

DOI: <https://doi.org/10.24275/rtediq.11.101>

Análisis de compuestos análogos a Nitazoxanida: efecto giardicida y alteraciones en la expresión génica de *Giardia lamblia*

Morales-Luna Laura E.^{1,2}, Vázquez-Bautista Montserrat^{1,3}, Hernández-Ochoa Beatriz⁴, Navarrete-Vázquez Gabriel⁵, Martínez-Rosas Víctor⁶, Gómez-Manzo Saúl^{1*}

¹Laboratorio de Bioquímica Genética, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, Ciudad de México 04530, México.

²Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México


³Programa de Posgrado en Biomedicina y Biotecnología Molecular, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, C.P. 11340, México.

⁴Laboratorio de Inmunoquímica, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Secretaría de Salud, Ciudad de México, C.P. 06720, México.

⁵Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, C.P. 62209, México

⁶Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Milpa Alta, Tecnológico Nacional de México, Milpa Alta, Ciudad de México, C.P. 12300, México.

*Autor para correspondencia: saulmanzo@ciencias.unam.mx

ORCID : 0000-0003-2095-9182

Recibido:

25/abril/2025

Aceptado:

15/diciembre/2025

Palabras clave:

Giardiasis,
compuestos FLP,
expresión génica

Keywords:

Giardiasis,
FLP compounds,
gene expression

RESUMEN

La giardiasis, causada por el parásito *Giardia lamblia*, representa un problema de salud pública a nivel mundial, especialmente en países en desarrollo. El tratamiento habitual es el uso de nitroimidazoles, los cuales, han perdido eficacia debido a un aumento de cepas resistentes. En este estudio se evaluaron cinco compuestos análogos a la nitazoxanida, los cuales demostraron una potente actividad anti-giardiasis así como una baja toxicidad en células humanas. Además, se evaluaron los efectos en la expresión de genes clave del metabolismo y estructura del parásito, observándose alteraciones significativas. Las herramientas moleculares y computacionales utilizadas permitieron predecir un perfil farmacológico favorable. Estos resultados abren nuevas posibilidades terapéuticas contra cepas resistentes y refuerzan la importancia de buscar alternativas innovadoras frente a enfermedades desatendidas como la giardiasis.

ABSTRACT

Giardiasis, caused by the parasite *Giardia lamblia*, is a public health concern, particularly in developing countries. Its standard treatment with nitroimidazoles has become less effective due to emerging drug-resistant strains. In this study, five nitazoxanide analogues were evaluated, showing strong anti-giardial activity and low toxicity in human cell lines. Their effects on key metabolic and structural genes of the parasite were also analyzed, revealing significant alterations. Computational and molecular tools confirmed a favorable pharmacological profile for these compounds. These findings highlight the potential of these new molecules as therapeutic alternatives against resistant strains and reinforce the importance of innovative strategies for tackling neglected diseases such as giardiasis.

Introducción

La giardiasis es una enfermedad intestinal ocasionada por el parásito *Giardia lamblia*, generalmente relacionada con la enfermedad del viajero (Mørch y Hanevik, 2020). Presenta elevados índices de morbilidad en países en vías de desarrollo, con una prevalencia estimada entre el 30% y el 60%. Los grupos poblacionales más susceptibles comprenden a niños en edad preescolar, individuos inmunocomprometidos y habitantes de zonas rurales. Estos dos últimos grupos muestran una fuerte correlación con prácticas inadecuadas de higiene personal y comunitaria, así como con la carencia de infraestructura sanitaria básica, incluyendo sistemas de alcantarillado, manejo adecuado de aguas residuales, condiciones de hacinamiento y deficiencias en la educación sanitaria. (Fletcher et al., 2012; Leung et al., 2019; Feng et al., 2011).

Debido a que la diseminación de la giardiasis se ha asociado con la presencia de agua contaminada, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha incluido a la enfermedad dentro de la iniciativa de enfermedades desatendida y asociadas con la calidad del agua (Rogawski et al., 2017; Cernikova et al., 2018, Efstratiou et al., 2017).

