



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Análisis del efecto citotóxico oxidante del  
albendazol y el papel del metabolismo  
antioxidante en la resistencia a este fármaco en  
*Giardia duodenalis.*”**

TESIS

Que presenta

**RODRIGO MARTÍNEZ ESPINOSA**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR**

**Directora de la Tesis: Dra. María Guadalupe Ortega Pierres**

México, D.F.

Septiembre, 2015

## Agradecimientos

A la Dra. Ma. Guadalupe Ortega Pierres, por su tutoría a lo largo del doctorado y su apoyo permanente.

A los miembros del comité tutorial:

Dra. Rosa María Bermúdez Cruz, CINVESTAV.

Dra. Emma Saavedra, INC.

Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda, CINVESTAV.

Dra. Patricia Talamás Rohana, CINVESTAV.

Dr. José Pedraza Chaverri, UNAM.

Dr. Luis Kameyama Kawabe, CINVESTAV.

Asistencia técnica y asesorías:

Dr. Raúl Argüello García.

Biol. Arturo Perez Taylor.

Blanca Herrera Ramirez.

Dra. Viridiana Olin Sandoval.

Dr. Adolfo Sierra Santoyo.

M. en C. Omar Medina Campos.

Financiamiento:

Beca CONACYT No. 215120.

Financiamiento CONACYT No 49724-M.

## Índice

Lista de Figuras.....	2
Resumen-Abstract.....	3
1. Introducción.....	5
1.1. Generalidades de <i>G. duodenalis</i> .....	5
1.2. Epidemiología.....	6
1.3. Manifestaciones clínicas.....	8
1.4. Tratamiento.....	9
1.4.1. Nitroimidazoles.....	9
1.4.2. Paramomicina.....	10
1.4.3. Nitazoxanida.....	11
1.4.4. Benzimidazoles.....	12
i) Albendazol.....	12
1.5. Resistencia a fármacos en parásitos.....	13
1.5.1. Resistencia a fármacos en <i>G. duodenalis</i> .....	14
1.5.2. Antecedentes de resistencia de <i>G. duodenalis</i> a albendazol.....	15
1.6. Sistemas de defensa biológica contra estrés oxidante.....	19
1.6.1. Sistema de defensa en parásitos.....	20
1.6.2. Mecanismos antioxidantes en <i>G. duodenalis</i> .....	21
1.7. Antecedentes Directos.....	22
2. Hipótesis.....	23
3. Objetivo.....	23
3.1. Objetivos Particulares.....	24
3.2. Diagrama metodológico.....	25
4. Material y Métodos.....	25
4.1. Ensayo de exposición a albendazol.....	26
4.2. Detección de peroxidación lipídica.....	27
4.3. Detección de proteínas oxidadas.....	28
4.4. Detección de daño oxidativo en DNA.....	29
5. Resultados.....	33
6. Discusión.....	51
7. Bibliografía.....	60

## Lista de Figuras

### Introducción

Figura 1: Ciclo de vida de *G. duodenalis*. Pag. 8

Figura 2. Estructura química del albendazol y de sus derivados oxigenados. Pag 13.

Figura 3. Activación del ABZ. Pag 15.

### Resultados

Figura 1. Detección de especies reactivas de oxígeno (ERO) en trofozoítos de *Giardia duodenalis* expuestos al albendazol (ABZ). Pag. 37.

Figura 2. Localización intracelular de la producción de ERO en trofozoítos de *G. duodenalis*. Pag. 39.

Figura 3. Resistencia cruzada a ABZ y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y protección de la cisteína (Cys) en trofozoitos expuestos al ABZ. Pag. 41.

Figura 4. Daño oxidante en biomoléculas de trofozoitos expuestos al ABZ. Pag. 43.

Figura 5. Formación de daño oxidante en material genético de trofozoítos de *Giardia duodenalis* expuestos al Albendazol (ABZ). Pag. 44.

Figura 6. Fragmentación del DNA y fosforilación de la histona H2AX en trofozoítos de *Giardia duodenalis* expuestos al Albendazol (ABZ). Pag 45.

Figura 7. Translocación de fosfodiesteraras e incorporación de yoduro de propidio (IP) en trofozoítos de *Giardia duodenalis* expuestos al Albendazol (ABZ). Pag 47.

Figura 8. Efecto de la exposición al albendazol en ciclo celular de trofozoítos de *Giardia duodenalis*. Pag. 49.

Figura 9. Modelo teórico tridimensional de proteínas putativas en *Giardia duodenalis*. Pag. 51.

Figura 10. Detección de proteínas homologas a CYP-450 en trofozoitos de *Giardia duodenalis* por Western blot. Pag. 52.

Figura 11. Detección de actividad enzimática específica de CYP-450 en trofozoitos de *Giardia duodenalis*. Pag. 53.

Figura 12. Detección del de RNAm de proteínas putativas en trofozoitos de *Giardia duodenalis*. Pag. 54.

Figura 13. Modelo propuesto de activación del ABZ y muerte celular en *Giardia duodenalis*.Pag. 61.

## Resumen

El control de las infecciones por *Giardia duodenalis* se lleva a cabo principalmente por drogas, entre éstas el albendazol (ABZ) es de uso general. Aunque el efecto citotóxico de ABZ por lo general implica la unión a  $\beta$ -tubulina, se ha sugerido que el estrés oxidativo también puede desempeñar un papel en su mecanismo de parasiticida. En este trabajo se analizó el efecto de ABZ en clonas de *Giardia* que son susceptibles o resistentes a diferentes concentraciones (1,35, 8 y 250  $\mu$ M) de esta droga. En las clonas susceptibles de *Giardia* se indujeron Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) por ABZ y esto se asoció con una disminución en el crecimiento que en parte, fue compensado mediante la administración de cisteína. De forma interesante, los clonas resistentes a ABZ exhibieron resistencia cruzada parcial a  $H_2O_2$ , mientras que una cepa de *Giardia* resistente a  $H_2O_2$  creció en presencia de ABZ. La oxidación lipídica y carbonilación de proteínas en los parásitos tratados con ABZ no mostraron diferencias significativas en comparación con los parásitos no tratados. Sin embargo el ABZ indujo la formación de aductos 8OHdG y la degradación del DNA, lo que indica el daño oxidativo de los ácidos nucleicos. Estas observaciones fueron apoyadas por la detección de la fosforilación de la histona H2AX en trofozoítos susceptibles a ABZ y tratados con 250 ABZ  $\mu$ M. Los análisis por citometría de flujo mostraron que el ABZ detuvo parcialmente ciclo celular en clonas sensibles a este fármaco en la fase G2 / M a expensas de las células en la fase G1. Además, el tratamiento ABZ resultó en la exposición de fosfatidilserina en la superficie del parásito, un evento relacionado con la apoptosis. Con la finalidad de determinar la activación de algunas moléculas en el mecanismo de formación de ERO se identificó en la base del genoma de *Giardia* una molécula tipo citocromo P450 (CYP-450) que participa en otros sistemas, en la metabolización de xenotóxicos. Esta molécula fue descrita por nuestro grupo como una proteína de superficie variable asociada con la resistencia a ABZ (ARR-VSP). Así mismo se obtuvieron datos preliminares que permitieron la identificación de esta molécula y su actividad en trofozoítos tratados con ABZ. En conjunto estos resultados sugieren que ABZ induce ERO en los trofozoítos tratados con este fármaco y esto daña el DNA del parásito a través de mecanismos de estrés oxidativo y la posterior inducción de eventos apoptóticos. Finalmente se propone la posible participación de la ARR-VSP en el mecanismo del metabolismo ABZ en trofozoítos de *G. duodenalis* expuestos a este medicamento.

## **Abstract**

The control of *Giardia duodenalis* infections is carried out mainly by drugs, among these albendazole (ABZ) is commonly used. Although the cytotoxic effect of ABZ usually involves binding to  $\beta$ -tubulin, it has been suggested that oxidative stress may also play a role in its parasitocidal mechanism. In this work the effect of ABZ in *Giardia* clones that are susceptible or resistant to different concentrations (1.35, 8 and 250  $\mu$ M) of this drug was analyzed. Reactive oxygen species (ROS) were induced by ABZ in susceptible clones and this was associated with a decrease in growth that was alleviated by cysteine supplementation. Remarkably, ABZ-resistant clones exhibited partial cross-resistance to  $H_2O_2$ , whereas a *Giardia*  $H_2O_2$ -resistant strain can grow in the presence of ABZ. Lipid oxidation and protein carbonylation in ABZ-treated parasites did not show significant differences as compared to untreated parasites; however ABZ induced the formation of 8OHdG adducts and DNA degradation, indicating nucleic acid oxidative damage. This was supported by observations of histone H2AX phosphorylation in ABZ-susceptible trophozoites treated with 250  $\mu$ M ABZ. Flow cytometry analysis showed that ABZ partially arrested cell cycle in drug-susceptible clones at G2/M phase at the expense of cells in G1 phase. Also, ABZ treatment resulted in phosphatidylserine exposure on the parasite surface, an event related to apoptosis. In order to determine the participation of some molecules in the mechanism of formation of ROS a molecule type cytochrome P450 (CYP-450) was identified in the database of the genome of *Giardia* which participates in other systems, in metabolizing xenotóxicos. This molecule was described by our group as an ARR-VSP (variable surface protein associated with ABZ resistance). Likewise preliminary data that allowed the identification of this molecule and its activity in trophozoites treated with ABZ were obtained. All together these results suggest that ABZ induces ROS in the trophozoites treated with this drug and this damages the parasite DNA through mechanisms of oxidative stress and the subsequent induction of apoptotic events. Finally we propose the possible participation of the ARR-VSP in the mechanism of ABZ metabolism in *G. duodenalis* trophozoites exposed to this drug.

## **Abreviaturas**

8OHdG: *8 oxo guanosina.*

ABZ: *Albendazol*

ABZ-SO (ASOX): *Sulfóxido de albendazol*

ABZ-SOO (ASON): *Sulfona de albendazol*

ARR-VSP: *Proteína Variable de Superficie-Relacionada a la Resistencia de Albendazol.*

CYP: *Citocromo P-450.*

Cys: *Cisteina*

DMF: *Dimetilformamida*

ERO: *Especies Reactivas de Oxígeno.*

HNE: *4-Hidroxinonenal*

IP: *Ioduro de Propidio.*

MDA: *Malondialdehido*

NADH: *Nicotinamia Adenina Dinucleótido.*

PBS: *Buffer Salino de Fosfatos.*

R1.35: *Clona de G. duodenalis resistente a 1.35  $\mu$ M de ABZ*

R250: *Clona de G. duodenalis resistente a 250  $\mu$ M de ABZ*

R8: *Clona de G. duodenalis resistente a 8  $\mu$ M de ABZ*

RT-PCR: *Reacción en Cadena de la Polimerasa-Retro Transcripción.*

WB: *Cepa parental de G. duodenalis.*

## 1. Introducción

### 1.1 Generalidades de *Giardia duodenalis*

*Giardia duodenalis* es un protozooario parásito del orden Diplomonadida. Este microorganismo se considera como un eucarionte de evolución temprana, por lo que es un modelo de estudio importante. *G. duodenalis* presenta dos estadios morfológicos en su ciclo de vida, el trofozoito que es la fase vegetativa y el quiste que es la forma infectiva. El trofozoito tiene una estructura piriforme, mide de 10 a 12  $\mu\text{m}$  de largo y entre 5 y 7  $\mu\text{m}$  de ancho, y se caracteriza por la presencia de dos núcleos, la superficie dorsal es convexa, mientras que la ventral es cóncava, tiene un disco adherente en la parte anterior y cuenta con cuatro pares de flagelos. El quiste tiene un tamaño de entre 8 y 12  $\mu\text{m}$  de largo y de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de ancho y se encuentra recubierto por una pared de 0.3-0.5  $\mu\text{m}$  de espesor, la cual está compuesta por proteínas y carbohidratos. En el estado de quiste pueden existir dos o hasta cuatro núcleos (Adam 2001; Ankarklev *et al*, 2010; Plutzer *et al*, 2010; Ortega-Pierres *et al*, 2009).

La transmisión del parásito inicia cuando se ingieren alimentos contaminados con los quistes del parásito. Después de la ingestión, la exposición en el estómago al ácido gástrico induce la activación del quiste en reposo. Una vez que el quiste se encuentra en el tracto digestivo ocurre el proceso de desenquistamiento. en respuesta a las proteasas del intestino y a señalizaciones propias del parásito, emerge una célula que se divide 2 veces por fisión binaria sin replicación del DNA, produciendo eventualmente cuatro trofozoitos los cuales colonizan el tracto proximal adhiriéndose a la mucosa intestinal (Castillo-Romero *et al*, 2010). Los parásitos son trasportados a través del intestino por el peristaltismo y por la movilidad de los mismos, y durante este proceso se da lugar el enquistamiento El ciclo termina con la expulsión de los quistes en las heces fecales y estos son capaces de infectar a otros hospederos (Ankarklev *et al*, 2010; Ortega-Pierres *et al*, 2009). (Figura 1).

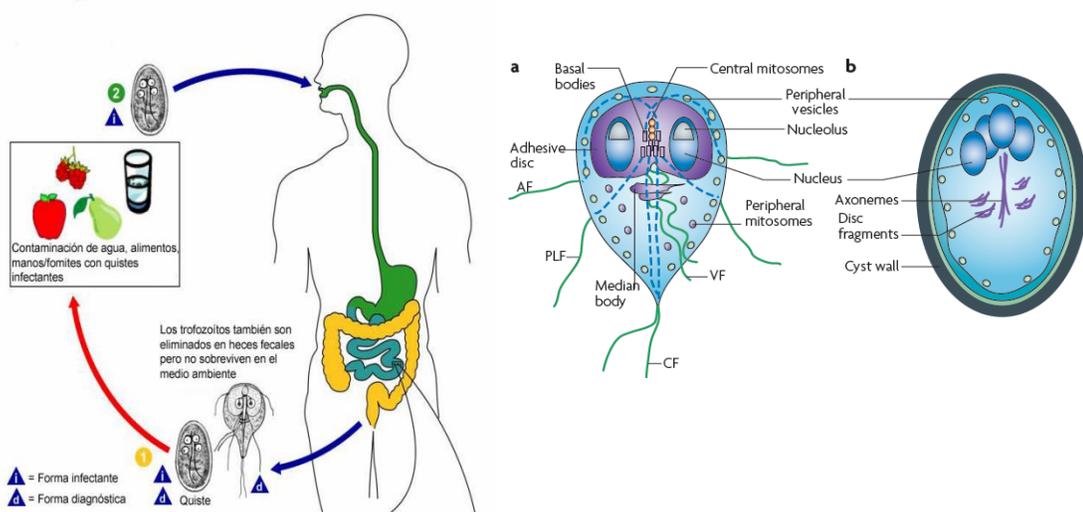


Figura 1: Ciclo de vida de *G. duodenalis*. El quiste es la forma infectiva, se puede encontrar contaminando alimentos y agua. Los trofozoítos son la forma vegetativa, se reproducen en el tracto gastrointestinal donde se establece la infección. Los trofozoítos dan lugar a los quistes que son expulsados al medio ambiente en la materia fecal, permitiendo así, que se inicie nuevamente el ciclo de vida. Trofozoíto (a) y quiste (b). AF: Flagelo anterior, VF: Flagelo ventral, PLF: Flagelo lateral-posterior, CF: flagelo caudal (www.dpd.cdc.gov/dpdx; Ankarklev et al, 2010).

## 1.2 Epidemiología

La infección causada por *G. duodenalis* se denomina giardiasis. Algunos reportes estiman que ésta afecta a 200 millones de personas en Asia, África y América latina, con 500,000 casos nuevos cada año (Plutzer *et al*, 2010). En México la prevalencia va de 7.4 a 68.5% dependiendo del rango de edad. Las incidencias más altas se encuentran entre lactantes, preescolares y escolares (Cedillo-Rivera *et al*, 2009).

Desde 1960 existen reportes de epidemias humanas asociadas a *G. duodenalis*. De manera similar, este parásito infecta gran variedad de mamíferos, aves, reptiles y anfibios. Aun cuando no se han presentado evidencias contundentes sobre la naturaleza zoonótica de esta infección, el hecho de que el ganado se infecte con este parásito puede potencialmente presentar características de un problema de zoonosis (Ryan y Cacciò, 2013). En numerosos reportes se ha determinado la presencia de quistes de *G. duodenalis* en cuerpos de agua, superficies y alimentos en zonas urbanas (de Man *et al*, 2014).

De acuerdo con los datos reportados por la Secretaría de Salud de México, en el boletín de epidemiología del año 2009 (último dato completo) se reportaron 15,245 casos totales de giardiasis en el país, la cual tiene una distribución en prácticamente todos los estados de la Republica Mexicana. Por otro lado, Cedillo-Rivera y colaboradores (2009) reportaron 55.3% de seropositividad (n=3461) en anticuerpos IgG anti- *G. duodenalis* en toda la Republica Mexicana y en personas de 1 a 98 años de edad.

Diversos estudios han demostrado la existencia de gran variedad genética y etiológica en este parásito. Así, se han descrito varias especies y ocho ensamblajes genéticos (A-H) (Cacciò y Ryan, 2008; Beck *et al*, 2011; Ryan y Cacciò, 2013; Lasek-Nesselquist *et al*, 2010). Estos son:

*G. duodenalis* (= ensamble A). En humanos y otros primates, perros, gatos, ganado, roedores y otros mamíferos silvestres.

*G. enterica* (= ensamble B). En humanos y otros primates, perros y algunos mamíferos silvestres.

*G. agilis*. En anfibios.

*G. muris*. En roedores.

*G. psittaci*. En aves.

*G. ardeae*. En aves.

*G. microti*. En roedores.

*G. canis* (= ensamblajes C/D). En perros y otros cánidos, gatos.

*G. cati* (= ensamble F). En gatos.

*G. bovis* (= ensamble E). En ganado bovino y otros ungulados.

*G. simondi* (= ensamble G). En ratas.

*G. duodenalis*, ensamble H. En mamíferos marinos.

Actualmente existe controversia en el manejo de la nomenclatura de algunas de estas especies, por lo cual es habitual encontrar referencias de los ensamblajes, los cuales se aceptan actualmente en la clasificación de *Giardia*.

### *1.3 Manifestaciones clínicas de la giardiasis.*

Los mecanismos de patogenia de la giardiasis no están totalmente establecidos. Sin embargo se sabe que es un proceso multifactorial, en el que se encuentran involucrados aspectos inmunológicos y funcionales del hospedero así como del parásito (Ortega-Pierres *et al*, 2009). El proceso de patogénesis presenta diversas características, como lo son: alteraciones en el borde "en forma de cepillo" de las micro vellosidades intestinales, atrofia de vellosidades, hiperplasia de las criptas, incremento en la permeabilidad celular, inflamación de la mucosa y aumento en las poblaciones bacterianas (Ankarklev *et al*, 2010; Ortega-Pierres *et al*, 2009). El período de incubación de la giardiasis es de entre una y dos semanas. Un gran porcentaje de individuos presentan infecciones asintomáticas, teniendo deficiencias imperceptibles en la absorción intestinal. Otro porcentaje de las personas infectadas puede presentar una serie de manifestaciones clínicas que van de leves a graves, como lo son: diarrea acuosa o pastosa, esteatorrea, dolor epigástrico postprandial, anorexia, distensión abdominal, flatulencia y ocasionalmente, cefalea, febrícula y manifestaciones alérgicas (artralgias, mialgias, urticaria) (Nash, 2013). La enfermedad aguda suele resolverse de manera espontánea en pocas semanas. Sin embargo un porcentaje importante de pacientes (30 - 50%) desarrolla una parasitosis crónica con diarrea recurrente, esteatorrea, evidencia bioquímica de malabsorción de grasas, lactosa y otros disacáridos, vitamina A y vitamina B12, disminución de peso y deficiencias en el crecimiento y desarrollo infantil (Plutzer *et al*, 2010; Halliez y Buret, 2013).

### *1.4 Tratamiento*

En el tratamiento de esta infección se han empleado una gran variedad de compuestos muchos de los cuales han sido utilizados para tratar otras parasitosis. Los fármacos de elección pertenecen a las familias de los 5-nitrofuranos (furazolidona), 5-nitimidazoles (metronidazol) y bencimidazoles (albendazol y mebendazol) (Tejman-Yarden y Eckmann, 2011; Wright, 2012; Ansell *et al*, 2015; Leitsch 2015.).

#### 1.4.1 Furazolidona, tinidazol, secnidazol y nitazoxanida

En el caso de la furazolidona (nombre comercial Furoxona) se recomiendan 100 mg cada 6 h por 7 a 10 días y se ha reportado una efectividad de alrededor de 80% para este fármaco. Algunos otros fármacos utilizados son: tinidazol (2 g x 2 d), secnidazol (600 mg c/12h x 2-3 d) y nitazoxanida (500 mg c/12h x 3 d) (Rossignol 2010; Paget *et al*, 2004; Upcroft y Upcroft 2001).

#### 1.4.2 Nitroimidazoles

Estos compuestos incluyen al metronidazol, así como a sus derivados, el secnidazol, tinidazol y ornidazol. En 1962 Darbon y colaboradores mostraron que el metronidazol podía ser utilizado en el tratamiento de la giardiasis. Este compuesto se absorbe completamente después de la administración oral, se metaboliza principalmente en el hígado y se excreta en la orina. El mecanismo de acción del metronidazol está relacionado a la reducción de su grupo nitro formando especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno que pueden dañar la estructura helicoidal del DNA y la desregulación del estado redox por la inhibición de la tioredoxina reductasa (Rossignol 2010). Se ha reportado que el estrés oxidante causado por este fármaco afecta al DNA de los trofozoitos, produciendo ruptura de doble cadena en esta molécula. El metronidazol se une a la cisteína, tanto libre como en proteínas, afectando la disponibilidad de este aminoácido y la funcionalidad de las proteínas que lo contienen (Ansell *et al*, 2015; Leitsch 2015). En cuanto al uso del metronidazol (nombre comercial Flagyl) la dosis es de 250 mg cada 8 h por 5 días y tiene una efectividad del 90%.

El metronidazol se activa principalmente por nitroreductasas y la vía de reducción mediada por la ferredoxina. Esta última es a su vez reducida por la piruvato:ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) la cual transfiere los electrones producidos durante la descarboxilación oxidativa del piruvato a la ferredoxina. Otra enzima que reduce directamente al metronidazol es la flavo enzima tioredoxina reductasa que utiliza

equivalente reductores provenientes del NADPH (Leitsch *et al*, 2011; Ansell *et al*, 2015; Leitsch 2015).

