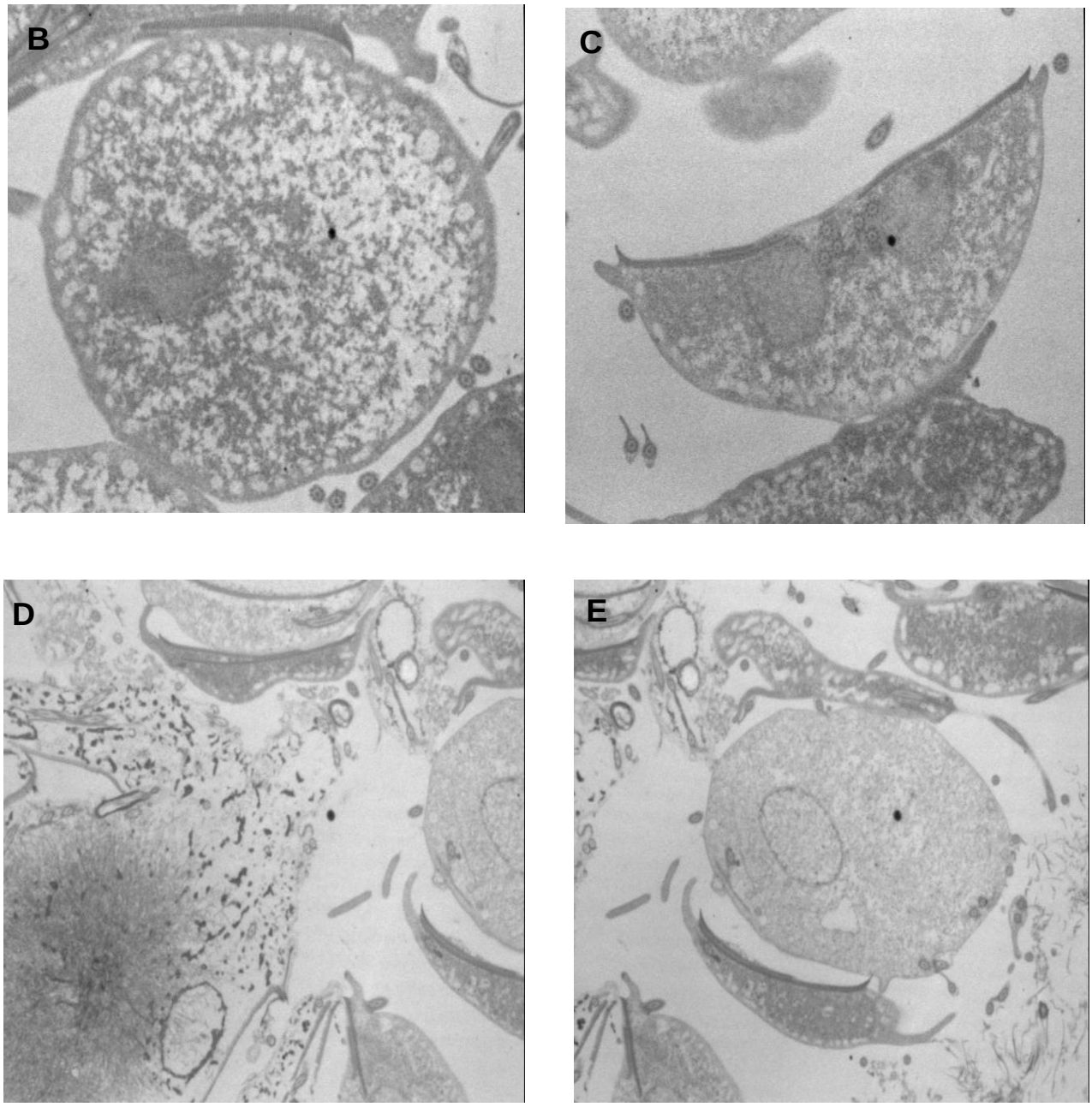


Figura 5. Las figuras anteriores son un ejemplo del daño causado a los trofozoitos de *Giardia lamblia* por el péptido Palm-KK a 200 mg/mL (B y C) y (D y E) a 300mg/ml al ser incubados por 3 h.

DISCUSION

Hoy en día algunos de los fármacos de elección para el tratamiento de la giardiasis han causado resistencia, tal es el caso del Albendazol y el Metronidazol (34,5,14), donde inclusive se han identificado los genes que causan dicha resistencia. La resistencia a los fármacos es un grave problema económico, no solo para las compañías farmacéuticas sino para los gobiernos que invierten en Salud (39,14).