La giardiasis puede manifestarse clínicamente de forma diversa, presentando síntomas como vómitos, distensión y dolor abdominal, así como diarrea aguda o crónica. En casos persistentes, puede ocasionar pérdida de peso significativa e incluso ha sido asociada con el desarrollo de síndrome de malabsorción (Halliez et al., 2013). Los cuadros agudos se caracterizan por la presencia de diarrea acuosa o pastosa, esteatorrea, dolor epigástrico, pérdida de peso, deshidratación y meteorismo. En los casos crónicos, la alteración de la absorción intestinal compromete la asimilación de grasas, así como de micronutrientes esenciales como las vitaminas A y B12, ácido fólico y lactosa (Adam, 2021).

El tratamiento farmacológico de la giardiasis se basa en la administración de nitroimidazoles, entre los que se incluyen el metronidazol, tinidazol, secnidazol y ornidazol (Liu et al., 1996; Leung et al., 2019). El metronidazol es un agente antimicrobiano de amplio espectro, con actividad frente a bacterias anaerobias y protozoos. Actúa como un profármaco que penetra en el parásito y se activa intracelularmente mediante su metabolismo. En este proceso, su grupo 5-nitro es reducido por enzimas nitroreductasas, entre las que destaca la piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR), lo que da lugar a la formación de un radical nitro tóxico.

Esta molécula activa se une al ADN del parásito, provocando daños estructurales que inducen la apoptosis celular (Adam, 2001; Adam, 2021; Argüello-García et al., 2020).

Se han reportado efectos adversos asociados a los tratamientos indicados para la giardiasis. Entre ellos destaca la encefalopatía inducida por metronidazol, la cual puede manifestarse con síntomas como cefaleas, pérdida de reflejos, entre otros (Sorensen et al., 2018).

Estos efectos secundarios no se presentan en la totalidad de los pacientes tratados, aunque se encuentran entre los más recurrentemente documentados en la literatura científica.

La aparición cada vez más frecuente de cepas de *Giardia lamblia* resistentes a los fármacos anti-giardiasis ha sido ampliamente documentada. Esta resistencia se encuentra asociada a mutaciones en rutas metabólicas clave del parásito, así como a su capacidad para activar mecanismos de evasión, como la formación de quistes y la modificación de proteínas esenciales involucradas en las vías metabólicas diana (Carter et al., 2018; Leitsch et al., 2016; Loderstädt et al., 2021; Argüello-García et al., 2020).

Este fenómeno resalta la necesidad urgente de profundizar en los mecanismos moleculares responsables de la resistencia y desarrollar nuevas alternativas terapéuticas. Por lo que la búsqueda de nuevos fármacos es de suma importancia. En este contexto, la identificación de nuevas moléculas activas o combinaciones farmacológicas capaces de superar la resistencia constituye una prioridad en la investigación biomédica. El estudio de rutas metabólicas específicas del parásito, así como de sus mecanismos de supervivencia y virulencia, representa una vía prometedora para el diseño de terapias dirigidas. Además, el uso de herramientas avanzadas, como el cribado de compuestos bioactivos, la biología estructural y la edición genética, está acelerando la identificación de nuevos blancos terapéuticos potenciales.

Previamente, nuestro grupo de investigación evaluó moléculas inhibitoras de la enzima fusionada G6PD::6PGL, entre ellas CNZ-7, CNZ-8 y FLP-2, que demostró su efecto selectivo sobre células de trofozoítos de *Giardia lamblia*. En este estudio, reportamos dos nuevas moléculas con potencial anti-giardiasis: FLP-6 y FLP-8. Además, evaluamos la expresión génica para determinar las alteraciones en los trofozoítos tratados con los cinco compuestos analizados.

Mediante análisis computacionales, confirmamos que los compuestos cumplen con los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos requeridos. Además, mediante ensayos de citotoxicidad se demostró que los compuestos tienden a ser selectivos a las células de *G. lamblia* al carecer de efectos citotóxicos en líneas celulares humanas.

