

Determinación *in vitro* de la susceptibilidad a la nitazoxanida de cuatro aislados de *Giardia duodenalis* obtenidos de diferentes huéspedes

Martha Ponce-Macotela*,# Josefina Gómez-Garduño,* Angélica González-Macié,**
Rafael Reynoso-Robles,** Vicente Anislado-Tolentino,** Mario N. Martínez-Gordillo.*

* Parasitología médica del Instituto Nacional de Pediatría. ** Microscopia electrónica del Instituto Nacional de Pediatría.
*** Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. # Becaria del CONACYT.

In vitro determination of the sensitivity to nitazoxanide of four *Giardia duodenalis* isolates from different hosts

RESUMEN

ABSTRACT

Background. In Mexico giardiasis is the most prevalent parasitic disease in children. Treatment with antiparasitics derived from: nitroimidazoles, benzimidazoles and nitrofurans have been used; but, some of them have undesirable side effects. Recently nitazoxanide (Ntz) was introduced in Mexico; however, there are few studies on *Giardia duodenalis* susceptibility to Ntz. **Objective.** To determine *G. duodenalis* sensitivity to Ntz and compare it to tinidazole (Tnz). **Material and methods.** Assays were performed in four *G. duodenalis* isolates: INP231087MM, INP210897-AXA1 obtained from humans infections, INP170693HG8, INP300693-CP5 from a cat and a dog, respectively. Half million trophozoites were exposed to different Ntz or Tnz concentrations in TYI-S-33, for 24 hours at 37° C. Trophozoite viability was tested by the colorimetric method of MTT-tetrazolium salts reduction to MTT-formazan. To analyze ultrastructural damage, control and experimental samples were processed by standard electron microscopy methods. Experiments were carried out, in a double blind in triplicate and repeated four times. Results were analyzed by variance analysis. **Results.** Susceptibility at 100% were in a Ntz concentration ranging from 1 µg to 7 µg and in a Tnz concentration ranging from 1 µg to 4 µg. There were significant differences when sensitivities to Ntz were compared between them ($P < 0.001$). The ultrastructural analysis showed changes in trophozoite volume, loss of characteristic shape and swelling. **Conclusions.** This is the first report of *G. duodenalis* susceptibility to Ntz performed in isolates from different hosts. *G. duodenalis* isolates were more susceptible to Tnz than Ntz.

Antecedentes. En México la giardiasis es la protozoosis intestinal más frecuente en los niños, para el tratamiento se utilizan los nitrofuranos, nitroimidazoles y benzimidazoles. Recientemente se introdujo un antiparasitario polivalente: la nitazoxanida (Ntz); del cual hay pocos estudios sobre su actividad anti-giardiasis. **Objetivo.** Determinar *in vitro* la sensibilidad de *G. duodenalis* a la nitazoxanida y compararla con el tinidazol (Tnz).

Material y métodos. La susceptibilidad se estudió en cuatro aislados axénicos de *G. duodenalis*: INP231087MM y INP210897-AXA1 (humanos), INP170693HG8 y INP300693-CP5 (gato y perro, respectivamente). Se expusieron 500,000 trofozoitos a diferentes concentraciones de Ntz o Tnz. La viabilidad se determinó por el método colorimétrico de la reducción de sales de tetrazolio (MTT) a MTT-formazán y los resultados se analizaron por ANOVA. Los cambios estructurales se determinaron por microscopia electrónica de transmisión. Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron cuatro veces en un diseño experimental ciego. **Resultados.** Para alcanzar el 100% de mortalidad (sensibilidad o susceptibilidad) se necesitó una concentración de 1 a 7 µg/mL de Ntz y de 1 a 4 µg/mL de Tnz. Cuando se comparó la susceptibilidad de los aislados a la Ntz se encontró que hubo diferencias significativas entre ellos ($P < 0.001$). Los fármacos produjeron aumento de volumen y menor electrodensidad del citoplasma y núcleos. **Conclusiones.** Este es el primer reporte de la sensibilidad, *in vitro*, de *G. duodenalis* a Ntz, en aislados de diferentes huéspedes. Se observó mayor susceptibilidad al Tnz que a la Ntz. Debido a la deformación de los trofozoitos, se sugiere que la Ntz induce modificaciones en la membrana y lisis celular.