El metronidazol es mutagénico y algunos estudios en ratas reportan efectos carcinogénicos, sin embargo no existe correlación entre el tratamiento de metronidazol y cáncer en humanos. Algunas manifestaciones clínicas secundarias del metronidazol son: cefalea, vértigo, náuseas e incluso pancreatitis, toxicidad del sistema nervioso central y neutropenia transitoria reversible. Este inhibe la aldehído deshidrogenasa, por lo cual al combinar con el consumo de alcohol, puede causar vómito, dolor gastrointestinal y cefalea (Rossignol 2010; Leitsch 2015).

#### *1.4.3 Paromomicina*

Este fármaco inhibe la síntesis de proteínas de *G. duodenalis* al interactuar con las subunidades ribosomales 50S y 30S. Se absorbe pobremente y tiene una eficiencia contra la giardiasis del 60-70%. La paromomicina se considera como un fármaco de elección contra infecciones de *G. duodenalis* en mujeres embarazadas (Rossignol 2010).

#### *1.4.4 Nitazoxanida*

La nitazoxanida tiene una alta actividad giardicida con efectividades del 71-80% además de que tiene alta eficacia en contra de aislados resistentes a metronidazol. Se ha postulado que en su mecanismo de activación puede estar involucrada la nitroreductasa de *G. duodenalis*, GINR-1 (Rossignol *et al*, 2012) la cual puede reducir el grupo nitro del fármaco. Uno de los mecanismos de acción del fármaco que se ha propuesto es la inhibición de la enzima PFOR, enzima esencial en el metabolismo energético del parásito (Rossignol 2010, Hoffman *et al*, 2007). También se ha reportado la inhibición por esta droga de la nitroreductasa 1, lesiones en la membrana y la inducción de vacuolización (Ansell *et al*, 2015; Leitsch 2015).

### 1.4.5 Benzimidazoles

Este grupo incluye a fármacos como el mebendazol y el albendazol. La seguridad, amplio espectro contra helmintos y en el caso del albendazol, el hecho de que la dosis y el tiempo de prescripción sean accesibles, los han convertido en los fármacos de elección en quimioterapias masivas contra nematodos intestinales. El mebendazol fue el primer benzimidazol reportado contra *Giardia*, aunque se ha observado que únicamente elimina al 37% de estos protozoarios flagelados (Rossignol 2010).

#### i) Albendazol

Este fármaco es utilizado como tratamiento de elección en la infección por una gran variedad de parásitos, incluido *G. duodenalis*. Se sabe que el albendazol ejerce sus efectos al ser transformado secuencialmente a sus formas sulfóxido y sulfona (Figura 2) (Oxberry *et al.* 2000) por la acción de citocromos y oxidasas dependientes de flavina (Dayan 2003). Su acción en contra de este parásito se conoce desde 1986, con los trabajos de Zhong y colaboradores. La vía de acción del albendazol y de otros compuestos de la familia de los benzimidazoles es la unión selectiva a la  $\beta$ -tubulina en cuatro de sus regiones, evitando así la polimerización y la estabilidad de los microtúbulos. Lo anterior impide la movilidad así como el transporte de moléculas vitales para los parásitos. Dicha vía de acción se ha descrito en helmintos y hongos, sin embargo esto no ha sido determinado para *G. duodenalis*. Del mismo modo no se ha establecido si la toxicidad de este fármaco se basa exclusivamente a la unión con la  $\beta$  tubulina (Robinson *et al.*, 2004; Rossignol 2010; Solaymani-Mohammadi *et al.*, 2010; Argüello-García *et al.*, 2015).

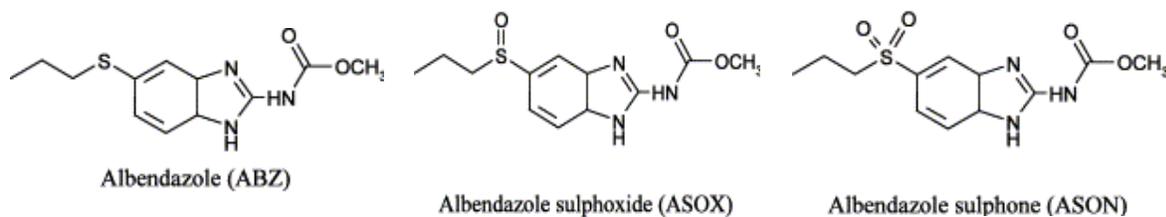


Figura 2. Estructura química del albendazol y de sus derivados oxigenados, sulfoxido de albendazol (ASOX) y sulfona de albendazol (ASON).

A nivel veterinario este fármaco se utiliza contra parásitos intestinales como *Dictyocaulus spp*, *Moniezia spp*, *Fasciola hepática* y diversos nematodos, reportándose gran eficacia (Dayan 2003). En humanos se utiliza ampliamente contra diversos helmintos intestinales, siendo los principales: *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichiura* con tasas de cura del 88 y 28%, respectivamente, mientras que para *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*, se reportan una efectividad del 72% con una sola dosis de 400 mg, cuando el tratamiento esta destinado a combatir la gardiasis se recomienda una dosis de 400 mg durante 5 días (Ansell *et al*, 2015). El albendazol forma parte de los cuatro fármacos antihelmínticos que se encuentran en la lista modelo de medicinas esenciales de la Organización Mundial de la Salud (Keiser y Utzinger 2008). Otros parásitos no intestinales también se han tratado con albendazol, como es el caso de *Wuchereria bancrofti* y *Taenia solium* (en casos de neurocisticercosis). En el caso del tratamiento contra protozoarios intestinales, se ha reportado efecto terapéutico del albendazol en *Cryptosporidium spp*, *Enterocytozoon bieneusi* y *Encephalitozoon spp.*, con diversos resultados (Farthing 2006).

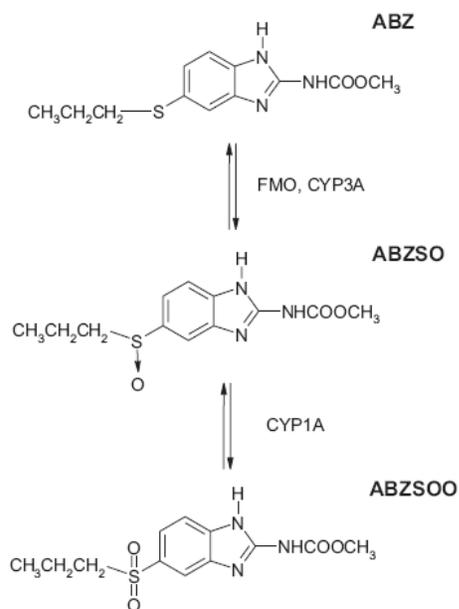
El albendazol se absorbe pobremente en el intestino del hospedero. No existe evidencia de efectos genotóxicos o inducción de tumores, aún bajo regímenes de altos niveles del fármaco (Dayan 2003). El sulfóxido es el metabolito con actividad terapéutica, existiendo en sus dos formas enantioméricas (-) y (+) encontrándose en una relación 20:80 (-/+ ) en el plasma de personas (Dayan 2003).

El albendazol se utiliza extensivamente por diversas causas que incluyen el amplio espectro antihelmíntico que tiene y el elevado número de casos de resistencia de *G. duodenalis* al tratamiento con otros fármacos y en estos casos el albendazol ha mostrado ser efectivo. Los efectos secundarios de este fármaco son poco frecuentes, así se ha reportado anorexia, constipación y en casos raros neutropenia. Se contraindica su consumo en caso de embarazo, por posibles efectos teratogénicos, aunque esto no ha sido corroborado en diversos estudios (Gardner y Hill 2001, Dayan 2003).

En el 2004 Locatelli y colaboradores reportaron la inducción de estrés oxidante en ratones tratados con albendazol, en los que determinaron la lipoperoxidación y la actividad de enzimas antioxidantes como catalasa y superóxido dismutasa. Si bien las mediciones fueron realizadas en las células del hospedero mamífero se sugiere que el estrés oxidante puede ser un posible mecanismo de toxicidad del albendazol (Locatelli *et al*, 2004; Dimitrijevic *et al*, 2012).

*ii) Farmacocinética y Farmacodinámica del albendazol.*

El albendazol no es soluble en agua y se absorbe pobremente en el intestino del hospedero. Debido a la acción de flavina monooxigenasas (FMO) y/o citocromos P450 (CYP-450) (principalmente de la familia CYP3A en mamíferos) el albendazol se transforma a sulfona de albendazol. Posteriormente la sulfona es transformada a sulfoxido vía citocromo P450 (esta vez CYP1A principalmente) (Figura 3). El papel de las FMO y CYPs es clave en la activación del compuesto, tanto en el hospedero como en el parásito, (Oxberry *et al*, 2000; Bártíková *et al*, 2010, Laing *et al*, 2010; Alam *et al*, 2012). En el caso de *Giardia* no se ha reportado ninguna enzima responsable de la activación ni de la metabolización del ABZ (Capece *et al*, 2009).



*Figura 3. Activación del ABZ. El ABZ es activado vía su mono-oxigenación por un citocromo P450, en algunos modelos de la familia 3A o enzimas flavin monooxigenasas, posteriormente es desactivado por otra enzima de la familia de los citocromos P450 que agrega otro oxígeno a la molécula.*

## 1. 5 Resistencia a fármacos en parásitos

### 1.5.1 Resistencia a fármacos en diversos parásitos

El fenómeno de resistencia a fármacos en organismos parásitos ha sido estudiado por varios grupos. Sin embargo, la respuesta de resistencia es particular de cada parásito ya que dependen tanto de los mecanismos de acción química de cada fármaco como de la biología de cada parásito. Es muy importante el estudio de los mecanismos de acción de los fármacos así como el de los mecanismos de resistencia a los mismos debido a que cada vez son más frecuentes los casos clínicos refractarios a las diversas alternativas de quimioterapia, de manera particular en el caso de infecciones parasitarias. También es importante destacar que los mecanismos de resistencia pueden variar grandemente entre diferentes parásitos y entre diferentes fármacos. El conocer los mecanismos de resistencia permitirá evitar este fenómeno y el encontrar alternativas terapéuticas en caso de presentarse, del mismo modo eficientizará los tratamientos antiparasitarios, permitiendo un mejor control de las infecciones causadas por los mismos y las problemáticas que ellas conllevan.

Dentro de los parásitos protozoarios resistentes a fármacos más estudiados se encuentra *Plasmodium falciparum*, agente causal de la malaria. En este protozoario, se han caracterizado gran cantidad de casos de multiresistencia a diversos fármacos anti-maláricos y en muchos de los casos se ha relacionado con polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés), así como con un incremento en el número de copias de genes que codifican proteínas de resistencia a multidrogas 1 (MDR-1, por sus siglas en inglés), los cuales son miembros de la familia que contiene dominios de unión a ATP (ABC, por sus siglas en inglés) (Koenderink *et al*, 2010). Otro mecanismo de resistencia es el incremento en las defensas antioxidantes, esto en particular contra el fármaco arteeter (Chandra *et al.*, 2011). Uno de los principales fármacos utilizados en contra de *P. falciparum* es la cloroquina. Se han reportado cepas resistentes a este fármaco asociadas a mutaciones en la proteína transportador de resistencia a cloroquina de *P. falciparum* (PfCRT), así como mutaciones en las proteínas MDR-1. Un factor que correlaciona con la resistencia a este fármaco es el nivel elevado en las concentraciones de glutatión y resistencia cruzada con

estrés oxidante. El papel de los mecanismos antioxidantes en la resistencia a fármacos en este parásito resulta preponderante y es un factor clave en el estudio del fenómeno de resistencia (Koenderink *et al*, 2010; Chandra *et al*, 2011).

Otros parásitos en los que se han identificado factores de resistencia a fármacos son los tripanosomatidos (*Leishmania sp.*, *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*). El fenómeno de resistencia en estos parásitos es menos común y menos estudiado en comparación con el de *P. falciparum*. En el caso de *Leishmania* se ha relacionado la resistencia al antifolato metotrexato con la sobreexpresión de las proteínas pteridina reductasa (PTR-1), metionina adenosiltransferasa y niveles elevado de s-adenosilmetionina y otros antioxidante (Drummelsmith *et al*, 2004). Así mismo, por análisis metabolómico se ha demostrado una diferencia en el metabolismo de lípidos entre aislados de *Leishmania* resistentes y susceptibles a fármacos antimoniales (Kindt *et al*, 2010). También se han relacionado a cepas resistentes los transportadores ABC (Ouellette *et al*, 1998). Por otro lado, en el caso de *T. brucei*, se ha reportado la adquisición de resistencia a eflornitina por la pérdida del transportador de aminoácidos TbAAT6 mientras que la resistencia a arsénicos se da por la pérdida del transportador de aminoácidos P2 (Matovu *et al*, 2001). En el caso de *T. cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas, por estudios proteómicos se ha sugerido que algunas proteínas participan en la resistencia a benznidazol entre las cuales se encuentran una proteasa de cisteína tipo calpaína, la peroxiredoxina, la tirosina amino transferasa, la ciclofilina A, la glutamato deshidrogenasa, la superóxido dismutasa y la nucleósido difosfato cinasa (Andrade *et al*, 2008). También se ha determinado que una nitroreductasa de *T. cruzi* activa a los dos fármacos con los que se combate a este parásito (benznidazol y nifurtimox), y que la disminución en la expresión de dicha proteína es un mecanismo de resistencia. Esto muestra que los tripanosomatidos, al igual que otros grupos filogenéticos de parásitos, pueden modular su metabolismo y, dicha plasticidad confiere resistencia específica para los fármacos contra los que se utilizan en su eliminación.

La resistencia a emetina de *Entamoeba histolitica*, parásito microaerófilico, se asocia con el aumento en un transportador homólogo a los ABC (Descoteaux *et al*, 1995). En el caso del metronidazol, la nitroimidazol reductasa está directamente relacionada a su

susceptibilidad, en tanto que la tioredoxina y la tioredoxina reductasa han sido propuestas como enzimas cuya inhibición puede resultar en resistencia al metronidazol (Leitsch *et al*, 2007).

Por otro lado, para *Trichomonas vaginalis*, el cual es filogenéticamente cercano a *G. duodenalis*, uno de los mecanismo de resistencia a metronidazol es la disminución en la expresión de la tioredoxina reductasa, enzima reguladora del metabolismo redox, y que es la encargada de activar al metronidazol (Leitsch *et al*, 2009).

Como se puede apreciar que existen vías de resistencia análogas entre diferentes especies de parásitos y es importante señalar que el metabolismo redox es de gran relevancia en el fenómeno de resistencia de varias de estas especies, aunque no es el único mecanismo reportado.

#### *1.5.1.1 Resistencia a ABZ en helmintos.*

Al igual que los parásitos protozoarios los helmintos intestinales constituyen un problema de salud en muchas regiones en el mundo. Así mismo, al afectar significativamente al ganado también son un grave problema económico. Dado lo anterior se han utilizado varios fármacos para combatir a los helmintos, siendo el ABZ uno de los más empleados tanto en humanos como en ganado.

La resistencia de parásitos intestinales al ABZ se detecto inicialmente en granjas y en rebaños de importancia económica (Wolstenholme *et al*, 2004). Los mecanismos de resistencia al ABZ en los nematodos se basan en polimorfismos en un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en ingles) de la molécula de  $\beta$ -tubulina. Un SNP en el codón 200 de la  $\beta$ -tubulina, que cambia una fenilalanina (Phe) a tirosina (Tyr), se correlaciona con resistencia al ABZ. De manera menos frecuente también se han encontrado un SNP en el codón 167, donde una Phe pasa a Tyr, y en el codón 198 con el cambio de ácido glutámico (Glu) a alanina (Ala) (Coles *et al*, 1995, Diawara *et al*, 2009, Barrère *et al*, 2011).

### 1.5.2 Resistencia a fármacos en *G. duodenalis*

*G. duodenalis* desarrolla resistencia a los fármacos antes descritos (Lamée *et al*, 2000; Tejman-Yarden y Eckmann 2011; Kulakova *et al*, 2014). Los primeros indicios de ello se tuvieron cuando se analizaron diferencias en la susceptibilidad de diferentes aislados de *G. duodenalis* a metronidazol, tinidazol, furazolidona y quinacrina. Del mismo modo se han reportado casos de resistencia frente a nitroimidazoles, nitrofuranos, paromomicina, emetina y fanquinona (Argüello-García *et al*, 2009; Müller *et al*, 2008; Upcroft y Upcroft 2001).

Un problema muy importante en el caso del tratamiento de la giardiasis es que no se siguen los tratamientos farmacológicos o se prescriben dosis menores a las efectivas. En ambos casos se favorece la inducción de resistencia en este parásito. Así mismo se ha reportado que se puede inducir la resistencia *in vitro* a gran variedad de fármacos, con lo cual se ha establecido una metodología importante para estudiar los mecanismos moleculares y bioquímicos de dichas resistencias. Un ejemplo de ello son los trabajos en los que se estudiaron las bases de la resistencia al metronidazol, en los cuales se evaluó la actividad de diversas enzimas encontrando que una disminución de la PFOR resulta en resistencia a metronidazol (Upcroft y Upcroft 2001). Por otro lado, la resistencia a furazolidona se ha relacionado con enzimas que regulan el estado redox del parásito (tiol reductasas y peroxidasas), debido a lo cual se ha propuesto que dicho fármaco tiene su actividad parasiticida por la inducción de estrés oxidante (Argüello-García *et al*, 2009; Upcroft y Upcroft 2001).

La resistencia a nitazoxanida se ha estudiado mediante análisis transcriptómicos y proteómicos y se ha sugerido la posible participación de proteínas de choque térmico (HSPs, por sus siglas en inglés), proteínas disulfuro isomerasas (PDI-4) y la nitroreductasa de unión a nitazoxanida o nitroreductasa-1 de *G. duodenalis* (GLNR-1) (Müller *et al*, 2008). Otros trabajos corroboran el papel de la GLNR-1 en la activación de la nitazoxanida (Nillius *et al*, 2011).

En lo referente a resistencia a bencimidazoles (p.ej. albendazol), en helmintos y hongos se ha correlacionado con la presencia de mutaciones en la secuencia de la  $\beta$ -tubulina, en particular en residuos de aminoácidos importantes en la unión de estos fármacos (glutamato 198 y fenilalanina 200) (Chavez *et al*, 1992; Hansen *et al*, 2013; Diawara *et al*, 2013). En el caso de *G. duodenalis* se han reportado cepas resistentes a albendazol, las cuales presentan una morfología particular con un cuerpo medio prominente. Sin embargo, en éstas no se detectaron mutaciones en la  $\beta$ -tubulina, únicamente se han documentado rearrreglos cromosómicos, aunque sin evidencia de que afecten a algún gen o grupos de genes en particular (Argüello-García *et al*, 2009; Upcroft y Upcroft 2001).

### *1.5.3. Antecedentes de resistencia a albendazol de G. duodenalis*

La inducción *in vitro* de resistencia de *G. duodenalis* al albendazol está reportada (Argüello-García *et al*, 2015), particularmente en nuestro grupo de trabajo se han obtenido cepas resistentes mediante la adición de concentraciones crecientes de este fármaco en cultivos del parásito, alcanzando una concentración máxima de 250  $\mu$ M de albendazol (iniciando a partir de 0.5  $\mu$ M de este fármaco). En los cultivos resistentes se observó una menor acumulación intracelular de los productos metabólicos del albendazol (sulfóxido y sulfona) (Cruz-Soto, 2000), sugiriendo una menor conversión del fármaco o una mayor capacidad de degradación de dichos metabolitos (Argüello-García *et al*, 2015).

Las clonas resistentes a albendazol muestran menor incorporación de timidina y uridina marcadas radioactivamente y una capacidad de adhesión disminuida con respecto a las cepas susceptibles. Resulta importante mencionar que algunas cepas resistentes a albendazol han presentado resistencia cruzada con el fármaco mebendazol (Cruz-Soto 2000). La resistencia cruzada entre diversos fármacos es un fenómeno reportado en *Giardia*, aunque no están claramente establecidos las causas y alcances del mismo (Lalle, 2010; Leitsch 2015).

En estudios subsecuentes realizados con las cepas resistentes, se observó por análisis proteómico un aumento en el contenido de diversas proteínas, siendo algunas de las más importantes la NADH oxidasa y la tioredoxina peroxidasa. Ambas enzimas están

involucradas en la defensa antioxidante de *G. duodenalis* (González, 2006) la cual se ha visto implicada en la resistencia a fármacos (ver sección 1.5.1) en otros organismos, así como en *G. duodenalis* tratada con el fármaco furazolidona (Leitsch 2015).

### 1.6 Sistemas biológicos de defensa contra el estrés oxidante

Todos los sistemas biológicos tienen mecanismos de defensa contra el estrés oxidante, algunos de ellos muy conservados a lo largo de la escala filogenética. En general, los sistemas de defensa se pueden dividir en enzimáticos y no enzimáticos, dependiendo de las moléculas que intervienen en estos (Ahmad, 1995; Ozawa y Tatsum, 1998).

#### 1.6.1 Sistemas de defensa antioxidante en parásitos

Los parásitos poseen una amplia gama de mecanismos de defensa contra ERO, por ejemplo en algunos grupos de helmintos, como *Trichinella spiralis* y en el cisticerco de *Taeniaeformis* se ha descrito la presencia de superóxido dismutasa (SOD) (Callahan *et al*, 1991) la cual es una familia de proteínas cuya función es eliminar el  $O_2^{\cdot-}$ , catalizando su dismutación a  $H_2O_2$  y  $O_2$ . También se ha aislado y caracterizado la glutatión peroxidasa (GPX), que es la responsable de la descomposición del  $H_2O_2$  y de otros peróxidos utilizando glutatión reducido (GSH) como donador de electrones. Esta enzima se ha encontrado en *Dirofilaria immitis*, *Brugia pahangi* y *Taenia solium* entre muchos otros (Selkirk *et al*, 1998). Otras enzimas presentes comúnmente en protozoarios y helmintos parásitos son las catalasas (CAT), capaces de reducir al  $H_2O_2$  y las peroxirredoxinas (Tsuji *et al*, 2000), las cuales descomponen  $H_2O_2$  así como peróxidos orgánicos. Los anteriores son componentes enzimáticos de la respuesta contra estrés oxidante y aunque no son los únicos, sí son los principales y los más ampliamente distribuidos, no sólo entre parásitos sino a lo largo de toda la escala filogenética.