Metodología

Evaluación de moléculas con potencial efecto giardicida en cultivos de *Giardia lamblia*

Se realizó la evaluación del efecto de las moléculas CNZ-7, CNZ-8, FLP-2, FLP-6 y FLP-8 en cultivos de trofozoítos de *Giardia lamblia*. El ensayo se realizó en la cepa ATCC 30957 crecida en medio TYI-S-33 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibiótico. El pre-cultivo se realizó en tubos de borosilicato de 16x150 mm con medio, se inoculó con 2×10^5 trofozoítos incubado a 37°C durante 48 h. Para la recuperación de los trofozoítos el vial se incubó en baño de hielo durante 8 minutos y se centrifugó 6 min a $805 \times g$, el botón celular se resuspendió en 1 mL de tampón fosfato salino (PBS) y se contabilizó el número de trofozoítos colocando concentración 1:1 de cultivo celular y colorante azul de tripan (2.5 g/L), posteriormente se tomó una gota homogénea de la mezcla, se colocó en la cámara de Neubauer y se realizó el conteo de células totales.

Determinación de IC_{50} de los compuestos seleccionados

Los compuestos CNZ-7, CNZ-8, FLP-2, FLP-6 y FLP-8 inhibieron el crecimiento del cultivo del parásito *G. lamblia* en porcentaje mayor al 98% a 25 μM , por lo que se determinó el valor de IC_{50} para realizar los ensayos posteriores. La IC_{50} es definida como la concentración de compuesto a la cual se inhibe el 50% de la viabilidad de los cultivos de *G. lamblia*. Se realizaron curvas con concentraciones de 0-50 μM de cada compuesto. El ensayo se realizó colocando 15×10^4 células en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL con medio suplementado y diferentes concentraciones del compuesto (0-50 μM). El control negativo se realizó bajo las mismas condiciones sin compuesto y como control positivo se utilizaron los fármacos nitazoxanida (NTZ) y metronidazol (MTZ). Las muestras se incubaron durante 48 h a 37°C. Al término de la incubación se realizó el conteo de viabilidad celular mediante la técnica de azul tripan. El cálculo de viabilidad se realizó siguiendo la fórmula $nv/(nv+nm)$ donde nv son las células vivas y nm son las células muertas, el valor de viabilidad obtenido se expresó en porcentaje.

Se determinaron los porcentajes de viabilidad del cultivo para cada concentración de compuesto y utilizando el servidor en línea IC_{50} Calculator (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>), se determinó el valor de IC_{50} de cada compuesto.

Evaluación del efecto citotóxico de los compuestos anti-giardíacos

El ensayo de citotoxicidad se realizó con la finalidad de evaluar el efecto de los compuestos seleccionados en células humanas, se utilizaron células de colon debido a que es una estirpe celular similar al del intestino, microambiente donde coloniza *G. lamblia*. El ensayo se realizó utilizando las líneas celulares humanas Caco-2 (ATCC HTB-37) y HT29 (ATCC HHTB-38), la viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de XTT. Se preparó una suspensión celular de 2×10^4 células/mL en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con suero bovino fetal inactivado al 10% y antibiótico (penicilina/estreptomicina al 1%, 5000 U/mL, en volumen de 100 μL). La suspensión se añadió en una placa de 96 pozos. Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C con atmósfera de 5% de CO_2 . A continuación, el medio de cada pozo se reemplazó con 100 μL de medio con compuestos (CNZ-7, CNZ-8, FLP-2, FLP-6, FLP-8) en concentraciones de 250, 125, 62, 32, 15, 7 y 3 μM . Se incubó durante 48 h a 37°C con atmósfera de 5% de CO_2 , posteriormente se determinó la viabilidad de las células siguiendo los siguientes pasos. El medio de cada pozo se reemplazó con 100 μL de medio fresco y se añadieron 50 μL de mezcla de marcado XTT por pozo, la reacción se incubó durante cuatro horas a 37°C y 5% de CO_2 . Terminada la incubación se midió la absorbancia de las muestras en la placa a 450 nm. Cada compuesto se ensayó por triplicado a través de tres experimentos independientes. Los valores de concentración citotóxica media (CC_{50}), concentración a la cual se tiene el 50% de viabilidad celular, se determinaron utilizando la función de regresión no lineal.

Evaluación del efecto de compuestos sobre los niveles de expresión de genes de *Giardia lamblia* mediante RT-qPCR cuantitativa

Para determinar las alteraciones en el metabolismo y los procesos celulares del parásito inducidas por los compuestos, se evaluaron los niveles de expresión de diversos genes que codifican proteínas metabólicas, estructurales y de respuesta al estrés oxidativo. Los genes evaluados se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1. Genes analizados en este estudio.