Key words. *Giardia duodenalis*. Giardiasis. Treatments. Anti-giardiasics. Nitazoxanide. Tinidazole.

Palabras clave. *Giardia duodenalis*. Giardiasis. Tratamiento. Nitazoxanida. Tinidazol. Anti-giardiasicos.

ANTECEDENTES

En México la giardiosis es la protozoosis intestinal que se encuentra con más frecuencia en los niños;¹ puede cursar como una parasitosis asintomática o presentar cuadros con diarrea, dolor abdominal, hiporexia, náusea, vómito, síndrome de mala absorción intestinal, desnutrición y anemia.² Para el tratamiento se usan fármacos derivados de los nitroimidazoles, nitrofuranos y benzimidazoles.³ Sin embargo, algunos de estos antiparasitarios producen efectos secundarios indeseables: desde el malestar general⁴ hasta posibles daños cromosómicos.⁵ Además existe el riesgo de que se estén seleccionando cepas resistentes a los tratamientos tradicionales.^{6,7}

Recientemente se introdujo al mercado mexicano un nuevo antiparasitario, la nitazoxanida (Ntz);^{8,9} sobre este parasitocida polivalente hay pocos estudios.¹⁰ En este trabajo se reportan las concentraciones de Ntz necesarias para matar, *in vitro*, al 100 % de los trofozoítos de *Giardia duodenalis* procedentes de diferentes huéspedes.

MATERIAL Y MÉTODOS

La susceptibilidad se determinó en cuatro aislados axénicos de *G. duodenalis*: INP231087-MM, de un niño; INP210897-AXA-1, de un adulto y el INP170693-HG8, de un gato; los cuales se obtuvieron por el método de desenquistamiento *in vitro*.¹¹ El aislado INP300693-CP5, se obtuvo de un raspado del epitelio intestinal de un perro sacrificado; los trofozoítos se obtuvieron del duodeno y se resuspendieron en un frasco de cultivo de tejido que contenía medio TYI-S-33, complementado con 1 mg/mL de bilis bovina, 10% de suero fetal de bovino y antibióticos: gentamicina 20 µg/mL y ceftazidima 20 µg/mL. El frasco con trofozoítos se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Para eliminar restos del epitelio y moco, los trofozoítos adheridos a las paredes del frasco se lavaron tres veces con TYI-S-33 a 37 °C. Finalmente, el frasco con trofozoítos adheridos se llenó con medio fresco y se incubó a 37 °C.

La sal de Ntz fue obsequio del laboratorio Columbia y la de Tnz del laboratorio Grossman. Cada uno de los fármacos se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) y se esterilizó por filtración a través de una membrana de 0.22 µm. La concentración máxima de DMSO que se utilizó en cada uno de los ensayos fue menor al 0.5 %.

Se expuso a medio millón de trofozoítos a diferentes concentraciones de Ntz o Tnz (0.5, 1, 2, ...10 µg) en 1.5 mL del medio TYI-S-33 y se incubaron a 37 °C durante 24 horas; posteriormente, para eliminar restos del medio de cultivo y/o de los fármacos, se lavaron tres veces

con solución salina amortiguada con fosfatos (SSF). La viabilidad de los trofozoítos se determinó por el método colorimétrico de la reducción de las sales de tetrazolio (MTT: bromuro de (3[4,5 dimetil tiazol-2-il]) 2,5 difenil tetrazolio) a MTT-formazán.¹² Los trofozoítos lavados se resuspendieron en SSF, se les agregó 40 µg de MTT y 20 µg de metosulfato de fenazina (PMS) y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. El colorante sintetizado por los trofozoítos vivos, se extrajo y se solubilizó con isopropanol/HCl. La concentración del MTT-formazán se midió en un espectrofotómetro (Ultrospec III, Pharmacia) a 570 nm. Como controles se incluyeron: trofozoítos sin exposición a los fármacos, trofozoítos que crecieron en 0.5 % de DMSO y trofozoítos muertos por tres ciclos de congelación/ descongelación (c-d) en N₂ líquido. Los experimentos se desarrollaron por triplicado y se repitieron cuatro veces. Se siguió un diseño experimental ciego.

