



Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Unidad Zacatenco

Departamento de Genética y Biología Molecular

“Análisis de la posible participación de una
proteína CYP450-like en la resistencia a
albendazol en *Giardia duodenalis*.”

Tesis que presenta:

I.B.T. García Solís Juan Carlos

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias

En la especialidad de:

Genética y Biología Molecular

Director de Tesis: Dra. María Guadalupe Ortega Pierres

Ciudad de México

Noviembre 2016

El presente proyecto fue realizado en el departamento de genética y biología molecular del centro de investigación y de estudios avanzados del IPN, bajo la dirección de la Dra. María Guadalupe Ortega Pierres y la asesoría de la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz y el Dr. Adolfo Sierra Santoyo.

Su realización fue posible gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mediante el otorgamiento de la beca con numero de registro 625713

Agradecimientos

A la Dra. María Guadalupe Ortega Pierres por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, su apoyo y orientación.

A los auxiliares de investigación Biol. Roció Fonseca, Arturo Pérez y Dr. Raúl Arguello por su orientación y apoyo en el laboratorio.

A los integrantes del laboratorio Isabel Palacios y Blanca Herrera por su apoyo, ayuda y consejos.

A mis compañeros de laboratorio y de maestría por su apoyo, comprensión y amistad.

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional y comprensión en las decisiones que he tomado.

Contenido

Resumen	6
Abstract.....	8
1.-Introducción	9
1.1.-Generalidades de <i>Giardia</i>	9
1.2 Ciclo de Vida	11
1.3 Epidemiología de la Giardiasis.....	13
1.3 Patogénesis.....	14
1.4 Diagnóstico.....	16
1.5 Tratamiento y control	17
2.- Antecedentes	19
3.-Justificación	28
4.-Hipótesis	28
5.-Objetivos	28
5.1.- Objetivo general	28
5.2.- Objetivos particulares	28
6.- Material y métodos.....	29
6.1 Cultivo de parásitos.....	29
6.2 Ensayo de inhibición de adherencia.....	29
6.3 Análisis in silico.....	30
6.4 Cuantificación de mensajeros por RT-PCR de punto final	30
6.5 Técnica de DARTS (drug affinity responsive target stability por sus siglas en inglés).....	31
6.6 Espectrometría de masas	32
7.- Resultados.....	34
7.1 Análisis in silico.....	34
7.2 Ensayo de susceptibilidad a albendazol en <i>Giardia</i> en presencia de hemina.....	43
7.2 Ensayo RT-PCR	45
7.3 Micrografías de cultivos de trofozoítos tratados con ABZ y/o proadifen.....	48
7.4 Ensayo de detección de la proteína tipo CYP	50
7.5 Resultados espectrometría de masas.....	51
8. – Discusión	53
9 Conclusiones y perspectivas.....	57

9.1 Conclusiones..... 57
9.2 Perspectivas..... 58
9. - Bibliografía..... 59

Resumen

Giardia duodenalis es el parásito causante de la giardiasis, una infección diarreica de distribución mundial. El albendazol (ABZ) es uno de los fármacos de elección para combatir esta infección. El mecanismo reportado en la acción del ABZ incluye la unión a tubulina; sin embargo, se ha sugerido que los metabolitos del ABZ, el sulfóxido (ABZ-SO) y la sulfona (ABZ-SOO) son los principales productos activos. En humanos se ha reportado que estos resultan del metabolismo mediado por el citocromo P450 (CYP) 3A4 y las monooxigenasas de flavina (MOF). En nuestro grupo se obtuvieron clonas de *G. duodenalis* resistentes a diferentes concentraciones de ABZ (1.35, 8, 250 μ M) y se ha demostrado que las especies activas están en menor proporción en las clonas resistentes con respecto a la cepa WB. Con la finalidad de determinar si *G. duodenalis* posee una proteína tipo CYP, se realizaron ensayos de susceptibilidad al ABZ en presencia y ausencia de hemina para determinar si ésta inducía a una proteína con características de CYP. Así mismo, se evaluó la susceptibilidad de los trofozoítos de *G. duodenalis* en presencia y ausencia de distintos inhibidores de CYP y MOF. Los resultados mostraron que los trofozoítos tratados con hemina presentaron un aumento en la sensibilidad al ABZ que se reflejó en una disminución de la IC₅₀ del ABZ en las clonas resistentes y en la cepa sensible WB. Con la finalidad de establecer una relación de estos resultados con la posible participación del CYP se evaluó la expresión relativa del mensajero de la CPR, como una de las proteínas que posiblemente esté involucrada en el proceso de biotransformación del ABZ. Los resultados mostraron un aumento en la expresión del mensajero de la CPR en presencia de hemina. Por otra parte, el tratamiento de los cultivos con el inhibidor de CYP, proadifen produjo una protección total en los trofozoítos sobre la citotoxicidad por parte de los compuestos activos del ABZ, mientras que no se observó ningún efecto con el metimazol, que es un inhibidor de las MOF. Por otro parte, para determinar si *Giardia* tiene una proteína con la posible función del CYP se empleó la técnica DARTS. Con esta técnica en la cual se utilizó proadifen como agente protector se observó una banda diferencial en un peso aproximado de 37 kDa con respecto a los trofozoítos control. El análisis de esta banda por espectrometría de masas mostro una serie de proteínas que podrían tener posible interacción con el proadifen, entre ellas se identificó a la proteína GSB_151784. Se realizó el modelado in silico de esta proteína y se obtuvo el valor

más alto de alineamiento TM= 0.5722 indicando que ésta podría ser la proteína candidato que participa en la biotransformación del ABZ en las clonas resistentes.

Abstract

Giardia duodenalis is the parasitic protozoan that causes giardiasis, a diarrheal infection with cosmopolitan distribution. Albendazole (ABZ) is one of the drugs of choice to treat this infection. The mechanism reported for ABZ action includes binding to tubulin; however, it has been suggested that metabolites of ABZ, sulfoxide (ABZ-SO) and sulfone (ABZ-SOO) are the main active products. In humans, the production of these metabolites has been reported to be mediated by cytochrome P450 (CYP) 3A4 and flavin monooxygenase (MOF). In our group, *G. duodenalis* clones resistant to different concentrations of ABZ (1.35, 8, 250 μ M) were obtained and the active species were in a lower proportion in resistant clones compared with the WB strain. In order to determine whether *G. duodenalis* possesses a CYP-like protein, susceptibility assays to ABZ were performed in the presence and absence of hemin to determine whether it induced a protein with CYP characteristics. Likewise, the susceptibility of *G. duodenalis* trophozoites was evaluated in the presence and absence of different inhibitors of CYP and MOF. The results showed that hemin-treated trophozoites exhibited an increase in ABZ sensitivity that was reflected in a decrease in the IC₅₀ of ABZ in resistant clones and in the WB-sensitive strain. In order to establish a relationship between these results and the possible participation of CYP, the relative expression of the CYP messenger was evaluated as one of the proteins possibly involved in the ABZ biotransformation process. The results showed an increase in the expression of the CYP messenger in the presence of hemin. On the other hand, treatment of cultures with the CYP inhibitor, proadifen produced a total protection in the trophozoites of cytotoxicity induced by the active ABZ compounds, whereas no effect was observed with methimazole, which is an inhibitor of the MOF. On the other hand, to determine if *Giardia* has a protein with the possible CYP function, the DARTS technique was used. Using this technique in which proadifen was used as a protective agent, a differential band was observed with an approximate molecular weight of 37 kDa with respect to the control trophozoites. The analysis of this band by mass spectrometry showed several of proteins that could have a possible interaction with proadifen, including the protein GSB_151784. The latter was in silico analyzed and the highest alignment value TM = 0.5722 was obtained indicating that this could be the candidate protein that participates in the biotransformation of the ABZ in the resistant clones.

1.-Introducción

1.1.-Generalidades de *Giardia*

Una característica particular de los organismos parásitos es su gran capacidad de adaptación a cambios del medio ambiente. La mayoría de los parásitos, ya sean unicelulares como los protozoarios o multicelulares como los helmintos, ocupan diferentes sitios tanto en los vectores como en los hospederos. Así estos organismos han desarrollado mecanismos extraordinarios de adaptación que les permiten sobrevivir en condiciones ambientales que de otro modo los destruirían. Durante una infección, la supervivencia de los organismos patógenos depende no sólo de su habilidad para colonizar un individuo sino también de su capacidad para contrarrestar los mecanismos de defensa que se activan en el hospedador. Así, la virulencia de los parásitos refleja la interacción dinámica entre estos y el hospedador y su capacidad de respuesta a los sistemas de defensa, condición necesaria para la supervivencia parasitaria y el mantenimiento y/o transmisión de la infección (Deitsch, Moxon, & Wellems, 1997).

Giardia duodenalis (sinónimos *G. intestinalis*, *G lamblia*) es un protozoario binucleado y flagelado que habita el intestino, agente causal de una de las parasitosis más comunes en todo el mundo, la giardiasis. Esta infección se presenta con manifestaciones clínicas que varían desde la infección asintomática a la enfermedad aguda o crónica asociada con diarrea y mala absorción de nutrientes (R. C. Thompson, 2000).

En algunos países en vías de desarrollo, la giardiasis afecta a un gran porcentaje de la población infantil. Algunas epidemias han ocurrido por contaminación fecal de alimentos y reservorios de agua, infectando en algunos casos a miles de personas (Fayer, Dubey, & Lindsay, 2004). Actualmente, el control de la giardiasis se lleva a cabo por medio de fármacos. Además de su importancia médica y veterinaria, *Giardia* es de gran interés en biología puesto que es una de las células eucariotas de

divergencia temprana en la evolución (Sogin, Gunderson, Elwood, Alonso, & Peattie, 1989).

Morfológicamente el género *Giardia* tiene varias especies y algunas de ellas infectan mamíferos. Esta clasificación propuesta por Filice en 1952, está basada en diferencias entre la forma del trofozoíto y el cuerpo medio (Nash, Herrington, Losonsky, & Levine, 1987). Estos grupos son, *Giardia muris*, *Giardia agilis* y *Giardia duodenalis* (Figura 1). Posteriormente, basados en estudios de microscopía electrónica se propusieron tres nuevas especies *Giardia pssittaci*, *Giardia ardea* y *Giardia microti*. (Adam 2001). La especie *G. duodenalis* incluye ocho ensambles considerando características genéticas y el hospedero que infectan (R. C. Thompson & Monis, 2004). La caracterización y genotipificación de cada uno de los ensambles se ha establecido en aislados de *G. duodenalis* procedentes de distintas especies empelando genes constitutivos que incluyen a la triosa-fosfato isomerasa (tpi), a la subunidad pequeña de RNA ribosomal (SSU), a la glutamato deshidrogenasa, a las proteínas estructurales ribosomales, a la ferredoxina y a la proteína homóloga de MutL (R. C. Thompson & Monis, 2004).

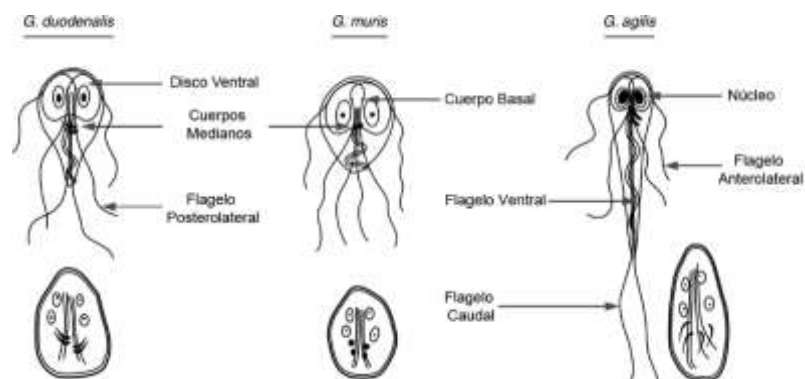


Figura 1. Morfología de trofozoíto y quiste de *Giardia duodenalis*, *G. muris* y *G. agilis*. En la especie *G. muris* los trofozoítos tienen cuerpos medios redondeados e infectan principalmente a roedores; *G. agilis* estos poseen cuerpos más largos y estrechos, con discos adhesivos más pequeños y han sido aislados únicamente de anfibios; en cuanto a *G. duodenalis* esta especie tiene un cuerpo medio distintivo con forma de martillo e infecta a una gran variedad de mamíferos, incluyendo al humano (R. C. Thompson & Monis, 2004).

1.2 Ciclo de Vida

Giardia tiene dos estadios en su ciclo de vida el trofozoíto y quiste. El trofozoíto tiene forma de pera, mide 10-20 micras por 5-15 micras, y tiene dos núcleos funcionalmente idénticos y transcripcionalmente activos y cuatro pares de flagelos (Adam, 2001). En el lado ventral de su cuerpo se encuentra un disco cóncavo, compuesto de unidades de repetición de los microtúbulos, que participa en la adhesión del trofozoíto a la pared intestinal. El quiste es la forma mediante la cual se transmite la enfermedad ya sea a través de agua o alimentos contaminados con estos. El quiste es ovalado, mide entre 11-14 micras por 7-10 micras, tiene una pared externa gruesa, un axonema central y cuatro núcleos y es la forma infecciosa (Visvesvara, Dickerson, & Healy, 1988). Los quistes se desenquistan durante su paso por el contenido ácido del estómago liberando los trofozoítos. A diferencia del quiste, los trofozoítos necesitan condiciones anaeróbicas para sobrevivir y multiplicarse, además de condiciones específicas de temperatura, pH y salinidad (Adam, 2001).

El mecanismo de adaptación de *Giardia* conocido como enquistamiento es esencial para que el parásito pueda sobrevivir fuera del intestino del hospedador, ya que los trofozoítos son muy sensibles a los cambios de temperatura, humedad y a la presencia de agentes químicos (Adam, 2001). La infección se inicia con la ingestión de quistes por un hospedero susceptible, estos llevan a cabo el proceso de desenquistamiento en el intestino superior liberando los trofozoítos, la forma del parásito que prolifera en el intestino y es responsable de los síntomas de la enfermedad. Este proceso de desenquistamiento consta de dos etapas: la primera en la que el quiste se expone al pH ácido del estómago y la segunda donde se encuentra con un ambiente rico en proteasas y ligeramente alcalino en la parte alta del intestino delgado (Figura 2). Durante la primera etapa el quiste detecta los estímulos a través de la pared, lo cual lleva a una respuesta altamente coordinada en la que se dan cambios en los niveles de mRNA, hay ligeros cambios del pH intracelular y se da la aparición de pliegues de membrana

que podrían ser importantes para determinar la polaridad de los trofozoítos (Hetsko et al., 1998).

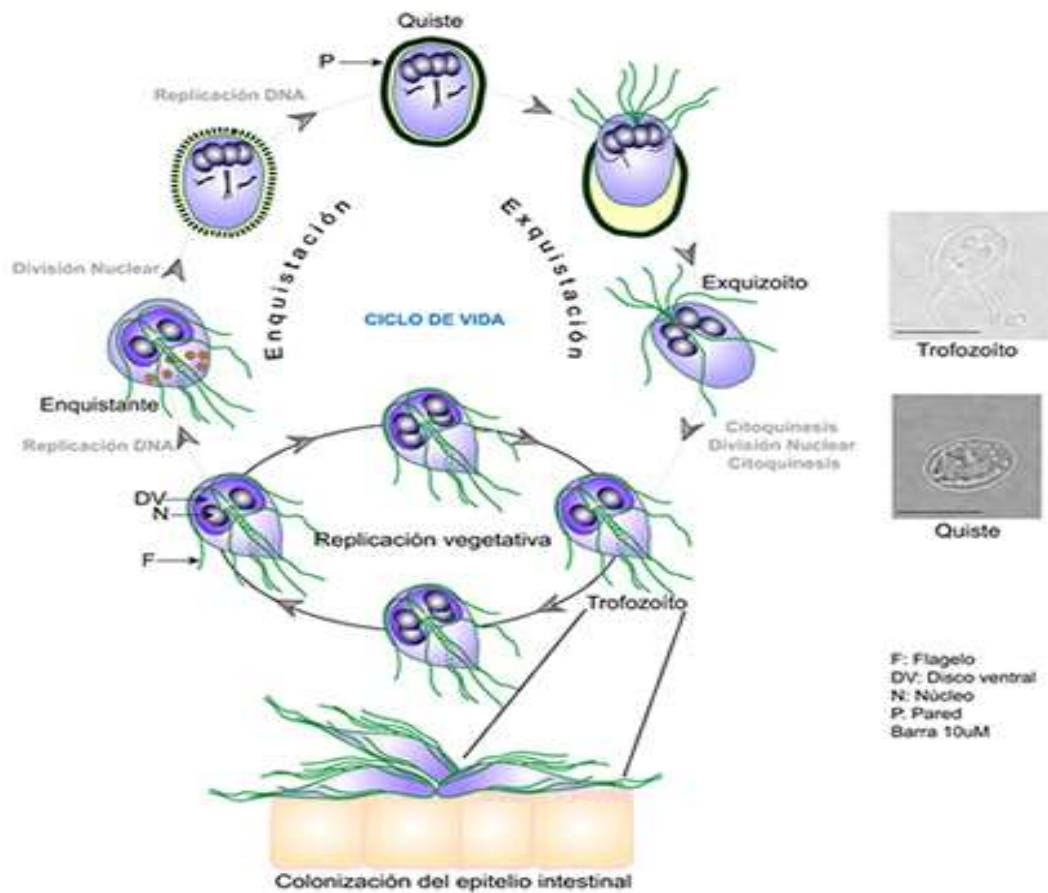


Figura 2. Ciclo de vida del parásito *Giardia Intestinalis*. En la figura se observan las diferentes etapas del ciclo de vida del parásito. (P) Pared del quiste, (DV) Disco ventral, (Visvesvara et al.) vesículas específicas de enquistación, (F) flagelo y (N) núcleo. (Nino, Prucca, Chaparro, Lujan, & Wasserman, 2012)

El proceso de desenquistamiento se completa cuando del quiste emerge el exquizoito, una célula oval, con cuatro núcleos (16N) y un metabolismo intermedio entre un trofozoíto y un quiste; el exquizoito rápidamente se divide por citocinesis, dos veces sin la replicación del DNA y los dos trofozoítos activos que se generan se dividen nuevamente por fisión binaria para generar un total de cuatro trofozoítos que colonizan el duodeno a partir de un quiste (Bernander, Palm, & Svard, 2001).