Gen	Gen Nombre	Longitud (pb)	Función	Nº Acceso
PFK	Fosfofructocinas	1635	Transferasa en glucólisis	XM_001707455.1
TPI	Triosa fosfato isomerasa	764	Oxidoreductasa en glucólisis	XM_001706778
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato	1224	Oxidoreductasa en glucólisis	XM_001703983
PK	Piruvato cinasa	1662	Oxidoreductasa en glucólisis	XM_001709477.1
PPDK	Piruvato fosfatodicinasas	2655	Oxidoreductasa en glucólisis	XM_001705520.1
ALDO	aldolasa	972	Oxidoreductasa en glucólisis	XM_001709998
G6PD	Glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa	2229	Oxidoreductasa en PPP	XM_001704389.1
6PGDH	6-Fosfogluconatodeshidrogenasa	1416	Oxidoreductasa en PPP	XM_001704391.1
TKT	Transacetolasa	2160	Transferasa en PPP	XM_001704562.1
NADHox	NADH oxidasa	1377	Enzima desintoxicante de O ₂	XM_001707922
PFOR	Piruvato oxidoreductasa	3762	Oxidoreductasa	XM_001708652.1
GIA	Giardina	1091	Proteína estructural del citoesqueleto	AF331827
ACT	Actina	1128	Proteína estructural del citoesqueleto	AF331826
VSP	Proteína variant de superficie	702	Proteína de membrana	U89152

Cultivo, extracción y síntesis de cDNA

Se creció la cepa ATCC 30957 de *G. lamblia* siguiendo los parámetros de cultivo previamente establecidos. Los tratamientos se realizaron con 1x10⁵ trofozoítos, se incubaron 48 horas a 37°C en presencia de la IC₅₀ determinada para cada compuesto. Posteriormente se extrajo el RNA total siguiendo la técnica de TRIZOL®. La evaluación de integridad de RNA y síntesis de cDNA se realizó según lo reportado por Gutiérrez-Cardona et al., (2024).

Evaluación de niveles de expresión

Para determinar los niveles de expresión de los genes: *fosfofructocinasa*, *piruvato cinasa*, *glucosa-6-fosfato deshidrogenasa*::*6-fosfogluconolactonasa*, *6-fosfogluconato deshidrogenasa*, *transacetolasa*, se realizó el diseño de oligonucleótidos específicos para amplificar cada gen.

El diseño de los oligonucleótidos se realizó tomando en cuenta las secuencias génicas depositadas en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) y se siguieron los siguientes criterios para el diseño: longitud de 18-20 pb, tm 61°C, G/C -40%, producto de amplicón entre 80 y 200 pb (Tabla 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para evaluación de los niveles de expresión mediante RT-qPCR.