Parásitos conocidos como microaerobios (p.ej. *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* y *G. duodenalis*) viven en bajas concentraciones de oxígeno, por lo cual son considerados susceptibles al estrés oxidante. Las defensas antioxidantes de estos organismos patógenos son muy particulares. *T. vaginalis* carece de GSH, la principal molécula

antioxidante en mamíferos, basando su equilibrio redox en cisteína y diversos tioles derivados a partir de ésta. Del mismo modo se ha localizado la enzima SOD así como peroxidases dependientes de ascorbato y de tioredoxina. Dado que no presentan CAT, la principal enzima antioxidante en *T. vaginalis* es la NADH oxidasa (Coombs *et al*, 2004).

*E. histolytica* no presenta CAT, peroxidasa o enzimas del metabolismo del GSH, su principal tiol es la cisteína, aunque también cuenta con proteínas como la proteína de 29 kDa rica en cisteína, la cual podría tener un papel en el control del estado redox en el parásito. Como parte de la defensa antioxidante de tipo enzimática el parásito tiene SOD y una NADH:flavina oxidoreductasa (Sen *et al*, 2007).

Como se puede observar los mecanismos antioxidantes generales no son necesariamente compartidos entre todos los organismos. Gran parte del desarrollo de las defensas antioxidantes esta dado por la historia evolutiva y por el contexto biológico en donde se encuentran los parásitos. De manera particular debemos destacar las diferencias en estos sistemas redox entre parásitos y los seres humanos (sus hospederos) ya que esto pudiese brindar información útil para su control.

#### 1.6.2 Sistemas antioxidantes en *G. duodenalis*

Los mecanismos de protección antioxidante en *G. duodenalis* son muy particulares. A diferencia del sistema presente en la mayoría de los demás organismos incluyendo a los mamíferos, *G. duodenalis* no tiene SOD, CAT, GSH o a las enzimas que lo utilizan (glutación reductasa y GPXs). En su lugar *G. duodenalis* tiene a las siguientes enzimas:

i) NADH oxidasa, que es una enzima importante en el transporte de electrones permitiendo con ello la descarboxilación del piruvato. La participación de esta enzima en contra del estrés oxidante está documentada, al catalizar la reducción tetravalente del O<sub>2</sub> para formar agua (Vicente *et al*, 2009; Brown *et al*, 1996; Brown *et al*, 1995). En el 2006 Li y Wang (Li y Wang 2006) sobre-expresaron a esta enzima, resultando en un fenotipo de mayor tolerancia a altas concentraciones de oxígeno en comparación a las cepas silvestres.

ii) Tioredoxina peroxidasa (TrxP) y tioredoxina reductasa (TrxR). Este sistema acoplado de enzimas se encarga de reducir el  $H_2O_2$ , peróxidos orgánicos y nitroperóxidos. Los equivalentes reductores provenientes del NADPH se pasan a través de grupos tioles presentes en estas enzimas. Las TrxPxs están ampliamente distribuidas a lo largo de toda la escala filogenética y su función antioxidante es ampliamente conocida (Mastronicola *et al*, 2014).

iii) Proteína Flavodihierro (Flavodiiron proteín, FDP), es una proteína con alta afinidad por el oxígeno molecular y con actividad de reductasa sobre este. Debido a su capacidad de reducción tetravalente es capaz de formar agua y prevenir así la formación de ERO (DiMatteo *et al*, 2008).

En relación con la superóxido reductasa (SOR), esta aun por determinar su importancia biológica aunque ésta ha sido purificada y parcialmente caracterizada en *Giardia* (Testa *et al*, 2011). Por otro lado la flavohemoglobina (flavoHb) metaboliza al óxido nítrico (NO) (Mastronicola *et al*, 2010). La relevancia *in vivo* de ambas enzimas, comúnmente encontradas en bacterias, tendrá que ser estudiada con mayor detalle en el caso de *Giardia*.

Otras enzimas que podrían contribuir en menor medida al estado redox de este parásito, son las proteínas disulfuro isomerasas (PDI), la NADH-peroxidasa membranal y la NAD(P)H:menadiona oxidoreductasa, esta última haciendo sensible al parásito a la formación de ERO (Li y Wang 2006). Dentro de las defensas antioxidantes no enzimáticas más importantes en *G. duodenalis* se encuentran la cisteína, así como las proteínas ricas en este aminoácido y recientemente se ha postulado al piruvato como posible antioxidante del parásito (Lane y Lloyd 2002; Biagini *et al*, 2001).

### 1.7 Antecedentes directos del proyecto

En nuestro grupo de trabajo se han obtenido clonas estables resistentes al ABZ las cuales se obtuvieron en procesos independientes por cultivo en dosis crecientes y sub-letales del fármaco. A partir de la cepa WB sensible al fármaco se obtuvieron clonas resistentes a 1.35, 8 y 250  $\mu\text{M}$  de albendazol equivalentes a 8.2, 48.5 y 1515 veces la concentración letal mínima, respectivamente (Cruz-Soto, 2000; Argüello-García, 2009).

Se ha documentado que el albendazol produce estrés oxidante en epitelio de ratones (Locatelli *et al*, 2004). Estudios previos en nuestro grupo de trabajo han reportado la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en trofozoitos de *G. duodenalis* tratados con albendazol, y se observó una disminución notable de formación de ERO en las clonas resistentes al fármaco. Por otro lado, se midió un aumento del contenido de cisteína en las clonas resistentes en comparación con la cepa sensible (Argüello-García *et al*, 2015). Así mismo, se detectó el contenido de RNA mensajero por RT-PCR de la TrxP, de la NADH oxidasa y de la FDP. En los tres casos se observaron diferencias entre la cepa susceptible a albendazol al compararla con las clonas resistentes, mostrando un mayor nivel de expresión en estas últimas (Paz Maldonado *et al*, 2013; Argüello-García *et al*, 2015). De manera muy relevante también se ha observado un menor acúmulo intracelular de los metabolitos del ABZ en trofozoitos resistentes al fármaco respecto a los sensibles, lo cual indica, bien una menor tasa metabólica (de activación) del fármaco o bien una capacidad diferencial de incorporación y/o desecho del ABZ y sus metabolitos.

Estos datos constituyen una plataforma para proponer que el estrés oxidante puede ser una consecuencia importante del metabolismo del albendazol y que el parásito tendría mecanismos para evitar el el daño por este fármaco desarrollando mecanismos de resistencia a esta droga. Así mismo, el hecho de que se presente resistencia cruzada a fármacos con diferentes mecanismos de acción permite sugerir la convergencia de mecanismos comunes de resistencia, pudiendo ser el metabolismo antioxidante uno de estos.

## **2. Justificación**

El fármaco ABZ es ampliamente utilizado para tratar a una gran variedad de infecciones parasitarias, incluida la giardiosis. El parásito *G. duodenalis* puede desarrollar resistencia a dicho fármaco. Tanto los mecanismos de acción del ABZ como los mecanismos de resistencia al mismo han sido poco estudiados en *G. duodenalis* por lo que su estudio aportaría conocimientos relevantes para entender la resistencia a este fármaco.

### **3. Hipotesis**

Si el albendazol produce estrés oxidante en *G. duodenalis*, entonces se observará daño en macromoléculas del parásito inducido por especies reactivas de oxígeno y éste puede contrarrestarse si *Giardia* tiene algunas de las enzimas que activan al ABZ y otras moléculas que participan en el metabolismo antioxidante. Si esto es así, entonces sería posible que éstas estén involucradas en el fenómeno de resistencia.

### **4. Objetivo General del Proyecto**

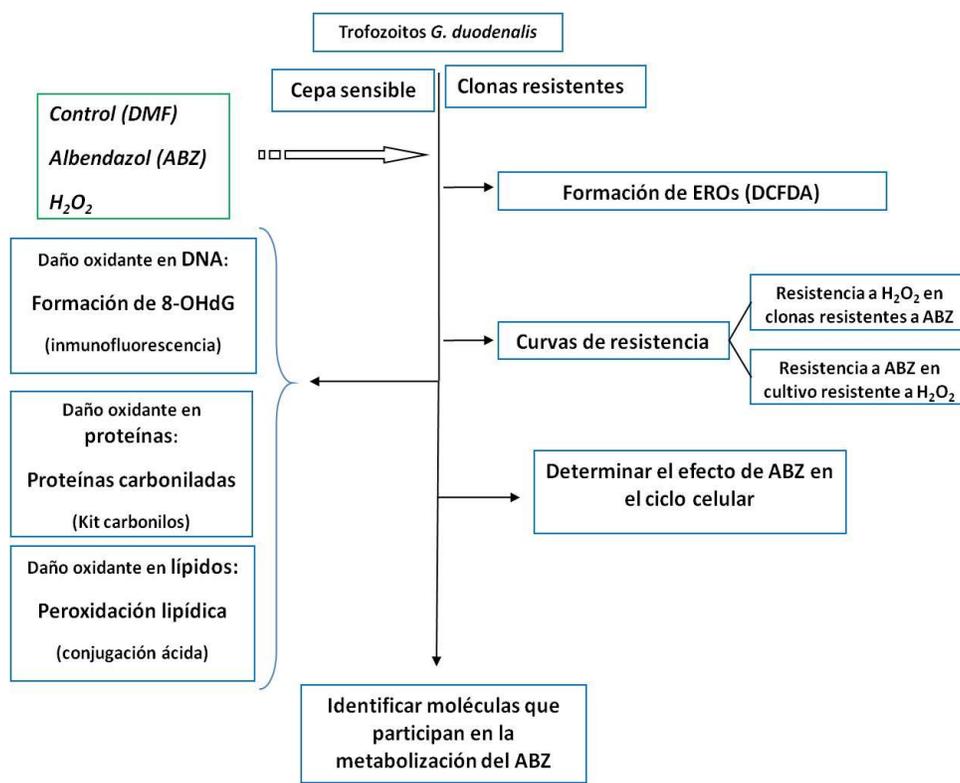
Analizar el efecto citotóxico del ABZ en *Giardia duodenalis* y evaluar la participación de moléculas del parásito en la activación del éste y en el metabolismo anti-oxidante y que posiblemente estén involucradas en la resistencia a este fármaco.

### **5. Objetivos particulares**

- Determinar la generación de EROs en el parásito por efecto del ABZ.
- Obtener un cultivo resistente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Determinar la susceptibilidad de las clonas resistentes y susceptibles a ABZ, hacia compuestos inductor de estrés oxidante, como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
- Determinar el daño oxidante producido por ABZ en biomoléculas del parásito (proteínas, lípidos y DNA), tanto en la cepa susceptible como en las clonas resistentes a este fármaco.
- Evaluar la posible presencia del sistema de activación del ABZ por citocromo P450 y citocromo P450-Reductasa.

## 6. Estrategia experimental

Trofozoitos de *G. duodenalis* tanto de la cepa sensible (WB) como de las clonas resistentes (R1.35, R8 y R250) fueron expuestos a diferentes concentraciones de ABZ, como controles se utilizaron parásitos expuestos al vehiculo (DMF) y a  $H_2O_2$ . Después de la exposición se evaluó la formación de ERO mediante DCFDH, tanto por microscopia como por citometría de flujo. El crecimiento de los diferentes cultivos en presencia del ABZ y  $H_2O_2$  (resistencia cruzada) se evaluó mediante SYTOX Green. El daño oxidante en las principales biomoléculas se detectó; en las proteínas por medición de la formación de grupor carbonilo, en los lípidos con la medición de los productos de lipoperoxidación MDA y HNE, y en el caso del DNA detectando la formación de 8-oxiGuanosina. Finalmente se evaluó la apoptosis mediante la detección de fosfatidilserina en la superficie de los trofozoítos (ensayo de anexina v) y la progresión del ciclo celular por tinción con ioduro de propidio. Por otro lado se llevaron a cabo análisis bioinformáticos y experimentales para la detección de posibles proteínas homólogas del sistema de citocromos (CYP-450 y CYP-450 reductasa).



## 7. Metodología

### 7.1 Cultivo de trophozoite y obtención de trofozoítos resistentes a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Trofozoítos de *G. duodenalis* de la cepa WB (ATCC nº 30957) y clonas resistentes a ABZ se mantuvieron en medio TYI-S-33 suplementado con 10% de suero fetal bovino (Hyclone) y solución de antibiótico / antimicótico (Thermo, EE.UU.) a 37 ° C (Keister, 1983) en viales de 4,5 ml con tapón de rosca. Los trofozoítos resistentes a ABZ se seleccionaron mediante subcultivo continuo en las concentraciones sub-letales de ABZ (Sigma cat. A-4673). Cuando los parásitos crecieron estos se clonaron por dilucion limitante usando la concentración ABZ correspondiente (Paz -Maldonado *et al*, 2013). Los trofozoítos fueron sub-cultivados dos veces por semana bajo la presencia continua de medicamento (para clonas resistentes a ABZ) y para las clonas sensibles a ABZ sólo en la presencia del vehículo (N, N-dimetilformamida; DMF, Sigma). Con la finalidad de obtener los parásitos resistentes a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ROX), los trofozoítos se seleccionaron mediante subcultivo continuo aumentando de las concentraciones subletales de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma, EE.UU.). En ensayos subsecuentes se utilizó una solución inicial (0,01-25 mM) de ABZ en DMF o DMF. El estrés oxidativo se indujo mediante la exposición de los parásitos a 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y estos cultivos se utilizaron como controles positivos (Raj *et al*, 2014).

### 7.2 Determinación del crecimiento de trofozoíto

El crecimiento de trofozoíto fue evaluado por la detección del compuesto fluorescente verde SYTOX de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen cat. S7020). Brevemente, los trofozoítos se lavaron tres veces en solución amortiguadora de salina de fosfato (PBS) y luego se suspendieron en solución de lisis (6% SDS, HEPES 10 mM) usando un agitador Vortex durante 10 s. Enseguida se añadió una solución de trabajo de SYTOX Green (5 mM) en una relación 1: 5 v / v y se incubó durante 10 min en la oscuridad. La curva estándar de crecimiento se obtuvo utilizando un número variable de trofozoítos lisadas. Los valores de absorbancia de cada muestra a partir de los trofozoítos no tratados y tratados se determinaron en placas de 96 posos con fondo negro, utilizando un lector de

FACSCalibur equipado con filtros de 504/525 nm de excitación / emisión (Gerphagnon *et al*, 2013). Los valores de absorbancia de los controles negativos se obtuvieron de los pozos sin células.

### *7.3 Detección de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) en trofozoítos incubados con ABZ o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.*

Los trofozoítos sensibles a ABZ se incubaron con ABZ (1,35, 8 y 250  $\mu$ M), DMF o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) durante 16 horas a 37 ° C. La formación de ERO se evaluó por el Kit de detección de ERO Image-live Green™ según instrucciones del fabricante (Life Technologies. gato I36007). Después de la incubación, los trofozoítos se lavaron en PBS y se suspendieron en 25 mM 6-carboxi-2',7'-diacetato de dichlorodihydrofluorescein (carboxi H2DCFDA) a 37 ° C durante 30 min. Se añadió Hoechst 33342 a una concentración final de 1  $\mu$ M durante 5 min. La fluorescencia en los trofozoitos se detectó al final del periodo de incubación en un citómetro de flujo FACSCalibur Beckman o en un microscopio óptico usando el software BD FACSComp.

### *7.4 Protección por cisteína y determinación de resistencia cruzada entre ABZ y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

En los ensayos de protección por cisteína, los trofozoítos sensibles a ABZ se cultivaron en medio TYI-S-33 suplementado con diferentes concentraciones de cisteína (0,5, 1, 2 o 4 mM). Posteriormente, los trofozoítos se incubaron en presencia de 0,2  $\mu$ M ABZ durante 48 horas a 37 ° C. El crecimiento celular se determinó por SYTOX Green, como se describió anteriormente.

La resistencia cruzada entre ABZ y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se evaluó usando las clonas resistentes a ABZ y resistente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antes mencionadas. Las clonas resistentes ABZ (R1.35, R8, R250) fueron expuestas a 0, 25, 50, 75 y 100  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24 hrs. a 37 ° C. El número de células se determinó por SYTOX Green como se describió anteriormente. La resistencia a ABZ se determinó en ROX (parásitos resistentes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que fueron expuestos a 0,05, 0,1,

0,2, 0,4 y 0,8  $\mu\text{M}$  de ABZ durante 24 hrs a 37 ° C. Los cultivos control se crecieron en ausencia de ABZ o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El número de células se determinó por SYTOX Green como se describió anteriormente.

### *7.5 Detección de carbonilación y peroxidación lipídica*

Los trofozoítos sensibles a ABZ fueron incubados con DMF, ABZ (1,35, 8 y 250  $\mu\text{M}$ ) o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) durante 24 hrs a 37 ° C. La carbonilación de proteínas se determinó utilizando un kit comercial (Protein carbonilo Ensayo, Química, EE.UU.). Los trofozoítos se lavaron con PBS, se suspendieron en solución de lisis (MES 50 mM, EDTA 1 mM a pH 7.4) y se lisaron por 3 ciclos de congelación-descongelación seguido de centrifugación a 10.000 X g durante 10 min. Posteriormente, la proteína se derivatizó con dinitrofenilhidrazina (DNPH) durante 60 min en condiciones de oscuridad, la reacción se detuvo con ácido tricloroacético al 20% y las muestras se centrifugaron a 10.000 X g durante 10 min. Las muestras se lavaron tres veces con solución de etanol / acetato de etilo. Finalmente, las proteínas se suspendieron en clorhidrato de guanidina y se determinó la absorbancia a 450 nm (Krisko y Radman, 2010). La concentración de proteína en la fracción soluble se determinó por absorbancia a 280 nm en nanodrop (Termo Scientific).

Para la determinación de la peroxidación lipídica, después de la incubación con el fármaco o el vehículo, se añadió a homogeneizados de trofozoíto una solución de 1-metil-2-fenilindol en una mezcla de acetonitrilo / metanol (3:1 V:V). Para la determinación de malondialdehído (MDA), la reacción se inició mediante la adición de HCl a una concentración final 37%. En el ensayo de detección de 4-hidroxinonenal (HNE) se utilizaron ácido metanosulfónico y  $\text{FeCl}_3$  a una concentración final de 34  $\mu\text{M}$ . La absorbancia (A) a 586 nm se midió después de la incubación de la mezcla de reacción a 45 ° C durante 40 min. Para cada serie de ensayos se restó, la absorbancia de un control en el cual se empleó agua en lugar de la muestra. Así mismo en cada ensayo se incluyó una muestra de control en el que el reactivo se sustituye por acetonitrilo / metanol (3:1, V/V). En todos los ensayos se empleó una curva estándar de trimethoxypropane, en la cual se utilizaron concentraciones

de 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mM disueltas en el mismo volumen y leídas como se describe arriba. (Gerard-Monnier *et al*, 1998; Orozco-Ibarra *et al*, 2007).

#### 7.6 Detección de fragmentación del DNA

Trofozoítos sensibles a ABZ se incubaron con ABZ (1,35, 8 y 250  $\mu$ M), DMF o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) durante 24 horas a 37 ° C enseguida se lavaron dos veces en PBS 1 X, y se incubaron durante toda la noche a 42 ° C en una solución de lisis (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; EDTA 10 mM; NaCl 150 mM; 0,4% de dodecilsulfato de sodio y 200 mg / ml de proteinasa K). El ARN se eliminó de las muestras por incubación con 20 mg / ml de RNasa A a 37 ° C durante 30 min. El lisado se trató con fenol / cloroformo (1:1) y los ácidos nucleicos se precipitaron a -20 ° C con 0,3 M de acetato de sodio pH 7 y etanol. Después de la cuantificación, el grado de fragmentación del ADN se analizó por electroforesis en gels de agarosa al 1% con bromuro de etidio (Ghosh *et al*, 2009).

#### 7.7 Detección de daño oxidativo en DNA

El daño al DNA se evaluó por inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal anti-8-hydroxydeoxyguanosine (8OHdG) (Santacruz cat. SC-66036). Para ello, trofozoítos sensibles a ABZ fueron tratados con DMF, ABZ (1,35, 8 y 250  $\mu$ M) o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) durante 16 horas a 37 ° C. Posteriormente los trofozoitos se colocaron en cubreobjetos tratados previamente con poli-L-lisina (2 mg / ml) durante 1 h a 37 ° C en y lavaron dos veces con PBS. Estos se fijaron con una solución de metanol: acetona (1: 1 v/v) a -20 ° C. Las células fijadas se trataron con HCl 0,05 N durante 5 min en hielo, se lavaron con PBS y finalmente con PBS que contenía 35, 50 y 75% de etanol consecutivamente durante 3 min cada vez. El DNA fue desnaturalizado in situ con NaOH 0,15 N en etanol al 70% durante 4 min. El precipitado se lavó dos veces con PBS y se incubó con 0.2 mg / ml de colorante Hoechst durante 10 min. Posteriormente los parásitos se lavaron con PBS que contenía 75, 50 y 35% de etanol en forma consecutiva en la presencia de 4% de formaldehído durante 2 min cada vez. Las muestras se incubaron en solución de tripsina (49,5 mM de base Tris,

EDTA 1 mM, 150,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 14,9 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1% de tripsina a pH 7.8) durante 10 min a 37 ° C y se lavaron 3 veces con PBS. Los trofozoítos se incubaron durante 30 min con albúmina de suero bovino 1% (BSA) para bloquear la unión no específica y posteriormente se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-ratón 8-OHdG durante 1 h. Después de un lavado con PBS, las células se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con IgG de cabra anti-ratón acoplado a FITC (Santa Cruz Tecnologías de cat. Sc-2010). Las muestras se analizaron usando un microscopio Zeiss equipado con iluminación de epifluorescencia como se ha descrito previamente (Suzuki *et al*, 2006).