Cuando los trofozoítos alcanzan la parte media del intestino delgado, el yeyuno, inicia el enquistamiento; este proceso es estimulado por el exceso de sales biliares y la disminución en colesterol disponible en el ambiente. A lo largo del enquistamiento se dan cambios bioquímicos y morfológicos importantes que se pueden dividir en tres etapas: I) recepción de estímulos para la formación del quiste y la consecuente activación de genes específicos; II) biogénesis de organelos secretores y la síntesis, empaquetamiento, transporte y liberación de materiales de la pared celular; y III) el ensamble de la pared extracelular (Lujan, Mowatt, Byrd, & Nash, 1996). Durante el enquistamiento se expresan las proteínas de la pared celular (CWP1, CWP2 y CWP3) que se caracterizan por tener regiones con alto porcentaje de identidad. Estas proteínas son transportadas en vesículas secretoras (ESVs) en las cuales sufren modificaciones importantes, como el rompimiento del extremo C-terminal de la CWP2 en el cual participa una cisteín proteasa (ESCP), importante para el proceso de formación de la pared celular (Lujan, Mowatt, & Nash, 1998). En esta etapa también se observan dos rondas sucesivas de replicación de los cromosomas sin un evento de citocinesis y el desensamblaje y empaquetamiento de organelos como el disco ventral y los flagelos. Cuando se completa el enquistamiento los quistes son expulsados a través de las heces y se inicia un nuevo ciclo en el mismo hospedero o en otro (Adam, 2001).

1.3 Epidemiología de la Giardiasis.

Giardiasis es el nombre que recibe la infección causada por el parásito *Giardia duodenalis*. Esta afecta a miles de personas alrededor del mundo, sin embargo, no fue hasta finales de los años 70's que este microorganismo fue reconocido como patógeno (Marques, Takayanagui, & Lanchote, 2002). Los principales hospederos de *Giardia* son los seres humanos, el ganado, perros, gatos y algunas especies de mamíferos silvestres o marinos (Ryan & Caccio, 2013). En las zonas endémicas para giardiasis, la infección es más común en niños menores de 10 años de edad, y disminuye con la edad debido a la

inmunidad adquirida y al disminuir la exposición a quistes de *Giardia*. La prevalencia de la infección está influenciada por varios factores sociales, económicos, climáticos y del medio ambiente y se asocia con el hacinamiento, la alta densidad de población, la falta de servicios de agua y alcantarillado (Dib, Lu, & Wen, 2008).

Las actividades laborales de los hospederos de *Giardia* pueden ser uno de los factores de riesgo más importantes para que se desarrolle la giardiasis, por ejemplo, los trabajadores de riego y desagüe pueden ser más susceptibles a adquirir la infección debido a su exposición a los quistes de *Giardia*. En las guarderías y otras situaciones en las que los niños pequeños se agrupan, la incidencia de la infección por *Giardia* es alta (Yoder et al., 2012).

1.3 Patogénesis

La adhesión de trofozoítos de *Giardia* al epitelio intestinal es el primer paso en la patogénesis de la giardiasis, ésta se lleva a cabo mediante el disco adhesivo que es una estructura especializada (Figura 3) y es crucial para iniciar la colonización, así como para mantener la infección. Este está constituido por alfa giardinas que son proteínas relacionadas con anexinas, altamente expresadas en *Giardia*, y un citoesqueleto muy bien organizado (N. Yoshida, Tyler, & Llewellyn, 2011) . Al unirse al epitelio que recubre las de capas mucosas, *Giardia* puede inducir alteraciones en las células epiteliales intestinales a través de los productos secretados (de Carvalho, David, Coradi, & Guimaraes, 2008). *Giardia* puede causar malabsorción y diarrea principalmente a través de la interrupción de uniones estrechas epiteliales del intestino, que a su vez aumenta la permeabilidad intestinal (Buret, 2008). Otros factores que participan en la patogénesis de la giardiasis incluyen varios mecanismos como la reducción de las actividades de disacaridasas intestinales y de proteasas, el acortamiento de las vellosidades, hiperplasia de las criptas, aumento de la permeabilidad

epitelial, toxinas, inflamación de la mucosa, sobre crecimiento bacteriano, más recientemente, hipermotilidad intestinal (Koot et al., 2009).

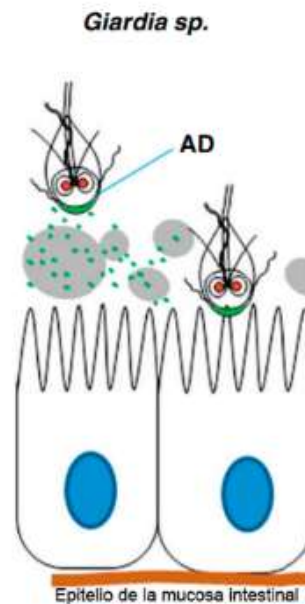


Figura 3. *Giardia sp* y su interacción con la mucosa intestinal humana. Los trofozoítos liberan proteasas (puntos verdes) para degradar la capa mucosa (gris) y se adhieren a las células epiteliales a través de un disco adhesivo (AD) especializado en su superficie ventral (N. Yoshida et al., 2011).

La respuesta inmune del huésped y su papel en la modulación de la infección por *Giardia* y patogenia de la giardiasis aún no se entienden completamente. La ocurrencia frecuente de infecciones asintomáticas se puede deber a una respuesta inmune del huésped eficaz o a la modulación inmune por el parásito. La respuesta inmune innata tiene un efecto inhibitorio sobre *Giardia* e incluye: péptidos antimicrobianos α -defensina y lactoferrina, el óxido nítrico inducible y la activación por la vía de la lectina. Recientemente, se ha encontrado la señalización del receptor Toll-like en las células dendríticas, lo que resulta en una respuesta anti-inflamatoria (Kamda & Singer, 2009). Se ha reportado que anticuerpos IgA secretados en la leche materna protegen contra la infección por *Giardia* en los lactantes (Tellez et al., 2005). En ratones con deficiencia en la producción de IgA, aunque la infección no fue erradicada se observó que la carga infecciosa se redujo durante la infección.

Esto mostró que pueden existir distintos mecanismos en la defensa del huésped (Langford et al., 2002). Así mismo, se han reportado respuestas a proteínas solubles de *Giardia* en la activación específicas de células T. (Astiazaran-Garcia et al., 2009). Otros estudios en animales han reportado que la hipermotilidad puede ser una causa de la diarrea por *Giardia* (Andersen, Gillin, & Eckmann, 2006).

La gran mayoría (35% al 70%) de individuos infectados con giardiasis permanecen asintomáticos. Una proporción mucho menor desarrolla enfermedad diarreica aguda con fiebre, dolor epigástrico, náuseas y vómitos. La giardiasis también se ha asociado con el síndrome del intestino irritable post-infección, dispepsia y trastornos gastrointestinales funcionales y manifestaciones alérgicas de la piel como urticaria y angioedema (Grazioli et al., 2006). El amplio espectro de la sintomatología de la infección por *Giardia* se ha atribuido a factores tales como el tamaño del inóculo, la respuesta específica del huésped y la diferencia genotípica del parásito puede ser un determinante importante. La infección persistente y la enfermedad crónica en algunos pacientes pueden explicarse por la evasión inmune debido a la variación antigénica en VSP, regulado por un mecanismo similar al ARN de interferencia (Prucca et al., 2008).

1.4 Diagnóstico

A lo largo de los años, el método estándar para el diagnóstico de giardiasis intestinal ha sido el examen de heces en el que se detectan trofozoítos y quistes. Con la finalidad de lograr la sensibilidad de más del 90%, se propone que se analicen al menos tres muestras de heces que se deben coleccionar en tres días sucesivos (Homan & Mank, 2001).

Actualmente se tienen disponibles comercialmente varios ensayos rápidos inmunocromatográficos para detectar los antígenos del parásito en las muestras de heces. Sin embargo, se han observado variaciones en la sensibilidad y la especificidad entre varios estudios. Esto podría ser debido a la falta de reactivos estandarizados y así como al hecho de que los

hospederos pueden estar multiparasitados. Las pruebas serológicas se utilizan para detectar anticuerpos, aunque no son particularmente útiles en el diagnóstico de parásito luminal (A. Thompson, 2001).

En los últimos años, se ha empleado la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la PCR en tiempo real (qPCR) en el diagnóstico de *Giardia*. En la técnica de PCR, un fragmento de ADN específico se puede amplificar para dar lugar a muchos millones de copias de la molécula de ADN. El producto final de PCR se visualiza por la separación electroforética en geles de agarosa. Esta técnica es sensible, específica y aplicada para la detección y determinación del genotipo del parásito (Calderaro et al., 2010).

Otro método molecular es la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) capaz de detectar ADN correspondiente a la cantidad teórica de un solo quiste (Guy, Payment, Krull, & Horgen, 2003).

El ensayo de qPCR ha mostrado ventajas significativas sobre otros métodos publicados, en particular porque tiene la capacidad de discriminar entre los grupos de ensamblaje de *Giardia* y evaluar simultáneamente la viabilidad (Baque, Gilliam, Robles, Jakubowski, & Slifko, 2011).

1.5 Tratamiento y control

El tratamiento incluye fármacos de compuestos nitroheterocíclicos como metronidazol, tinidazol, ornidazol, C17, furazolidona y nitazoxanida) y benzimidazoles como albendazol y mebendazol. Dentro de éstas el fármaco de elección es el metronidazol en una dosis de 250 mg tres veces al día durante una semana. En el embarazo, el medicamento alternativo es la paromomicina en una dosis de 500 mg cada ocho horas durante cinco a diez días, especialmente en el primer trimestre. Tinidazol en una dosis sencilla de 2 g en adultos tiene una tasa de curación alta (90-98%) (Gardner & Hill, 2001).

La furazolidona se puede utilizar también en lugar de metronidazol, pero requiere la administración cada seis horas durante diez días. La nitazoxanida en una dosis de 500 mg dos veces al día durante tres días es eficaz en el

tratamiento de los pacientes infectados por el VIH refractarios (Robertson, Hanevik, Escobedo, Morch, & Langeland, 2010).

El albendazol (ABZ) fue introducido por primera vez en 1982 como un antihelmíntico. En 1986 fue publicado por primera vez el uso de ABZ como un tratamiento efectivo en contra de *Giardia* (Zhang et al., 1986). Se ha reportado que los mayores niveles de eficacia con ABZ requieren de múltiples dosis, y esto coincide con varios reportes donde el tratamiento falla (Brasseur & Favennec, 1995) (Jimenez-Cardoso et al., 2009). Sin embargo, actualmente el ABZ es la droga de uso más común para tratar giardiasis en México. Se ha documentado que algunos fármacos no son absolutamente eficaces para el tratamiento de la giardiasis, y la resistencia a las drogas es una de las razones de la no-eficacia. Así mismo, es difícil discriminar entre "cura seguida por la reinfección" y otros factores. (Perez-Rangel et al., 2013). La eficacia del ABZ es del 35% al 96%; el porcentaje más bajo (35%) puede explicarse si se considera que un pequeño número de trofozoítos puede enquistarse y si algunos de estos quistes maduran y el paciente podría sufrir una auto-infección por lo que el tratamiento con ABZ podría ser ineficaz (Robertson, 2010).

Se ha propuesto que la terapia probiótica podría ser útil en la prevención de la infección o como coadyuvante del tratamiento de la misma (Reynoldson et al., 1998). Así mismo, se ha reportado que bacterias comensales pueden determinar la vulnerabilidad y la resistencia a la infección por *Giardia* en ratones (Singer & Nash, 2000). Por otro lado, se ha demostrado que los lactobacilos probióticos liberan un factor termosensible, de bajo peso molecular, que inhibe la proliferación de los trofozoítos de *Giardia* en el cultivo in vitro. Estas estrategias terapéuticas alternativas pueden investigarse ya que podrían ser útiles para el tratamiento de niños en regiones endémicas (Perez et al., 2001).

La recurrencia de los síntomas después del tratamiento podría ser debido a la baja efectividad de los medicamentos para eliminar los parásitos, a una reinfección o síndromes como el síndrome post-infección del intestino

irritable. Si no hay respuesta al tratamiento después de una semana de la finalización del mismo es posible que haya resistencia a los medicamentos (aunque también se debe considerar la re-infección, en particular en las zonas endémicas), y se puede emplear otra droga o una combinación de éstas (Spiller & Garsed, 2009).

Otro aspecto que es muy importante para evitar la transmisión de la giardiasis son las medidas de higiene. Esto incluye lavarse las manos después de defecar y antes de comer, la protección de los alimentos de las moscas, el lavado y desinfección de verduras frescas y frutas antes de consumirlas, así como no utilizar aguas no tratadas como fertilizante (Matukaitis, 1997). Se aconseja a los viajeros consumir agua embotellada. En tanto que el agua de uso local puede desinfectarse con yodo, así como por el uso de sistemas de filtración. En los países en desarrollo en los cuales no están disponibles sistemas de tratamiento de agua se recomienda hervir el agua de uso doméstico (Lane & Lloyd, 2002). Con el fin de disminuir la giardiasis, los pacientes deben ser advertidos de evitar las actividades sexuales sin higiene. Así mismo es importante examinar a los animales que viven con o cerca al hombre, ya que podrían ser una fuente de infección directa o contaminación indirecta de las zonas de captación de agua (Ryan & Caccio, 2013).

El tratamiento para giardiasis se debe dar particularmente en los casos sintomáticos y también se recomienda darlo a personas portadoras de quistes, especialmente para aquellos que preparan alimentos, ya que estas personas tienen el riesgo de transmitir la infección a otras personas.

2.- Antecedentes

La resistencia a una droga se puede definir como el decremento en la eficiencia de un fármaco y ésta que ocurre por un cambio genético (mutación, delección o amplificación) que puede alterar la respuesta de metabolismo, sitio de interacción o el flujo de salida de la droga (Baker, de Koning, Maser, & Horn, 2013). Paul Ehrlich fue el primero en observar y

describir la resistencia hacia una droga en contra de tripanosomas a principio de 1904. Sin embargo, Ehrlich también reconoció el potencial de modificaciones químicas en el medicamento para mejorarlo satisfactoriamente (Kaufmann, 2008). En el tratamiento de giardiasis la quimioterapia es el método de elección. Después de la introducción de la quinacrina, metronidazol y otros nitroimidazoles son las drogas más utilizadas (Figura4). A pesar de que hay varios medicamentos disponibles para el tratamiento de la giardiasis, ninguno es 100% efectivo. Este fracaso podría ser debido a que no se completa adecuadamente el tratamiento, dosis inadecuadas o la resistencia del parásito a los fármacos.

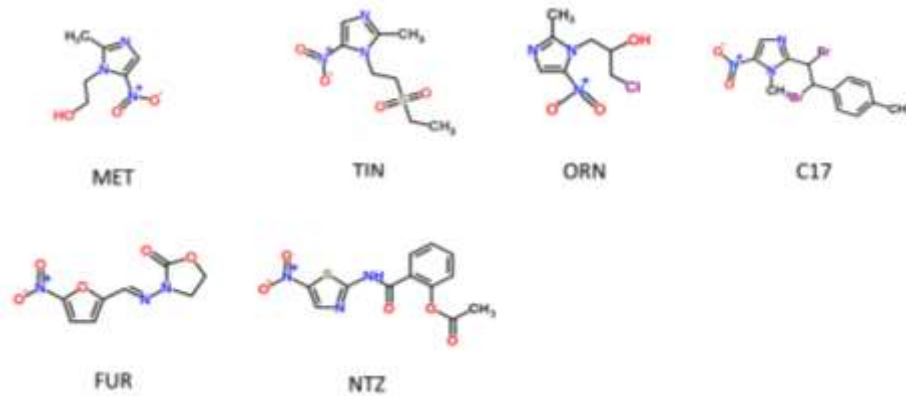


Figura 4. Estructuras de compuestos nitro heterocíclicos anti-giardiasis. Los 5-nitroimidazoles incluyen metronidazol (MET), tinidazol (TIN), ornidazol (ORN) y C17. La Furazolidona (FUR) es un nitrofurano-redox activo, nitazoxanida (von Mentzer et al.) es un nitrotiazol que puede actuar tanto como un oxidante-redox activo o como un inhibidor de estérico de la actividad enzimática (Ansell et al., 2015).

Se ha reportado variabilidad genética entre los aislados de *Giardia*. Esta variabilidad puede influir en la epidemiología, la virulencia y sensibilidad a los medicamentos. (Monis, Andrews, Mayrhofer, & Ey, 2003) (Baruch, Isaac-Renton, & Adam, 1996). Así se ha demostrado que los protistas microaerófilos tienen diferentes combinaciones de enzimas que activan metronidazol (nitrorreductasas y fusiones ferredoxina-nitrorreductasa) o inactivan metronidazol (Nims et al.) (Leiros et al., 2004) (Pal et al., 2009).