Gen	Secuencia de Primers	Tamaño amplicón
δ-GIA Giardina (Marcial-Quino et al., 2016)	Fw 5' AGGACGACCAGGAGAGAA -3' Rv 5' ACGGGTAAAGCACAATTCA -3'	74
ACT, Actina (Marcial-Quino et al., 2016)	Fw 5' TTGCCGTACCTGCCTTCTAT-3' Rv 5' GCCCGGAAGCTGAGAGAGC-3'	60
VSP, Proteína variable de superficie (Marcial-Quino et al., 2016)	Fw 5' GCGAAAGTGATAGCAATGGG-3' Rv 5' TGAGGTAACAGAGGACGGAGC-3'	60
P-FOR, Piruvato Ferredoxin-oxidoreductasa (Begaydarova R. et al., 2015)	Fw 5' CTACGACATGACTTTGCTG-3' Rv 5' CCCATCTTCTGCTTGAC-3'	180
NADH, oxidasa (Marcial-Quino et al., 2016)	Fw 5' GCACCATATGGCTTCAACGG-3' Rv 5' CAGGCTGTCCGTGTCATTA-3'	98
ALD, Aldolasa (Marcial-Quino et al., 2016)	Fw 5' GAGTCCGTGAAGATGGCGA-3' Rv 5' GTCCCAAGTTCAGCCTCCAC-3'	149
TPI, Triosa fosfato isomerasa (Marcial-Quino et al., 2016)	Fw 5' AGGAGCTCGAGAGTCCAA-3' Rv 5' ACACGGGCTCGTAAGCAAT-3'	60
GAPDH, Gliceraldehído 3-fosfatos-deshidrogenasa (Marcial-Quino et al., 2016)	Fw 5' CATGGAGCGTGCCTACTT-3' Rv 5' CACTCCAAGACCACATCC-3'	237
PPDK, Piruvato fosfato dicinasas (Marcial-Quino et al., 2016)	Fw 5' TTGAAACACAGGCGATGAC-3' Rv 5' TCATCATAGCAGCCTTCCA-3'	196
G6PD, Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	Fw 5' CTACCTTACAAGGACAC-3' Rv 5' ATACCGTCTTAATACGA-3'	87
6PGL, 6-Fosfogluconolactonasa	Fw 5' TAGGGCAGCAATTCTGGG-3' Rv 5' TTCCCACTCTCACCAGCA-3'	83
6PDH, 6-Fosfogluconato deshidrogenasa	Fw 5' CTCGACATGATCCAGACTG-3' Rv 5' TCATAGGTGTGAGCTCCAA-3'	80
TKT, Transacetolasa	Fw 5' AAGATCACCATACACGGC-3' Rv 5' ACGGGATAGGCATACGATA-3'	96
PFK, Fosfofructocinasa	Fw 5' ATCTCTCAGATTGAAACG-3' Rv 5' AGTGATAGAGCGGAGTAA-3'	97
PK, Piruvato cinasa	Fw 5' AGGTGTGGATAAGAATCA-3' Rv 5' GATCATTCTGCTATGAC -3'	97

Además, para determinar los niveles de expresión de los genes: *proteína estructural de superficie, giardina, actina, piruvato ferredoxin-oxidoreductasa, nadh oxidasa, triosa fosfato isomerasa, gliceraldehído 3-fosfato-deshidrogenasa y aldolasa* (Tabla 2), se utilizaron los primers previamente reportados (Marcial-Quino et al., 2016; Begaydarova et al., 2015).

Para determinar los niveles de expresión se utilizaron 100 ng de cDNA del control y de los tratamientos con los compuestos CNZ-7, CNZ-8, FLP-2, FLP-6, FLP-8 y NTZ. Se utilizó el sistema kit Fast SYBR® Green Master Mix. Como control negativo se analizó la expresión de los reactivos en ausencia de cDNA para comprobar la ausencia de ADN contaminante. Los ciclos de amplificación se realizaron en el equipo de PCR tiempo real, bajo las siguientes condiciones: 95 °C durante 30 s, 40 ciclos de 95 °C por 3 s y 61 °C durante 30 s. 95 °C durante 3 s y 60 °C durante 30 s.

Se realizó la normalización utilizando los valores medios geométricos derivados del umbral del ciclo (Ct) y se obtuvieron valores de expresión relativos a todos los genes propuestos por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak et al., 2001). Se realizaron 3 réplicas del análisis de cada reacción para los genes evaluados.

Para medir la expresión se tomó al gen *Aldolasa* de *G. lamblia* como gen de referencia, el cual previamente fue reportado por Marcial-Quino et al. (2016) como un gen de referencia en el parásito. Los valores de expresión relativa obtenidas se graficaron y evaluaron los efectos causados por los compuestos en los procesos celulares en el parásito *G. lamblia*.

Evaluación de parámetros farmacocinéticos y fisicoquímicos de los compuestos anti-giardíacos seleccionados

Para evaluar las moléculas como potenciales agentes terapéuticos se realizó la determinación de los parámetros fisicoquímicos de Lipinski y farmacobiológicos ADMET, los cuales se calcularon mediante el uso de servidores computacionales; en los cuales se utilizó la notación SMILE de los compuestos seleccionados. Los parámetros fisicoquímicos se calcularon utilizando el servidor en línea Chemicalize (<https://chemicalize.com/app/calculation>) y los parámetros ADMET se evaluaron en el software libre ADMETlab 2.0. (<https://admetmesh.scbdd.com/>).

Actividad giardicida de compuestos seleccionados en una cepa resistente a nitazoxanida

Para evaluar el efecto de los compuestos CNZ-7, CNZ-8, FLP-2, FLP-6 y FLP-8 en una cepa de *G. lamblia* resistente a fármacos, se realizó un ensayo para determinar los valores de IC₅₀ en una cepa resistente a NTZ, aislada de un paciente (Reyes-Vivas et al., 2016).