La sensibilidad (mortalidad o susceptibilidad) se calculó con la fórmula:

$$S = \frac{DO_{\text{vivos}} - DO_{\text{experimental}}}{DO_{\text{vivos}} - DO_{\text{muertos (c-d)}}$$

Los resultados se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA).

Para identificar cambios ultraestructurales, se fijaron muestras de los grupos control y experimental con glutaraldehído en amortiguador de fosfatos a pH = 7.2, se postfijaron con tetróxido de osmio, se deshidrataron e incluyeron en resina epóxica. Los cortes finos se contrastaron con acetato de uranilo-citrato de plomo y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss EM109.

RESULTADOS

El aislado CP5 obtenido por resección del duodeno se estableció después de diez días en el medio TYI-S-33 y se expandió.

Primero se determinó la influencia del DMSO sobre el crecimiento de los trofozoítos de *Giardia*. Se encontró que no hubo diferencias significativas ($p > 0.001$) en el crecimiento entre las poblaciones que se cultivaron con TYI-S-33 comparadas con aquellas que se sembraron con TYI-S-33 más el 0.5 % de DMSO.

Después se estudió el efecto de los antiparasitarios sobre los trofozoítos. Para conocer las concentraciones letales al 100 % contra los trofozoítos de los cuatro aislados; se transformaron los valores de concentración de la síntesis de formazán, expresados en unidades de densidad óptica (DO) con la fórmula de sensibilidad. Los resultados obtenidos se presentan en la gráfica de caja y bigote (Figura 1). Los trofozoítos más susceptibles (1-3 µg/mL) tanto a la Ntz como

al Tnz fueron los del aislado HG8 (gato). Por otro lado, los trofozoítos con mayor resistencia a la Ntz fueron los del aislado MM que requirieron de una concentración entre 2-7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para matar al 100 % de la población.

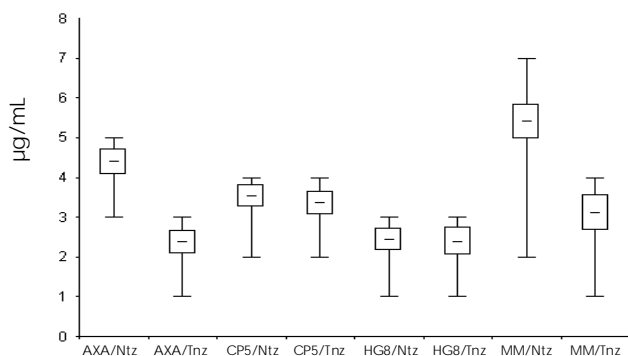


Figura 1. Gráfica de caja y bigote que muestra la comparación entre los intervalos de concentración de nitazoxanida (Ntz) y tinidazol (Tnz) para obtener el 100% de mortalidad en cuatro aislados de *Giardia duodenalis* obtenidos de diferentes huéspedes.

La ultraestructura de los trofozoítos del grupo sin tratamiento mostró la morfología típica: el disco suctor sin deformaciones, el citoplasma electrodens, la región dorsal con el complejo vacuolar y el glucocáliz íntegro (Figura 2A). Aunque los trofozoítos expuestos a la Ntz presentan el disco suctor íntegro, la membrana dorsal perdió su complejo vacuolar y hubo aumento de volumen, lo que dio a los trofozoítos una apariencia globosa, con el citoplasma y el nucleoplasma menos electrodensos y sin glucocáliz (Figura 2B). Los trofozoítos tratados con Tnz mostraron imágenes semejantes a las obtenidas con Ntz (no mostradas).