El metronidazol es un profármaco que es activado por la reducción intracelular del grupo nitro (Edwards, 1993). La reducción univalente produce un anión radical nitro, que puede ser re-oxidado por O_2 en células aeróbicas debido a su potencial redox muy bajo. Se denomina re-oxidación al "ciclo redox inútil" (Figura 5c) y hace al MET en gran parte no tóxico para las células huésped.

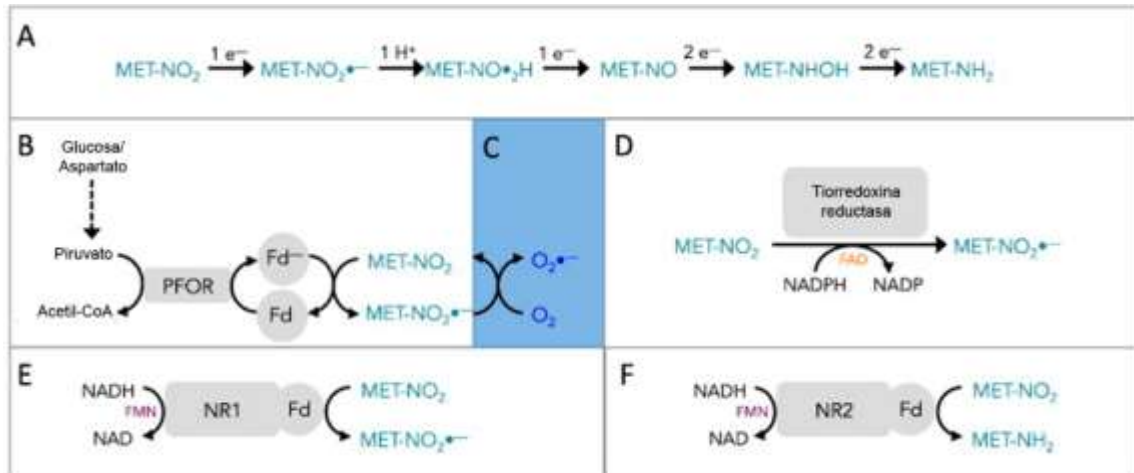


Figura 5. Mecanismos de activación de metronidazol y la desintoxicación de *Giardia duodenalis*. El pro-fármaco metronidazol ($MET-NO_2$) entra en la célula a través de difusión pasiva y requiere reducción univalente por las enzimas glucolíticas o antioxidantes para generar el anión nitro ($MET-NO_2^{\bullet-}$). Además, la reducción enzimática o la oxidación de biomoléculas proporciona cinco electrones adicionales para producir la amina inerte ($MET-NH_2$; Panel A). MET puede aceptar electrones de ferredoxina (Fd) reducida por PFOR (Panel B), sin embargo, el oxígeno puede volver a oxidar el anión nitro del pro-fármaco con la producción de superóxido (Panel C). Tiorredoxina reductasa puede activar el MET usando NADPH como donante de electrones (Panel D). Nitrorreductasa 1 se evidencia en la activación de MET para reactivar intermedios (Grupo E), mientras la nitrorreductasa desintoxicar el MET al reducir por completo el profármaco a una amina inerte (Grupo F). Para simplificar, sólo el producto de reducción univalente se muestra en los paneles B, D, E y F, sin embargo, estos mecanismos pueden suministrar electrones adicionales a intermedios activados. PFOR: piruvato: ferredoxina oxidorreductasa; NR: nitrorreductasa.

Sin embargo, en las condiciones altamente reducidas que se encuentran en el citoplasma de *G. duodenalis* y otros microaerófilos, el anión radical nitro puede reducirse aún más para formar intermedios reactivos. Estos intermedios inestables se cree que pueden adquirir progresivamente electrones por biomoléculas oxidantes, formando finalmente la amina inerte MET-NH₂ (Figura 5a). Trabajos recientes correlacionan la exposición a MET 2A con la histona (H2A) fosforilación (un marcador de daño en el ADN) y la detención de la progresión del ciclo celular sugiere que el fármaco también puede dañar el ADN de *G. duodenalis*. Sin embargo, el tiempo relativamente corto a la citotoxicidad inducida por MET en microaerófilos (dentro de 4-6 horas) puede ser indicativo de una extensa oxidación de biomoléculas citosólicas además de ADN (Uzlikova & Nohynkova, 2014). Además, los compuestos intermedios MET activados en el citosol serían candidatos más probables para interactuar con biomoléculas cercanas o a la membrana nuclear, en lugar del ADN (Leitsch et al., 2009).

En *G. duodenalis* se ha reportado que en la activación del MET participan tres enzimas. Así, se ha demostrado que la Ferredoxina y la TrxR reducen el MET in vitro (Leitsch et al., 2011) (Figura. 5b y d). La tercera enzima, NR-1, está implicada en la activación de MET; cuando se sobre-expresa en *G. duodenalis* se aumenta la susceptibilidad a MET (Nillius, Muller, & Muller, 2011). La desintoxicación enzimática completa de MET puede ocurrir en *G. duodenalis*. En particular, la nitrorreductasa NR-2 actúa para la desintoxicación de MET, y se ha visto que la sobre-expresión de esta enzima en trofozoítos WB son protegidas contra la citotoxicidad inducida por MET (Muller, Schildknecht, & Muller, 2013) (Figura. 5f). Otros mecanismos adicionales de resistencia pueden incluir desintoxicación de MET por NR-2, y la neutralización de los intermedios de MET y biomoléculas dañadas (Smith, Bryant, & Boreham, 1988). Por otra parte, la reciente identificación de fosforilación H2A sugieren que la regulación de las vías de reparación del ADN también contribuyen a la resistencia (Uzlikova & Nohynkova, 2014).

La activación de nitro-heterocíclicos por *G. duodenalis* puede estar regulada además por el estado, abundancia y la oxidación intracelular del NAD(P)H y cofactores de flavina que se requieren para la actividad de la enzima oxidorreductasa. Varias enzimas están implicadas en la síntesis, la reducción y la oxidación de NAD (P) y flavinas las cuales participan en la resistencia a fármacos nitroheterocíclicos. Por ejemplo, la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) no está directamente asociada con la activación de drogas o desintoxicación, pero el gen que codifica esta enzima es regulado transcripcionalmente y se encuentran a un nivel bajo de expresión en las líneas resistentes y en la línea susceptible WB-C6 después de tres horas de exposición MET. (Park, Schofield, & Edwards, 1998). La pérdida de actividad de la GDH puede limitar el suministro intracelular de NADPH y de ese modo inhibir la actividad de enzimas dependiente de NADPH como TrxR y NADH oxidasa, que activan las drogas (Muller, Sterk, Hemphill, & Muller, 2007). Las flavo enzimas incluyendo la NADH oxidasa y TrxR puede ser inhibidas funcionalmente por la falta del cofactor FAD en algunas líneas de *G. duodenalis* resistentes a MET (Leitsch et al., 2011).

Otras moléculas que participan en la metabolización de nitro-heterocíclicos son los citocromos P450 monooxigenasas (CYPs) que catalizan la oxidación de sustratos endógenos y exógenos en una amplia variedad de animales y plantas. Sin embargo, hay pocos estudios sobre el CYP en protozoarios y parásitos helmintos, a pesar de la relevancia obvia para el metabolismo de fármacos y la resistencia a los medicamentos (Barrett, 1998).

Los CYPs pueden catalizar una amplia gama de reacciones que implican sustratos tanto endógenos y exógenos; que están involucrados en la biosíntesis y catabolismo de los esteroides, retinoides, prostaglandinas y ácidos grasos y en la desintoxicación de sustratos exógenos incluyendo medicamentos e insecticidas (Zand et al., 1993). Los CYPs son las principales enzimas implicadas en el metabolismo de fase I, lo que aumenta la solubilidad de un sustrato, por lo general mediante la adición o el descubrimiento de un grupo hidrófilico. Esto es seguido por el metabolismo

de fase II, catalizada por uridil fosfato glucoronil transferasa para la excreción del sustrato (Williams et al., 2004). El metabolismo de fármacos en parásitos no se ha estudiado ampliamente, pero es probable que estas vías de biotransformación se conserven. Por ejemplo, en un aislado de *H. contortus* resistente a múltiples fármacos se ha demostrado una mayor producción de metabolitos derivados de la biotransformación de estos fármacos que un aislado susceptible, lo que sugiere que el aumento de actividad de enzimas relacionadas a desintoxicación está asociada con la resistencia anti-helmíntica (Cvilink et al., 2008). En años recientes, se han realizado ensayos de actividad del CYP en parásitos realizando mediciones de los metabolitos producidos en presencia de ABZ y se reportó que se producen los mismos metabolitos que en *C. elegans* (Laing et al., 2010). El ABZ se metaboliza en sulfóxido (ABZSO) y sulfona (ABZ-SOO) (Figura. 6) y recientemente se reportó la medición de estas especies, y las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Figura 7) que se producen en el metabolismo del ABZ en *G. duodenalis* (Arguello-Garcia et al., 2015).

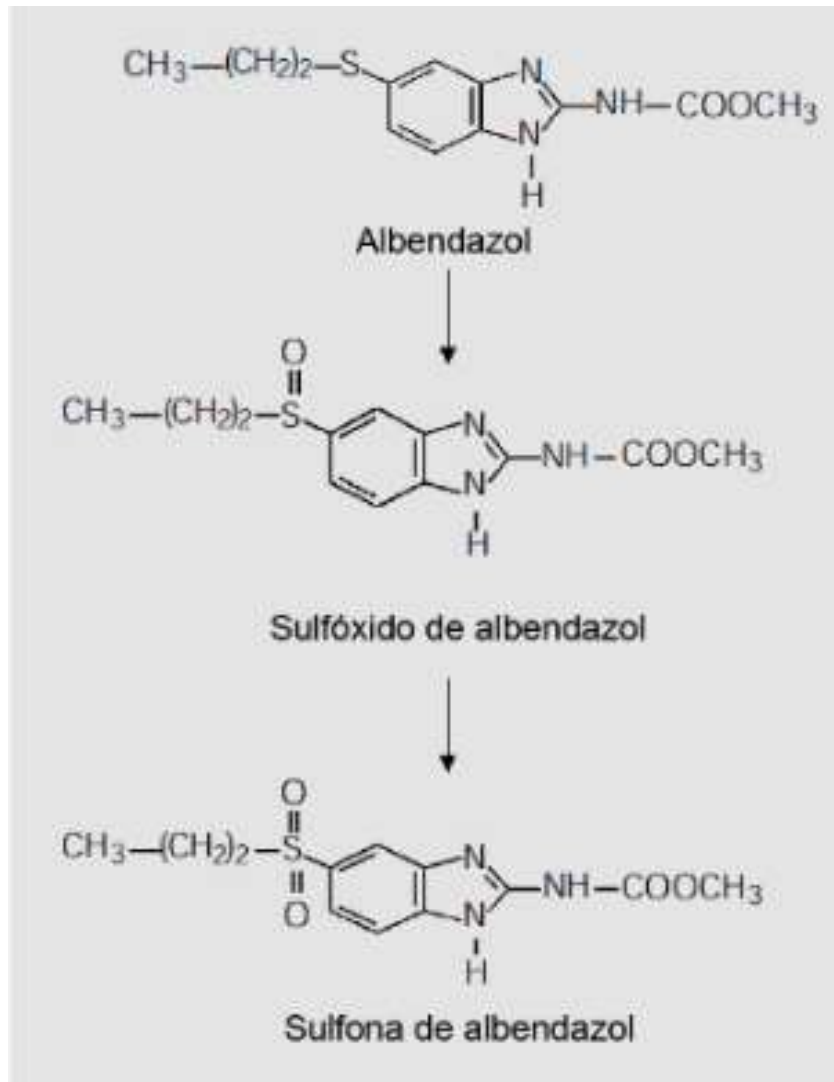


Figura 6. Metabolismo del albendazol. El albendazol se transforma rápidamente por la flavina monooxigenasas (FMO) y por el sistema del citocromo P450 (CYP) en el metabolito sulfóxido de albendazol [(+)-ASOX; (-)-ASOX], que posee actividad antihelmíntica, y en el metabolito sulfona de albendazol (Munro, Girvan, Mason, Dunford, & McLean) que carece de actividad farmacológica (Marques et al., 2002).

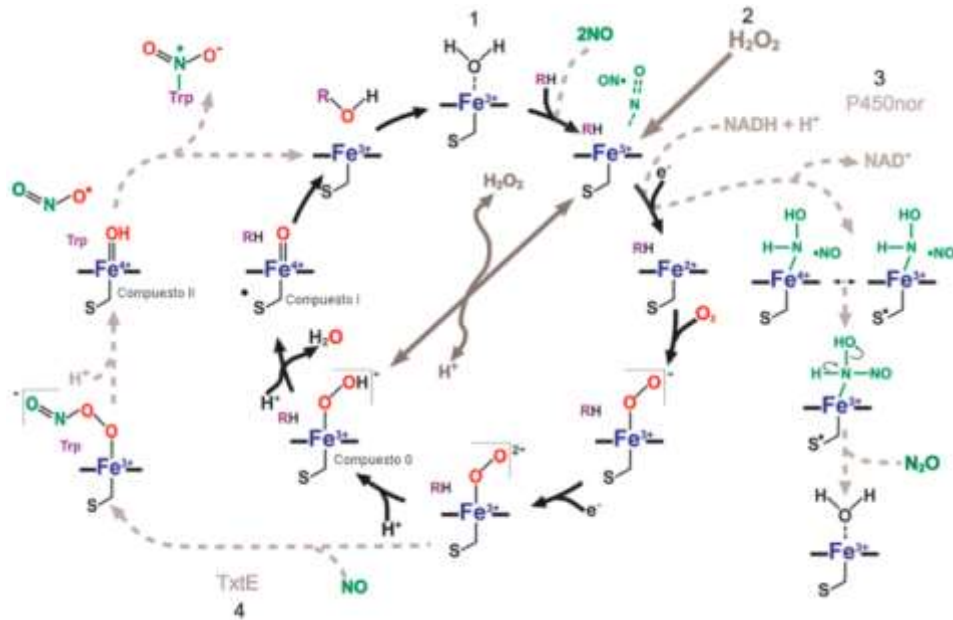


Figura 7. Ciclo catalítico expandido de P450. El esquema muestra: (1) La catálisis convencional del ciclo con R como sustrato. (2) La vía de derivación del peróxido que no requiere de electrones externos, convirtiendo al sustrato unido al Fe del P450 en un compuesto reactivo. (3) La reacción del P450nor que une dos moléculas de óxido nítrico (NO) y recibe electrones directamente de NADH sin requerir de una proteína redox accesoria para generar óxido de nitrógeno. (4) El mecanismo propuesto que utiliza NO y O₂ para catalizar la nitración directa del triptófano en la biosíntesis de la toxina thaxtomina (TxTE) (Munro et al.).

La caracterización inicial bioquímica de moléculas en *Giardia* no consideró la posibilidad de que este protista podría utilizar proteínas hemo. En retrospectiva, esta propuesta se basó quizá en generalización de varias observaciones, en particular la falta de respiración mitocondrial y la actividad catalasa procesos en los que el grupo hemo es esencial (Alam et al., 2012). Esta concepción tuvo modificaciones con la publicación del proyecto de genoma de *Giardia* en 2007 (Morrison et al., 2007). Aun cuando *Giardia* no tiene genes que codifican enzimas necesarias en la biosíntesis del grupo hemo, este parásito posee varios genes que codifican proteínas de unión al grupo hemo. Uno de estos genes codifica para una flavohemoglobina que tiene actividad óxido nítrico dioxigenasa; la expresión de esta proteína se

induce en presencia de compuestos donantes de óxido nítrico para proteger del estrés nitrosativo como el producido por el MET (Mastronicola et al., 2010).

El genoma *G. duodenalis* codifica para cuatro proteínas que son miembros de la familia del citocromo b5. Los citocromos b5 median la transferencia de electrones, por lo general de oxidorreductasas dependientes de NADPH a una variedad de aceptores de electrones tales como metahemoglobina, enzimas del CYP, indoleamine 2,3-dioxigenasas y acil-CoA desaturasa reductasa (Alam et al., 2012).

Debido a que el CYP participa en los mecanismos de detoxificación de xenobióticos, es muy importante determinar si *G. duodenalis* posee alguna proteína homóloga que podría participar en el mecanismo de resistencia en trofozoítos de *G. duodenalis*, en el cual podría participar la proteína CYP450-like ligada a resistencia. Así resulta importante conocer el metabolismo del ABZ debido a que sus metabolitos pueden tener relevancia farmacología o toxica muy diferente a la droga de la que se derivan estos. Además, es necesario caracterizar las enzimas que producen dichos metabolitos, para poder comprender y crear nuevos perfiles clínicos en el desarrollo de nuevas drogas. Estos estudios han sido útiles para la formulación de nuevas drogas (Ansell et al., 2015).

3.-Justificacion

La resistencia inducida a albendazol en *Giardia* por la exposición constante y a dosis sub-letales sugiere una capacidad metabólica del fármaco distinta entre clonas de *Giardia* resistentes y sensibles a éste. Considerando que la proteína tipo-CYP450 participa en la biotransformación del albendazol a especies inertes, es importante identificar y caracterizar si dicha proteína está presente en *Giardia duodenalis*.

4.-Hipótesis

Si *Giardia* posee la proteína tipo-CYP450, entonces es posible que ésta participe en la biotransformación del albendazol a especies no reactivas.