Los AMPs son componentes de la inmunidad innata en los organismos, que les permite controlar infecciones desde el momento en que estos lo invaden. El daño que causan a los microbios se debe a las características que presentan como la conformación, carga, momento hidrofóbico, hidrofobicidad y composición (39,40,28). Los AMPs son capaces de destruir bacterias, hongos, virus y células cancerosas, sin causar reacciones secundarias (28,39). Por ejemplo una manera de medir la citotoxicidad de los péptidos puede ser reflejada por el daño causado en los eritrocitos, para el péptido Palm-KK existen reportes en donde se indica que no tiene efecto dañino sobre estos (24).

Recientemente, se han realizado numerosas combinaciones de péptidos antimicrobianos naturales con moléculas que puedan potenciar su efecto antimicrobiano, tal es el caso del ácido palmítico que se conjugo con una cadena corta de aminoácidos (2,24,25,46), lo que generó los lipopéptidos como el Palm-KK y el Palm-KGK, el primero ha resultado efectivo en concentraciones bajas contra infecciones provocadas por bacterias y *Staphylococcus aureus , Streptococcus pyogenes, así* como por algunos *organismos* Gram+ *(*24), también se ha reportado su efecto en dermatofitos sólo o en combinación con otros fármacos (46). Nosotros tomamos como referencia lo antes mencionado y probamos el efecto de estos 2 lipopéptidos sobre los trofozoitos de *G. lamblia*.

Como primera parte del trabajo y para probar los AMPs en contra de *Giardia lamblia*, se implementó una curva de crecimiento con un inoculo de 10,000 trofozoitos en un volumen de 0.6 ml, con el objetivo de determinar el tiempo óptimo donde existiera la mayoría de trofozoitos viables, que fue a las 72 h.

Una vez determinado este sistema, se probaron los Palm-(KK y KGK) y otros 8 péptidos contra los trofozoitos de *G. lamblia*. Cabe mencionar que para algunos péptidos utilizado, existen reportes que indican el mecanismo de daño y muerte que causan en bacterias, hongos y virus (28, 39). Sin embargo, pocos reportes existen para protozoarios, en particular para *G. lamblia*. Para el caso de los trofozoitos de *G. lamblia*, varios AMPs no causaron el mismo efecto reportado en bacterias, lo cual podemos atribuirlo a diferentes causas, una de ellas puede ser las diferencias encontradas en la estructura, composición y diferentes cantidades de componentes de la membrana, ya que estas características influyen significativamente en la unión al péptido e inserción sobre la membrana o transporte a través de ella, así como a la unión de sus moléculas blanco dentro de los mismos (24,39).

La membrana plasmática de los trofozoitos de *Giardia* se caracteriza por la presencia de fosfolípidos aniónicos, lo que ayuda a los péptidos antimicrobianos con carga positiva a la penetración en la membrana y no a los péptidos con carga negativa, desafortunadamente todavía no están muy estudiados este tipo de interacciones en modelos de membrana con estos lipopéptidos (23,29,31,39,42).

El Omiganan tiene efecto sobre bacterias Gram + como *S. aureus*, *E. pyogenes* y un pobre efecto sobre Gram - como ejemplo en *E. coli* (12). Se observó que a la concentración máxima de 300 mg/ml provocó una disminución de 50% en la viabilidad de los trofozoitos de *G. lamblia*, efecto que se pierde con el tiempo, por lo que este péptido fue descartado de los siguientes experimentos. Una explicación a este efecto es que a esa concentración las rutas bioquímicas de los trofozoitos regeneren los componentes dañados, originando un freno en la actividad del péptido.

Por otro lado, el Palm-KK y el Palm-KGK mostraron el mayor efecto en la viabilidad de los trofozoitos de Giardia, sin embargo si comparamos entre los dos, el Palm-KK mostró un mayor efecto a una concentración 300 mg/mL y 200mg/mL en un tiempo de 3 h. Estos péptidos son extremadamente lipofílicos comparados con cualquiera de los AMPs probados, por lo cual atribuimos su

actividad a esta característica, por el contrario el Omiganan no es lipofilico, sino rico en triptófano, aminoácido que presenta propiedades ácidas lo que favorece la carga positiva, en contraste con algunos otros aminoácidos como la histatina y lisina que predominan en los péptidos Palm-KK y Palm-KGK. Grandes porcentajes de estos aminoácidos inducen la translocacion de fosfolipidos de la membrana ocasionando la formación de poros (20,39), estas diferencias podrían ser una explicación a la alta disminución de viabilidad presentada por estos lipopéptidos. Por otro lado, algunos reportes mencionan que la formación de oligomeros sobre la membrana es un requisito para su actividad antimicrobiana en estos lipopéptidos. Por lo tanto, les sería difícil llegar a los fosfolípidos de las membranas citoplásmicas. Además de esto vale la pena mencionar que la amidación en el extremo COOH del lipopéptido provoca una mayor hidrofobicidad para estos péptidos lo que ayuda a integrarse más rápidamente a la membrana.