### 7.8 Detección de aductos proteína-MDA y de la fosforilación de H2AX

Tanto la formación de aductos proteína-MDA como la fosforilación de la histona H2AX (en Ser139) se evaluaron por ensayos de Western blot utilizando anticuerpos específicos. En estos, los trofozoítos sensibles a ABZ fueron incubados con DMF, ABZ (1,35, 8 y 250 µM) o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24 h 37 ° C, se lavaron con PBS y se suspendieron en amortiguador de lisis. Posteriormente se cargaron 20 µg de proteína por pozo en geles de acrilamida al 12% para el ensayo de proteína-MDA y en geles de 15% de acrilamida para la detección de H2AX. Después de terminada la electroforesis, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa durante 60 min a 100 volts. Una vez que se realizó la transferencia se corroboró el transpaso de proteínas a la membrana utilizando rojo Ponceau por 30 seg. y se lavó con PBS 1X hasta su total desteñimiento. Las membranas se bloquearon con PBS 1X con 0,1% de leche Svelty (Nestle) y Tween-20 al 1%, durante 2 horas a 37 ° C. Enseguida las membranas se lavaron con amortiguador salino con Tris (TBS), se incubaron con anticuerpo de conejo anti-MDA (Abcam, EE.UU.) y anticuerpos de conejo anti-H2AX (Millipore, EE.UU.) en dilución 1:300 durante 1 h a temperatura ambiente bajo agitación constante. Posteriormente, las membranas se lavaron y se incubaron con anticuerpos de ratón anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano en dilución 1:1000, durante 1h a temperatura ambiente. La detección de quimioluminiscencia se realizó con el estuche de detección de Amersham ECL según las instrucciones del fabricante (Moore *et al*, 2013; Hofštetrova *et al*, 2010).

### *7.9 Identificación y cuantificación de apoptóticas y células necróticas*

Las células en procesos apoptóticos o necróticos después de la exposición a ABZ o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se analizaron por citometría de flujo cuantificando la fluorescencia por anexina V (verde) y ioduro de propidio (IP) (rojo). En este ensayo la anexina se une a las células apoptóticas y el IP a las células con apoptosis tardía y necrosis. El ensayo se llevó a cabo utilizando el Estuche comercial Anexina V-FITC Kit de detección de apoptosis (BioVision, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células fueron incubadas con DMF, ABZ (1,35, 8 y 250 µM) o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM) durante 24 h. Posteriormente los trofozoítos se centrifugaron a 440 X g a 4 ° C y se suspendieron en 500 µL de amortiguador de unión 1X. Las células se incubaron con 5 µL de anexina V-FITC y 5 µL de IP (50 mg / ml) durante 5 min en la oscuridad a temperatura ambiente. La fluorescencia FITC y IP se midió con un FACS Calibur citómetro de flujo equipado con un FL-1 filtro (530 nm) y un filtro FL-2 (585 nm), respectivamente, en al menos 10.000 eventos (Ghosh *et al*, 2009) en cada experimento.

### *7.10 Determinación de las etapas del ciclo celular en trofozoítos de G. duodenalis expuestos a ABZ*

Para determinar las proporciones de los trofozoítos en las diferentes etapas del ciclo, la tinción nuclear con PI se acopló a la citometría de flujo. Brevemente, los trofozoítos sensibles a ABZ fueron expuestos a ABZ (1,35, 8 y 250 µM) durante 4 horas a 37°C, se lavaron con PBS y se fijaron 30 min con etanol al 70% en PBS. Enseguida las células se lavaron de nuevo y se incubaron en PBS que contenía 0,1 mg / ml de RNasa durante la noche a 4 ° C. Finalmente se retiraron sedimentos celulares por un pulso de centrifugación, se tiñeron con IP (1 µM en PBS), se lavaron y se suspendieron en un pequeño volumen (200-300 µL) para llevar a cabo el análisis en un FACS Calibur citómetro de flujo en al menos 10,000 eventos por muestra. Se identificaron las áreas de histograma según lo informado por Reaume *et al*, (2013).

### 7.11 Identificación de Proteínas activadoras de ABZ.

Se realizó una búsqueda exhaustiva de secuencias homólogas a citocromo P-450 y flavin monooxigenasa en las bases de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) y del genoma de *Giardia* (<http://giardiadb.org/giardiadb/>) mediante Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), con búsqueda de dominios conservados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) y herramientas de búsqueda de motivos (<http://giardiadb.org/giardiadb/showQuestion.do?questionFullName=GeneQuestions.GenesByMotifSearch>).

### 7.12 Modelado y verificación de la función de proteínas *in silico*.

Las secuencias encontradas fueron modeladas *in silico* con la ayuda de los programas I-Tasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) y Quark (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/QUARK/>). La función putativa de cada proteína hipotética fue estudiada con el programa COFACTOR (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/COFACTOR/>). En términos generales se siguieron las recomendaciones y pautas preseleccionadas en cada programa y para cada modelo, utilizando como fuente de plantillas de las estructuras tridimensionales la base de datos BioLiP (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/BioLiP/>) (Xu y Zhang 2012; Yang *et al*, 2015)

### 7.13 Medición de la actividad de CYP-450.

La medición de la actividad de CYP-450 1A se realizó por fluorescencia dada por la formación de resorufina a partir de 7-etoxiresorufina, un sustrato específico de CYP-450. La molécula de resorufina emite fluorescencia detectable con longitudes de excitación a 520 nm y de emisión a 585 nm. Se utilizó una concentración de 5  $\mu$ M de 7-etoxiresorufina final en 2 ml de buffer de medición, se agregaron 100  $\mu$ g de proteína de extracto total de trofozoitos de *Giardia* tratados con ABZ 1.35  $\mu$ M por 24 hrs y sin tratar, la mezcla se incubó 3 min a 37°C en baño maría. La fluorescencia se midió en lector de fluorescencia después de

obtener una lectura basal hasta la estabilización de la señal, la reacción se inició con 1 mM de NADPH, los valores fueron registrados cada 3 segundos durante 150 segundos, a partir de la pendiente se obtuvieron las unidades enzimáticas de la reacción, definiendo estas como la cantidad de enzima que en una reacción enzimática cataliza la conversión de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto, se reportaron sobre  $\mu\text{g}$  de proteína (Escobar-García *et al*, 2001).

#### 7.14 Análisis de SDS PAGE y Western Blot.

Trofozoitos de *G. duodenalis* cepa WB en semiconfluencia fueron expuestos a DMF (vehículo), ABZ 1.35  $\mu\text{M}$  o  $\beta$ -naptoflavona 100 $\mu\text{M}$  (inductor de CYP-450) durante 16 hrs a 37 °C. Los parásitos fueron lisados con amortiguador de lisis (urea 4 M, tiourea 1 M, triton X-100 0.05%, tris 10 mM) para obtener el extracto total y la cuantificación de proteína se llevó a cabo por el método de Bradford. Se cargaron 50  $\mu\text{g}$  en cada carril de un gel de acríamida al 12% y corrieron a 100 volts por 1 h 30 min aproximadamente. Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 100 volts por 1 h. La membrana de nitrocelulosa fue teñida con rojo Ponceau para corroborar la correcta transferencia de las proteínas. La membrana se lavó en PBS 1X hasta su total desteñimiento, posterior a lo cual se bloqueó con solución de bloqueo (1% Tritón X-100, 1% BSA, 5% leche descremada, 0.7 % glicina en PBS 1X) durante 1 h a temperatura ambiente. Enseguida se lavó la membrana 5 veces 5 min cada vez con PBS 1X y se incubó con anticuerpo de ratón anti-CYP-450 1A1 (Oxford Biomedical Research Cat: PM10) en una dilución 1:1000 en solución de bloqueo 1 h a temperatura ambiente en agitación suave. La membrana se lavó 5 veces por 5 min cada vez con PBS 1X, tras lo cual se incubó con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (Invitrogen Cat: G21234) en una dilución 1:2000 en solución de bloqueo 1 h a temperatura ambiente en agitación suave. Finalmente la membrana se lavó 5 veces por 5 min cada vez con PBS 1X, posteriormente se reveló por quimioluminiscencia (Amersham ECL).

#### 7.15 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos en al menos 3 experimentos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (SD). La variación entre grupos se evaluó mediante análisis unidireccional de la

varianza (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. La significación estadística se estableció si  $p \leq 0.05$ .

## 8. Resultados

### 8.1 Formación intracelular de ERO en trofozoitos tratados con diferentes dosis de ABZ

En algunos informes, utilizando modelos animales, se reportó que el ABZ produce daño oxidante (Locatelli *et al*, 2004; Bártíková *et al*, 2010). Un inductor de estrés oxidativo en diversos modelos, incluido *G duodenalis* es el  $H_2O_2$  (Ghosh *et al*, 2009; Raj *et al*, 2014), en el presente trabajo se utilizó al  $H_2O_2$  como un control positivo de la inducción de estrés oxidante. En ensayos de microscopia utilizando DCFDH, compuesto que fluoresce al contacto con ERO, se detectó la formación de especies reactivas inducida por la exposición a ABZ. Como se muestra en la Figura 1, en el panel superior, la exposición de los trofozoitos sensibles al ABZ a este fármaco induce la formación de ERO en una manera dependiente de la concentración, particularmente en la concentración de 250  $\mu M$ . La misma Figura muestra micrografías en campo claro y con el colorante nuclear hoechst (primera y segunda fila, respectivamente) para su comparación con la detección de ERO (DCFHD). En ensayos de citometría de flujo los parásitos expuestos a ABZ (1.35, 8 y 250  $\mu M$ ) muestran mayor señal de ERO que los parásitos expuestos al vehiculo sin fármaco (Figura 1, panel inferior)

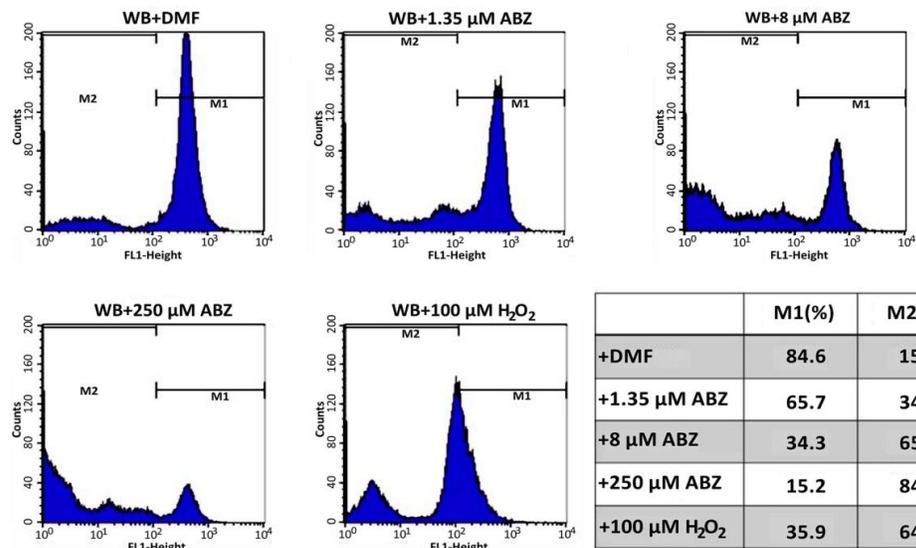
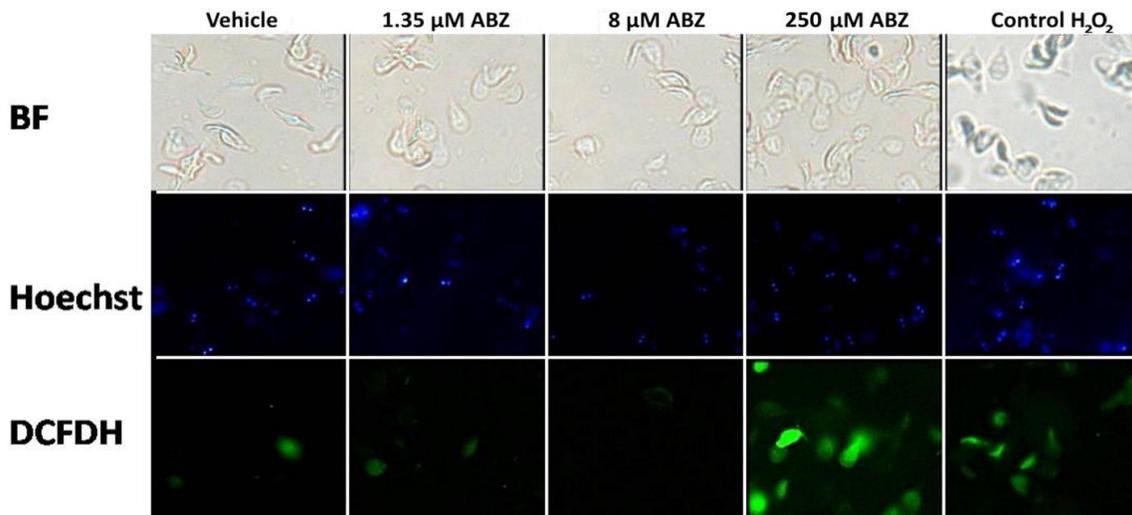
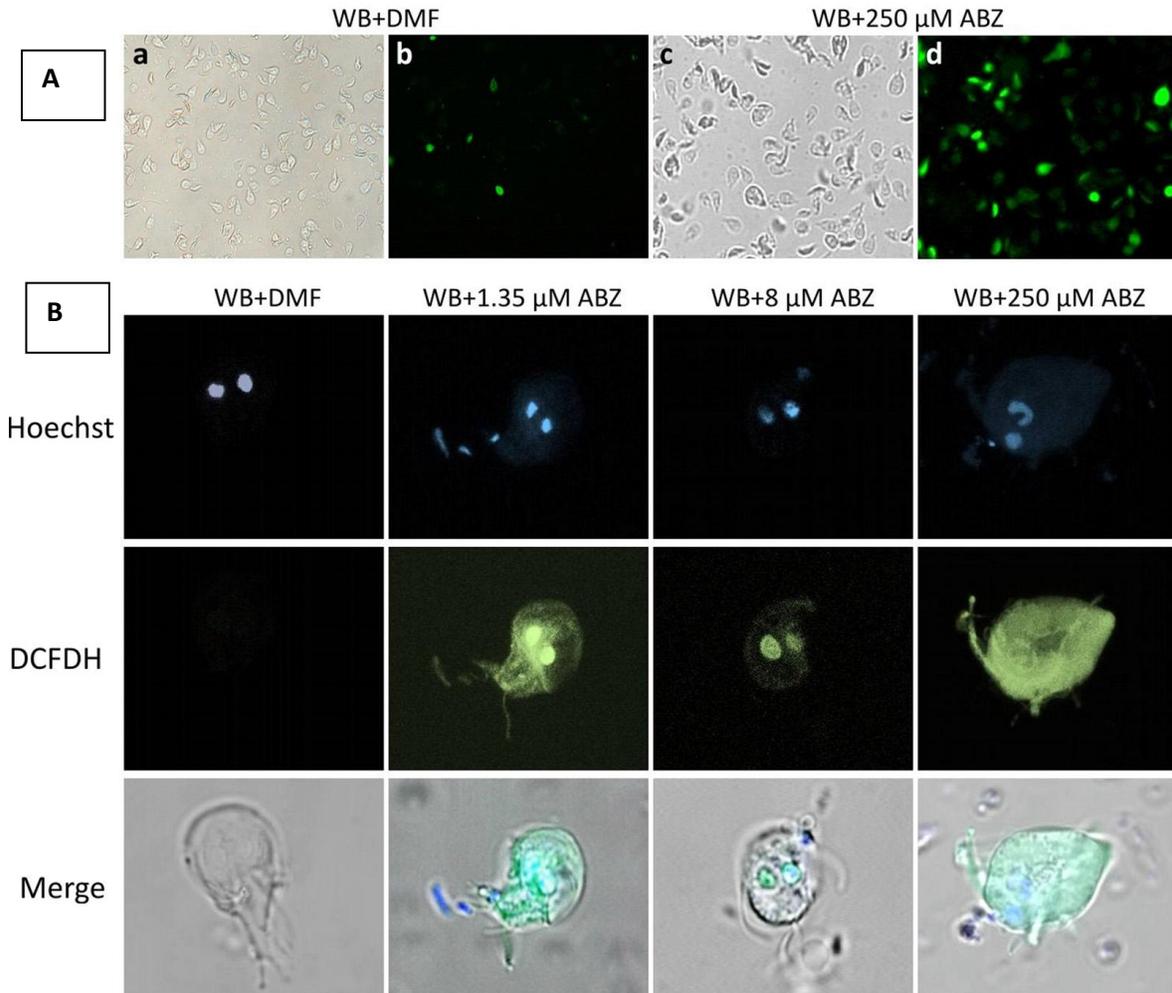


Figura 1. Detección de especies reactivas de oxígeno (ERO) en trofozoítos de *Giardia duodenalis* expuestos al albendazol (ABZ). La cepa sensible de *Giardia* (WB) fue expuesta a vehículo (DMF) y a 1.35 μM, 8 μM o 250 μM de ABZ por 8 hrs a 37°C. Posteriormente se agregó DCFDH para evaluar la formación de ERO. Como control positivo se utilizó a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μM (E). En las microfotografías del panel superior se muestran, en la primera fila las imágenes de campo claro, en la segunda la tinción con el colorante nuclear Hoechst y en la última fila la detección de ERO con DCFDH. Las células tratadas muestran una mayor señal fluorescente que las células sin tratar. Las graficas del panel inferior son datos de citometría de flujo de un experimento representativo de tres diferentes ensayos, en donde se cuantificó la población de trofozoítos positiva a ERO. La tabla resume lo encontrado en las gráficas, siendo la población M1 negativa a ERO y la población M2 positiva a ERO.

Para determinar la ubicación precisa de la formación de ERO intracelular dentro de los trofozoítos se utilizó el DCFDH en microscopía confocal con parásitos tratados con 1.35, 8 y 250  $\mu\text{M}$  de ABZ y añadiendo DCFDH. Como se aprecia en la Figura 2A la mayoría de la población expuesta al fármaco presenta señal positiva a ERO. La localización de las ERO se da de manera preferencial en los núcleos celulares, esto en los cultivos expuestos a 1.35 y 8  $\mu\text{M}$  de ABZ. En el caso de los parásitos expuestos a 250  $\mu\text{M}$  del fármaco la señal está presente tanto en el núcleo como en el citoplasma celular (Figura 2 pánel inferior). En este caso son evidentes los cambios morfológicos que produce el ABZ y que han sido previamente reportados (Paz-Maldonado *et al*, 2013).



*Figura 2. Localización intracelular de ERO en trofozoítos de G. duodenalis. La cepa sensible de Giardia (WB) fue expuesta a (columnas, de izquierda a derecha) 1.35, 8 y 250 μM de ABZ por 8 hrs a 37°C. Posteriormente se agregó DCFDH para evaluar la localización de ERO por microscopia confocal. A el panel superior muestra una imagen representativa de trofozoítos positivos y negativos a ERO. B Imágenes de células individuales representativas. En la primera fila las imágenes de tinción con el colorante nuclear Hoechst, en la segunda fila la detección de ERO con DCFDH y en la última fila las imágenes superpuestas. La localización en trofozoítos expuestos a 1.35 y 8 μM de ABZ es preponderantemente nuclear, mientras que los tratados con 250 μM de ABZ muestran un patrón difuso en el núcleo y todo el citoplasma de los trofozoítos. Las imágenes son representativas de al menos tres ensayos independientes.*

Las clonas resistentes a ABZ: R1.35, R8 y R250 (Argüello-García *et al*, 2009; Paz-Maldonado *et al*, 2013) se utilizaron para determinar la posible existencia de resistencia cruzada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un inductor de estrés oxidante. Con este propósito las clonas resistentes se incubaron en concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 25, 50, 75, 100 µM) y se determinó el crecimiento celular después de 24 hrs mediante SYTOX Green. En general, las clonas resistentes a 1.35 y 250 (R1.35 y R250) mostraron una resistencia cruzada parcial a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 3A). Es un caso especial la clona R8, la cual se comporta de manera diferente a las otras dos, esta clona se ha catalogado como un “estado de transición” y se sabe presenta comportamientos particulares similares a lo observado en este ensayo (Argüello-García *et al*, 2009; Paz-Maldonado *et al*, 2013).

Para evaluar si existe resistencia cruzada entre parásitos resistentes a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el ABZ, se cultivaron trofozoitos en presencia de concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, alrededor de 6 meses de cultivo permitieron obtener una cepa con resistencia a 75 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (denominada ROX). Esta cepa fue cultivada en presencia de diferentes concentraciones de ABZ (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 y 8 µM) mostrando un mayor crecimiento en presencia del fármaco en comparación de la cepa susceptible (WB) (Figura 3B).

## 8.2 La cisteína aumenta la tolerancia a ABZ en los trofozoítos tratados con el fármaco

*G. duodenalis* posee un metabolismo antioxidante similar al bacteriano en el que la cisteína es el principal tiol antioxidante en lugar de glutatión. Con la finalidad de analizar si el aumento de los niveles de cisteína extracelular puede conferir una mayor tolerancia al fármaco en los trofozoítos susceptibles a ABZ, estos se incubaron en medio de cultivo con diferentes concentraciones de cisteína (0.5, 1, 2 y 4 mM), posteriormente se añadió el ABZ a una concentración 0.2 µM y después de un periodo de incubación de 48 hrs se determinó el crecimiento celular en los trofozoitos trados. En estos ensayos se observó que los parásitos que se incubaron a la concentración de cisteína más alta (4 mM) mostraron mayores tasas de crecimiento después de la exposición ABZ que aquellos que se incubaron a concentraciones

más bajas de este aminoácido (Figura 3C). Estos resultados sugieren que la exposición a cisteína puede, en parte, prevenir el estrés oxidante ocasionado por el ABZ.