5.-Objetivos

5.1.- Objetivo general

Analizar la posible participación de una proteína CYP450-like en la resistencia a albendazol en *Giardia duodenalis*.

5.2.- Objetivos particulares

- Realizar el análisis in silico y el modelamiento para determinar estructura 3D de proteínas de *Giardia* que posiblemente tengan características de la proteína tipo-CYP450.
- Identificar en trofozoítos la actividad de la proteína tipo-CYP450 empleando inhibidores e inductores del CYP450.
- Emplear la técnica de DART para identificar proteínas que posiblemente puedan funcionar como CYP450
- Determinar la identidad de las proteínas tipo-CYP450 en *G. duodenalis*.

6.- Material y métodos.

6.1 Cultivo de parásitos.

Se emplearon trofozoítos de la cepa WB (ATCC # 30957) y trofozoítos resistentes seleccionadas mediante subcultivo continuo en aumento de las concentraciones subletales de ABZ (Sigma USA). Cuando los parásitos se adaptaron a cada aumento de la concentración del fármaco, los cultivos se clonaron por dilución limitante usando la concentración ABZ correspondiente (1.35 μ M, 8 μ M y 250 μ M) (Paz-Maldonado et al., 2013). El cultivo se lleva a cabo en medio TYI-S-33 (ATCC 1404) suplementado al 10% de suero bovino (Hyclone) y solución de antibiótico / antimicótico al 1% (Thermo, EE.UU.) a 37 ° C en viales de 4.5 mL viales con tapón de rosca. Los trofozoítos se cosecharon por enfriamiento en un baño de agua-hielo y se contaron en un hemocitómetro. El ABZ fue diluido en el disolvente N, N-dimetilformamida (DMF; Sigma USA).

6.2 Ensayo de inhibición de adherencia

Para evaluar la susceptibilidad de los trofozoítos al ABZ, a la hemina y al proadifen se empleó el método de inhibición de la adhesión. El cual consiste en inocular una alícuota de 50,000 trofozoítos/mL en viales de 4.5 mL. Estos se dejan incubando a 37°C durante una hora para que la mayoría de los trofozoítos queden adheridos a la pared del vial. Posteriormente se adicionó el fármaco a distintas concentraciones. En seguida los trofozoítos se incubaron por 24 hr a 37°C. Finalmente se realizó el conteo de los trofozoítos adheridos al vial. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la adherencia y normalizados en base al número de células que fueron contadas en los cultivos control. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y se repitieron dos veces para cada cepa y compuesto.

6.3 Análisis in silico

Para investigar la existencia de homólogos del CYPy la de la NADPH citocromo P450 reductasa (CPR) se realizaron búsquedas BLAST en la base de datos del proyecto del genoma de *G. duodenalis* depositadas en el banco de genes Genbank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), así como la base de datos *G. duodenalis* (giardiadb.org/giardiadb/). Se utilizó el patrón consenso de CYP obtenido del sitio PROSITE (prosite.expasy.org/) para la búsqueda de posibles candidatos a CYP. Cada uno de los candidatos fue analizado con la herramienta de <https://swissmodel.expasy.org/> de esta forma se analizaron la mayor cantidad de candidatos obtenidos por el análisis de los patrones consenso; solo se analizaron los resultados para *G. duodenalis* del aislado WB ensamble A. Además, se utilizó la herramienta bioinformática

(<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/TM-align/>) para observar el grado de homología que existe entre la estructura del templado y de las proteínas candidatos.

6.4 Cuantificación de mensajeros por RT-PCR de punto final

La extracción de RNA se obtuvo a partir de un cultivo de trofozoítos utilizando Trizol (Invitrogen). Para ello se añadieron 0.750 mL de Trizol por cada 0.25 mL de muestra con una concentración de 1×10^7 . Esta mezcla se dejó homogeneizando en hielo y se colocó en el vortex por lo menos 1 minuto y después se dejó en el hielo, se realizaron 3 ciclos para obtener el máximo rompimiento de las células y la máxima disociación de los complejos nucleoprotéicos. En seguida se añadió 0.2 mL de cloroformo, se homogeneizó y se dejó incubar en un baño de hielo por 3 min. Se realizó la centrifugación a 12,000 x g en frío a 4°C, durante 15 min. Posteriormente se obtuvieron dos fases y se recuperó la fase ligera en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL. A esta fase se le añadieron 0.5 mL de isopropanol se dejó incubando 10 min en un baño de hielo y se centrifugó a 12,000 x g a 4°C. Así se obtuvo una pastilla de ácidos nucleicos y se retiró todo el sobrenadante

para lavar la pastilla con 1 mL de etanol al 75%. Posteriormente se homogeneizó ésta suavemente y se centrifugó nuevamente a 12,000 x g por 5 min. Se retiró el sobrenadante y se dejó reposar el tubo invertido sobre papel absorbente. Finalmente, los ácidos nucleicos obtenidos fueron resuspendidos en 20 µL de agua libre de RNAsas.

Los ácidos nucleicos obtenidos fueron cuantificados con el equipo NANODROP 2000 (Thermo); se seleccionó la opción del equipo RNA para cuantificar la cantidad obtenida de nuestro proceso de extracción y su calidad fue analizada en geles de agarosa al 1.2%. Estas muestras se trataron con DNasa I grado amplificación (Life Technologies) por 30 minutos a 37°C. Con un 1 µg de RNA libre de DNA se procedió a realizar la Síntesis de cDNA utilizando los oligonucleótidos oligo (dT) y el Kit SuperScript II RNase H- Transcriptasa reversa (Invitrogen). Se realizó la técnica de PCR de punto final para el cDNA de la (CPR) con los oligos CYPORF 5' AGGTGGTAGCAGAGGCATCAG 3', CYPORR 5' GGGAGGAGAACTTGGTAAATA 3'. Se tomó como control el gen de la Ubiquitina utilizando los oligos UbF 5' GATCTTCGTCAAGACTCTCACCG 3', UbR 5' TAGTTACCACCACGGAGGCG 3'. Las condiciones para realizar esto fueron 94°C por 5 min, después por 25 ciclos 94°C por 30 seg, 64°C por 30 seg, 72°C por 30° seg y para finalizar 72°C por 5 min. Los productos de PCR obtenidos fueron observados en geles de agarosa al 2%.

6.5 Técnica de DARTS (drug affinity responsive target stability por sus siglas en ingles).

La identificación de la proteína se llevó a cabo por la técnica DARTS (drug affinity responsive target stability). Esta técnica, es un acercamiento relativamente rápido y directo para analizar la unión directa de fármacos a los blancos de estos. Se basa en la protección contra la proteólisis conferida a la proteína blanco mediante la interacción con un fármaco. La mayor ventaja de este método es poder utilizar el fármaco en su forma nativa sin tener que inmovilizarlo o modificarlo. A partir de un cultivo se tomaron

aproximadamente 120×10^6 trofozoítos y se realizó la extracción total de proteína en un volumen de 600 μL de solución de lisis M-PER (Pierce) suplementado con inhibidores de proteasa y fosfatasa. Después se centrifugó a 14.000 rpm a 4°C , los lisados se dividieron en 12 condiciones distintas y se diluyeron al mismo volumen y concentración final con el buffer de la pronasa (Tris 50 mM · HCl (pH 8.0), NaCl 50 mM, CaCl_2 10 mM). Todas las etapas se realizaron en hielo a 4°C para prevenir la degradación temprana de proteínas. Cada muestra se colocó a temperatura ambiente y se colocaron 3 μL del disolvente de la droga en 6 viales y en los otros 6 se agregaron 3 μL de la droga en este caso el proadifen; las muestras se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente para lograr la mayor protección por el proadifen y evitar la proteólisis de moléculas blanco de este compuesto. Posteriormente se realizó la proteólisis con distintas diluciones de pronasa, considerando como concentración inicial 10 mg/mL y las diluciones se hicieron en buffer TNC a las diluciones finales de 1:100, 1:300, 1:1000, 1:3000 y 1:10000. Posteriormente se agregaron 2 μL de cada dilución para cada una de las condiciones y se dejó un intervalo de 1 min antes de añadir la pronasa; las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Para detener la proteólisis, se añadieron 5 μL de EDTA (pH 8,0) 0.5 M a cada muestra. Finalmente se agregaron a cada una de las muestras 10 μL de buffer de carga con 2-mercaptoetanol. Enseguida se calentaron a 98°C durante 10 min y se colocaron en un baño de hielo antes de ser cargadas. Finalmente, las muestras fueron visualizadas en geles de poliacrilamida al 10% y teñidas con azul de Coomassie.

6.6 Espectrometría de masas

La banda identificada en los geles SDS-PAGE se analizó por espectrometría de masas. Para ello se cortó ésta en condiciones de esterilidad y se incubó a 95°C durante 15-20 min y posteriormente se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 20 μL de iodoacetamida 200 mM

preparado en buffer de bicarbonato de amonio 50 mM, se mezcló suavemente e incubó durante 1h a temperatura ambiente y en oscuridad. Después, se agregaron 20 μ L de ditioneitol 200 mM preparado en buffer de bicarbonato de amonio 50 mM para detener la reacción y consumir el exceso de iodoacetamida. Enseguida se agregó tripsina a una razón final 1:100 de tripsina: proteína y se incubó a 37°C durante 1 h. La muestra fue congelada a -20°C. Antes de analizar la muestra por espectrometría de masas se pasó por unas puntas/columnas C4 para ser desaladas. Finalmente, la muestra de inyectó en el equipo de HPLC EKspot MALDI spotter que transfiere la muestra a una placa para finalmente ser analizada en el equipo 4800 MALDI TOF.

7.- Resultados

7.1 Análisis in silico

En el análisis in silico se utilizó como molde la secuencia del CYP de *Pseudomonas putida*, dado que es un citocromo soluble y se han obtenido cristales de esta proteína. Los datos sobre la secuencia son los siguientes:

```
>tr|Q88LH7|Q88LH7_PSEPK    Cytochrome    P450    family    protein
OS=Pseudomonas putida (strain KT2440) GN=PP_1955 PE=4 SV=1
MEILDRPQAPSDFNPMSEQSFDPASICQRAREETPVFFYAPLGVWMVTR
REDAERVLSEWETFSSLANSPNVPEEFRSRFAPSVMADSIVAIDPPRHTQA
RNVIQRGFMKPKIDPLEPIIEQRAHEIIDRFAGESGTEIMNNYCLELTRTLMA
LYDLPLEDRPMFERIRDVSIKVLASVYEPMQEPEKSRVWNEYVSGYEYFYQ
LVEQRRNSDARDIISTMASQKDNQGNPALSTERIALHLVEIAFAGTDTTAQM
MANAILFLDSHPEALAAAKADKTLWSRVFEETVRRRPSAPFAGRITTTTEVEIQ
GVKIPAGSPVWVSLAAANTDPRHVGCPMNF DINREAPQDHLAFTKGRHTC
PGAPLARLQGATGLRVLFERLPELKVVPDQPLNFAPMALLPVRLSLQVIW
```

En el modelamiento de la proteína se usó la secuencia y estructura 3D del CYP de *Saccharomyces cerevisiae*, dado que evolutivamente está más cercana a *Giardia* considerando los organismos en los que se ha reportado el CYP. La secuencia del CYP de *S. cerevisiae* es la siguiente:

```
>sp|P54781|ERG5_YEAST    Cytochrome    P450    61    OS=Saccharomyces
cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=ERG5 PE=1 SV=1
```

En nuestro grupo de trabajo se obtuvieron clonas resistentes al ABZ y en éstas se observó que se sobre-expresaba una proteína que fue identificada como una proteína variable de superficie (ARR-VSP) de *Giardia*. La secuencia de ésta VSP es la siguiente:

```
>tr|A8BPL3|A8BPL3_GIAIC VSP OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803
/ WB clone C6) GN=GL50803_101765 PE=4 SV=1
```

Estas dos secuencias fueron alineadas con la herramienta bioinformática T-Coffee. El color indica el nivel de consistencia entre la alineación final realizada por T-Coffee. El puntaje principal es el valor de consistencia total.

Para este alineamiento se obtuvo un puntaje de 0.631 y un color Amarillo para la ARR-VSP de consistencia promedio

	BAD	AVG	GOOD
*			
SP450	: 70		
ARRVSP	: 61		
cons	: 63		
SP450	MSSVAENIIQHATHNSTLHQLA---KDQ--PSVGVTTAFSIL		
ARRVSP	MLLLAPCLLISALAASCSGPTASKCKDGECDMIGKTEVCTQC		
cons	* : * :: * * * ** : * * . :		
SP450	DTLKSM SYLKIFATLICILLVWDQVAYQI-----KKGSIAG		
ARRVSP	---KTETDH--LIDGECV PAGTDQAAAKCASPAQKCGSCGD		
cons	* : : * : ** . * : * ** ..		
SP450	P-----KFKFWPIIGPFLES LDPKFEEYKAKWASGPLSCV		
ARRVSP	GYFMYKGGCYEFAGELGGLI-CADPAGGATVGKVTGVCKDCV		
cons	: : * : * : . ** . * : . . **		
SP450	SIFHKFVVIAS TRDLARKILQSSKFVK-----		
ARRVSP	EGFFKSPVAAANKQSCISCNDTTGADQYQGVDQCKTCNPPSN		
cons	. * . * * * : : : . . : : : : * .		
SP450	-----PCV-----		
ARRVSP	TGPATCTACDEGYFGAGTTTCIACGDENCATCTEATTTKCS		
cons	* .		
SP450	-----VDVAVKI		
ARRVSP	KCKATGKMYLKKESGSLTGICVEGNQCSTDSTLYPDDTEPKS		
cons	* . *		

SP450 LRPCNW-VFLDGKAHTDYRKSLNGLFT-----KQALA
 ARRVSF CKPCTAGTFENCKTCTKSDTSVTCTACKENMVFLGKKSICIS
 cons :** . * : * : * . * : . * . . . *

SP450 QYLPSELEQIMDKYMDKQVRLSKENNYEPQVFFHEMREILCAL
 ARRVSF S-CPDNSEAKTENTCTCNDGFKLNEEETQCVPNDSFSPNPCST
 cons . * . : : . * * : * . * . : : . *

SP450 SLNSFCGNYITEDQV-RKIADDYYLVTAALELVNFPPIIPYT
 ARRVSF QDCKACSGAQTNKEICTECLSNKYLTPTNQCIDHCEYILGYY
 cons . . * . . * : : : : : : * * . . : : * : *

SP450 KTWYGGKTADMAMKIFENCAQ-----MAKDHAAGGKPV
 ARRVSF SSTEKNKRVCKKCEV-ANCLACSENGGCGLCKDGFY--GEAC
 cons . : * : * . : : * * : . * * : * : .

SP450 CVMDAWCKLMHDAKNSNDDDSRIYHREFTNKEISEAVFTFLF
 ARRVSF SPCDSSCKTCS-GNTANDCTSCKSGSTLTYGST-----
 cons . * : * * . : . : * * * * : * .

SP450 ASQ-----
 ARRVSF -GNTGTGCGAECAAGTGTGKCRECGLTVEGTKYCSVCSQNNY
 cons . :

SP450 -----DA
 ARRVSF PQNGVCAVKASRTDKCKDGSITGGVCNVCADGFFKMNGGCYS
 cons : : : : : : : : : : : :

SP450 SSSLACWLFQIVADRPDVLAKIREEQVLAVRNNDMSTELNLDL
 ARRVSF TSQLPGSTVCLSAQSTGGICKTPEEGFSLTGESLVTC-----
 cons : * . * . . : * : . . : . * * * : : . . . : *

```

SP450      IEKMKYTNMVI----KETLRYRPPVLMVPYVVKKNFPVSPNY
ARRVSP     -----YTGCAECTTTKDCSRCMDGYVKVGSACTKC--HESCY
cons       ** . . * : * : * . .* . . *

SP450      TAPKGAMLIPTLYPALHDPEVYENPDEFIPERWVEGSKASEA
ARRVSP     TCEAGATTCKVCAPGYKESSSNGPCRKCSEG-----
cons       * . ** . * . : . : * . .*

SP450      KKNWLVFGCGPHVCLGQTYVMITFAALLGKFALYTFHHTVT
ARRVSP     -----LAGCRQCAT
cons       . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .

SP450      PLSEKIKVFATIFPK-DDLLLTFKKRDPIITGEVFE-----
ARRVSP     PVNGKFICFETDDNTGDNTGGSTNKSGLSTGAIAGISVAVIV
cons       * : . * : * * . * : : : * . ** : . .

SP450      -----
ARRVSP     VVGGLVGFCLCWWFICRGKA
cons       . . . . . . . . . . . . . . . .