Para los casos de péptidos que presentan una pobre disminución en la viabilidad, una propuesta puede ser que el daño no se origine a nivel de membrana, sino atacando moléculas internas no esenciales para la vida del parásito. Que al ser sintetizadas de nuevo restablezcan las funciones de protozoario. En las figuras 2-5, se observa cómo estos péptidos los lipopéptidos Palm-KK y Palm-KGK dañan la movilidad, la viabilidad y las estructuras del trofozoito de *G. lamblia* determinado por la microscopia óptica y electrónica.

En el presente trabajo se implementó el cultivo de crecimiento de *G. lamblia* en un volumen pequeño, así como la propuesta a futuro de estos lipopéptidos como una nueva opción para el tratamiento de la giardosis causada por *G lamblia*. Por otro lado, abre la puerta para realizar nuevas investigaciones, como realizar experimentos en combinación con fármacos como el metronidazol o albendazol, mejorar el efecto de los lipopéptidos ya probados utilizando modelos computacionales para mejorar su unión a la membrana, así como determinar el mecanismo por el cual estos péptidos causan la muerte a los trofozoitos de *G. lamblia*. Una hipótesis de acuerdo a los reportes revisados hasta el momento podemos decir que estos péptidos forman poros sobre la membrana de los trofozoitos.

CONCLUSIONES:

Implementamos una curva de crecimiento para los trofozoitos de *G. lamblia* en donde el inoculo óptimo para realizar los experimentos fue 100000 trofozoitos a un tiempo de 72 horas.

De los péptidos probados sólo los péptidos Palm-KK y Palm-KGK mostraron una disminución en la viabilidad mayor al 80 %, para el caso del Palm-KGK a una concentración de 300mg/ml y para el Palm-KK a las concentraciones de 200 mg/ml y 300mg/ml.

Mediante la microscopia electrónica, corroboramos que el péptido PAL-KK causa daño en la membrana citoplásmica.

Se sugiere que el mecanismo que utilizan los péptidos Palm-KK y Palm-KGK es el mecanismo de lisis por la formación de poros.

REFERENCIAS

1.- Avrahami D, Shai Y. “Bestowing antifungal and antibacterial activities by lipophilic acid conjugation to D,L-amino acid-containing antimicrobial peptides: a plausible mode of action.”, Biochemistry. 2003;42(50):14946-56.

2.- Avrahami D, Shai Y. “A new group of antifungal and antibacterial lipopeptides derived from non-membrane active peptides conjugated to palmitic acid”, J Biol Chem. 2004 Mar 26;279(13):12277-85.

3.- Brogden, Kim A. “Antimicrobial peptides: pore formers or metaboic inhibitors in bacteria ?”, Nature reviews, 2005;3 :238-248.

4.- Bonilla Ruben, et al, “Identification of growth inhibiting comounds in Giardia lamblia high- throughput screen”, molecular & biochemical parasitology, 2008; 162: 149-164.

5.- Bulet, philippe, et al,“Antimicrobial peptides: from invertebrates to vertebrates”, Immunlogical reviews, 2004; 198: 169-184.

6.- Cabello Romero Raúl, Microbiología y Parasitología Humana. México D.F. Editorial panamericana.2007.

7.-Chan DI, Prenner EJ, Vogel HJ. “Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action”, Biochim Biophys Acta. 2006;1758(9):1184-202. Epub 2006 Apr 21.

8.- Cotton James A., K. Beatty Jennifer. “Host parasite interactions and pathophysiology in Giardia infections”, International Journal for Parasitology , 2011; 41(9): 925–933.

9.- C. S. Brian Chia, Yujing Gong, John H. Bowie “Membrane binding and perturbation studies of the antimicrobial peptides caerin, citropin and maculatin”, Biopolymers: Peptide Science 2010.

10.- Farnaud Sebastien, Evans Robert W. Et al. “Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties” Molecular Immunology 2003;40 : 395–405.

11.- Farthing MJ. “Giardia comes of age: progress in epidemiology, immunology and chemotherapy”. J Antimicrob Chemother. Nov 1992;30(5):563-566.