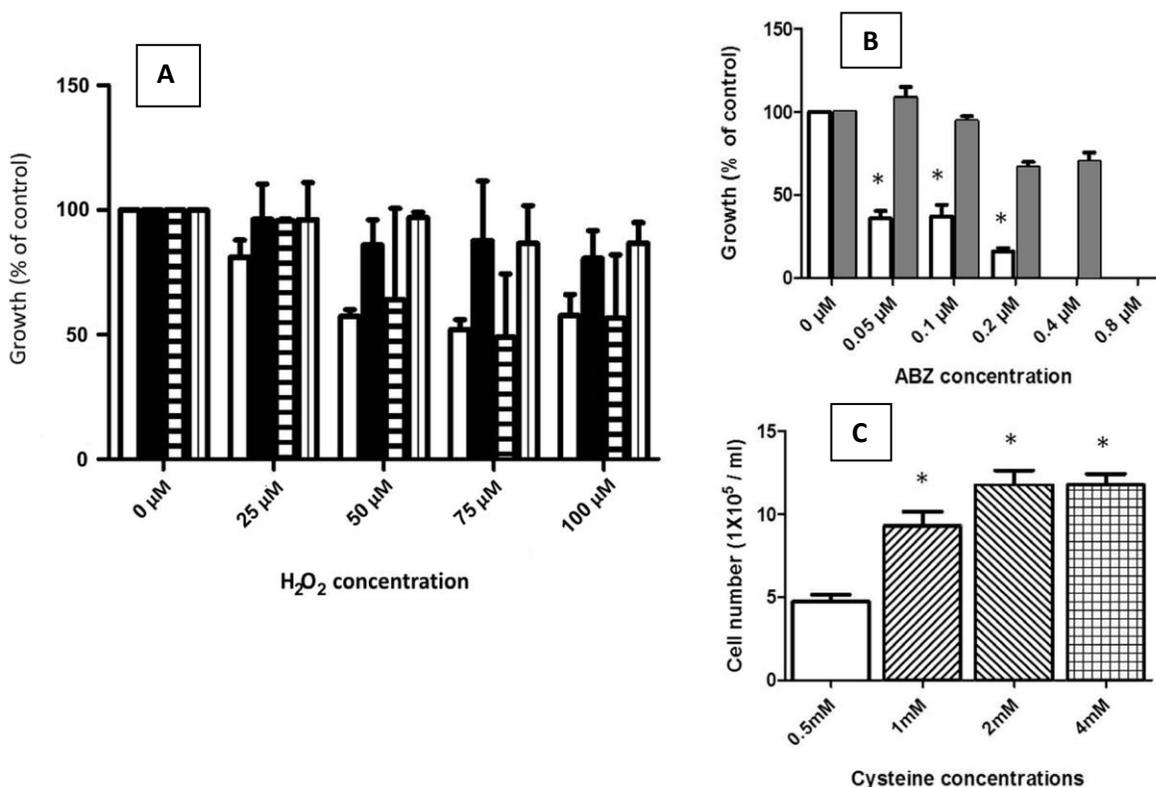


Figura 3. Resistencia cruzada a ABZ y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y protección de la cisteína (Cys) en trofozoitos expuestos al ABZ. **A** Resistencia cruzada de clonas resistentes al ABZ contra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las clonas resistentes a ABZ mostraron resistencia cruzada a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La barra blanca corresponde a cepa susceptible (WB), en barras negras la clona R1.35, barra con líneas horizontales R8, barra con líneas verticales R250. **B** Resistencia cruzada en cultivo resistente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ROX) contra ABZ, en barras blancas la cepa WB y en barras grises el cultivo ROX. Se observó que la cepa resistente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> crece en presencia de ABZ. **C** Protección de Cys en trofozoitos expuestos al ABZ, Cultivos de Giardia fueron incubados 24 h con 0.5 mM (barra blanca), 1 mM (barra con líneas ascendentes) 2mM (barra con líneas descendentes) y 4 mM (barra cuadriculada). Posteriormente se agregó 0.2 μM de ABZ y 48 h después se cuantificó el número de células. Las gráficas representan la media de tres ensayos independientes con desviación estándar. \* < p=0.5 en ANOVA y análisis de Tukey.

### 8.3 Análisis del daño a biomoléculas en trofozoítos de *G. duodenalis* ante la exposición a ABZ

La formación de ERO puede llevar a estrés oxidante, el cual se ve reflejado como daño oxidante en biomoléculas. Con el fin de evaluar este daño en proteínas se determinó la presencia de grupos carbonilo. Los trofozoítos de *Giardia* fueron expuestos a 1.35, 8 y 250  $\mu\text{M}$  de ABZ, y posteriormente se evaluó la concentración de grupos carbonilo en el extracto protéico. Como se observa en la Figura 4A, existe una tendencia de aumento en la concentración de grupos carbonilos con forme aumenta la concentración del fármaco, dicho aumento no muestra significancia estadística aunque no se puede descartar la posible relevancia biológica.

Por otro lado los lípidos pueden ser afectados en el estrés oxidativo por el fenómeno de lipoperoxidación, durante esta oxidación se presenta la formación de intermediarios como son MDA y HNE. La determinación de estos intermediarios se determinó después de la exposición de trofozoítos de la cepa WB a concentraciones crecientes de ABZ (1.35, 8 y 250  $\mu\text{M}$ ). Los resultados no muestran diferencias significativas en la formación de MDA o HNE entre los parásitos sin exponer y los expuestos al fármaco (Figura 4B). Se sabe que el MDA puede interaccionar con algunas proteínas, formando aductos MDA-proteína, debido a esto, se llevó a cabo la detección de estos aductos por Western blot utilizando anticuerpos específicos MDA-proteína (Figura 4C). De manera similar a lo observado en el ensayo anterior no se detectaron diferencias significativas entre los parásitos expuestos al ABZ y los que no lo estuvieron.

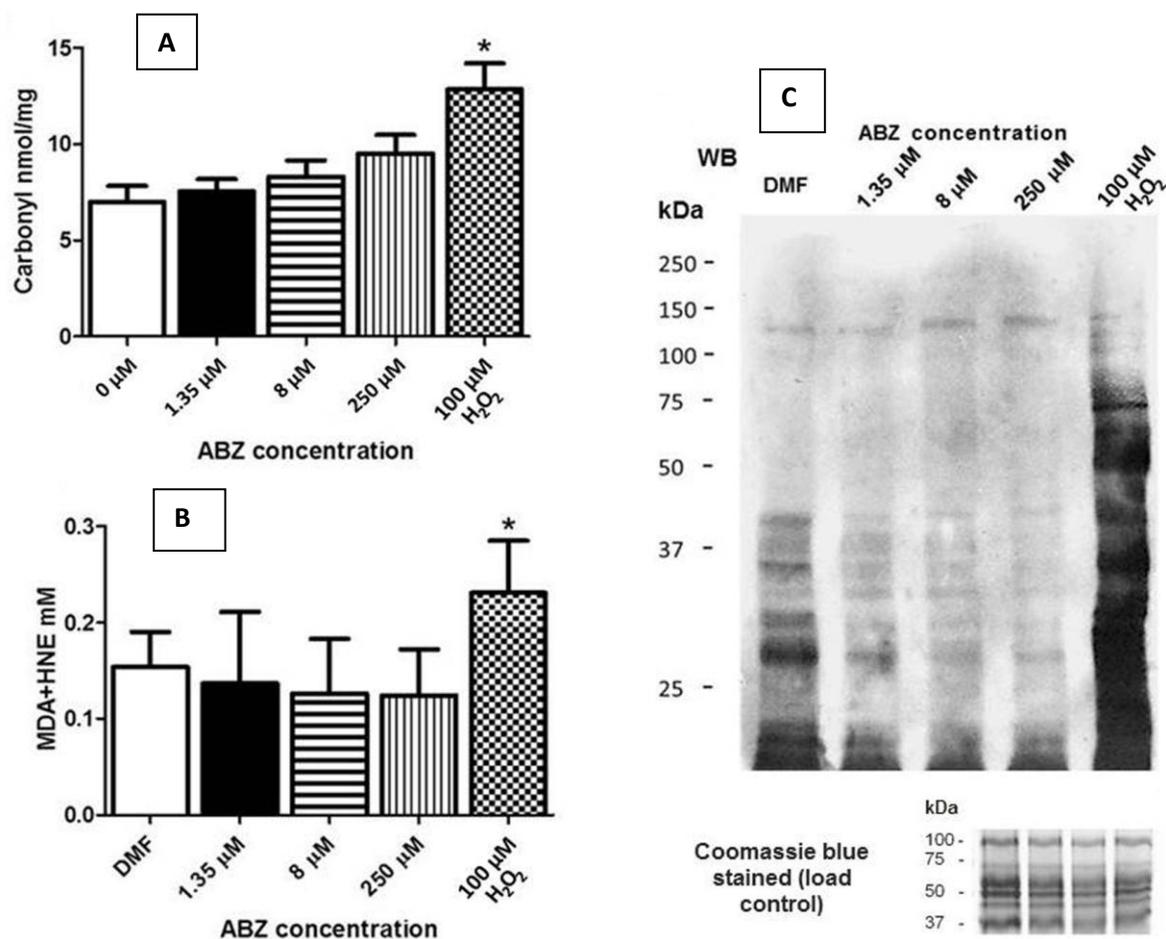
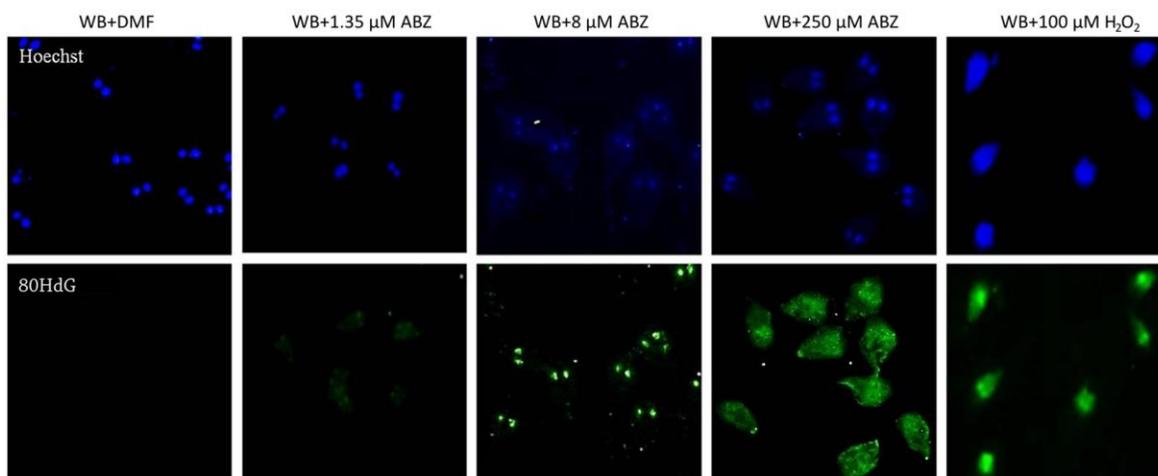


Figura 4. Daño oxidante en biomoléculas de trofozoitos expuestos al ABZ. **A** Carbonilación de proteínas en trofozoitos de *G. duodenalis* expuestos al ABZ. **A**. Los parásitos fueron expuestos a vehículo (barra blanca), 1.35  $\mu$ M (barra negra) 8  $\mu$ M (barra con líneas horizontales), 250 (barra con líneas verticales) y  $H_2O_2$  (barra cuadriculada). **B**. Evaluación de lipoperoxidación por detección de MDA y HNE en trofozoitos de *G. duodenalis* expuestos al ABZ, los parásitos fueron expuestos a vehículo (barra blanca), 1.35  $\mu$ M (barra negra) 8  $\mu$ M (barra con líneas horizontales), 250 (barra con líneas verticales) y  $H_2O_2$  (barra cuadriculada). **C**. Western blot con anticuerpos contra aductos de proteína-MDA en parásitos expuestos a 1.35, 8 y 250  $\mu$ M de ABZ. Las gráficas representan la media de tres ensayos independientes con desviación estándar. \* <  $p=0.5$  en ANOVA y análisis de Tukey.

#### 8.4 Caracterización del daño inducido por ABZ al DNA de trofozoitos de *G. duodenalis*

El daño oxidativo al DNA por la exposición al ABZ se determinó mediante ensayos de inmunocitoquímica utilizando anticuerpos contra 8OHdG marcados con floreseína. Después

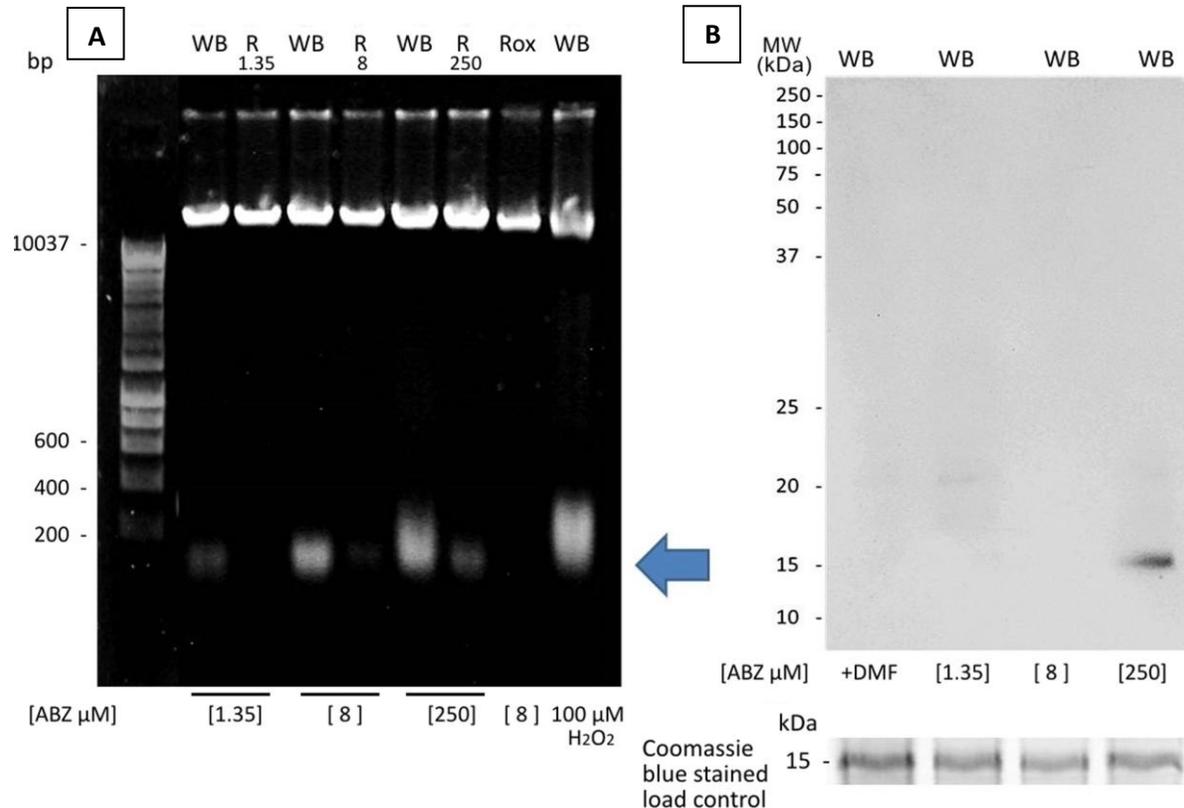
de la exposición de los trofozoítos a diferentes concentraciones de ABZ se observó un aumento significativo en la señal intranuclear, que se asocia a la formación de 8OHdG en DNA de las células tratadas (Figura 5). En la mayor concentración utilizada del fármaco (250  $\mu\text{M}$ ) se observó la señal fluorescente en el núcleo y todo el citosol, mostrando un patrón intracelular difuso (Figura 5).



*Figura 5. Formación de daño oxidante en material genético de trofozoítos de Giardia duodenalis expuestos al Albendazol (ABZ). La cepa sensible de Giardia (WB) fue expuesta a vehiculo (DMF) y a 1.35  $\mu\text{M}$ , 8  $\mu\text{M}$  o 250  $\mu\text{M}$  de ABZ por 8 hrs a 37°C. Posteriormente se incubó con anti-8OxiGuanosina. Como control positivo se utilizó a  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$ . En las micrografías de inmunofluorescencia se muestran, en el panel superior las imágenes con el colorante nuclear Hoechst y en panel inferior la detección de daño oxidante con anti-8OxiGuanosina. Las células tratadas muestran una mayor señal que las células sin tratar. Imágenes representativas de tres ensayos independientes.*

De las observaciones anteriores se concluye que el ABZ causó un daño oxidativo preferencial a nivel de DNA. Con la finalidad de analizar la integridad del DNA, trofozoitos de *Giardia* se expusieron al ABZ en diferentes concentraciones (1.35, 8, 259  $\mu\text{M}$ ), posteriormente se obtuvo el DNA de los parásitos para su corrimiento en geles de agarosa. Como se muestra en la Figura 6A, el DNA genómico sufrió degradación en los trofozoítos expuestos al ABZ, en el gel mostrado se aprecian bandas difusas de bajo peso molecular (flecha Figura 6A). Este daño no se presenta en las clonas resistentes al ABZ ni tampoco en la clona resistente a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Para corroborar la presencia de daño en DNA se utilizaron anticuerpos contra histona H2AX fosforilada, la cual se fosforila en respuesta a una ruptura

de doble cadena. Como se muestra en la Figura 6B la exposición del parásito a la mayor concentración de fármaco utilizada (250  $\mu\text{M}$ ) resultó en la detección de fosforilación en la H2AX, lo que indica daño de doble cadena en el DNA.



**Figura 6.** Fragmentación del DNA y fosforilación de la histona H2AX en trofozoítos de *Giardia duodenalis* expuestos al Albendazol (ABZ). **A** Degradación del DNA en trofozoítos de *Giardia duodenalis* expuestos al Albendazol, tanto la cepa sensible WB como las clonas resistentes al ABZ (R1.35, R8, R250) fueron expuestas a vehiculo (DMF) y a 1.35  $\mu\text{M}$ , 8  $\mu\text{M}$  o 250  $\mu\text{M}$  de ABZ por 8 hrs a 37°C. Posteriormente se purificó el DNA y corrió en geles de agarosa. **B** Detección de la fosforilación de la histona H2AX. Se incubó a los parásitos con (DMF) y a 1.35  $\mu\text{M}$ , 8  $\mu\text{M}$  o 250  $\mu\text{M}$  de ABZ, posteriormente se realizó el análisis de Western blot con anti-H2AX fosforilada. Como control positivo se utilizó a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu\text{M}$ . Imágenes representativas de tres ensayos independientes.

8.5 El tratamiento de los trofozoítos con ABZ induce apoptosis y afecta la progresión del ciclo celular en estos.

Para determinar el efecto del ABZ sobre los trofozoítos de *G. duodenalis* se analizó si este

fármaco induce fenómenos semejantes al proceso de apoptosis. Para ello se determinó la translocación de fosfatidilserina en la membrana de trofozoítos expuestos al ABZ, ello mediante la detección de anexina V como un marcador específico de la apoptosis temprana e IP para marcar a células con apoptosis tardía y necrosis. Como se aprecia en la Figura 7, los trofozoítos expuestos a ABZ muestran un aumento significativo en la señal de la anexina V. A concentraciones de fármaco más altas el número de células positivas para anexina V aumenta. En la concentración más elevada, 250  $\mu\text{M}$  de ABZ, se aprecia un elevado porcentaje de células marcadas positivamente tanto para anexina V como para IP, lo cual indica un proceso de muerte celular programada tipo apoptosis tardío y necrosis (Figura 7).

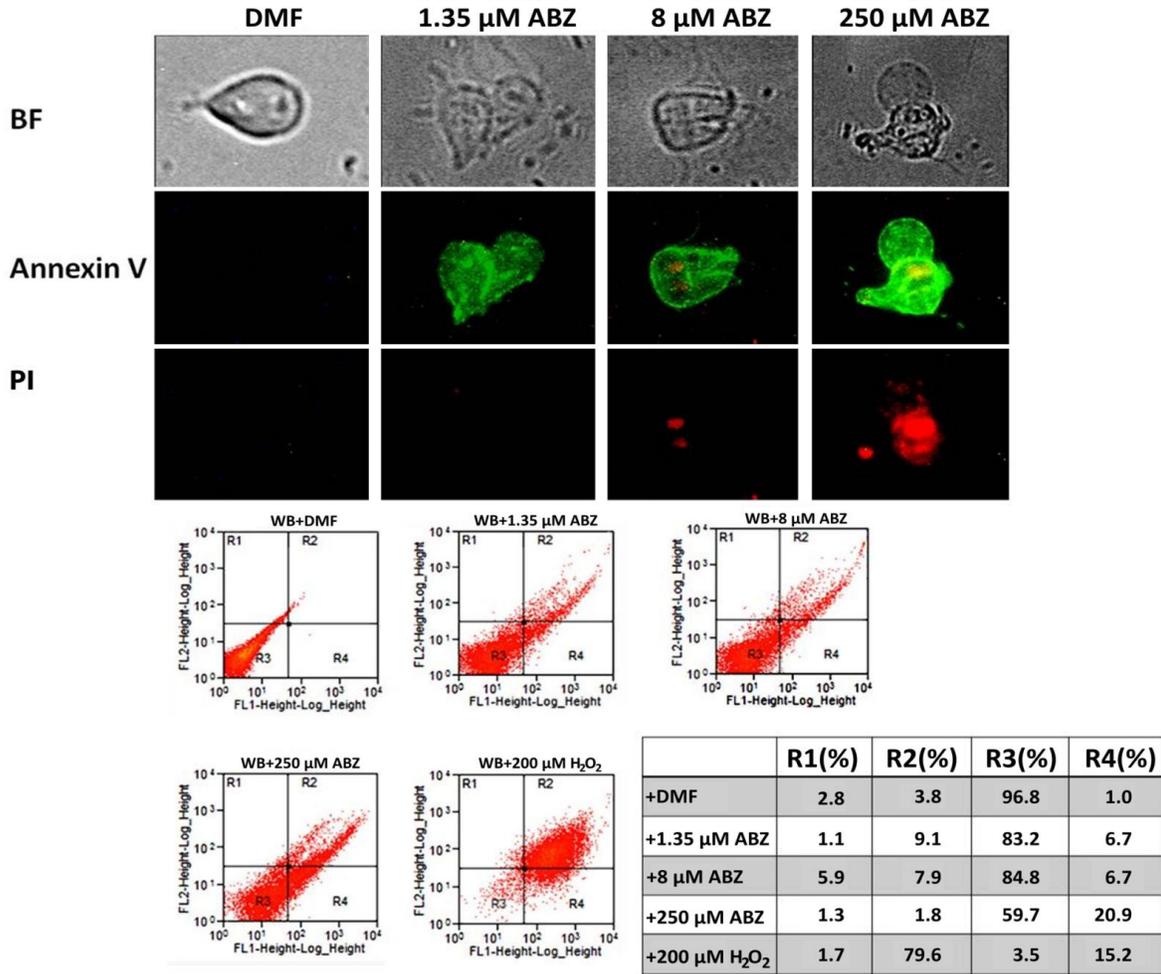


Figura 7. Translocación de fosfodiesterasas e incorporación de ioduro de propidio (IP) en trofozoítos de *Giardia duodenalis* expuestos al Albendazol (ABZ). La cepa sensible de *Giardia* (WB) fue expuesta a vehículo (DMF) y a 1.35 μM, 8 μM o 250 μM de ABZ por 16 hrs a 37°C. Posteriormente se agregó anexina V, la cual detecta fosfodiesterasas en región externa de la membrana, como marcador de apoptosis temprana e IP, el cual se incorpora al DNA cuando la célula pierde permeabilidad, como marcador de apoptosis tardía y necrosis. Como control positivo se utilizó a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μM (E) para tratar a los trofozoítos. En las micrografías del panel superior se muestran, en la primera fila las imágenes de campo claro, en la segunda la señal de anexina V y en la última fila la detección de IP. Las células tratadas muestran una mayor señal que las células sin tratar. Las gráficas del panel inferior son datos de citometría de flujo de un experimento representativo de tres diferentes, en donde se cuantifico la población de trofozoitos positiva a anexina V (R4), positiva para IP (R1), doble positivas (R2) o doble negativas (R3). La tabla resume lo encontrado en tres ensayos de citometría de flujo.