```

Considerando la posibilidad de que esta proteína pudiera tener homología con la estructura de la CYP de *S. cerevisiae*, se realizó el alineamiento empelando la herramienta TM-align que se encuentra en el servidor I-Tasser

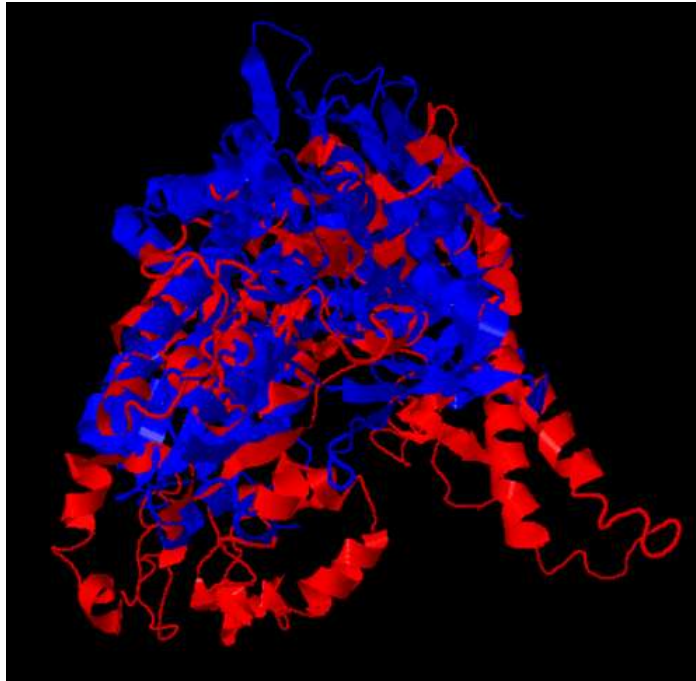


Figura 8. Alineamiento entre gCYP y un templado de CYP. En color azul se muestra el modelamiento de la proteína hipotética GL50803_101765 (gCYP) obtenido de I-TASSER. En color rojo se encuentra la proteína CYP de *Saccharomyces cerevisiae* obtenida del pdb. El score de alineamiento es (TM-score) de 0.24375. Este Valor indica un bajo nivel de alineamiento estructural, lo que no permite sugerir que esta secuencia sea un *bona fide* CYP.

Por otro lado, dada la gran variedad que se tiene en las secuencias de las isoformas del CYP, se empleó el programa PROSITE

<http://prosite.expasy.org/scanprosite/> el cual cuenta con un patrón consenso para identificar posibles candidatos que tengan esta función de monooxigenasa de los CYP, la cuales la siguiente:

[FW]-[SGNH]-X-[GD]-(F)-[RKHPT]-(P)-C-[LIVMFAP]-[GAD]

Cuando se utilizó la base de datos del genoma de *Giardia* para buscar posibles homólogos de esta secuencia consenso

(<http://giardiadb.org/giardiadb/showQuestion.do?questionFullName=GeneQuestions.GenesByMotifSearch>) se encontró que entre las secuencias con

mayor similitud, una de ellas resultó coincidentemente ser la ARR-VSP que, como se mencionó, se sobre-expresa en las cepas resistentes a ABZ

Es importante de señalar que éste no es el único patrón reportado para la identificación de CYP, por ejemplo, también se tiene los siguientes patrones: Phe-X-X-Gly-X-Arg-X-Cys-X-Gly o (Ala/Gly-Gly-X-Asp/Glu-Thr-Thr/Ser) (Danièle Werck, 2000). Sin embargo, cuando se utilizan estos se obtienen resultados distintos, por lo que consideramos que no existe un patrón único que permita identificar el homólogo de CYP en todas las especies. Como se sabe, el CYP requiere de dos electrones para llevar a cabo la reacción de monooxigenasa; estos son proporcionados por la NADPH. El grupo prostético hemo de ésta, solo puede aceptar un electrón a la vez, de modo que existe una proteína dependiente del NADPH que simultáneamente acepta dos electrones del NADPH, pero los transfiere individualmente hacia el CYP, cuyo nombre es NADPH-citocromo P450 reductasa (CPR). En algunas ocasiones la segunda transferencia de electrones puede darse en sistemas reconstituidos por el citocromo b5 y se ha reportado que el citocromo b5 permite la interacción alostérica entre el CYP y la CPR en la transferencia de electrones. Así, se ha reportado que estas dos proteínas son necesarias, pero no indispensables para realizar la reacción de monooxigenasa.

Considerando lo anterior, se realizó una búsqueda de la NADPH citocromo p450 reductasa (CPR) (GL50803_735) se encontraron reportes bioinformáticos sobre esta proteína o sobre otras posibles isoformas (GL50803_15897) que pueden tener función de NADPH-CYP450reductasa.

La secuencia de esta proteína es la siguiente:

```
>tr|A8BYC3|A8BYC3_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis  
(strain ATCC 50803 / WB clone C6) GN=GL50803_15897 PE=4 SV=1
```

Esta secuencia se comparó con la de *Saccharomyces cerevisiae*

```
>sp|P16603|NCP1_YEAST NADPH--cytochrome P450 reductase  
OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=NCP1  
PE=1 SV=3
```

Este alineamiento se realizó empleando la herramienta bioinformática T-Coffee. Para este alineamiento se obtuvo un puntaje de 0.876 y un color rojo para la gCPR de consistencia buena.

```

BAD AVG GOOD
*
sCPR : 88
gCPR : 89
cons : 87

sCPR MPFGIDNTDFTVLAVGLVLLVYKRNKSIKELLMSDDGDITAVSS
gCPR M-----
cons *

sCPR GNRDIAQVVTENN-KNYLVLYASQTGTAEDYAKKFSKELVAKFNL
gCPR -----TRSNKEPITVMYASATGTIQRLADQLVGDLCARE--
cons *..* : *:*:* *:*:* : *.: : * * :

sCPR NVMCADVENYDFESLNDVPVIVSIFI-STYEGDFPDGAVNFEDF
gCPR -ASVSSINMKAFKPYNIPRGTIIYMTCTFFAGEHPPASKEFIAW
cons . :.: * . :.* . *.: .* : *.:* . : .* :

sCPR I--CNAEAGALSNLRYNMFGLGNSTYEFFNGAAKKAEKHLSAAGA
gCPR LQTVNPSLRPFRDIRFAVFGMGSKNYTTFCAASKNADKSIEIFGG
cons : *.. .: :.*: :*:*. ..* * .*:*:*:* .: *.

sCPR IRLG-KLGEADDGAGTTDEDYMAWKDSILEVLKDELHLDEQEAKF
gCPR TRILDALHLDRDEFKSDDSAYIHWKDLFKVL----GLSEQPVIS
cons *: * * : *. * : **..: :** *.*.

sCPR TSQFQYTVLNEITDSMSLGEPYSAHYLPSHQLNRNADGIQLGPFDL
gCPR TNKIIIVTKNTSLPKWV-----CDV
cons *.: : * . :.*.

```


sCPR SQ-PYIAPIVKSRELFSSNDRNCIHSEFDLSGSNIKYSTGDHLAV
gCPR SPLGYKRGIMSKVKVLSDBGKVDGVVHLYEITCPCMKYEAGGHCAI
cons * * * : . . : : * . . . : : : : : . : * * . : * . * * :

sCPR WPSNPLEKVEQFLSIFNLDPETI--FDLKPLDP-----T
gCPR LPRNRAEDIKALLAKGHISLDHGCKVVAEASDIVVVEHASWVRS
cons * * * : : * : : . . : . : * . : : : : : :

sCPR --VKVPFPTPTTIGAAIKHYLEITGPVSRQLFSSLIQFAPN-ADV
gCPR VNAVLPLGRPIYVLDLLSQYLDFSTVIDFTSFKELVPYVTDGAQY
cons . : * : * : : : * : : : * * : : : : . * : * : : : : * :

sCPR KEKLTLLSKDKDQFAVEITSKYFNIADALKYLSDGAKWDTVPMQF
gCPR RQALHML-EDPTLFKTVFLDTRLNMIDIFTKFSS----LKVPIHT
cons : : * : * : * * . : . . : * : * : . : * . : : * * : :

sCPR LVESVPQMTPRYYSISSSS--LSEKQTVHVTSIVENFPNPELPDA
gCPR LIEHMPAMTHRMYSIASAPSYVGETRLQFIVSDVD-FECETLSKT
cons * : * : * * * * : * : . : . * : : . : * * : * * . : :

sCPR -PPVVGVTNLLRNIQLAQNNVNIAETNLPVHYDLNGPRKLFANY
gCPR IEKRPGLSTGYLSRLQ-----EGSAVFFQTF
cons * : : * . * : * : . : * : * : * : * : * : * : * : :

sCPR KLPVHVRRSNFRLPSNPSTPVIMIGPGTGAVPFRGFIRERVAFLE
gCPR SSPVRCGD-EFR-----GVPSITVGLGTGLAPCRSRLQHRALRL
cons . * * : : * * : . : * * : * * : * * : * * : * * : * * :

sCPR SQ-KKG---GNNVSLGKHILFYGSRNTDDFL-YQDEWPEYAKKLD
gCPR EQLKRAAPGEFIQPLDPYMTFIGLRRESDLKELIDELRDFVRK--
cons . * * : . : . : * * : . : * * * . : * : * * : : * * : : * :

sCPR GSFEMVVAHSRLPNT-----KQVY
gCPR GIATIFVAFSREEKSREWFEIIPNDADGALADVDKTAFCAEYKCY

```

cons      *      :. ** .**      ::      *      *
sCPR      VQDKLKDYEDQVFEMIN--NGAFIYVCGDAKGMAGVSTALVG-I
gCPR      VTRLMGEYANNIRNFVTSKDTCVITYCGKAGNVPQEIEGVILRSL
cons      *      :  :*  ::  :::.  :  ..*  **.*  ...:  :.  .:.  :
sCPR      LSRGKSITTDEATELIKMLKTSGRYQEDVW
gCPR      VSSG--MTEKDAKARWEKLRADQNLI FEAW
cons      :*  *  :*  .:*  :  *:.  .  :.*

```

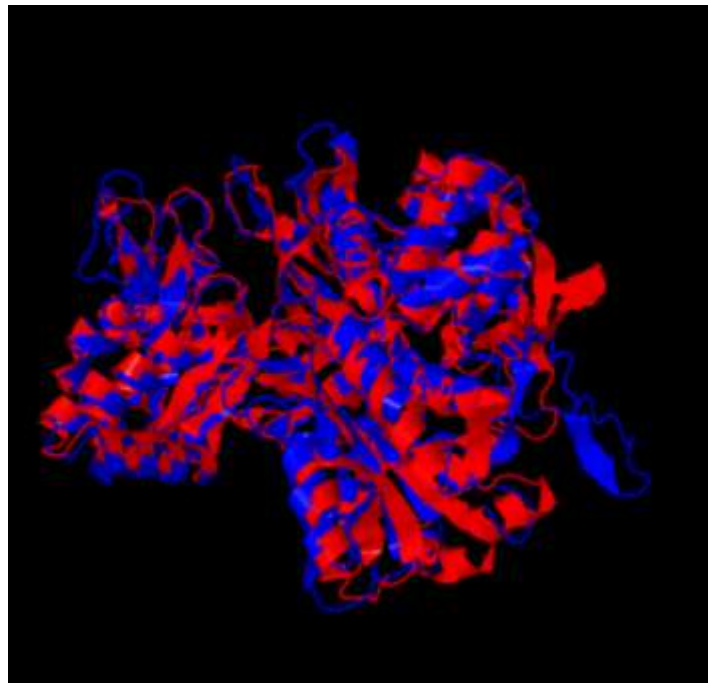


Figura 9. Alineamiento entre gCPR y un templado de CPR. El Alineamiento se realizó empelando la plataforma TM-align. En color azul se muestra el modelamiento de la proteína hipotética GL50803_735 (gCPR) obtenido de I-TASSER. En color rojo se encuentra la proteína NADPH-p450 reductasa de *Saccharomyces cerevisiae* obtenida del pdb. Los scores de alineamiento para la cadena 1 fue TM-score =0.85721 y para la cadena 2 fue TM-score =0.8942, los cuales indican una homología entre las moléculas.

Con este análisis se puede sugerir que hay una homología entre la CPR de *Saccharomyces cerevisiae* y la posible proteína candidata. Este hallazgo no necesariamente implica que aun cuando se tenga una CPR se deba tener CYP. Uno de los antecesores evolutivos de este tipo de proteínas oxidoreductasas son las flavohemoproteínas y dentro del genoma de *G. duodenalis* se encuentran reportadas. Sin embargo, dado la poca conservación de aminoácidos que existe entre los CYPs de distintas especies no se puede realizar un análisis con una proteína predecesora de los CYP ya que hasta la fecha no se ha reportado una molécula de éstas que pudiera encontrarse en todos los organismos.

7.2 Ensayo de susceptibilidad a albendazol en *Giardia* en presencia de hemina

Con la finalidad de medir la susceptibilidad a albendazol se realizó el método descrito por Meloni et al. (1990), que comprueba la viabilidad del trofozoíto midiendo la inhibición de la adherencia del parásito en presencia de agentes quimioterapéuticos. En este ensayo se añadieron 50,000 trofozoítos por mililitro a tubos de 4.5 mL que contienen medio modificado TYI-S-33 y fueron incubados durante 60 minutos a 37 ° C. Este paso es necesario para que los trofozoítos se puedan adherir a la pared en tubos de vidrio. Después de este tiempo se añadieron diluciones apropiadas del medicamento para llegar a una concentración final dentro del rango de resistencia reportado para cada una de las clonas WB y las resistentes a ABZ 1.35,8 y 250 µM. Después que los trofozoítos se incubaron durante 24 horas a 37°C, las células adherentes se contaron en un microscopio invertido.

Para el análisis de resultados se decidió utilizar una ecuación de crecimiento modificada que se ha reportado para el análisis y cálculo de datos con este tipo de comportamiento.
$$Y = \frac{K}{1 + \left(\frac{X}{I_{50}}\right)^b}$$

Donde k representa el valor máximo de células viables en ausencia del medicamento, b es una tasa de velocidad e IC₅₀ la concentración a la cual la viabilidad se reduce a la mitad.

Giardia, a pesar de que carece de una vía de síntesis de grupos hemo y el de un conjunto típico de hemoproteínas es capaz de utilizar grupos hemo extracelulares e incorporarlos en las proteínas como el cytb₅. Considerando esto se decidió comparar la condición con hemina y ABZ, con la finalidad de ver si tenía un efecto en la proteína que biotransforma el ABZ a su especie activa que esta denotada como hemoproteína.

Con la ecuación y las condiciones propuestas se obtuvo la siguiente tabla.

Tabla 1. Valores de IC₅₀ para cada una de las condiciones

	IC ₅₀ (μM)	k	b	R cuadrada
WB	0.06837	0.97219	4.73712	0.99635
WB + Hemina	0.03482	0.96827	2.35302	0.99844
1.35	1.47202	0.93892	4.96981	0.97703
1.35 + Hemina	0.69216	0.98593	1.68398	0.97965
8	4.33372	0.99477	3.77465	0.98999
8 + Hemina	2.71879	1.00173	3.34105	0.9928
250	79.15644	0.99037	2.93417	0.99718
250 + Hemina	38.93802	0.97476	2.07739	0.98747

Se puede observar un cambio en la sensibilidad del ABZ en *Giardia* donde la concentración inhibitoria IC₅₀ disminuye. En el caso de WB su IC₅₀ fue de 0.06837 μM y en presencia de hemina este valor disminuyo a 0.03482 μM. El valor de la IC₅₀ de la clona resistente a 1.35 μM de ABZ fue de 1.47202 μM y en presencia de hemina su IC₅₀ fue de 0.69216 μM. El valor de la IC₅₀ de la clona resistente a 8 μM de ABZ fue de 4.33372 μM y en presencia de hemina su IC₅₀ fue de 2.71879 μM. El valor de la IC₅₀ de la clona resistente a 250 μM de ABZ fue de 79.15644 μM y en presencia de hemina su IC₅₀ fue de 38.93802 μM. Se propone que este cambio puede estar relacionado con la velocidad de transformación del ABZ hacia su especie activa y la hemina puede estar relacionada como un inductor de la proteína relacionada con

dicha transformación; debido a que es una hemo proteína la que está relacionada con la biotransformación del ABZ hacia su especie activa.

7.2 Ensayo RT-PCR

A partir de muestras de *Giardia duodenalis* de un tubo confluyente, se realizó el protocolo de extracción de RNA, siguiendo el protocolo establecido para el reactivo Trizol. Así mismo se siguió el protocolo de la desoxirribonucleasa grado amplificación para eliminar todo rastro de DNA remanente de la extracción del RNA. Finalmente siguiendo el protocolo de superscript III se sintetizó el cDNA a partir del RNA ya libre de DNA extraído de la muestra. Con el cDNA obtenido de la extracción se prosiguió a realizar la PCR de dicha muestra en la cual se utilizaron: primers específicos para ubiquitina, ARR-VSP y la CPR de *Giardia duodenalis*.

Tabla 2. Primers usados en PCR

Primer	Forward	Reverse	Producto de amplificación PB
Ubiquitina	GATCTTCGTCAAGACTCTCACCG	TAGTTACCACCACGGAGGCG	229
CPR	AGGTGGTAGCAGAGGCATCAG	GGGAGGAGAACTTGGTAAATA	297

El análisis de los productos amplificados por PCR es decir los transcritos de muestras de trofozoitos de *G. duodenalis* cepa WB mostró que para el mensajero de la CRP hay un aumento de la expresión de éste en presencia de hemina (Figura 10).