12.-Fritsche R, Thomas., R. Paul., “Antimicrobial activity of omiganan pentahydrochloride tested against contemporary bacterial pathogens commonly responsible for catheter-associated infections”, J. Antimicrob. Chemother. 2008; 61 (5):1092-1098.

13.- Galluci Enrico, Meleleo Daniela, et al., “Magainin 2 channel formation in planar lipid membranes: the role of lipid polar groups and ergosterol”, Eur Biophys J, 2003;32: 22-32.

14.- Gardner TB, Hill DR., “Treatment of giardiasis”. *Clin Microbiol Rev.* Jan 2001;14(1):114-128.

15.- G. K. Mutwri, et al., “Effect of the antimicrobial peptide, D-hecate, on trichomonads”, Journal parasitology, 2000;86:1355-1359.

16.- Gillin D.Frances, Reiner S. David, “Attachment of te Flagelate Giardia lamblia: Role of reducing agents, serum, temperature, and Ionic composition” Molecular and Cellulr bioloy, 1982; 2(4):369-377.

17.- Giacometti Andrea, Cirioni Oscar, Kamysz Wojciech, “In Vitro Activity and Killing Effect of Citropin 1.1 against Gram-Positive Pathogens Causing Skin and Soft Tissue Infections”, Antimicrobial agents and chemotherapy, 2005;46(6) : 2507–2509.

18.- Groot fedde, “Histatin 5-Derived Peptide with Improved Fungicidal PropertiesEnhances Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication by Promoting Viral Entry”, Journal of virology, 2006;80(18): 9236–924.

19.- Hernández-Alcántara Gloria, De la Mora Ignacio, et al., “Unraveling the mechanisms of tryptophan fluorescence quenching in the triosephosphate isomerase from Giardia lamblia”, Biochimica et Biophysica Acta 2008, 1784;(11):1493-1500.

20.- Huang HW, Chen FY, Lee MT, “Molecular mechanism of Peptide-induced pores in membranes”, Phys Rev Lett. 2004;92(19):198304.

21.- Hwang PM, Zhou N, Shan X, Arrowsmith CH, Vogel HJ., “Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin.”, Biochemistry. 1998 Mar 24;37(12):4288-98.

22.- Jarroll Edward L., Muller J. Patrick, et al., “lipid and carbohydrate metabolism of Giardia lamblia”, Molecular and Biochemical Parasitology, 1981; 2: 187-196.

23.- Juha. Pekka Mattila, Karen Sabatini, et al.,“Oxidized phospholipids as potentiel molecular targets for antimicrobial peptides”, blochimica et Biophysica Acta, 2008 1778: 2041-2050.

24.- Kamysz Wojciech, Silvestri Carmela, Cirioni Oscar, et al., “In Vitro Activities of the Lipopeptides Palmitoyl (Pal)-Lys-Lys-NH2 and Pal-Lys-Lys Alone and in Combination with Antimicrobial Agents against Multiresistant Gram-Positive Cocci”, antimicrobials agents and chemtherapy, 2007,51(1) 354–358.

25.- Kamysza E., . Simonettib O, Cirioni O. et a.l, “In vitro activity of the lipopeptide PAL-Lys-Lys-NH2, alone and in combination with antifungal agents, against clinical isolates of Candida spp.” Peptides ,2011;32: 99–103.

26.- Kavanagh Kevin and Susan Dowd, “Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential”, JPP 2004, 56: 1-5.

27.- Keister B. David, “Axenic culture of giardia in TYI-S-33 medium supplemented with bile” Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene” 1983;77(4): 487-488.

28.- K.V. R. Reddy,et al.,“Antimirobial peptides: premises and promises”, international journal of antimicrobial agents 2004; 24:536-547.

29.- Makovitzki A, Shai Y., “pH-dependent antifungal lipopeptides and their plausible mode of action”, Biochemistry. 2005 Jul 19;44(28):9775-84.

30.- Manoni Maria Luisa, Saugar Jose M, et al., “Temporins, small antimicrobial peptides with Leishmanicidal activity”, The journal of biological chemistry, 2005; 280: 984-990.

31.- Mason AJ, Marquette A, Bechinger B., “Zwitterionic phospholipids and sterols modulate antimicrobial peptide-induced membrane destabilization”, Biophys J. 2007 ;93(12):4289-99.

32.- Miyake Yuko, et al.,“Cryopeservation of protozoan parasites” Cryobiology, 2004; 48: 1-7.

33.- Monis PT, Caccio SM, and Thompson RCA. “Variation in Giardia: towards a taxonomic revision of the genus”, Trends Parasitol, Feb 2009; 25(2):93-100

34.-Muller Joachim, et al., “Identification of differentially expressed enes in a Giardia lamblia WB C6 clone resistant to nitazoxanide and metronidazole”, Journal of Antimicrobial Chemoterapy, 2008; 62: 72-82.