Dada la evidencia de daño en material genético y la presencia de marcadores de apoptosis, se evaluó la posible afectación en el ciclo celular del parásito. En experimentos adicionales los núcleos de trofozoítos se tiñeron con PI para evaluar si la exposición al ABZ puede alterar la progresión del ciclo celular. En los trofozoitos tratados se observó una disminución notable en la subpoblación G1 (área amarilla, a partir de 14,6% en las células tratadas con vehículo al 2,7% en las células tratadas con 250  $\mu$ M ABZ), un ligero aumento en la subpoblación de la fase S (22.1% a 27%, respectivamente) y un aumento similar en la subpoblación G2 (61,0% a 69,9%, respectivamente). Estos datos sugieren que las concentraciones ABZ citotóxicos sólo permiten un tránsito parcial de G1 a S y de S a G2 en las células, presentando un patrón (G2 >> S > G1 > M) que indica un paro del ciclo celular en el límite de fase G2 / M.

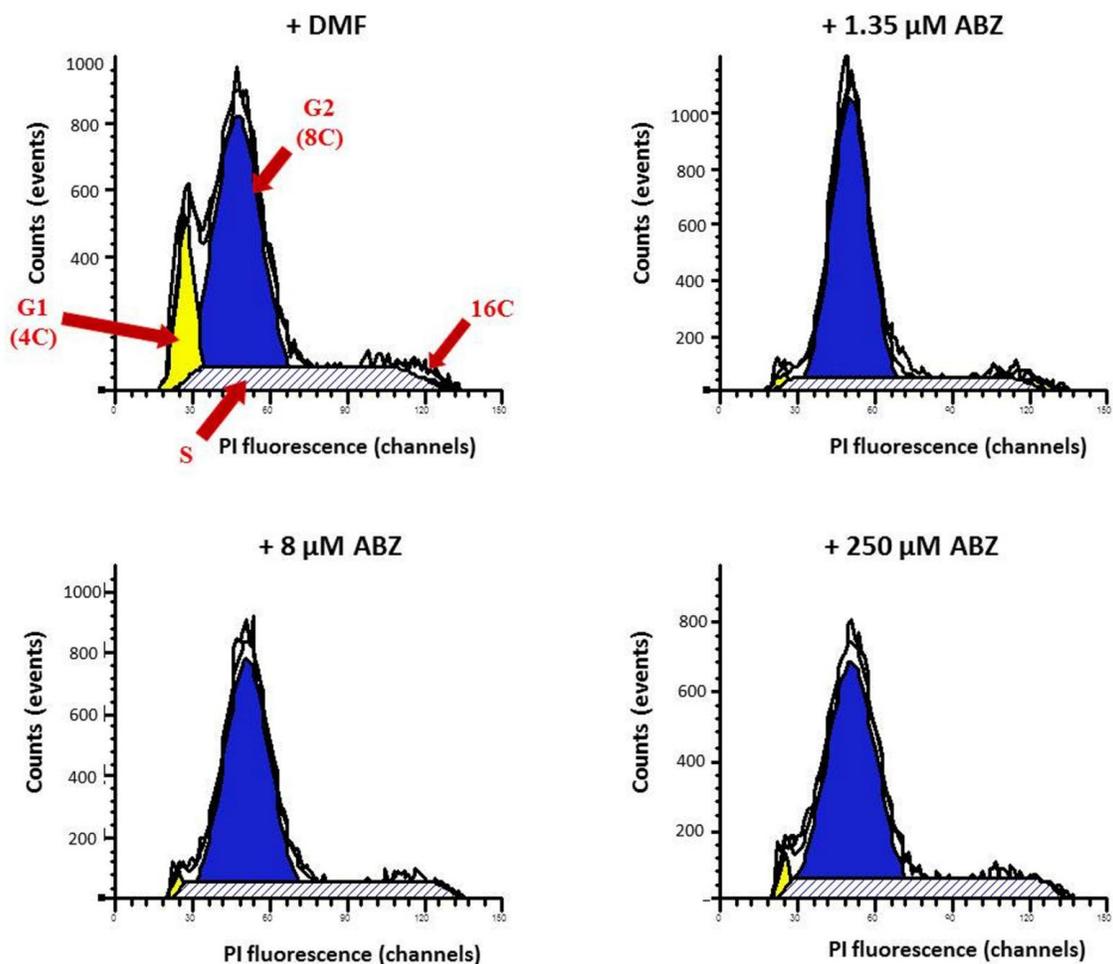


Figura 8. Efecto de la exposición al albendazol en ciclo celular de trofozoítos de *Giardia duodenalis*. La cepa sensible de *Giardia* (WB) fue expuesta a vehiculo (DMF) y a 1.35  $\mu\text{M}$ , 8  $\mu\text{M}$  o 250  $\mu\text{M}$  de ABZ por 4 hrs a 37°C. Las células fueron teñidas con yoduro de propidio (IP), la fluorescencia fue medida por citometría de flujo. La región amarilla corresponde a células en G1, la azul a G2 y la S por el área rayada, M esta indicada con la flecha. Las figuras son representativas de tres ensayos independientes.

### 8.6 Identificación de posibles proteínas activadoras del ABZ.

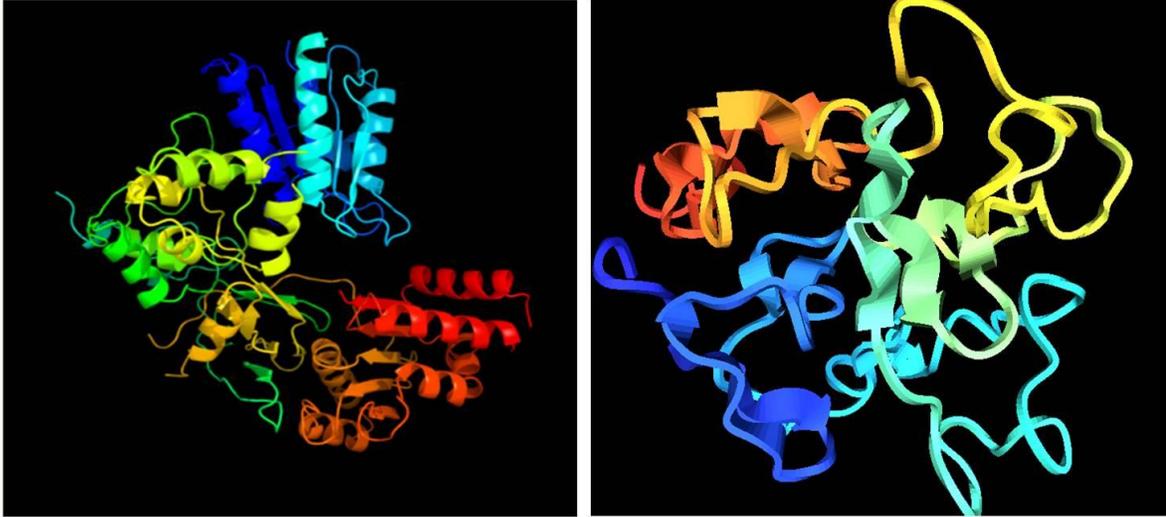
El ABZ es un profarmaco, por lo cual es necesaria su activación (por monooxigenación) para ejercer el efecto parasiticida. En términos generales se sabe que esta activación se puede llevar a cabo por dos tipos de proteínas, las flavin monooxigenasas y con mayor frecuencia, los citocromos P450 (CYP-450). Uno de los objetivos del presente trabajo fue evaluar la presencia de alguna de estas enzimas en el parásito *G. duodenalis*. Mediante la

herramienta bioinformática “Genes By Motif Search” disponibles en la base de datos de *Giardia* (<http://giardiadb.org/>), se localizó una proteína hipotética que contenía un motivo característico de los CYP-450 ([FW]-[SGNH]-X-[GD]-{F}-[RKHPT]-{P}-C-[LIVMFAP]-[GAD], este motivo está reportado en <http://prosite.expasy.org/PS00086>, con precisión de 95.33 % y cobertura de 93.07 %). Empleando un procedimiento similar se encontró una CYP-450 reductasa, típicamente asociada a la función biológica de los CYP-450. No se localizaron proteínas similares a flavin monooxigenasas en el genoma de *Giardia* ni en otras bases de datos revisadas. El número de identificación del gen homólogo a CYP-450 reductasa es >GL50803\_15897, y el número de la proteína con patrón concenso de CYP-450 es >GL50803\_101765.

Mediante el uso de los programas computacionales I-Tasser y QuarcK se obtuvieron modelos teóricos de la estructura tridimensional del CYP-450 reductasa y del CYP-450 respectivamente (Xu y Zhang 2012; Yang *et al.*, 2015). En ambos programas se ingresó la secuencia de aminoácidos de la proteína en formato FASTA y, a partir de ésta, el programa busca modelos similares en bases de datos para estructuras terciarias y cuaternarias previamente reportadas (Figura 10). En el caso de la CYP-450 se obtuvo un modelo de baja calidad, ello principalmente a la presencia de una secuencia altamente hidrofóbica (Figura 9). El subsecuente análisis de dicha estructura hidrofóbica demostró alta homología con la familia de las proteínas variantes de superficie (VSP, por sus siglas en inglés). En una búsqueda bibliográfica del gen correspondiente a la CYP-450 hipotética se encontró un reporte de Argüello y colaboradores en 2009 donde describen a esta proteína y la identifican como una VSP relacionada a la resistencia al ABZ (ARR-VSP, por sus siglas en inglés).

CYP-450 reductasa putativa *G. duodenalis*

CYP-450 putativa *G. duodenalis*



*Figura 9. Modelo teórico tridimensional de proteínas putativas en Giardia duodenalis. Mediante bases de datos y programas computacionales se identificaron genes que codifican para proteínas homólogas a CYP-450 reductasa y CYP-450 respectivamente. Con la estructura primaria se realizaron modelamientos teóricos in silico. De izquierda a derecha, modelo en programa I-Tasser de una proteína putativa CYP-450 reductasa *G. duodenalis*, modelo en programa Quark de una proteína putativa CYP-450 en *G. duodenalis*.*

En ensayos subsecuentes, se utilizaron anticuerpos policlonales heterologos contra CYP-450 para detectar una posible proteína homóloga a esta familia en *Giardia*. En estos ensayos los trofozoitos se incubaron en presencia de beta naptoflavona, un inductor de CYP-450 por diferentes tiempos (10, 12, 24 y 48 hrs), se obtuvieron los extractos totales y se analizaron en ensayos de Western blot como se describe en la sección de materiales y métodos. Los resultados mostraron una banda específica en un peso molecular aproximado de 45 kDa. Dicha banda incrementa su señal después de la incubación con el inductor beta naptoflavona, lo cual indica que pudiera corresponder a un CYP-450 (Figura 10).

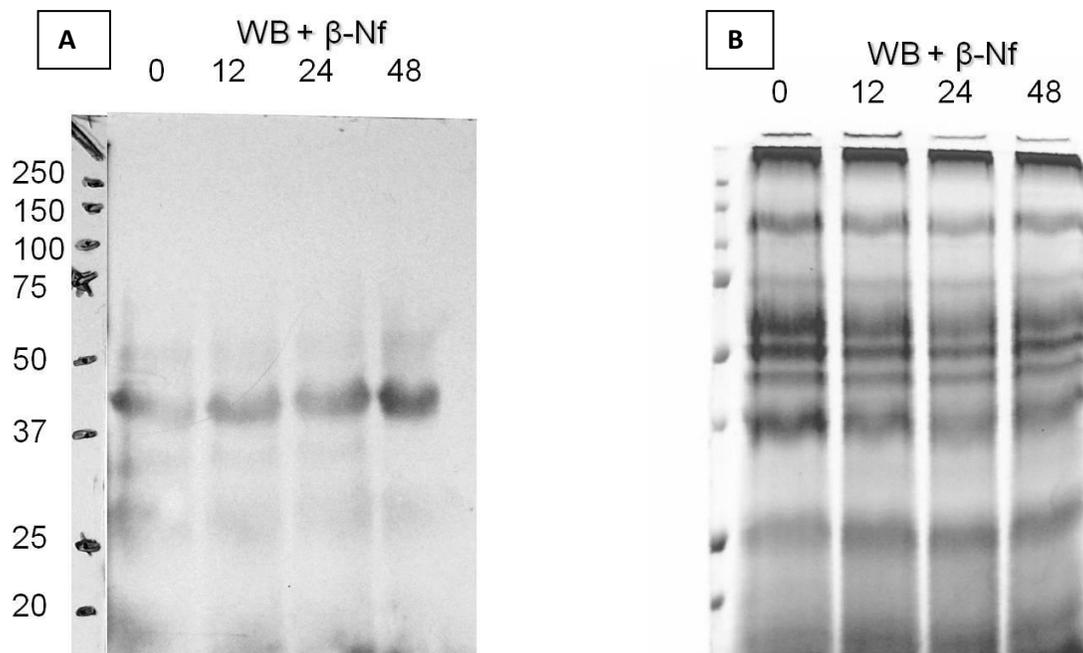


Figura 10. Detección de proteínas homologas a CYP-450 en trofozoitos de *Giardia duodenalis* por Western blot. A. Trofozoitos de *G. duodenalis* fueron expuestos a  $\beta$ -naphthoflavona, un inductor de CYP-450 por 0, 12, 24, 48 hrs a 37°C, posteriormente los extractos proteicos fueron analizados por Western blot empelando anticuerpos anti-CYP1A1 heterólogos. En B se muestra el gel de proteína teñido con azul de coomassie como control de carga.

Por otro lado se realizaron ensayos para detectar actividad enzimática específica de CYP-450. En estos ensayos se utilizó la 7-etoxiresorufina como un substrato específico, el cual se incubó con extracto total de trofozoitos de *Giardia*. La presencia de fluorescencia indica la activación del substrato y corresponde a la actividad enzimática. Como se observa en la Figura 11 se detectó actividad enzimática específica para CYP-450 de 0.17 pmol/min/mg promedio, es decir, los trofozoitos de *Giardia* tienen actividad específica de CYP-450.

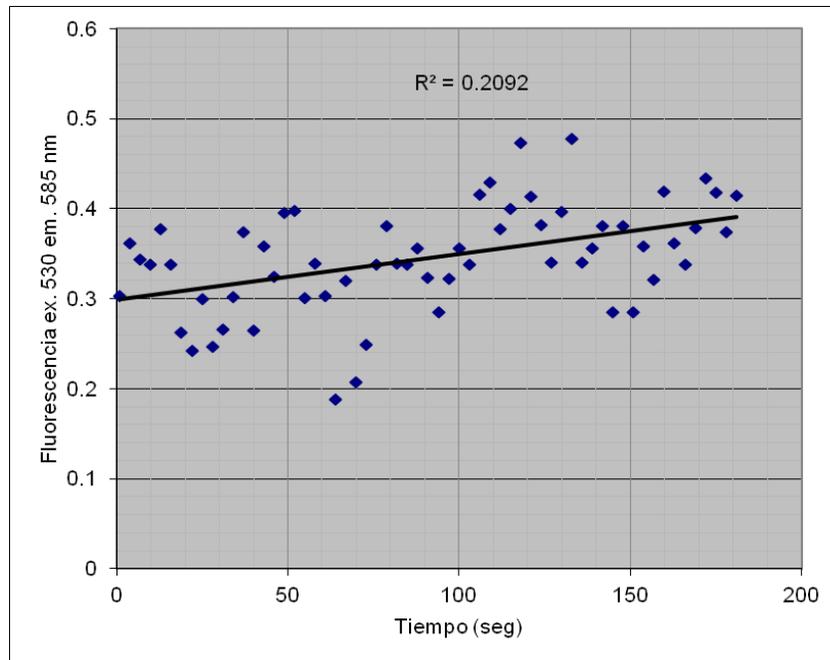


Figura 11. Detección de actividad enzimática específica de CYP-450 en trofozoitos de *Giardia duodenalis*. Extractos totales de trofozoitos de *G. duodenalis* se obtuvieron para realizar ensayos de actividad enzimática mediante el uso el substrato 7-etoxiresorufina. La imagen muestra una imagen representativa del ensayo de detección de actividad de CYP-450 por fluorescence.

Finalmente se analizaron los transcritos correspondientes a los genes de *Giardia* homologos a CYP-450 reductasa y la ARR-VSP (CYP-450 putativa), emplando primers específicos utilizados en RT-PCR de punto final. El RNAm extraído de la cepa susceptible y de las clonas resistentes a ABZ fue retrotranscrito y utilizado en el ensayo de RT-PCR. Como se observa en la Figura 12 los transcritos de las dos proteínas (CYP-450 reductasa y ARR-VSP) se encuentran en menor concentración en las clonas resistentes al ABZ, mostrando una relación inversa entre resistencia y cantidad de transcrito. En todos los casos se utilizó el transcrito de ubiquitina, gen de expresión constitutiva, como control (Figura 12).

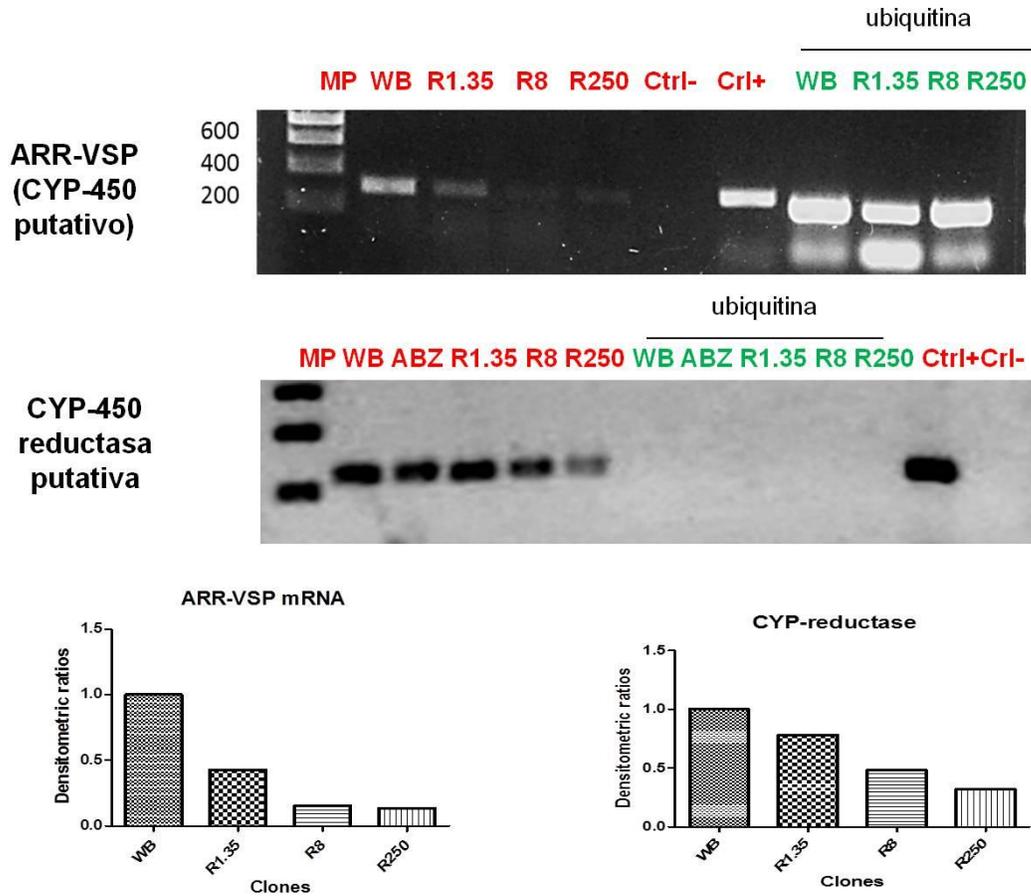


Figura 12. Detección del de RNAm de proteínas putativas en trofozoitos de *Giardia duodenalis*. Se obtuvieron RNAm de la cepa susceptible (WB) y de las clonas resistentes R1.35, R8 y R250. A partir de estos se realizó una retrotranscripción para evaluar los niveles de RNAm específico de CYP-450 reductasa putativa y ARR-VSP (CYP-450 putativa). En la imagen superior se muestran los amplificadores correspondientes a ARR-VSP, en la imagen inferior se muestran los amplificadores de CYP-450 reductasa putativa. En ambos casos se utilizó la ubiquitina como amplificador control. Mediante el programa ImageJ se obtuvieron datos de densitometría, los cuales están graficados en el panel inferior. Las imágenes y los datos son representativos de tres ensayos independientes.

## 9. DISCUSIÓN

Las enfermedades parasitarias por protozoos y helmintos representan un grave problema de salud en todo el mundo. El control de las infecciones causadas por estos parásitos se lleva a cabo principalmente por el tratamiento farmacológico. El fármaco ABZ es un benzimidazol con un efecto anti-helminto de amplio espectro esto aunado a su bajo costo hacen de este fármaco una alternativa adecuada en los programas de administración masiva de medicamentos para desparasitar niños en los países donde la giardiasis es endémica. La dosificación de ABZ contra la giardiasis es de una dosis de 400 mg cada 24 hrs. durante 5 días. La utilización de dosis subóptimas está asociada a la generación y difusión de la resistencia a ABZ en *Giardia*. (Watkins y Eckmann, 2014; Tian, 2010). La presencia de casos refractarios al ABZ es un problema de salud, a la fecha se han descrito gran cantidad de estos casos y resultan relativamente frecuentes en la práctica clínica. Los parásitos resistentes al ABZ también pueden presentar resistencia a otros fármacos, dicha resistencia cruzada dificulta la eliminación de la infección e incrementa la severidad de la misma. El conocer los mecanismos de acción del ABZ permitirá determinar el proceso de resistencia y así poder generar tratamientos más eficientes para combatir, en este caso a *Giardia*. (Watkins y Eckmann, 2014). La comprensión de los mecanismos de acción del ABZ en *Giardia* también ayudará a entender y prevenir efectos secundarios del ABZ (Dayan, 2003; Nandi y Sarkar. 2013), así como para desarrollar quimioterapias novedosas más efectivas.