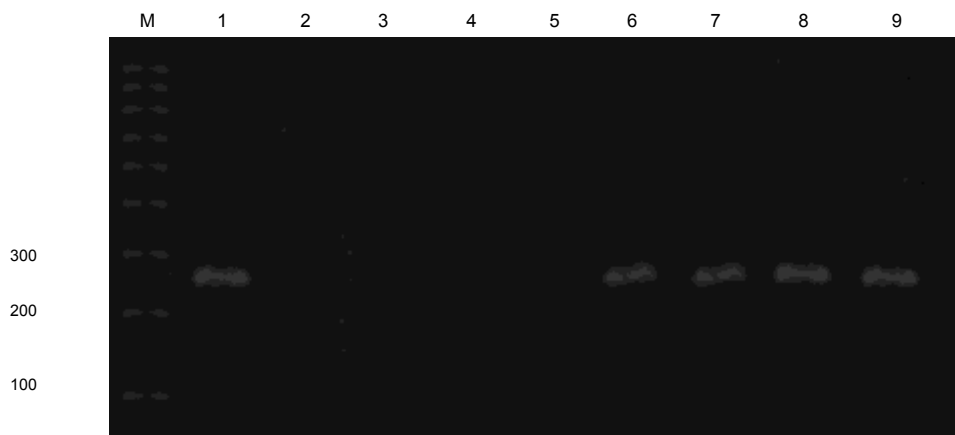


Figura 10. Productos amplificados por PCR para el mensajero de la CRP. Gel de electroforesis de los productos de PCR amplificados de una muestra de cDNA obtenidas del mRNA de una muestra de *Giardia* en presencia y en ausencia de hemina. Carril M= Marcador, 1=ADN genómico de *G. duodenalis*, 2= WB, 3= R1.35 μ M, 4= R 8 μ M, 5= 250 μ M, 6= WB + Hemina, 7=R1.35 μ M + Hemina, 8= R 8 μ M + Hemina, 9=250 μ M + Hemina.

El análisis densitométrico de las bandas mostró que hay una diferencia significativa para la condición con hemina (Figura 11). El valor mostrado en la gráfica es el resultado de la división del valor obtenido por densitometría de la banda problema entre el valor de la banda del gen control en este caso se tomó como control la ubiquitina. Este resultado final fue graficado y comparado solamente con su condición control en ausencia de la hemina. Se realizó un análisis t-student para observar si había cambios significativos solo entre las condiciones con y sin hemina de las distintas cepas.

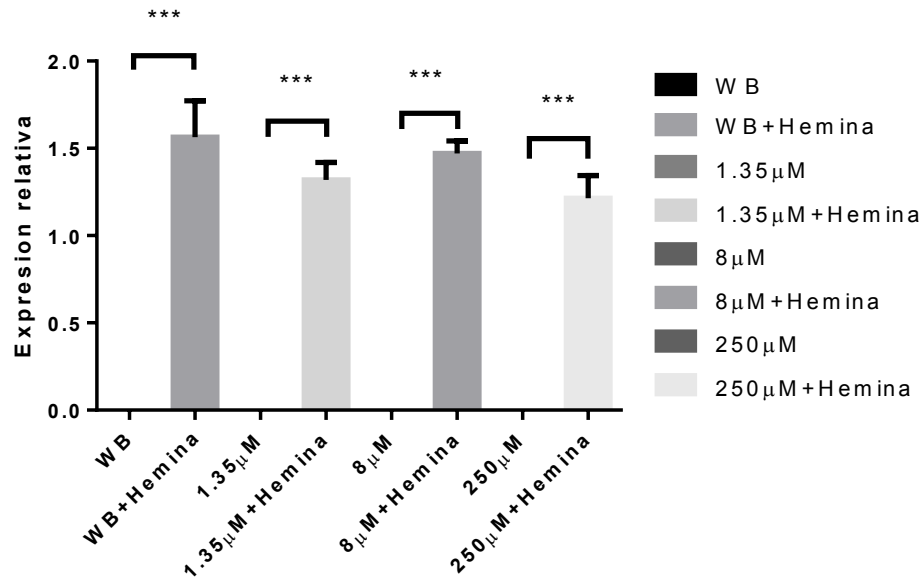


Figura 11. Expresión del mensajero de la CPR en condiciones con y sin hemina. Se aisló el RNA total en las condiciones con y sin hemina para las cepas WB, R1.35 μ M, R8 μ M y R250 μ M a ABZ, y se determinó mediante PCR de punto final la expresión génica del CPR. Los resultados se presentan como media \pm E.E. de la media (N = 3). *, P <0.001 comparado con el control

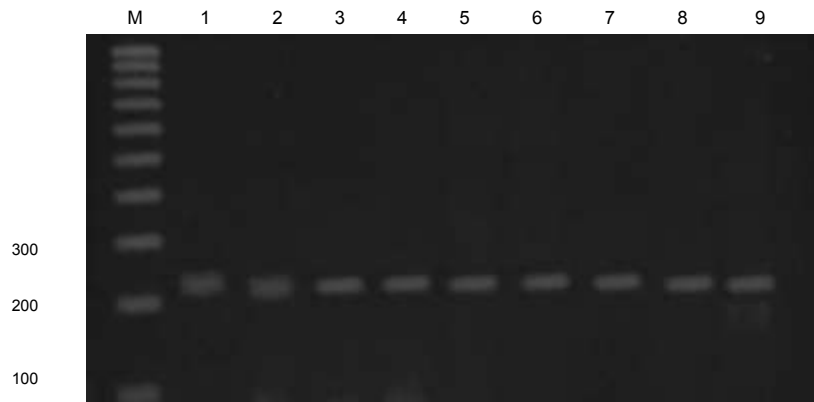


Figura 12. Productos amplificados por PCR para el mensajero de ubiquitina. Gel de electroforesis de los productos de PCR amplificados de una muestra de cDNA obtenidas del mRNA de una muestra de *Giardia* en presencia y en ausencia de hemina. Carril M= Marcador, 1=ADN genómico de *G. duodenalis*, 2= WB, 3= R1.35 μ M, 4= R 8 μ M, 5= 250 μ M, 6= WB + Hemina, 7=R1.35 μ M + Hemina, 8= R 8 μ M + Hemina, 9=250 μ M + Hemina.

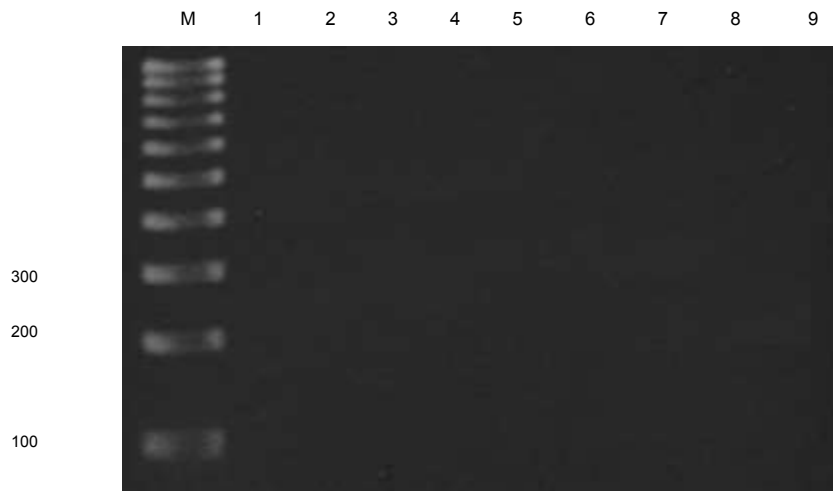


Figura 13. Controles negativos de las muestras analizadas por PCR. Gel de electroforesis de los productos de PCR amplificados de una muestra de cDNA obtenidas del mRNA de una muestra de *Giardia* en presencia y en ausencia de hemina. Carril M= Marcador, 1= Negativo de PCR, 2= Negativo de RT-PCR WB, 3= Negativo RT-PCR R1.35 μ M, 4= Negativo RT-PCR R 8 μ M, 5= Negativo de RT-PCR 250 μ M, 6= Negativo RT-PCR WB + Hemina, 7=Negativo RT-PCR R1.35 μ M + Hemina, 8= Negativo RT-PCR R 8 μ M + Hemina, 9=Negativo de RT-PCR 250 μ M + Hemina

En las Figuras 12 y 13 se pueden observar los controles positivos y negativos respectivamente para cada una de las condiciones y muestras. Como control positivo se amplificó parte del mensajero de la ubiquitina. Como control negativo se realizó la técnica de PCR utilizando la muestra de RNA obtenida en cada una de las condiciones; el primer carril (Figura 13) muestra la técnica de PCR sin muestra.

7.3 Micrografías de cultivos de trofozoítos tratados con ABZ y/o proadifen

A partir de muestras de *Giardia duodenalis* de un tubo confluyente que habían sido lavadas tres veces con PBS frío para retirar los trofozoítos adheridos se fijaron estos con paraformaldehído al 2%. Las preparaciones fueron

montadas en cubreobjetos. Estas fueron observadas en el microscopio óptico con sistema de epifluorescencia Axioskop 40 ZEISS (AxioVision Rel 4.8).

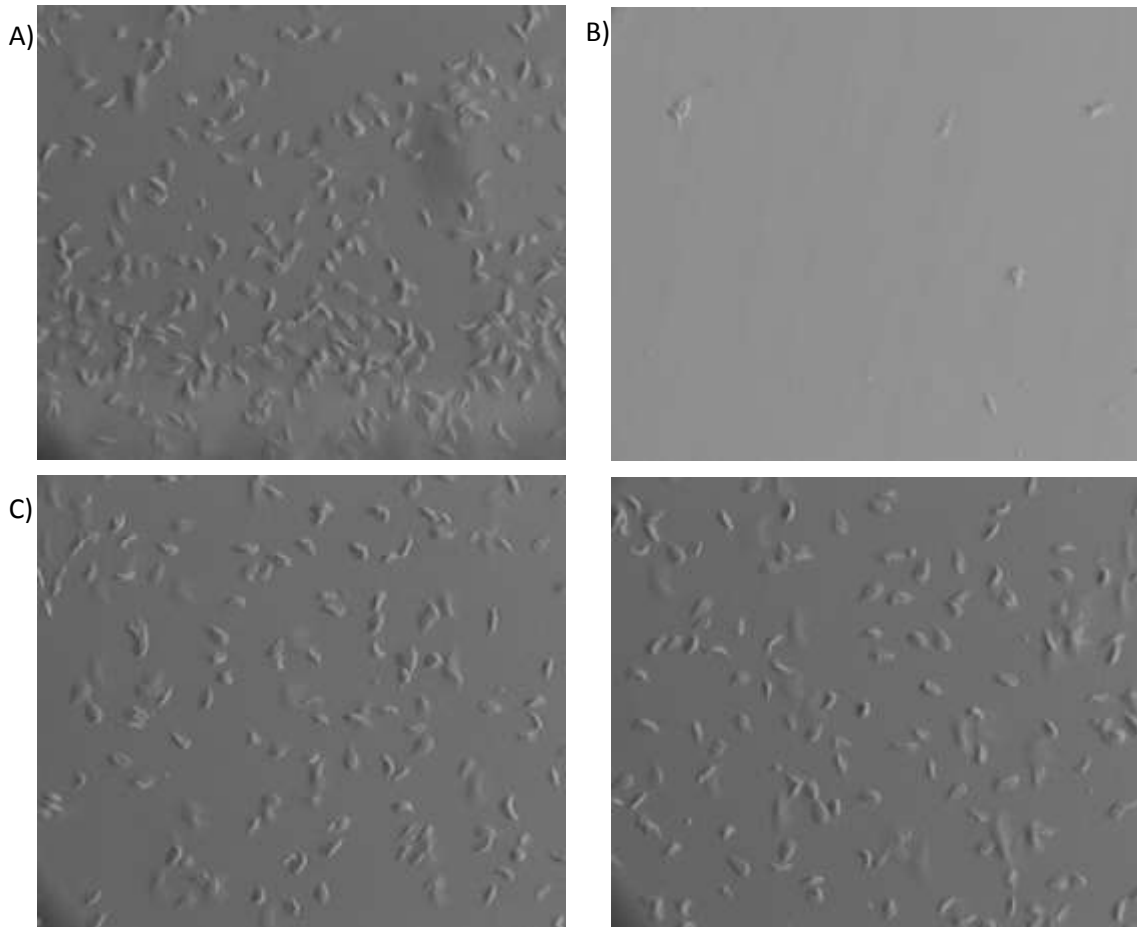


Figura 14. Micrografías de cultivos de trofozoítos tratados con ABZ y/o proadifen. A) Trofozoítos control, B) Trofozoítos tratados con una dosis letal de ABZ 0.1 μ M, C) Trofozoítos tratados con una dosis de 25 μ M de proadifen, D) Trofozoítos tratados con una dosis de 25 μ M de proadifen + 0.1 μ M de ABZ.

Este ensayo se confirmó que la presencia de proadifen tiene un efecto sobre la molécula relacionada a la transformación del ABZ hacia su especie activa. Como se puede observar (Figura 14D) en presencia de proadifen y una dosis letal de ABZ no se observa el efecto citotóxico al compararlo en la presencia de una dosis letal de ABZ (Figura 14B).

7.4 Ensayo de detección de la proteína tipo CYP

Mediante el ensayo de DARTS se obtuvo una banda diferencial para las dos condiciones utilizadas que fueron con y sin proadifen a una concentración de pronasa de 1:300. También se realizaron los ensayos en presencia y ausencia de hemina, así como para el ABZ. Pero en presencia de hemina no se observó algún cambio notorio en la relación de alguna banda nueva o con mayor densidad. Cuando se realizó el experimento en presencia de ABZ no se logró observar ningún cambio notorio entre las dos condiciones. Esto posiblemente se deba a que el ABZ al ser un sustrato de la proteína no esté en contacto continuo con esta y la pronasa puede degradar dicha proteína

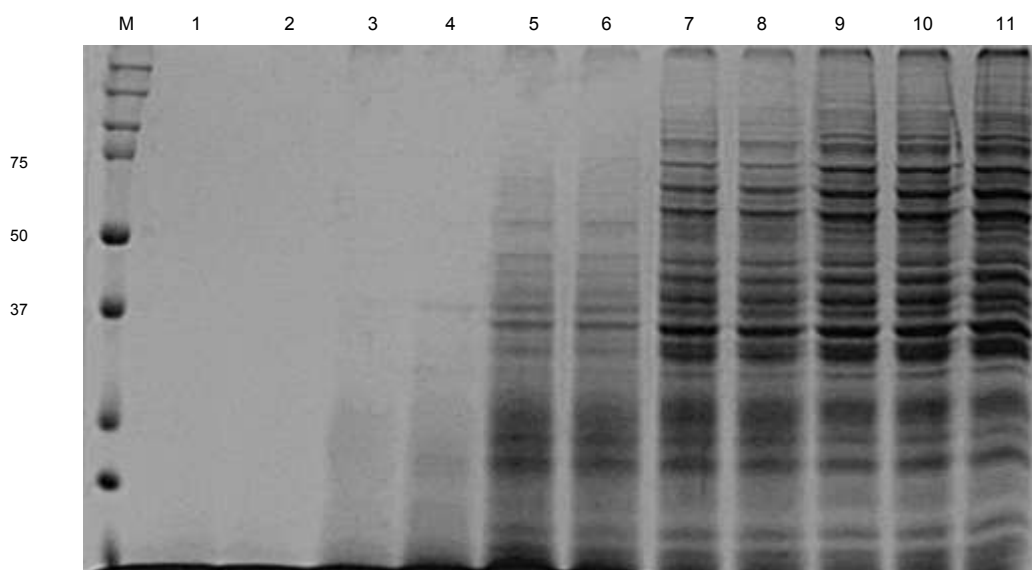


Figura 15. SDS-PAGE de muestras tratadas por la técnica de DARTS. Se observa en el carril 4 una banda diferencial ubicada a una altura de 37 KDa para la condición con proadifen. Carril; M= Marcador, 1= DMSO + 1:100 pronasa, 2=Proadifen + 1:100 pronasa, 3= DMSO + 1:300 pronasa, 4=Proadifen + 1:300 pronasa, 5= DMSO + 1:1000 pronasa, 6=Proadifen + 1:1000 pronasa, 7= DMSO + 1:3000 pronasa, 8=Proadifen + 1:3000 pronasa, 9= DMSO + 1:10000 pronasa, 10=Proadifen + 1:10000 pronasa, 11= Muestra sin tratar.

7.5 Resultados espectrometría de masas

La banda del experimento DARTS fue procesada y analizada por el equipo 4800 MALDI TOF y los resultados se pueden observar en la Tabla 3.

Tabla 3. Proteínas identificadas por espectrometría de masas

N	Unused	%Cov	Nombre
1	11.9	57.8000009	Ornithine carbamoyltransferase GN=GSB_10311
2	7.89	47.7800012	Mitogen-activated protein kinase GN=GSB_22850
3	6.07	29.6900004	Carbamate kinase GN=GSB_16453
4	5.27	31.8599999	Heat shock protein 70 GN=GSB_88765
5	4.96	34.9999994	Arginine deiminase GN=GSB_112103
6	3.49	32.100001	NADP-specific glutamate dehydrogenase (Fragment) GN=GSB_21942
7	3.27	26.4899999	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GN=GSB_6687
8	2.93	21.5100005	Heat shock protein 90 GN=GSB_98054
9	2.63	14.0499994	Transketolase GN=GSB_9704
10	2.37	22.62	Putative TPR repeat family protein GN=GSB_27310
11	2.21	16.6299999	Enolase GN=GSB_11118
12	2	6.51400015	Putative hybrid cluster protein GN=GSB_3042
13	1.7	16.6199997	Protein Translation Initiation Factor 4A GN=GSB_10255
14	1.21	12.1699996	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A GN=GSB_7532
15	1.15	6.59499988	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (Fragment) GN=GSB_8682
16	1.1	25.5899996	Uncharacterized protein GN=GSB_151784
16	0	21.1099997	Uncharacterized protein GN=GSB_151420

Como se puede observar (Tabla 2) en la banda se encontraron varias proteínas relacionadas a la síntesis de ATP, la inhibición del metabolismo de ATP por el proadifen ya se ha mencionado en estudios anteriores (Tavares et al., 2015).

Dentro de los resultados la proteína no caracterizada GSB_151784 y la GSB_151420 son dos isoformas de la misma proteína por ello el valor de “unused” fue de cero para la segunda.