DISCUSIÓN

Este es el primer trabajo en el que se reporta la susceptibilidad de *G. duodenalis* a la nitazoxanida y es el primer estudio que incluye dos aislados axénicos de *Giardia* obtenidos de animales. La inserción del aislado CP5 es importante; porque, hasta donde sabemos, en el mundo solamente hay cuatro aislados de *G. duodenalis* obtenidos de perros y mantenidos en cultivo axénico,¹³ el aislado CP5 es el quinto aislado establecido *in vitro* y el primero que corresponde al grupo genético II del ensamblaje A (Ponce-Macotela, manuscrito en preparación).

Con el método colorimétrico de la reducción de las sales de tetrazolio se encontró que para matar al 100% de los trofozoítos fue necesario aplicar una mayor concentración de nitazoxanida (1 a 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que de tinidazol (1 a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El análisis estadístico mostró que no hubo diferencia significativa de la sensibilidad entre

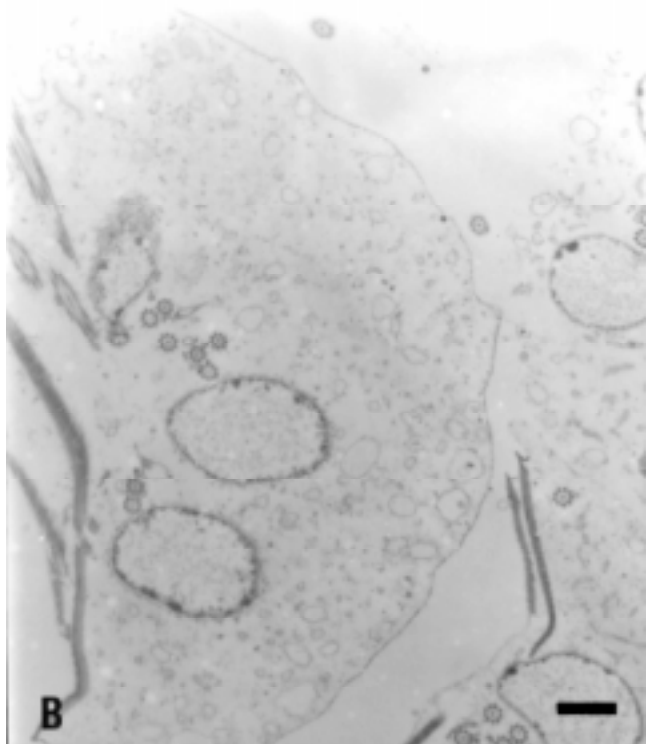
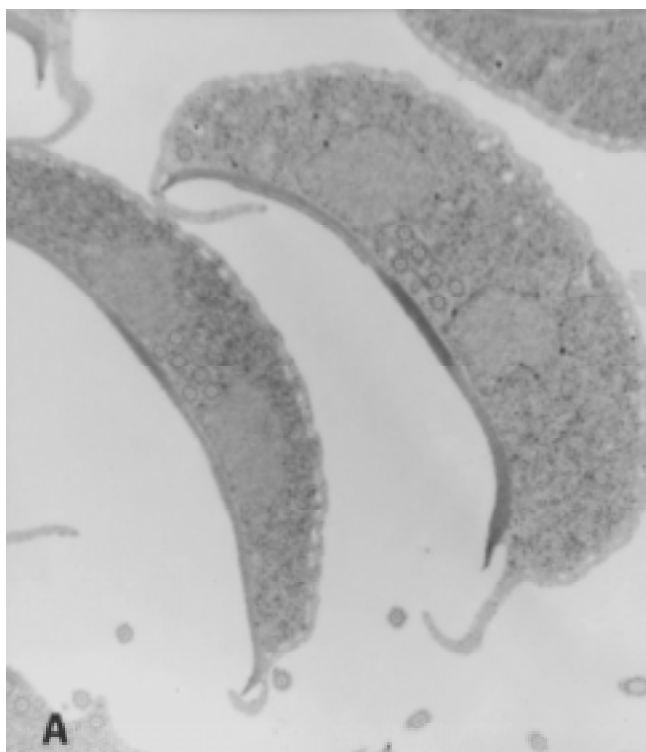