En este contexto, los mecanismos de acción del ABZ se han estudiado principalmente en los parásitos helmintos, pero la información en protozoo es limitada. En helmintos, su principal mecanismo de acción se lleva a cabo mediante la unión a  $\beta$ -tubulina, causando la desestabilización del citoesqueleto. La resistencia a ABZ se ha asociado a mutaciones puntuales en esta proteína y hasta el momento otros efectos de ABZ han sido poco analizados. Algunos estudios en células de mamíferos han correlacionado el uso de ABZ a la presencia de estrés oxidativo. La susceptibilidad de muchos parásitos al estrés oxidativo es un fenómeno ya estudiado. (Pal y Bandyopadhyay, 2012), por lo tanto, en este estudio se evaluó la capacidad de ABZ para inducir estrés oxidativo en el parásito protozoario *G. duodenalis*. En nuestro grupo de trabajo se han publicado datos referentes a

la relación del ABZ con el estrés oxidante en *Giardia*, de manera particular la intervención de algunas enzimas antioxidantes en el fenómeno de resistencia a este fármaco (Argüello-García *et al*, 2015).

De acuerdo con nuestros resultados, la exposición a ABZ causó la formación intracelular de ERO en trofozoítos de *G. duodenalis*. Con ello se demuestra que el ABZ afecta el estado redox del parásito, lo cual constituye un fenómeno que se describe en este trabajo por primera vez en *G. duodenalis*. Los resultados obtenidos por microscopia confocal mostraron que las ERO se detectaron principalmente en los núcleos de los trofozoítos expuestos a ABZ. Por lo tanto, el estrés oxidativo causado por ABZ puede ser parte del efecto citotóxico de este fármaco en *Giardia*. Un aspecto importante a ser abordados en futuros estudios es determinar cuales son las ERO que están implicadas y los mecanismos que inducen su formación. La observación de que el núcleo es el principal sitio en donde se detectan ERO es un tema de interés en nuestro grupo y se puede sugerir que esto puede deberse a una distribución diferencial de las defensas antioxidantes, siendo menor en el núcleo.

Debido a que la citotoxicidad de ABZ se relacionó con el estrés oxidativo, se evaluó otra molécula pro-oxidante ( $H_2O_2$ ). Esta molécula es una de las principales ERO y se empleó a lo largo del presente trabajo como un inductor de estrés oxidante. En nuestro estudio, se detectó un grado parcial de resistencia cruzada a este agente en las clonas resistentes a ABZ. Esta correlación entre la resistencia a fármacos y la respuesta antioxidante también se ha sugerido en las cepas de *Leishmania* resistentes a los medicamentos y en otros patógenos tales como *Plasmodium* y *Pseudomonas* (Berg *et al*, 2015; Poole, 2014; Lehane *et al*, 2012). Es especialmente importante la resistencia cuando los fármacos presentan una actividad pro-oxidante, es decir cuando su mecanismo de acción está ligado a la formación de ERO y el estrés oxidante (Pal y Bandyopadhyay, 2012). El fenómeno de resistencia cruzada en *Giardia* hacia diferentes fármacos, incluyendo metronidazol y ABZ ya ha sido reportado (Tejman-Yarden y Eckmann 2011), aunque las causas de este aún no han sido completamente dilucidadas. La protección conferida por cisteína en trofozoítos tratados con ABZ corrobora que este fármaco induce toxicidad

mediante estrés oxidante. En este contexto, es importante estudiar más a fondo la participación de otras moléculas anti-oxidantes, en particular enzimas (por ejemplo, NADH oxidasa, flavoprotein-A, la reductasa de superóxido, peroxirredoxinas), podrían conferir protección contra el estrés oxidativo inducido por ABZ. Recientemente Argüello-García y colaboradores reportaron la sobre expresión de transcritos para varias de estas enzimas en clonas resistentes al ABZ, lo cual nos indica un papel importante en el metabolismo de resistencia a fármacos (Argüello-Gacía *et al*, 2015). En una aproximación basada en microarreglos Raj y colaboradores (2014) observaron sobreexpresión de diversos transcritos de *G. duodenalis* tras exponer a trofozoitos de este parásito a estrés oxidante, dichas proteínas corresponden a varios procesos celulares, incluyendo metabolismo energético y ciclo celular, entre otras (Raj, *et al*, 2014), Lo que nos indica que gran variedad de proteínas y vías metabólicas pudiesen estar relacionadas a la respuesta contra estrés y, en última instancia, a los fenotipos de resistencia a fármacos.

El daño oxidante causado por ABZ en las principales biomoléculas del parásito fue evaluado en el presente trabajo, de manera importante se encontró ausencia de peroxidación lipídica y de carbonilación de proteínas inducidas por el ABZ. Por otro lado, el análisis de la molécula de DNA muestra daño oxidante significativo y degradación del mismo por efecto del fármaco. La falta de la peroxidación de lípidos puede ser debida al hecho de que *Giardia* puede tomar lípidos y colesterol a partir de fuentes exógenas, esto aunado a metabolismo particular de los lípidos y a la localización nuclear de la formación de ERO (Gibson *et al*, 1999; Das *et al*, 2002) en este parásito. Por otro lado, la carbonilación de proteínas, un daño oxidativo irreversible, sólo mostró una tendencia a aumentar cuando se utilizaron concentraciones altas de ABZ pero se detecta un fuerte aumento cuando los parásitos se trataron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aunque la carbonilación es un marcador importante de daño a las proteínas, será importante analizar si se presentan otros mecanismos de daño oxidativo en proteínas (Møller *et al*, 2011) en los trofozoítos tratados con ABZ.

La detección de 8OHdG, junto con la degradación del DNA en trofozoítos expuestos al ABZ, indican que el DNA es una de las principales biomolécula afectada por la acción pro-oxidante de ABZ. El daño *in vitro* sobre DNA por fármacos como el metronidazol se ha

demostrado recientemente en *Giardia* (Uzlikova y Nohynkova, 2015). Otros fármacos con actividad redox tal como benznidazole y hydroxymethylnitrofurazone se ha observado que afectan de manera importante al DNA (Davies *et al*, 2014). Esto podría explicar, al menos en parte, el que se haya reportado la existencia de cepas con resistencia cruzada a varios fármacos. En el presente trabajo reportamos el efecto en trofozoítos tratados con ABZ sobre la fosforilación de la histona H2AX, que se considera como una señal de reparación después de ruptura de doble cadena del DNA. En otros protozoarios parásitos, tales como *Toxoplasma gondii*, la fosforilación de H2AX ha sido correlacionado con la pérdida de potencial patológico y baja tasa de crecimiento (Vonlaufen *et al*, 2010). Es importante señalar que el patrón de escalera típica de la degradación del DNA observado en *Giardia* expuesto a ABZ no fue simialr al asociado con la apoptosis en otros organismos ni a un patrón de barrido del DNA como comúnmente se presenta en necrosis (Bagchi *et al*, 2012). Así, el patrón de degradación del DNA se correlaciona con un fenómeno similar a la apoptosis presente en *G. duodenalis* (Bagchi *et al*, 2012; Uzlikova and Nohynkova, 2015). De hecho, la detección de fosfatidilserina, una molécula que se encuentra en la cara interna de la membrana celular y que durante las primeras etapas de la apoptosis se transloca hacia la cara exterior de la célula, sugiere un evento tipo apoptótico. Estos resultados son comparables a los reportados por otros autores con respecto a un proceso tipo apoptótico en *Giardia* cuando se expone a inductores clásicos de estrés oxidativo y a metronidazol (Bagchi *et al*, 2012). En trofozoítos expuestas a ABZ se observó una detención parcial en fases S y G2 del ciclo celular, lo que se correlaciona con la inducción de estrés oxidativo y de un proceso tipo apoptótico. Es de destacar que la detención del ciclo celular no es completa y esto permite que una porción de la población de células pueda continuar a través del ciclo celular. El efecto de diferentes fármacos en el ciclo celular de *Giardia* ha sido reportado mostrando diferentes fenómenos, incluyendo detención parcial del ciclo celular en etapas diferentes de acuerdo con el fármaco en estudio (Reaume *et al*, 2013), lo que demuestra que los mecanismos de acción de cada fármaco actúan de manera diferencial a lo largo del ciclo celular del parásito. En este trabajo, los trofozoítos tratados con ABZ mostraron un patrón consistente con el tratamiento de trofozoítos con compuestos que afectan los microtúbulos, causando citocinesis incompleta (Mariante *et al*, 2005) y corroborando así la acción que tiene el ABZ en el citoesqueleto del parásito.

En resumen, este trabajo demostró que ABZ induce la formación de intracelular de ERO en *G. duodenalis*, conduciendo a un estado de estrés oxidativo, donde la principal biomolécula afectada es el DNA. Este daño indujo la formación de 8OHdG y ruptura de doble cadena en el DNA y a su vez condujo a la desregulación del ciclo celular y eventualmente a la muerte celular tipo apoptótica. Esta información permite ampliar nuestro conocimiento con respecto a los mecanismos de acción que tiene el ABZ en *G. duodenalis*, así como de los posibles mecanismos involucrados en la resistencia a este y otros fármacos. Este conocimiento será de importancia en la implementación de quimioterapias más eficientes y en el desarrollo racional de nuevos fármacos.

En el presente trabajo también se abordó la búsqueda exhaustiva de proteínas que pudieran pertenecer a la familia de las CYP-450, las cuales se sabe son activadores de gran número de xenobióticos incluido el ABZ (Baliharová *et al*, 2005; Bártíková *et al*, 2010). Mediante el uso de bases de datos y diversos programas computacionales, se detectaron dos genes que codifican para proteínas homologas a CYP-450 y CYP-450 reductasa, respectivamente. La revisión bibliográfica y en bases de datos permitió localizar una proteína con una región homóloga a CYP-450 que había sido reportada por Argüello-García y colaboradores en el 2009 como una VSP relacionada a resistencia del albendazol (ARR-VSP). Utilizando anticuerpos específicos contra CYP-450 se detectó una banda en ensayos de Western blot, la cual corresponde a una proteína de aproximadamente 45 kDa que incrementa su expresión en presencia de inductores de CYP-450. Por otro lado, se determinó la presencia de actividad enzimática de CYP-450 en extractos totales de *G. duodenalis*, dichos ensayos dieron como resultado la detección de actividades enzimáticas específicas que están en el orden de los picomoles / min / mg de proteína. Estos niveles de actividad son comunes en las mediciones de CYP-450 (Baliharová *et al*, 2005), sin embargo sería necesario utilizar inductores e inhibidores específicos, así como otros sustratos para poder determinar cambios y caracterizar en su totalidad la actividad que existe en el extracto total (Escobar-García *et al*. 2001; Baliharová *et al*, 2005; Bártíková *et al*, 2010) . Finalmente se evaluó la concentración de RNAm de los dos genes encontrados, esto mediante RT-PCR y comparando la cantidad de transcrito entre la cepa susceptible y las clonas resistentes al ABZ.

Los resultados muestran una disminución en los mensajeros de ambos genes en las clonas resistentes comparadas con la cepa susceptible. Esto sugiere que existe una regulación diferencial de la expresión de estas proteínas asociada con la resistencia. Este es el primer trabajo en el cual se analizan proteínas de la familia de CYP-450 y de CYP-450 reductasa y en donde existe una detección y caracterización *in silico*. Dichos resultados permiten suponer que el parásito puede tener un metabolismo de citocromos de tipo P450, lo que en otros modelos se sabe es esencial para el metabolismo del ABZ. Actualmente no se tienen otros reportes de actividad enzimática específica para esta familia de enzimas por lo que es muy importante el dilucidar el mecanismo de activación del ABZ y las moléculas que participan en éste, lo cual permitirá tener mayor conocimiento del metabolismo de este fármaco.

Considerando la información obtenida en el presente trabajo, proponemos un modelo en el cual el albendazole puede ser activado por una molécula homóloga a CYP-450, posiblemente ARR-VSP, y que durante esta activación se da la formación de ERO, las cuales se concentran en el núcleo celular y afectan de manera particular a la molécula de DNA. Esto aunado a la capacidad del ABZ de causar un paro en el ciclo celular, evita la división celular, conduciendo a los trofozoitos a un fenómeno de muerte celular tipo apoptosis (Figura 13). Los datos obtenidos en este trabajo permiten ampliar nuestra comprensión sobre el mecanismo citotóxico de ABZ en *Giardia* y abre las direcciones futuras para un diseño racional de fármacos para la giardiasis, teniendo en cuenta las respuestas antioxidantes como posibles mecanismos de resistencia a múltiples fármacos. En este contexto, la generación de ERO o la inhibición de las enzimas antioxidantes endógenas sería un enfoque terapéutico racional para el desarrollo de nuevos medicamentos contra la *Giardia*, según lo propuesto anteriormente para otros parásitos (Pal y Bandyopadhyay, 2012).

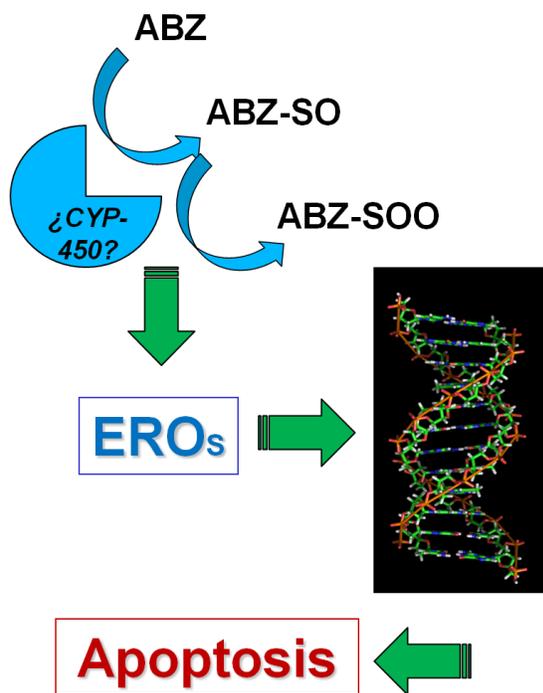


Figura 13. Modelo propuesto de activación del ABZ y muerte celular en *Giardia duodenalis*. En este modelo el ABZ es activado (ABZ-SO) por la actividad de una enzima tipo citocromo P450 de *G. duodenalis*. Durante dicha activación se generan especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales dañan el material genético del parásito, lo cual lleva a una muerte celular tipo apoptosis. En este modelo, la disminución de la actividad de la CYP-450 llevaría a una menor activación del ABZ y a una disminución en la formación de ERO, explicando así la correlación del fenotipo resistente y la disminución en la expresión de los genes que codifican a CYP-450 putativa en *Giardia*.

## **10. Conclusiones**

- **En los cultivos de trofozoítos de *G. duodenalis* expuestos a ABZ se induce la formación intracelular de ERO. .**
- **Las clonas resistentes a ABZ presentan resistencia cruzada a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**
- **El efecto oxidante del ABZ en los trofozoitos es contrarrestado, en parte, por la cisteína.**
- **El estrés oxidante inducido por ABZ. daño al DNA de *G. duodenalis***
- **El ABZ induce un proceso tipo apoptótico en los trofozoitos.**
- **El ciclo celular de *G. duodenalis* se ve afectado (arresto en fase G2) por la exposición al ABZ.**
- ***G. duodenalis* tiene gen que codifica para una proteína similar a CYP450-reductasa.**
- ***G. duodenalis* tiene un gen que codifica para la ARR-VSP la cual tiene un patrón consenso de la superfamilia de CYP450.**
- **Anticuerpos anti-CYP450 1A1 reconocen una proteína de aproximadamente 45 kDa en extractos totales de *G. duodenalis* expuestos a beta naptoflavona.**
- **Se detectó actividad enzimática de CYP450 1A1 en extractos totales de *G. duodenalis*.**
- **Se determinó una expresión diferencial de RNAm de proteínas similares a CYP450-reductasa y ARR-VSP (CYP450 putativa) entre las diferentes clonas resistentes y la cepa susceptible al ABZ.**

## 11. Perspectivas

- Detectar actividad enzimática específica de CYP-450 mediante el uso de inductores e inhibidores específicos.
- Identificar otras proteínas que pudieran participar en la metabolización del ABZ.
- Obtener anticuerpos específicos contra ARR-VSP y otras proteínas involucradas en el metabolismo de ABZ, para evaluar su participación en el fenómeno de resistencia.

## 12. Referencias

- Adam R.D., (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev.* Jul;14(3):447-475.
- Ahmad S., (1995). Oxidative stress from environmental pollutants. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 29: 135-157.
- Alam S., Yee J., Couture M., Takayama S.J., Tseng W.H., Mauk A.G., Rafferty S. (2012). Cytochrome b5 from *Giardia lamblia*. *Metallomics.* Dec;4(12):1255-61. doi: 10.1039/c2mt20152f.
- Andrade H.M., Murta S.M., Chapeaurouge A., Perales J., Nirdé P., Romanha A.J. (2008). Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole. *J Proteome Res.* Jun;7(6):2357-2367.
- Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., Svärd, S.G. (2010). Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol.* Jun;8(6):413-422. doi: 10.1038/nrmicro2317.
- Ansell, B.R., McConville, M.J., Ma'ayeh, S.Y., Dagley, M.J., Gasser, R.B., Svärd, S.G., Jex, A.R. (2015). Drug resistance in *Giardia duodenalis*. *Biotechnol Adv.* Apr 25. pii: S0734-9750(15)00074-9. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.04.009.
- Argüello-García, R., Cruz-Soto, M., Romero-Montoya, L., Ortega-Pierres, G. (2009). In vitro resistance to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles in *Giardia duodenalis*: variability and variation in gene expression. *Infect Genet Evol.* Dec;9(6):1057-64. doi: 10.1016/j.meegid.2009.05.015.
- Argüello-García, R., Cruz-Soto, M., González-Trejo, R., Paz-Maldonado, L.M., Bazán-Tejeda, M.L., Mendoza-Hernández, G., Ortega-Pierres, G. (2015). An antioxidant response is involved in resistance of *Giardia duodenalis* to albendazole. *Front Microbiol.* Apr 10;6:286. doi: 10.3389/fmicb.2015.00286.
- Bagchi, S., Oniku, A.E., Topping, K., Mamhoud, Z.N., Paget, T.A. (2012). Programmed cell death in *Giardia*. *Parasitology.* Jun;139(7):894-903. Doi:

10.1017/S003118201200011X.

- Baliharová V., Velík J., Fimanová K., Lamka J., Szotáková B., Savlík M., Skálová L. (2005). Inhibitory effect of albendazole and its metabolites on cytochromes P450 activities in rat and mouflon *in vitro*. *Pharmacol Rep.* Jan-Feb;57(1):97-106.
- Barrère V., Álvarez L., Suarez G., Ceballos L., Moreno L., Lanusse C., Prichard R.K. (2011). Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single nucleotide polymorphisms on the  $\beta$ -tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol.* May 25;186(3-4):344-9. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.11.068.
- Bártíková, H., Vokřál, I., Skálová, L., Lamka, J., Szotáková, B. (2010). *In vitro* oxidative metabolism of xenobiotics in the lancet fluke (*Dicrocoelium dendriticum*) and the effects of albendazole and albendazole sulphoxide ex vivo. *Xenobiotica.* Sep;40(9): 593-601. doi: 10.3109/00498254.2010.497565.
- Beck R., Sprong H., Bata I., Lucinger S., Pozio E., Cacciò S.M. (2011). Prevalence and molecular typing of *Giardia spp.* in captive mammals at the zoo of Zagreb, Croatia. *Vet Parasitol.* Jan 10;175(1-2):40-46.
- Berg, M., García-Hernández, R., Cuypers, B., Vanaerschot, M., Manzano, J.I., Poveda, J.A., Ferragut, J.A., Castanys, S., Dujardin, J.C., Gamarro, F. (2015). Experimental resistance to drug combinations in *Leishmania donovani*: metabolic and phenotypic adaptations. *Antimicrob Agents Chemother.* Apr;59(4):2242-55. doi: 10.1128/AAC.04231-14.
- Biagini G.A., Park J.H., Lloyd D., Edwards M.R. (2001). The antioxidant potential of pyruvate in the amitochondriate diplomonads *Giardia intestinalis* and *Hexamita inflata*. *Microbiology.* Dec;147(Pt 12):3359-3365.
- Brown D.M., Upcroft J.A., Upcroft P. (1995). Free radical detoxification in *Giardia duodenalis*. *Mol Biochem Parasitol.* Jun;72(1-2):47-56.
- Brown D.M., Upcroft J.A., Upcroft P. (1996). A H<sub>2</sub>O-producing NADH oxidase from the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. *Eur J Biochem.* Oct;1;241(1):155-161.

- Brown, D.M., Upcroft, J.A., Upcroft, P. (1996). A thioredoxin reductase-class of disulphide reductase in the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. *Mol Biochem Parasitol*. Dec 20;83(2): 211-220.
- Cacció S.M., Ryan U. (2008). Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol*. Aug;160(2):75-80.
- Callahan H.L., Crouch R.K., James E.R., (1991). *Dirofilaria immitis* superoxide dismutase: purification and Characterization. *Mol. Biochem. Parasitol*. 49: 245-251.
- Capece B.P., Virkel G.L., Lanusse C.E. (2009). Enantiomeric behaviour of albendazole and fenbendazole sulfoxides in domestic animals: pharmacological implications. *Vet J*. 2009 Sep;181(3):241-50. doi: 10.1016/j.tvjl.2008.11.010.
- Castillo-Romero, A., Leon-Avila, G., Wang, C.C., Perez, Rangel, A., Camacho, Nuez, M., Garcia, Tovar, C., Ayala-Summano, J.T., Luna-Arias, J.P., Hernandez, J.M. (2010). Rab11 and actin cytoskeleton participate in *Giardia lamblia* encystation, guiding the specific vesicles to the cyst wall. *PLoS Negl Trop Dis*. Jun 1;4(6):e697. doi: 10.1371/journal.pntd.0000697.
- Cedillo-Rivera R., Leal Y.A., Yépez-Mulia L., Gómez-Delgado A., Ortega-Pierres G, Tapia-Conyer R., Muñoz O. (2009). Seroepidemiology of giardiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. Jan;80(1):6-10.
- Chandra R., Tripathi L.M., Saxena J.K., Puri S.K. (2011). Implication of intracellular glutathione and its related enzymes on resistance of malaria parasites to the antimalarial drug arteether. *Parasitol Int*. 60(1):97-100.
- Chavez, B., Cedillo-Rivera, R., Martinez-Palomo, A. (1992). *Giardia lamblia*: ultrastructural study of the in vitro effect of benzimidazoles. *J Protozool*. Jul-Aug;39(4): 510-515.
- Coles G.C., Papadopoulos E., Himonas C.A. (1995). Tubulin resistance and worms. *Parasitol. Today* 11: 183–185.
- Coombs G.H., Westrop G.D., Suchan P., Puzova G., Hirt R.P., Embley T.M., Mottram J.C., Müller S. (2004). The amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*

contains a divergent thioredoxin-linked peroxiredoxin antioxidant system. *J Biol Chem.* Feb 13;279(7):5249-5256.