Estas proteínas al ser analizadas in silico en I-TASSER y swissmodel mostraron un grado de identidad con tres proteínas (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados I-TASSER y swissmodel

Proteína	% Identidad
o-metiltransferasa	20.00
Nitrato reductasa	17.11
Hemoproteína sulfito reductasa	9.15

Los modelos 3D arrojados por I-TASSER que tienen mayor TM son proteínas CYP con un máximo de 0.5722 (Figura 16). En dichos modelamientos en 3D no se obtuvo ninguna de las proteínas anteriores con las que se realizó el alineamiento entre los aminoácidos.

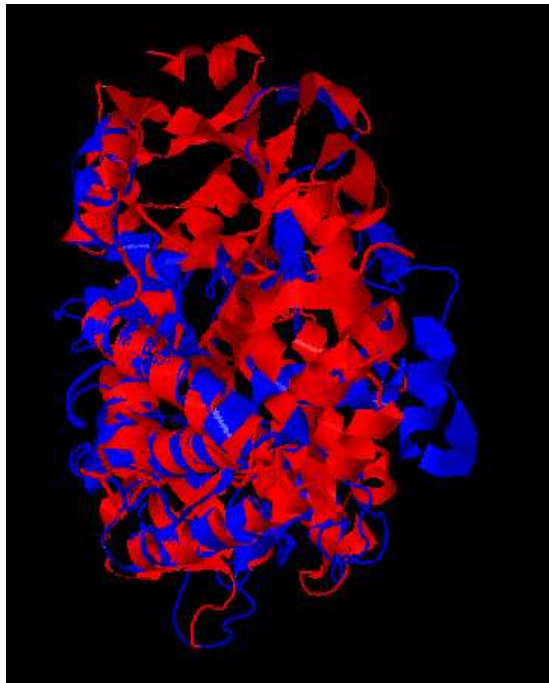


Figura 16. Alineamiento entre CYP 3A4 y proteína no caracterizada. El Alineamiento se realizó empelando la plataforma TM-align. En color azul se muestra el modelamiento de la proteína hipotética GSB_151784 obtenido de I-TASSER. En color rojo se encuentra la proteína CYP 3A4 humano obtenida del pdb. El score de alineamiento TM-score =0.5722.

8. – Discusión

La resistencia al ABZ en *Giardia* ha sido observada en aislados Clínicos (Farbey, Reynoldson, & Thompson, 1995) y en el laboratorio (Arguello-Garcia, Cruz-Soto, Romero-Montoya, & Ortega-Pierres, 2009); (Upcroft, Mitchell, Chen, & Upcroft, 1996); (Paz-Maldonado, Arguello-Garcia, Cruz-Soto, Mendoza-Hernandez, & Ortega-Pierres, 2013) De hecho, *Giardia* puede adaptarse a concentraciones de Albendazol que son aproximadamente 1000 veces superiores a la CI_{50} de poblaciones de *Giardia* susceptibles (Paz-Maldonado et al., 2013) En helmintos, la resistencia a este benzimidazol se ha relacionado con mutaciones en la β -Tubulina, preferentemente en las posiciones de aminoácidos 167 y 200. En *Giardia*, sin embargo, no se han encontrado cambios en estos aminoácidos considerados “hot spots” en esta proteína y relacionados con la resistencia a ABZ (Upcroft et al., 1996).

En clones resistentes a ABZ se han observado reordenamientos cromosómicos, aberraciones en el citoesqueleto (Upcroft et al., 1996); así como la expresión alterada de varios genes, incluyendo una proteína VSP (Arguello-Garcia et al., 2009). Así mismo se han reportado cambios en los constituyentes del disco ventral ($\alpha 2$ -Giardina) o diversas enzimas tales como NADH oxidasa y triosa fosfato isomerasa (Upcroft et al., 1996), así como la sobreexpresión de varias proteínas entre ellas la PFOR a albendazol (Paz-Maldonado et al., 2013). Estos reportes sugieren que probablemente un grupo más diverso de moléculas puede estar implicado en la resistencia a ABZ en *Giardia*. En este contexto, durante la realización de este trabajo se propuso identificar una proteína que estuviera relacionada con la transformación del ABZ hacia su especie activa y que pudiera estar relacionada en el fenómeno de resistencia a ABZ en las clones generadas en nuestro grupo de trabajo (Arguello-Garcia et al., 2009). Entre las proteínas ya reportadas que transforman el ABZ a su especie activa se encuentran los CYP y las monooxigenasas de flavina (Marques et al., 2002). Por tal motivo se planteó realizar este estudio para analizar si alguna de esas proteínas u otra

relacionada con este tipo de actividad se encuentra presente en *G. duodenalis* y participe en la biotransformación del ABZ a su especie activa.

Los CYPs forman un complejo con un socio redox para la transferencia de electrones (Guengerich, 2008). En esta función se puede utilizar una COR para la entrega de electrones de NADPH y en algunos sistemas reconstituidos los CYPs utilizan el citocromo b₅ (cyt b₅) (Hannemann, Bichet, Ewen, & Bernhardt, 2007)

G. duodenalis posee isoformas de (cyt b₅) y un homólogo de NADPH citocromo P450 reductasa (CPR) por lo cual podría tener moléculas semejantes a citocromos P450, sin embargo, no se han identificado éstas en su genoma (Rafferty et al., 2016). Dado que se había reportado una VSP relacionada con la resistencia a ABZ (Argüello Garcia et al) se procedió a realizar el análisis bioinformático de esta proteína. Este reveló poca identidad de esta VSP con un posible CYP; así mismo no se encontró homología de la estructura en 3D entre la VSP de *Giardia* y la estructura 3D de *Saccharomyces cerevisiae*. En otros análisis de este tipo utilizando los patrones consenso de los CYP que ya han sido publicados no se pudo obtener un candidato posible de CYP. Sin embargo, cabe mencionar que entre los resultados arrojados por las herramientas bioinformáticas se logró identificar una proteína hipotética con sitio de unión a grupos hemo y con posible actividad de peroxidasa (GL 50803_25080). Este resultado fue obtenido utilizando la herramienta <https://swissmodel.expasy.org/> y con ésta se realizó un análisis rápido de los candidatos obtenidos por los patrones consenso. De todos los candidatos analizados solo esta proteína coincidió con un sitio de unión al grupo hemo. En cambio, para la CPR con la secuencia GL50803_15897 se logró obtener una homología con nuestro templado a pesar del bajo porcentaje de identidad. Aun cuando en *Giardia* se encuentran los genes de la CPR y del citocromo b₅ como se mencionó anteriormente aún no se ha identificado un CYP. Este parásito posee una flavohemoglobina con actividad de dioxygenasa en los procesos de desintoxicación del óxido nítrico a nitrato y se ha propuesto como un posible

antecesor evolutivo de estas dos proteínas (Y. Yoshida, Aoyama, Noshiro, & Gotoh, 2000). En el caso del CYP aún no se encuentra un antecesor del cual pudieron derivarse todas las isoformas a través de la mayoría de las especies, aunque hay reportes de algunas isoformas en las que se conservan algunos aminoácidos en ciertas partes de la molécula en casi todas las especies.(Lepesheva & Waterman, 2004). Sin embargo, el grado de identidad en las secuencias a través de la familia del citocromo P450 de distintas especies puede ser muy bajo, por este motivo en la identificación de los citocromos se utilizan patrones consenso de las regiones más conservada (Shaik, Kumar, de Visser, Altun, & Thiel, 2005). Debido a esta variabilidad que existe en las secuencias y que no hay un antecesor bien definido en *Giardia* aún no se ha logrado identificar una proteína con homología a un CYP450. Sin embargo, cabe mencionar que más de la mitad de los marcos de lectura abierta en *Giardia* han sido anotados como proteínas hipotéticas y esto deja abierta la posibilidad de que posea un CYP (Yang, Pazdzior, Yee, & Rafferty, 2016).

Los resultados de sensibilidad en cultivos de trofozoítos con hemina sugieren que la presencia de ésta puede contribuir a la rápida transformación del ABZ hacia su especie activa y así disminuir la viabilidad de los trofozoítos. Esto se ve reflejado en la IC₅₀ que disminuye en cada caso. La forma en que la hemina pueda estar actuando es como un inductor inespecífico de la proteína involucrada en la biotransformación del ABZ hacia su especie activa. Dado que no se cuenta con la secuencia de la proteína tipo CYP se realizó un análisis de una de las proteínas necesarias para que el CYP tenga su actividad de monooxigenasa, la CPR. El análisis de transcritos mostró que en todos los casos en presencia de hemina hay una sobre-expresión del mensajero de la CPR que puede estar relacionado con la actividad de la proteína tipo CYPy una mayor transformación del ABZ a su especie activa(Braun et al., 2012).

La inhibición del monooxigenasa de flavina y los citocromos tipo P450 en los trofozoítos analizados mostró que en presencia del proadifen a una

concentración de 0.1 μM ABZ hay una inhibición de la biotransformación del ABZ a su especie activa y no se observa el efecto citotóxico del ABZ. Sin embargo, no se observó ningún efecto por parte del metimazol a 0.1 μM ABZ. Como ya se ha mencionado antes entre las proteínas ya reportadas que transforman el ABZ a su especie activa se encuentran los CYP y las monooxigenasas de flavina (Marques et al., 2002). Así, se sugiere que el posible mecanismo de transformación del ABZ en *G. duodenalis* pueda estar relacionado con una proteína tipo CYP y no una monooxigenasa de flavina.

Así en este trabajo se optó por el uso de la técnica DARTS el cual, es un ensayo relativamente rápido y sencillo para identificar blancos protéicos potenciales de moléculas pequeñas. Este ensayo se basa en la protección que se da por estas interacciones y así se evita la acción de la pronasa debido al impedimento estérico. Se ha reportado diversos objetivos del proadifen como CYP, óxido nítrico sintetasa (NOS), flujo transmembranal de Ca^2 , niveles de ATP intracelulares, glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β), canales de potasio, etc. (Clayton, LeDuc, & Kelly, 2005; Jendzelovsky et al., 2012; Tavares et al., 2015). Utilizando proadifen se logró encontrar una serie de proteínas blanco de este compuesto dentro de *G. duodenalis*.

Dentro los resultados de espectrometría de masas se observaron varias proteínas relacionadas con la síntesis de ATP que fueron protegidas de la pronasa por el proadifen (Tavares et al., 2015). Además de éstas, se encuentran otra serie de proteínas de las cuales la proteína no caracterizada (GSB_151784) mostró en los diversos análisis in silico de su secuencia un sitio de unión al grupo hemo y diversas actividades como proteína reductasa de grupos nitrito o sulfito. En el análisis en 3D realizado con la herramienta I-TASSER se mostró una posible relación con un CYP mostrando un valor TM-score =0.5722. En este contexto, un valor TM-score=0.5 puede ser considerado como un punto de corte para sugerir si dos proteínas poseen la misma topología. Es decir, la mayoría de las proteínas con una puntuación $\text{TM}>0.5$ pueden considerarse de la misma topología, mientras que la mayoría de las proteínas con una puntuación $\text{TM}<0.5$ deben ser de diferente

topología. Por ejemplo, cuando la puntuación TM=0.4, hay un 99% que las proteínas no tengan la misma topología de acuerdo con la definición consenso de SCOP y CATH; cuando TM-score= 0.6 hay un 90% que las proteínas compartan la misma topología basado en el criterio de consenso (Xu & Zhang, 2010).

Con esto podemos concluir que la proteína no caracterizada GSB_151784 presenta una topología similar a un CYP dado que el valor está por arriba del punto de corte y que pudiera estar relacionada en el fenómeno de transformación del ABZ hacia su especie activa.

9 Conclusiones y perspectivas

9.1 Conclusiones

El análisis bioinformático de la VSP relacionada con la resistencia a ABZ en *Giardia* empujando los patrones consenso de los CYP no arrojó datos de homología con la VSP previamente reportada en clonas resistentes a ABZ.

El análisis bioinformático de la proteína hipotética GL50803_735 mostro homología entre la CPR de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se identificò en *Giardia* una proteína hipotética (GL 50803_25080) con sitio de unión a grupos hemo y con posible actividad de peroxidasa

La hemina tiene un efecto sobre la sensibilidad del ABZ en *Giardia* disminuyendo la concentración inhibitoria IC₅₀ posiblemente relacionada con el mecanismo de biotransformación del ABZ a su especie activa.

El inhibidor proadifen aumentó la sensibilidad de las clonas hacia el ABZ indicando la posibilidad de que *Giardia* tenga una proteína con las características de CYP.

Estos resultados sugieren que una proteína tipo CYP puede estar afectada por estos dos compuestos y este efecto se ve reflejado en el aumento o disminución de la sensibilidad hacia el ABZ.

La técnica DART en presencia de proadifen y diversos análisis in silico mostraron una proteína no caracterizada GSB_151784 con un grupo hemo y con diversas posibles funciones entre ellas la de CYP por lo que, se propone a ésta como un posible candidato involucrado en la biotransformación del ABZ hacia su especie activa.

9.2 Perspectivas

Realizar un ensayo de sensibilidad y medir el valor de la IC₅₀ utilizando otras concentraciones de proadifen. Esto con la finalidad de observar cual es la resistencia máxima que este compuesto puede generar y si se pueden obtener resultados similares en las clonas resistentes a ABZ.

Realizar ensayos de actividad enzimática con compuestos promiscuos de CYP y analizar si en *G. duodenalis* hay esta actividad. En ensayos similares agregar distintos activadores de CYP y analizar si se logra obtener más actividad de esta posible molécula y si tiene un efecto en la IC₅₀ hacia el ABZ lo que permitiría relacionar estos resultados con la transformación del ABZ hacia su especie activa.

Llevar a cabo la técnica de DARTS con otros activadores y un número mayor de trofozoítos.

Realizar ensayos de RT-PCR en las clonas resistentes para identificar la presencia de la proteína identificada por DARTS.

Realizar análisis in silico de la proteína identificada por DARTS, así como la clonación y determinación de la actividad por la técnica de CO₂ para confirmar si se trata de una proteína tipo CYP y si está relacionada con la sensibilidad al ABZ en *Giardia*.

9. - Bibliografía

- Adam, R. D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev*, *14*(3), 447-475. doi:10.1128/CMR.14.3.447-475.2001
- Alam, S., Yee, J., Couture, M., Takayama, S. J., Tseng, W. H., Mauk, A. G., & Rafferty, S. (2012). Cytochrome b5 from *Giardia lamblia*. *Metallomics*, *4*(12), 1255-1261. doi:10.1039/c2mt20152f
- Andersen, Y. S., Gillin, F. D., & Eckmann, L. (2006). Adaptive immunity-dependent intestinal hypermotility contributes to host defense against *Giardia* spp. *Infect Immun*, *74*(4), 2473-2476. doi:10.1128/IAI.74.4.2473-2476.2006
- Ansell, B. R., McConville, M. J., Ma'ayeh, S. Y., Dagley, M. J., Gasser, R. B., Svard, S. G., & Jex, A. R. (2015). Drug resistance in *Giardia duodenalis*. *Biotechnol Adv*. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.04.009
- Arguello-Garcia, R., Cruz-Soto, M., Gonzalez-Trejo, R., Paz-Maldonado, L. M., Bazan-Tejeda, M. L., Mendoza-Hernandez, G., & Ortega-Pierres, G. (2015). An antioxidant response is involved in resistance of *Giardia duodenalis* to albendazole. *Front Microbiol*, *6*, 286. doi:10.3389/fmicb.2015.00286
- Arguello-Garcia, 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*, *9*(6), 1057-1064. doi:10.1016/j.meegid.2009.05.015
- Astiazaran-Garcia, H., Quintero, J., Vega, R., Briceno, P., Oviedo, C., Rascon, L., . . . Velazquez, C. (2009). Identification of T-cell stimulating antigens from *Giardia lamblia* by using *Giardia*-specific T-cell hybridomas. *Parasite Immunol*, *31*(3), 132-139. doi:10.1111/j.1365-3024.2008.01083.x
- Baker, N., de Koning, H. P., Maser, P., & Horn, D. (2013). Drug resistance in African trypanosomiasis: the melarsoprol and pentamidine story. *Trends Parasitol*, *29*(3), 110-118. doi:10.1016/j.pt.2012.12.005
- Baque, R. H., Gilliam, A. O., Robles, L. D., Jakubowski, W., & Slifko, T. R. (2011). A real-time RT-PCR method to detect viable *Giardia lamblia* cysts in environmental waters. *Water Res*, *45*(10), 3175-3184. doi:10.1016/j.watres.2011.03.032
- Barrett, J. (1998). Cytochrome P450 in parasitic protozoa and helminths. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, *121*(1-3), 181-183.
- Baruch, A. C., Isaac-Renton, J., & Adam, R. D. (1996). The molecular epidemiology of *Giardia lamblia*: a sequence-based approach. *J Infect Dis*, *174*(1), 233-236.
- Bernander, R., Palm, J. E., & Svard, S. G. (2001). Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cell Microbiol*, *3*(1), 55-62.
- Brasseur, P., & Favennec, L. (1995). Two cases of giardiasis unsuccessfully treated by albendazole. *Parasite*, *2*(4), 422.
- Braun, A., Geier, M., Buhler, B., Schmid, A., Mauersberger, S., & Glieder, A. (2012). Steroid biotransformations in biphasic systems with *Yarrowia lipolytica* expressing human liver cytochrome P450 genes. *Microb Cell Fact*, *11*, 106. doi:10.1186/1475-2859-11-106
- Buret, A. G. (2008). Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. *Parasite*, *15*(3), 261-265.
- Calderaro, A., Gorrini, C., Montecchini, S., Peruzzi, S., Piccolo, G., Rossi, S., . . . Chezzi, C. (2010). Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the laboratory