Figura 2. Micrografía electrónica de transmisión de trofozoítos de *Giardia duodenalis*. (A) Trofozoítos sin fármaco. (B) Trofozoito expuesto a la nitazoxanida, durante 24 horas en el medio TYI-S-33. Trofozoito globoso y con disminución de la electrodensidad tanto en el citoplasma como en los núcleos y pérdida de estructura. Escala de la barra = 1 μm .

Cuadro 1. Resumen del ANOVA de dos criterios para la nitazoxanida y tinidazol.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados		Cuadrados medios		Razón de varianza	
		Ntz	Tnz	Ntz	Tnz	Ntz	Tnz
Aislados	3	3360.4	249.9	1120.1	83.3	15.12	0.926
Concentración	7	77998.4	37965.7	11142.6	5423.6	150.30	60.300
Interacción	21	3139128.5	3373490.5	149482.3	160642.4	2019.30	1786.500
Error	352	26083.2	31651.7	74.0	889.9		
Total	383	3246570.7	3443357.8				
		$F_{0.05(3,352)} = 2.6;$		$F_{0.05(7,352)} = 2.01;$		$F_{0.05(21,352)} = 1.52$	

los cuatro aislados de *G. duodenalis* expuestos al tinidazol ($p > 0.001$), (Cuadro 1). Sin embargo, en los aislados de *G. duodenalis* tratados con nitazoxanida hubo una respuesta heterogénea que presentó diferencias significativas entre sí ($p < 0.001$). Las diferencias en la susceptibilidad de los trofozoítos de cada aislado, podrían explicar, en parte, los mecanismos de la selección de aquellos organismos que presentan rasgos de resistencia y la eliminación de aquellos que no los tienen. Este proceso favorecería la permanencia y expansión de las poblaciones resistentes.

Por otro lado, los trofozoítos de *G. duodenalis* del aislado HG8, obtenido de un gato, fueron los más susceptibles a la nitazoxanida (1-3 $\mu\text{g/mL}$), ya que las concentraciones del parasiticida encontrados para los aislados AXA y MM de origen humano fueron de 3 - 5 $\mu\text{g/mL}$ y 2 - 7 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Ignoramos el significado de estas diferencias, tal vez, reflejan la interacción de los trofozoítos de *Giardia*, obtenidos de humanos, con otros antimicrobianos; los que quizá posibilitaron la expresión de genes *mdr*⁶ (genes de resistencia a las drogas). Por otro lado, creemos que la mayor susceptibilidad de los trofozoítos de *Giardia* obtenidos de animales a los antiparasitarios estudiados, probablemente, se debe a que en nuestro medio, los animales tienen menos posibilidades de interactuar con otros antibióticos, ya que en general las mascotas reciben menos tratamientos antimicrobianos que los humanos.

A nivel ultraestructural el aumento del volumen observado en los trofozoítos expuestos a la nitazoxanida y tinidazol, probablemente indica que los fármacos inducen modificaciones en la permeabilidad de membrana. Es posible que el primer cambio sea la alteración de la permeabilidad selectiva de las membranas, lo que permitiría el paso del agua extracelular, originándose trofozoítos globosos. Sin embargo, podría considerarse que esta morfología se origina debido a la acción de los antiparasitarios en otros blancos. Se sabe que los derivados de los

2-nitroimidazoles rompen la estructura helicoidal del DNA, producen fragmentación de las hebras y el consiguiente deterioro de su función de matriz en la replicación y alteran el control de la transcripción génica.¹⁴ Si consideramos que la nitazoxanida actúa de manera semejante, después de un tiempo de exposición de los trofozoítos al fármaco encontraríamos alteraciones de transcripción, traducción y desórdenes metabólicos que finalizarían en lisis celular.