- Cruz-Soto M. (2000). Tesis de Licenciatura: Determinación de la eficacia y actividad in vitro de fármacos de la familia de los bencimidazoles en el protozoario *Giardia duodenalis*. Caracterización parcial de la resistencia a drogas en este parásito. Asesores: Dra. Guadalupe Ortega Pierres y Dr. Raúl Argüello García. Universidad Nacional Autónoma de México, ENEP Iztacala. CINVESTAV-IPN.
- Das, S., Stevens, T., Castillo, C., Villaseñor, A., Arredondo, H., Reddy, K. (2002). Lipid metabolism in mucous-dwelling amitochondriate protozoa. *Int J Parasitol.* 2002 Jun;32(6):655-675.
- Davies, C., Dey, N., Negrette, O.S., Parada, L.A., Basombrio, M.A., Garg, N.J. (2014). Hepatotoxicity in mice of a novel anti-parasite drug candidate hydroxymethylnitrofurazone: a comparison with Benznidazole. *PLoS Negl Trop Dis.* Oct 16;8(10):e3231. doi: 10.1371/journal.pntd.0003231.
- Dayan A.D. (2003). Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Trop.* 86(2-3):141-159.
- de Man H., van den Berg H.H., Leenen E.J., Schijven J.F., Schets F.M., van der Vliet J.C., van Knapen F., de Roda Husman A.M. (2014). Quantitative assessment of infection risk from exposure to waterborne pathogens in urban floodwater. *Water Res.* 1;48:90-9. doi: 10.1016/j.watres.2013.09.022.
- Descoteaux S., Ayala P., Samuelson J., Orozco E. (1995). Increase in mRNA of multiple Eh pgp genes encoding P-glycoprotein homologues in emetine-resistant *Entamoeba histolytica* parasites. *Gene.* Oct 16;164(1):179-184.
- Di Matteo A., Scandurra F.M., Testa F., Forte E., Sarti P., Brunori M., Giuffrè A. (2008). The O<sub>2</sub>-scavenging flavodiiron protein in the human parasite *Giardia intestinalis*. *J. Biol. Chem.* Feb;15;283(7):4061-4068.
- Diawara A., Drake L.J., Suswillo R.R., Kihara J., Bundy D.A., Scott M.E., Halpenny C., Stothard J.R., Prichard R.K. (2009). Assays to detect beta-tubulin codon 200

polymorphism in *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3: e397.

- Diawara, A., Halpenny, C.M., Churcher, T.S., Mwandawiro, C., Kihara, J., Kaplan, R.M., Streit, T.G., Idaghdour, Y., Scott, M.E., Basáñez, M.G., Prichard, R.K. (2013). Association between response to albendazole treatment and  $\beta$ -tubulin genotype frequencies in soil-transmitted helminths. *PLoS Negl Trop Dis.* May 30;7(5):e2247. doi: 10.1371/journal.pntd.0002247.
- Dimitrijević, B., Borozan, S., Katić-Radivojević, S., Stojanović, S. (2012). Effects of infection intensity with *Strongyloides papillosus* and albendazole treatment on development of oxidative/nitrosative stress in sheep. *Vet Parasitol.* May 25;186(3-4): 364-375. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.11.017.
- Drummelsmith J., Girard I., Trudel N., Ouellette M. (2004). Differential protein expression analysis of *Leishmania major* reveals novel roles for methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in methotrexate resistance. *J. Biol. Chem.* Aug 6;279(32):33273-33280.
- Escobar-Garcia D., Camacho-Carranza R., Pérez I., Dorado V., Arriaga-Alba M., Espinosa-Aguirre J.J. (2001). S9 induction by the combined treatment with cyclohexanol and albendazole. *Mutagenesis.* 2001 Nov;16(6):523-8.
- Farthing M.J. (2006). Treatment options for the eradication of intestinal protozoa. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 3(8):436-445.
- Gardner T.B., Hill D.R. (2001). Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* Jan;14(1):114-128.
- Gérard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Régnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J.C., Chaudière, J. (1998). Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol.* Oct;11(10): 1176-1183.
- Gerphagnon, M., Latour, D., Colombet, J., Sime-Ngando, T. (2013). A double staining method using SYTOX green and calcofluor white for studying fungal parasites of

phytoplankton. *Appl Environ Microbiol.* Jul;79(13):3943-3951. doi: 10.1128/AEM.00696-13.

- Ghosh, E., Ghosh, A., Ghosh, A.N., Nozaki, T., Ganguly, S. (2009). Oxidative stress-induced cell cycle blockage and a protease-independent programmed cell death in microaerophilic *Giardia lamblia*. *Drug Des Devel Ther.* Sep 21;3:103-110.
- Gibson, G.R., Ramirez, D., Maier, J., Castillo, C., Das, S. (1999). *Giardia lamblia*: incorporation of free and conjugated fatty acids into glycerol-based phospholipids. *Exp Parasitol.* May;92(1):1-11.
- González T.R., Análisis proteómico de clonas de *Giardia duodenalis* sensibles y resistentes a albendazol. Tesis de maestría. (2006). Centro de Investigación y de Estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Departamento de Genética y Biología Molecular. México D.F.
- Halliez M.C., Buret A.G. (2013). Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World J Gastroenterol.* Dec 21;19(47):8974-85. doi: 10.3748/wjg.v19.i47.8974.
- Hansen, T.V., Thamsborg, S.M., Olsen, A., Prichard, R.K., Nejsum, P. (2013). Genetic variations in the beta-tubulin gene and the internal transcribed spacer 2 region of *Trichuris species* from man and baboons. *Parasit Vectors.* Aug 12;6:236. doi: 10.1186/1756-3305-6-236.
- Hoffman P.S., Sisson G., Croxen M.A., Welch K., Harman W.D., Cremades N., Morash M.G. (2007). Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother.* Mar;51(3):868-876.
- Hofstetrová, K., Uzlíková, M., Tůmová, P., Troell, K., Svärd, S.G., Nohýnková, E. (2010). *Giardia intestinalis*: aphidicolin influence on the trophozoite cell cycle. *Exp Parasitol.* Feb;124(2): 159-166. doi: 10.1016/j.exppara.2009.09.004.
- Keiser J., Utzinger J. (2008). Efficacy of current drugs against soil-transmitted helminth infections: systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 23; 299(16):1937-1948.

- Keister, D.B. (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 77(4):487-488.
- Koenderink J.B., Kavishe R.A., Rijpma S.R., Russel F.G. (2010). The ABCs of multidrug resistance in malaria. *Trends Parasitol.* Sep;26(9):440-446.
- Krisko, A., Radman, M. (2010). Protein damage and death by radiation in *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 10;107(32):14373-7. doi: 10.1073/pnas.1009312107.
- Kulakova L, Galkin A, Chen CZ, Southall N, Marugan JJ, Zheng W, Herzberg O. (2014). Discovery of novel anti-giardiasis drug candidates. *Antimicrob Agents Chemother.* Dec;58(12):7303-11. doi: 10.1128/AAC.03834-14.
- Laing ST, Ivens A, Laing R, Ravikumar S, Butler V, Woods DJ, Gilleard JS. (2010). Characterization of the xenobiotic response of *Caenorhabditis elegans* to the anthelmintic drug albendazole and the identification of novel drug glucoside metabolites. *Biochem J.* Dec 15;432(3):505-14. doi: 10.1042/BJ20101346.
- Lalle M. (2010). Giardiasis in the post genomic era: treatment, drug resistance and novel therapeutic perspectives. *Infect Disord Drug Targets.* Aug;10(4):283-94.
- Lane, S., Lloyd, D. (2002). Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol.* 28(2): 123-147.
- Lasek-Nesselquist E., Welch D.M., Sogin M.L. (2010). The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *Int J Parasitol.* Aug 1;40(9):1063-74. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.02.015
- Lehane, A.M., McDevitt, C.A., Kirk, K., Fidock, D.A. (2012). Degrees of chloroquine resistance in Plasmodium - is the redox system involved?. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* Dec 1;2:47-57.
- Leitsch D., Burgess A.G., Dunn L.A., Krauer K.G., Tan K., Duchêne M., Upcroft P., Eckmann L., Upcroft J.A. (2011). Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thioredoxin reductase are involved in 5-nitroimidazole activation while flavin metabolism is linked to 5-

nitroimidazole resistance in *Giardia lamblia*. *J Antimicrob Chemother.* Aug;66(8):1756-65. doi: 10.1093/jac/dkr192.

- Leitsch D., Kolarich D., Binder M., Stadlmann J., Altmann F., Duchêne M. (2009). *Trichomonas vaginalis*: metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by the flavin enzyme thioredoxin reductase and disrupt the cellular redox system. Implications for nitroimidazole toxicity and resistance. *Mol Microbiol.* Apr;72(2):518-536.
- Leitsch D., Kolarich D., Wilson I.B., Altmann F, Duchêne M. (2007). Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: a central role for thioredoxin reductase. *PLoS Biol.* Aug;5(8):1820-1834.
- Leitsch D. (2015). Drug Resistance in the Microaerophilic Parasite *Giardia lamblia*. *Curr Trop Med Rep.* 2(3):128-135. Review.
- Lemée, V., Zaharia, I., Nevez, G., Rabodonirina, M., Brasseur, P., Ballet, J.J., Favennec, L. (2000). Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. *J Antimicrob Chemother.* Nov;46(5):819-21.
- Li L., Wang C.C. (2006). A likely molecular basis of the susceptibility of *Giardia lamblia* towards oxygen. *Mol Microbiol.* Jan;59(1):202-211.
- Locatelli C., Pedrosa R.C., De Bem A.F., Creczynski-Pasa T.B., Cordova C.A., Wilhelm-Filho D. (2004). A comparative study of albendazole and mebendazole-induced, time-dependent oxidative stress. *Redox Rep.* 9(2):89-95.
- Mariante, R.M., Vancini, R.G., Melo, A.L., Benchimol M.(2005). *Giardia lamblia*: evaluation of the in vitro effects of nocodazole and colchicine on trophozoites. *Exp Parasitol.* 110, 62-72.
- Mastronicola D., Testa F., Forte E., Bordi E., Pucillo L.P., Sarti P., Giuffrè A. (2010). Flavohemoglobin and nitric oxide detoxification in the human protozoan parasite *Giardia intestinalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3: 654-658.
- Mastronicola, D., Falabella, M., Testa, F., Pucillo, L.P., Teixeira, M., Sarti, P., Saraiva, L.M., Giuffrè, A. (2014). Functional characterization of peroxiredoxins from the human protozoan parasite *Giardia intestinalis*. *PLoS Negl Trop Dis.* Jan 9;8(1):e2631. doi:

10.1371/journal.pntd.0002631.

- Matovu E., Seebeck T., Enyaru J.C., Kaminsky R. (2001). Drug resistance in *Trypanosoma brucei* spp., the causative agents of sleeping sickness in man and nagana in cattle. *Microbes Infect.* Jul;3(9):763-770.
- Møller, I.M., Rogowska-Wrzesinska, A., Rao, R.S. (2011). Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *J Proteomics.* Oct 19;74(11):2228-42. doi: 10.1016/j.jprot.2011.05.004.
- Moore, C.J., Shao, C.H., Nagai, R., Kutty, S., Singh, J., Bidasee, K.R. (2013). Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts are not formed on cardiac ryanodine receptor (RyR2) and sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA2) in diabetes. *Mol Cell Biochem.* Apr;376(1-2):121-135. doi: 10.1007/s11010-013-1558-1.
- Müller J., Ley S., Felger I., Hemphill A., Müller N. (2008). Identification of differentially expressed genes in a *Giardia lamblia* WB C6 clone resistant to nitazoxanide and metronidazole. *J Antimicrob Chemother.* Jul;62(1):72-82.
- Nandi, M., Sarkar, S. (2013). Albendazole-induced recurrent hepatitis. *Indian Pediatr.* Nov 8;50(11):1064.
- Nash, T.E. (2013). Unraveling how *Giardia* infections cause disease. *J Clin Invest.* Jun 3;123(6):2346-2347.
- Nillius D., Müller J., Müller N. (2011). Nitroreductase (GINR1) increases susceptibility of *Giardia lamblia* and *Escherichia coli* to nitro drugs. *J Antimicrob Chemother.* 66(5):1029-1035.
- Orozco-Ibarra, M., Medina-Campos, O.N., Sánchez-González, D.J., Martínez-Martínez, C.M., Floriano-Sánchez, E., Santamaría, A., Ramirez, V., Bobadilla, N.A., Pedraza-Chaverri, J. (2007). Evaluation of oxidative stress in D-serine induced nephrotoxicity. *Toxicology.* Jan 5;229(1-2):123-135.
- Ortega-Pierres G., Smith H.V., Cacciò S., Thompson R.C. (2009). New tools provide further insights into *Giardia* and *Cryptosporidium* biology. *Trends Parasitol.* Sept; 25(9):410-416.

- Ouellette M., Légaré D., Haimeur A., Grondin K., Roy G., Brochu C., Papadopoulou B. (1998). ABC transporters in *Leishmania* and their role in drug resistance. *Drug Resist Updat.* Mar;1(1):43-48.
- Oxberry, M.E., Reynoldson, J.A., Thompson, R.C. (2000). The binding and distribution of albendazole and its principal metabolites in *Giardia duodenalis*. *J Vet Pharmacol Ther.* Jun;23(3): 113-120.
- Ozawa T., Tatsum K., (1998). Biodefence against active oxigens and free radicals induced by oxidative stress. En: Biodefence mechanisms against environmental stress. Kuwabara M., Inanami O., (Ed.). Springer-Verlag, Heidelberg y Kodansha, Japon. Pp. 24-39.
- Paget T., Maroulis S., Mitchell A., Edwards M.R., Jarroll E.L., Lloyd D. (2004). Menadione kills trophozoites and cysts of *Giardia intestinalis*. *Microbiology.* May;150(Pt 5):1231-1236.
- Pal, C., Bandyopadhyay, U. (2012). Redox-active antiparasitic drugs. *Antioxid Redox Signal.* Aug 15;17(4):555-582. doi: 10.1089/ars.2011.4436.
- Paz-Maldonado, M.T., Argüello-García, R., Cruz-Soto, M., Mendoza-Hernández, G., Ortega-Pierres, G. (2013). Proteomic and transcriptional analyses of genes differentially expressed in *Giardia duodenalis* clones resistant to albendazole. *Infect Genet Evol.* Apr;15:10-17. doi: 10.1016/j.meegid.2012.08.021.
- Plutzer, J., Ongerth, J., Karanis, P. (2010). *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *nt J Hyg Environ Health.* Sep;213(5): 321-333. doi: 10.1016/j.ijheh.2010.06.005.
- Poole, K. (2014). Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: multidrug efflux and more. *Can J Microbiol.* Dec;60(12):783-791. doi: 10.1139/cjm-2014-0666.
- Raj, D., Ghosh, E., Mukherjee, A.K., Nozaki, T., Ganguly, S. (2014). Differential gene expression in *Giardia lamblia* under oxidative stress: significance in eukaryotic evolution. *Gene.* Feb 10;535(2): 131-139. doi: 10.1016/j.gene.2013.11.048.

- Reaume, C., Moore, B., Hernández, P., Ruzzini, A., Chlebus, M., Wasserman, M., Yee, J. (2013). Evaluation of drugs and stationary growth on the cell cycle of *Giardia intestinalis*. *Mol Biochem Parasitol.* Jan;187(1):72-6. doi: 10.1016/j.molbiopara.2012.11.005.
- Robinson, M.W., McFerran, N., Trudgett, A., Hoey, L., Fairweather, I. (2004). A possible model of benzimidazole binding to beta-tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *J Mol Graph Model.* Dec;23(3): 275-284.
- Rossignol, J.F. (2010). *Cryptosporidium* and *Giardia*: treatment options and prospects for new drugs. *Exp Parasitol.* Jan;124(1): 45-53. doi: 10.1016/j.exppara.2009.07.005.
- Rossignol, J.F., Lopez-Chegne, N., Julcamoro, L.M., Carrion, M.E., Bardin, M.C. (2012). Nitazoxanide for the empiric treatment of pediatric infectious diarrhea. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Mar;106(3):167-173. doi: 10.1016/j.trstmh.2011.11.007.
- Ryan U, Cacciò SM. (2013). Zoonotic potential of *Giardia*. *nt J Parasitol.* 2 Nov;43(12-13):943-56. doi: 10.1016/j.ijpara.2013.06.001.
- Selkirk M.E., Smith V.P., Thomas G.R., Gounaris K., (1998). Resistance of filarial nematode parasites to oxidative stress. *Int. J. Parasitol.*, 28: 1315-1332.
- Sen A., Chatterjee N.S., Akbar M.A., Nandi N., Das P. (2007). The 29-kilodalton thiol-dependent peroxidase of *Entamoeba histolytica* is a factor involved in pathogenesis and survival of the parasite during oxidative stress. *Eukaryot Cell.* Apr;6(4):664-673.
- Solaymani-Mohammadi, S., Genkinger, J.M., Loffredo, C.A., Singer, S.M. (2010). A meta-analysis of the effectiveness of albendazole compared with metronidazole as treatments for infections with *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis.* May 11;4(5):e682. doi: 10.1371/journal.pntd.0000682.
- Suzuki, K., Ojima, M., Kodama, S., Watanabe, M. (2006). Delayed activation of DNA damage checkpoint and radiation-induced genomic instability. *Mutat Res.* May 11;597(1-2):73-77.
- Suzuki, T., Ueta, Y.Y., Inoue, N, Xuan, X., Saitoh, H., Suzuki, H. (2006). Beneficial

effect of erythropoietin administration on murine infection with *Trypanosoma congolense*. *Am J Trop Med Hyg.* Jun;74(6):1020-1025.

- Tejman-Yarden, N., Eckmann, L. (2011). New approaches to the treatment of giardiasis. *Curr Opin Infect Dis.* Oct;24(5):451-456. doi: 10.1097/QCO.0b013e32834ad401.
- Testa F., Mastronicola D., Cabelli D.E., Bordi E., Pucillo L.P., Sarti P., Saraiva L.M., Giuffrè A., Teixeira M. (2011). The superoxide reductase from the early diverging eukaryote *Giardia intestinalis*. *Free Radic. Biol. Med.* 15: 1567-1574.
- Tian, H.F., Chen, B., Wen, J.F. (2010). *Giardiasis*, drug resistance, and new target discovery. *Infect Disord Drug Targets.* Aug;10(4): 295-302.
- t'Kindt R., Scheltema R.A., Jankevics A., Brunker K., Rijal S., Dujardin J.C., Breitling R., Watson D.G., Coombs G.H., Decuypere S. (2010). Metabolomics to unveil and understand phenotypic diversity between pathogen populations. *PLoS Negl Trop Dis.* Nov 30;4(11):e904.
- Tsuji N., Morales T.H., Ozols V.V., Carmody A.B., Chandrashekar R., (2000). Cloning and preliminary characterization of a novel cuticular antigen from the filarial parasite *Dirofilaria immitis*. *Parasitol. Int.*, 49: 321-325.
- Upcroft, J., Mitchell, R., Chen, N., Upcroft, P. (1996). Albendazole resistance in *Giardia* is correlated with cytoskeletal changes but not with a mutation at amino acid 200 in beta-tubulin. *Microb Drug Resist.* Fall;2(3):303-8.
- Upcroft, P., Upcroft, J.A. (2001). Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin Microbiol Rev.* Jan;14(1):150-164.
- Uzlikova M., and Nohynkova E. (2015). The effect of metronidazole on the cell cycle and DNA in metronidazole-susceptible and –resistant *Giardia* cell lines. *Mol Biochem Parasitol.* 2015 198, 75-81.
- Vicente J.B., Ehrenkaufner G.M., Saraiva L.M., Teixeira M., Singh U. (2009). *Entamoeba histolytica* modulates a complex repertoire of novel genes in response to oxidative and nitrosative stresses: implications for amebic pathogenesis *Cell Microbiol.* Jan;11(1):51-69.

- Vicente J.B., Testa F., Mastronicola D., Forte E., Sarti P., Teixeira M., Giuffrè A. (2009). Redox properties of the oxygen-detoxifying flavodiiron protein from the human parasite *Giardia intestinalis*. *Arch Biochem Biophys*. Aug;1;488(1):9-13.
- Vonlaufen, N., Naguleswaran, A., Coppens, I., Sullivan, W.J., Jr. (2010). MYST family lysine acetyltransferase facilitates ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase-mediated DNA damage response in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*. Apr 9;285(15):11154-11161. doi: 10.1074/jbc.M109.066134.
- Watkins, R.R., Eckmann, L. (2014). Treatment of giardiasis: current status and future directions. *Curr Infect Dis Rep*. Feb;16(2): 396. doi: 10.1007/s11908-014-0396-y.
- Wolstenholme A.J., Fairweather I., Prichard R., von Samson-Himmelstjerna G., Sangster N.C. (2004). Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol*. 20: 469–476.
- Wright S.G. (2012) Protozoan infections of the gastrointestinal tract. *Infect Dis Clin North Am*. Jun;26(2):323-39. doi: 10.1016/j.idc.2012.03.009.
- Xu, D., Zhang, Y., (2012). Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field. *Proteins* 80; 1715-1735.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D. Poisson, J., Zhang Y. (2015) The I-Tasser Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*. 12: 7-8.
- Zhong H.L., Cao W.J., Rossignol J.F., Feng M.L., Hu R.Y., Gan S.B., Tan W. (1986). Albendazole in nematode, cestode, trematode and protozoan (*Giardia*) infections. *Chin Med J (Engl)*. 1986 Nov;99(11):912-915.

### 13. Anexo. Publicación.