- diagnosis of giardiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 66(3), 261-267.
doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.10.004
- Clayton, N. P., LeDuc, B. W., & Kelly, L. J. (2005). Effect of potassium channel and cytochrome P450 inhibition on transient hypotension and survival during lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in the rat. *Pharmacology*, 73(3), 113-120. doi:10.1159/000081631
- Cvilink, V., Kubicek, V., Nobilis, M., Krizova, V., Szotakova, B., Lamka, J., . . . Skalova, L. (2008). Biotransformation of flubendazole and selected model xenobiotics in *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol*, 151(2-4), 242-248.
doi:10.1016/j.vetpar.2007.10.010
- de Carvalho, T. B., David, E. B., Coradi, S. T., & Guimaraes, S. (2008). Protease activity in extracellular products secreted in vitro by trophozoites of *Giardia duodenalis*. *Parasitol Res*, 104(1), 185-190. doi:10.1007/s00436-008-1185-z
- Deitsch, K. W., Moxon, E. R., & Wellems, T. E. (1997). Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61(3), 281-293.
- Dib, H. H., Lu, S. Q., & Wen, S. F. (2008). Prevalence of *Giardia lamblia* with or without diarrhea in South East, South East Asia and the Far East. *Parasitol Res*, 103(2), 239-251. doi:10.1007/s00436-008-0968-6
- Edwards, D. I. (1993). Nitroimidazole drugs--action and resistance mechanisms. II. Mechanisms of resistance. *J Antimicrob Chemother*, 31(2), 201-210.
- Farbey, M. D., Reynoldson, J. A., & Thompson, R. C. (1995). In vitro drug susceptibility of 29 isolates of *Giardia duodenalis* from humans as assessed by an adhesion assay. *Int J Parasitol*, 25(5), 593-599.
- Fayer, R., Dubey, J. P., & Lindsay, D. S. (2004). Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends Parasitol*, 20(11), 531-536. doi:10.1016/j.pt.2004.08.008
- Gardner, T. B., & Hill, D. R. (2001). Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev*, 14(1), 114-128. doi:10.1128/CMR.14.1.114-128.2001
- Grazioli, B., Matera, G., Laratta, C., Schipani, G., Guarnieri, G., Spiniello, E., . . . Lizza, F. (2006). *Giardia lamblia* infection in patients with irritable bowel syndrome and dyspepsia: a prospective study. *World J Gastroenterol*, 12(12), 1941-1944.
- Guengerich, F. P. (2008). Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol*, 21(1), 70-83. doi:10.1021/tx700079z
- Guy, R. A., Payment, P., Krull, U. J., & Horgen, P. A. (2003). Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. *Appl Environ Microbiol*, 69(9), 5178-5185.
- Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K. M., & Bernhardt, R. (2007). Cytochrome P450 systems--biological variations of electron transport chains. *Biochim Biophys Acta*, 1770(3), 330-344. doi:10.1016/j.bbagen.2006.07.017
- Hetsko, M. L., McCaffery, J. M., Svard, S. G., Meng, T. C., Que, X., & Gillin, F. D. (1998). Cellular and transcriptional changes during excystation of *Giardia lamblia* in vitro. *Exp Parasitol*, 88(3), 172-183. doi:10.1006/expr.1998.4246
- Homan, W. L., & Mank, T. G. (2001). Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int J Parasitol*, 31(8), 822-826.
- Jenzelovsky, R., Koval, J., Mikes, J., Papcova, Z., Plsikova, J., & Fedorocko, P. (2012). Inhibition of GSK-3beta reverses the pro-apoptotic effect of proadifen (SKF-525A) in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *Toxicol In Vitro*, 26(6), 775-782.
doi:10.1016/j.tiv.2012.05.014

- Jimenez-Cardoso, E., Eligio-Garcia, L., Cortes-Campos, A., Flores-Luna, A., Valencia-Mayoral, P., & Lozada-Chavez, I. (2009). Changes in beta-giardin sequence of *Giardia intestinalis* sensitive and resistant to albendazole strains. *Parasitol Res*, *105*(1), 25-33. doi:10.1007/s00436-009-1363-7
- Kamda, J. D., & Singer, S. M. (2009). Phosphoinositide 3-kinase-dependent inhibition of dendritic cell interleukin-12 production by *Giardia lamblia*. *Infect Immun*, *77*(2), 685-693. doi:10.1128/IAI.00718-08
- Kaufmann, S. H. (2008). Paul Ehrlich: founder of chemotherapy. *Nat Rev Drug Discov*, *7*(5), 373. doi:10.1038/nrd2582
- Koot, B. G., ten Kate, F. J., Juffrie, M., Rosalina, I., Taminiaw, J. J., & Benninga, M. A. (2009). Does *Giardia lamblia* cause villous atrophy in children?: A retrospective cohort study of the histological abnormalities in giardiasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, *49*(3), 304-308. doi:10.1097/MPG.0b013e31818de3c4
- Laing, S. T., Ivens, A., Laing, R., Ravikumar, S., Butler, V., Woods, D. J., & Gilleard, J. S. (2010). Characterization of the xenobiotic response of *Caenorhabditis elegans* to the anthelmintic drug albendazole and the identification of novel drug glucoside metabolites. *Biochem J*, *432*(3), 505-514. doi:10.1042/BJ20101346
- Lane, S., & Lloyd, D. (2002). Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol*, *28*(2), 123-147. doi:10.1080/1040-840291046713
- Langford, T. D., Housley, M. P., Boes, M., Chen, J., Kagnoff, M. F., Gillin, F. D., & Eckmann, L. (2002). Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. *Infect Immun*, *70*(1), 11-18.
- Leiros, H. K., Kozielski-Stuhrmann, S., Kapp, U., Terradot, L., Leonard, G. A., & McSweeney, S. M. (2004). Structural basis of 5-nitroimidazole antibiotic resistance: the crystal structure of NimA from *Deinococcus radiodurans*. *J Biol Chem*, *279*(53), 55840-55849. doi:10.1074/jbc.M408044200
- Leitsch, D., Burgess, A. G., Dunn, L. A., Krauer, K. G., Tan, K., Duchene, M., . . . 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*, *66*(8), 1756-1765. doi:10.1093/jac/dkr192
- Leitsch, D., Kolarich, D., Binder, M., Stadlmann, J., Altmann, F., & Duchene, 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*, *72*(2), 518-536.
- Lepesheva, G. I., & Waterman, M. R. (2004). CYP51--the omnipotent P450. *Mol Cell Endocrinol*, *215*(1-2), 165-170. doi:10.1016/j.mce.2003.11.016
- Lujan, H. D., Mowatt, M. R., Byrd, L. G., & Nash, T. E. (1996). Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(15), 7628-7633.
- Lujan, H. D., Mowatt, M. R., & Nash, T. E. (1998). The molecular mechanisms of giardia encystation. *Parasitol Today*, *14*(11), 446-450.
- Marques, M. P., Takayanagui, O. M., & Lançote, V. L. (2002). Albendazole metabolism in patients with neurocysticercosis: antipyrine as a multifunctional marker drug of cytochrome P450. *Braz J Med Biol Res*, *35*(2), 261-269.
- 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*, 399(4), 654-658.
doi:10.1016/j.bbrc.2010.07.137
- Matukaitis, J. M. (1997). The emerging recognition of cryptosporidium as a health hazard. *J Community Health Nurs*, 14(3), 135-140. doi:10.1207/s15327655jchn1403_1
- Monis, P. T., Andrews, R. H., Mayrhofer, G., & Ey, P. L. (2003). Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect Genet Evol*, 3(1), 29-38.
- Morrison, H. G., McArthur, A. G., Gillin, F. D., Aley, S. B., Adam, R. D., Olsen, G. J., . . . Sogin, M. L. (2007). Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*, 317(5846), 1921-1926. doi:10.1126/science.1143837
- Muller, J., Schildknecht, P., & Muller, N. (2013). Metabolism of nitro drugs metronidazole and nitazoxanide in *Giardia lamblia*: characterization of a novel nitroreductase (GINR2). *J Antimicrob Chemother*, 68(8), 1781-1789. doi:10.1093/jac/dkt106
- Muller, J., Sterk, M., Hemphill, A., & Muller, N. (2007). Characterization of *Giardia lamblia* WB C6 clones resistant to nitazoxanide and to metronidazole. *J Antimicrob Chemother*, 60(2), 280-287. doi:10.1093/jac/dkm205
- Munro, A. W., Girvan, H. M., Mason, A. E., Dunford, A. J., & McLean, K. J. What makes a P450 tick? *Trends in Biochemical Sciences*, 38(3), 140-150.
doi:10.1016/j.tibs.2012.11.006
- Nash, T. E., Herrington, D. A., Losonsky, G. A., & Levine, M. M. (1987). Experimental human infections with *Giardia lamblia*. *J Infect Dis*, 156(6), 974-984.
- Nillius, D., Muller, J., & Muller, N. (2011). Nitroreductase (GINR1) increases susceptibility of *Giardia lamblia* and *Escherichia coli* to nitro drugs. *J Antimicrob Chemother*, 66(5), 1029-1035. doi:10.1093/jac/dkr029
- Nims, R. W., Syi, J. L., Wink, D. A., Nelson, V. C., Thomas, P. E., Jones, C. R., . . . Lubet, R. A. (1993). Hepatic cytochrome P450 2B-type induction by ethyl/phenyl-substituted congeners of phenobarbital in the rat. *Chem Res Toxicol*, 6(2), 180-187.
- Nino, C. A., Prucca, C. G., Chaparro, J., Lujan, H. D., & Wasserman, M. (2012). The ubiquitin-activating enzyme (E1) of the early-branching eukaryote *Giardia intestinalis* shows unusual proteolytic modifications and play important roles during encystation. *Acta Trop*, 123(1), 39-46. doi:10.1016/j.actatropica.2012.03.012
- Pal, D., Banerjee, S., Cui, J., Schwartz, A., Ghosh, S. K., & Samuelson, J. (2009). *Giardia*, *Entamoeba*, and *Trichomonas* enzymes activate metronidazole (nitroreductases) and inactivate metronidazole (nitroimidazole reductases). *Antimicrob Agents Chemother*, 53(2), 458-464. doi:10.1128/AAC.00909-08
- Park, J. H., Schofield, P. J., & Edwards, M. R. (1998). *Giardia intestinalis*: characterization of a NADP-dependent glutamate dehydrogenase. *Exp Parasitol*, 88(2), 131-138.
doi:10.1006/expr.1998.4199
- Paz-Maldonado, M. T., Arguello-Garcia, R., Cruz-Soto, M., Mendoza-Hernandez, G., & Ortega-Pierres, G. (2013). Proteomic and transcriptional analyses of genes differentially expressed in *Giardia duodenalis* clones resistant to albendazole. *Infect Genet Evol*, 15, 10-17. doi:10.1016/j.meegid.2012.08.021
- Perez-Rangel, A., Hernandez, J. M., Castillo-Romero, A., Yopez-Mulia, L., Castillo, R., Hernandez-Luis, F., . . . Leon-Avila, G. (2013). Albendazole and its derivative JVG9 induce encystation on *Giardia intestinalis* trophozoites. *Parasitol Res*, 112(9), 3251-3257. doi:10.1007/s00436-013-3521-1
- Perez, P. F., Minnaard, J., Rouvet, M., Knabenhans, C., Brassart, D., De Antoni, G. L., & Schiffrin, E. J. (2001). Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from

- Lactobacilli: an in vitro study. *Appl Environ Microbiol*, 67(11), 5037-5042. doi:10.1128/AEM.67.11.5037-5042.2001
- Prucca, C. G., Slavin, I., Quiroga, R., Elias, E. V., Rivero, F. D., Saura, A., . . . Lujan, H. D. (2008). Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature*, 456(7223), 750-754. doi:10.1038/nature07585
- Reynoldson, J. A., Behnke, J. M., Gracey, M., Horton, R. J., Spargo, R., Hopkins, R. M., . . . Thompson, R. C. (1998). Efficacy of albendazole against *Giardia* and hookworm in a remote Aboriginal community in the north of Western Australia. *Acta Trop*, 71(1), 27-44.
- Robertson, L. J., Hanevik, K., Escobedo, A. A., Morch, K., & Langeland, N. (2010). Giardiasis-- why do the symptoms sometimes never stop? *Trends Parasitol*, 26(2), 75-82. doi:10.1016/j.pt.2009.11.010
- Ryan, U., & Caccio, S. M. (2013). Zoonotic potential of *Giardia*. *Int J Parasitol*, 43(12-13), 943-956. doi:10.1016/j.ijpara.2013.06.001
- Shaik, S., Kumar, D., de Visser, S. P., Altun, A., & Thiel, W. (2005). Theoretical perspective on the structure and mechanism of cytochrome P450 enzymes. *Chem Rev*, 105(6), 2279-2328. doi:10.1021/cr030722j
- Singer, S. M., & Nash, T. E. (2000). The role of normal flora in *Giardia lamblia* infections in mice. *J Infect Dis*, 181(4), 1510-1512. doi:10.1086/315409
- Smith, N. C., Bryant, C., & Boreham, P. F. (1988). Possible roles for pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thiol-dependent peroxidase and reductase activities in resistance to nitroheterocyclic drugs in *Giardia intestinalis*. *Int J Parasitol*, 18(7), 991-997.
- Sogin, M. L., Gunderson, J. H., Elwood, H. J., Alonso, R. A., & Peattie, D. A. (1989). Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science*, 243(4887), 75-77.
- Spiller, R., & Garsed, K. (2009). Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 136(6), 1979-1988. doi:10.1053/j.gastro.2009.02.074
- Tavares, M. A., Palma, I. D., Medeiros, H. C., Guelfi, M., Santana, A. T., & Mingatto, F. E. (2015). Comparative effects of fipronil and its metabolites sulfone and desulfinyl on the isolated rat liver mitochondria. *Environ Toxicol Pharmacol*, 40(1), 206-214. doi:10.1016/j.etap.2015.06.013
- Tellez, A., Palm, D., Weiland, M., Aleman, J., Winiacka-Krusnell, J., Linder, E., & Svard, S. (2005). Secretory antibodies against *Giardia intestinalis* in lactating Nicaraguan women. *Parasite Immunol*, 27(5), 163-169. doi:10.1111/j.1365-3024.2005.00758.x
- Thompson, A. (2001). Human giardiasis: genotype-linked differences in clinical symptomatology. *Trends Parasitol*, 17(10), 465.
- Thompson, R. C. (2000). Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol*, 30(12-13), 1259-1267.
- Thompson, R. C., & Monis, P. T. (2004). Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol*, 58, 69-137. doi:10.1016/S0065-308X(04)58002-8
- 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*, 2(3), 303-308. doi:10.1089/mdr.1996.2.303
- Uzlikova, M., & Nohynkova, E. (2014). The effect of metronidazole on the cell cycle and DNA in metronidazole-susceptible and -resistant *Giardia* cell lines. *Mol Biochem Parasitol*, 198(2), 75-81. doi:10.1016/j.molbiopara.2015.01.005

- Visvesvara, G. S., Dickerson, J. W., & Healy, G. R. (1988). Variable infectivity of human-derived *Giardia lamblia* cysts for Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J Clin Microbiol*, *26*(5), 837-841.
- von Mentzer, A., Connor, T. R., Wieler, L. H., Semmler, T., Iguchi, A., Thomson, N. R., . . . Dougan, G. (2014). Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. *Nat Genet*, *46*(12), 1321-1326. doi:10.1038/ng.3145
- Williams, J. A., Hyland, R., Jones, B. C., Smith, D. A., Hurst, S., Goosen, T. C., . . . Ball, S. E. (2004). Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos*, *32*(11), 1201-1208. doi:10.1124/dmd.104.000794
- Xu, J., & Zhang, Y. (2010). How significant is a protein structure similarity with TM-score = 0.5? *Bioinformatics*, *26*(7), 889-895. doi:10.1093/bioinformatics/btq066
- Yang, Z. A., Pazdzior, R., Yee, J., & Rafferty, S. (2016). Reduction potential and heme-pocket polarity in low potential cytochrome b5 of *Giardia intestinalis*. *J Inorg Biochem*, *158*, 110-114. doi:10.1016/j.jinorgbio.2016.02.021
- Yoder, J. S., Gargano, J. W., Wallace, R. M., Beach, M. J., Centers for Disease, C., & Prevention. (2012). Giardiasis surveillance--United States, 2009-2010. *MMWR Surveill Summ*, *61*(5), 13-23.
- Yoshida, N., Tyler, K. M., & Llewellyn, M. S. (2011). Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. *Trends Parasitol*, *27*(10), 459-466. doi:10.1016/j.pt.2011.06.006
- Yoshida, Y., Aoyama, Y., Noshiro, M., & Gotoh, O. (2000). Sterol 14-demethylase P450 (CYP51) provides a breakthrough for the discussion on the evolution of cytochrome P450 gene superfamily. *Biochem Biophys Res Commun*, *273*(3), 799-804. doi:10.1006/bbrc.2000.3030
- Zand, R., Nelson, S. D., Slattery, J. T., Thummel, K. E., Kalthorn, T. F., Adams, S. P., & Wright, J. M. (1993). Inhibition and induction of cytochrome P4502E1-catalyzed oxidation by isoniazid in humans. *Clin Pharmacol Ther*, *54*(2), 142-149.
- Zhang, Y. Q., Wang, Z. Y., Lu, S. Q., Feng, M. L., Peng, J. F., & Wang, J. G. (1986). A familial infection of giardiasis. *Chin Med J (Engl)*, *99*(5), 417-419.