CONCLUSIONES

Este es el primer reporte en el que se determina la sensibilidad de *G. duodenalis* a la nitazoxanida, en aislados obtenidos de diferentes huéspedes.

Los resultados mostraron que los aislados de *Giardia* fueron más susceptibles al tinidazol que a la nitazoxanida.

El aislado HG8 procedente de un gato fue más sensible a la nitazoxanida que los aislados obtenidos de humanos.

Debido al aumento de volumen de los trofozoítos, se sugiere que la nitazoxanida induce modificaciones en la permeabilidad de la membrana que producen lisis celular.

REFERENCIAS

1. Tay ZI, Gutiérrez QM, Alvarez T, Sánchez VJT, García YY, Fernández PAM. Frecuencia de las parasitosis en cuatro escuelas de Morelia, Michoacán. *Rev Fac Med UNAM* 1996; 39: 41-3.
2. Curtale F, Nabil M, El-Wakeel A, Shamy MY. Anaemia and intestinal parasitic infections among school age children in Behera Governorate, Egypt. *J Trop Pediatr* 1998; 44: 323-8.
3. Frayha GJ, Smyth JD, Gobert GJ, Savel J. The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. *Gen Pharmac* 1997; 28: 273-99.
4. Alvarez-Chacón R, Wong-Chio M, Cob-Sosa CE. Eficacia de la furazolidona, metronidazol y secnidazol en el tratamiento de la giardiasis en niños. *Comp Inv Clin Lat Mex* 1991; 11: 41-4.
5. Mitelman F, Hartley-Asp B, Ursing B. Chromosome aberrations and metronidazole. *Lancet* 1976; 9: 802.

6. Townson SM, Boreham PFL, Upcroft P, Upcroft JA. Resistance to the nitroheterocyclic drugs. *Acta Trop* 1994; 56: 173-94.
7. Upcroft P. Multiple drug resistance in pathogenic protozoa. *Acta Trop* 1994; 56: 195-12.
8. Rossignol JF, Maisonneuve H. Nitazoxanide in the treatment of *Taenia saginata* and *Hymenolepis nana*. *Am J Trop Med Hyg* 1984; 33: 511-2 .
9. Romero CR, Robert GL, Muñoz GMR, Geyne CA. Nitazoxanide for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in Mexico. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1997; 91: 701-3.
10. Rodríguez-García R, Rodríguez-Guzmán LM, Cruz CAH. Efectividad y seguridad del mebendazol comparado con la nitazoxanida en el tratamiento de *Giardia lamblia* en niños. *Rev Gastroenterol Mex* 1999; 64: 122-6.
11. Ponce-Macotela M, Martínez-Gordillo MN, Alvarez-Chacón R. Obtención y cultivo de *Giardia spp*. *Infectología* 1990; 10: 91-5.
12. Ponce-Macotela M, Navarro-Alegria I, Martínez-Gordillo MN, Alvarez-Chacón R. Efecto anti-giardiasico *in vitro* de 14 extractos de plantas. *Rev Invest Clin* 1994; 46: 43-7.
13. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Mackrill J, Kulda J, Issac-Renton JL et al. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. *Parasitol* 1998; 116: 7-19.
14. Knight RC, Skolimowski MI, Edwards DI. The interaction of reduced metronidazole with DNA. *Bioch Parasitol* 1978; 27: 2089-3.

Reimpresos:

Martha Ponce Macotela

Parasitología médica del Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur No. 3700-C
04530 México, D.F.
Tel: 5606 0002 Ext. 454
Fax. 5606 9455
Correo electrónico: macotelam@yahoo.com

*Recibido el 24 de enero de 2000.
Aceptado el 30 de agosto de 2000.*