35.- Papo N, Shai Y “Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes?”, Peptides. 2003 Nov;24(11):1693-703.

36.- Perez Arriaga L, Mendoza Magaña M.L., “Cytotoxic effect of curcumin on Giardia lamblia trophozoites”, Acta tropica, 2006; 98: 152-161.

37.- Ponce-Macotela M, Peralta-Abarca GE, Martínez-Gordillo MN.,“Giardia intestinalis and other zoonotic parasites: Prevalence in adult”, Vet Parasitol,2005;131(1-2):1-4.

38.- Reyes-Vivas Horacio,Diaz Adelaida, Jorge Peon, et al., "Disulfide Bridges in the Mesophilic Triosephosphate Isomerase from Giardia lamblia Are Related to Oligomerization and Activity”, Journal of Molecular Biology, 2007;365(3), 752-763.

39.- Rivas Luis, et al, “ Amphibian antimicrobial peptides and protozoa: Lessons from parasites”, Biochimica et Biophysica Acta, 2009: 1788; 1570- 1581.

40.- Rivas Santiago Bruno, et al “Peptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infeccionsas”, Salud Publica Mexico, 2006; 48: 62-91.

41.- Rivera Cedillo Roberto,Yelda A. Leal , Lilián Yépez-Mulia, et al., “Seroepidemiology of Giardiasis in Mexico”, Am. J. Trop. Med. Hyg, 2009;80(1), 6–10.

42.- Rohit Sood, Paavo K.J. Kinnunnen, “ Cholesterol, lanosterol, and erosterol attenuate the membrane association of LL-37(W27F) and temporin L”, bIochimica et Biophysica Acta, 2008 1778: 1460-1466.

43.- Rossigno Jean, “Cryptosporidium and Giardia: Treatment options and prospects for new drugs”, Experimental Parasitology 2010;124(1) , 45–53.

44.- Rosoff Jonh, Sanders Cynthia et al.,” Stool Diagnosis of Giardiasis Using a Commercially Available Enzyme Immunoassay To Detect Giardia-Specific Antigen 65 (GSA 65)”, Journal of Clinical Microbiology , 1989; 27(9):1997-2002.

45.- S.E. Löfren, et al., “trypanocidal and leishmanicidal activites of different antimicobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals”, Experimental parasitoloy , 2008; 118:197-202.

46.- Simonetti, Arzeni D,et al.,“In vitro activiti of the lipopeptide derivative (pal-lys- lys-NH2), alone and in combination with antifungal agents, against clinical isolates of dermatophytes”, British Journal of Dermatoloy, 2009; 161: 249-252.

47.- Solaymani-Mohammadi S, Genkinger JM, Loffredo CA, Singer SM. “A meta-analysis of the effectiveness of albendazole compared with metronidazole as treatments for infections with Giardia duodenalis”, Trop Dis. 2010;4(5):682.

48.- Subbalakshmi C, Sitaram N.,“Mechanism of antimicrobial action of indolicidin”, FEMS Microbiol Lett,1998 ;160(1):91-96.

49.- Stuart JM, Orr HJ, Warburton FG, et al., “Risk factors for sporadic giardiasis: a case-control study in southwestern England.” Emerg Infect Dis. Feb 2003;9(2):229-233.

50.- Tamamura H, Kuroda M, Masuda, et al.“A comparative study of the solution structures of tachyplesin I and a novel anti-HIV synthetic peptide, T22 ([Tyr5,12, Lys7]-polyphemusin II), determined by nuclear magnetic resonance.” Biochim Biophys Acta. 1993 13;1163(2):209-16.

51.- T. G. Mank, J. O. M. Zaat,et al., “Sensitivity of microscopy versus enzyme immunoassay in the laboratory diagnosis of giardiasis” ,European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 1997; 16(8):615-619.

52.-Thompson RC.,“Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential”, Int J Parasitol. Nov 2000;30(12-13):1259-1267.

53.-Yaoyu feng, lihua xiao, “Zoonotic potential and molecular epidemioloy of Giardia species and Giardiasis”, 2011; 24(1): 110-140.

54.- Zhao H, Rinaldi AC, Di Giulio A, Simmaco M, Kinnunen PK. “Interactions of the antimicrobial peptides temporins with model biomembranes. Comparison of temporins B and L.”, Biochemistry. 2002;41(13):4425-36.

55,.- [http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/medmaster/a603017-es.html