Se utilizó un precultivo en confluencia como punto de partida y se realizó una curva dosis respuesta utilizando una concentración inicial del compuesto de 25 µM en un volumen final de 1.5 mL de medio TYI-S-33, seguida de diluciones seriadas del compuesto. Cada tratamiento se inoculó con 15×10^4 trofozoítos y se incubó durante 48 h a 37 °C.

Al final de la incubación, se determinó el número de trofozoítos mediante el ensayo de azul tripán y conteo en cámara de Neubauer. El porcentaje de viabilidad a cada concentración del compuesto se calculó utilizando el control negativo como referencia.

Resultados y Discusión

Evaluación de moléculas con potencial efecto giardicida en cultivos de *Giardia lamblia*

Previamente nuestro grupo de trabajo identificó 3 moléculas inhibitoras de la actividad de la enzima G6PD::6PGL del parásito *G. lamblia* (Figura 1), los compuestos CNZ-7, CNZ-8 y FLP-2 (Morales-Luna et al., 2022).

Por lo que se evaluó el efecto de los compuestos en la viabilidad del parásito, además, se evaluaron dos compuestos, nombrados, FLP-6 y FLP-8 no inhibitoras de la enzima, que mostraron inhibición del cultivo a concentración de 25 µM.

Los 5 compuestos comparten la estructura del nitrotiazol compuesto por el anillo de tiazol y el grupo NO₂ unido al anillo, el cual es relevante ya que se le atribuye su actividad antimicrobiana y antiparasitaria (Navarrete-Vázquez et al., 2015).

Además, contienen un grupo amida que es el grupo que une al anillo con el resto de los grupos de las moléculas.



Figura 1. Estructuras químicas de los compuestos CNZ-7, CNZ-8 y FLP-2, inhibidores de la enzima G6PD, y FLP-6 y FLP-8, inhibidores de la viabilidad de los cultivos de *G. lamblia*. Los cinco compuestos son análogos de la nitazoxanida. La región estructural compartida por los compuestos comprende el anillo de tiazol unido a un grupo nitro, seguido de los sustituyentes urea o amida.

Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de los compuestos seleccionados en la viabilidad del cultivo de trofozoítos de *G. lamblia*, cepa ATCC 30957 después de 48 horas de incubación a 37°C. Se observó una relación dosis-dependiente, donde la viabilidad del cultivo disminuyó a concentraciones más altas de los compuestos (Figura 2) y se comparó con el efecto de los fármacos nitazoxanida (NTZ) y metronidazol (MTZ). A partir de los valores de viabilidad calculados para cada compuesto, se determinó el valor de IC₅₀ utilizando el software IC50 Calculator.

Los resultados obtenidos, Tabla 3, mostraron que el compuesto FLP-2, fue el inhibidor de la G6PD::6PGL que presentó el valor de IC₅₀ menor de los tres inhibidores, con un valor de 3.6 μM, el cual es un valor similar al calculado para los controles NTZ y MTZ con 3.4 μM y 4.3 μM respectivamente, este compuesto podría continuar evaluándose ya que podría ser utilizado como una alternativa para el tratamiento en pacientes que presentan giardiasis ocasionada por una cepa resistente, de igual forma los dos compuestos restantes mostraron valores bajos con respecto a los reportados por otros equipos de investigación (Auriostigue-Bautista et al., 2022; Rufino-González et al., 2019; Hernández-Ochoa et al., 2017).

El compuesto CNZ-7 presentó valor 5.2 μM y CNZ-8 11.1 μM. Por otra parte, los compuestos FLP-6 y FLP-8 fueron los que presentaron los valores de IC₅₀ más bajos con respecto a los 5 compuestos evaluados, con valores de 0.28 μM y 0.1 μM respectivamente. Lo que indica que podrían ser compuestos con mayor actividad giardicida ya que presentan mayor potencia que los fármacos, FLP-6 presentó potencia relativa 12 veces mayor que NTZ y 15 veces mayor que MTZ, por otro lado, FLP-8 presentó 34 y 43 veces mayor potencia que NTZ y MTZ respectivamente.

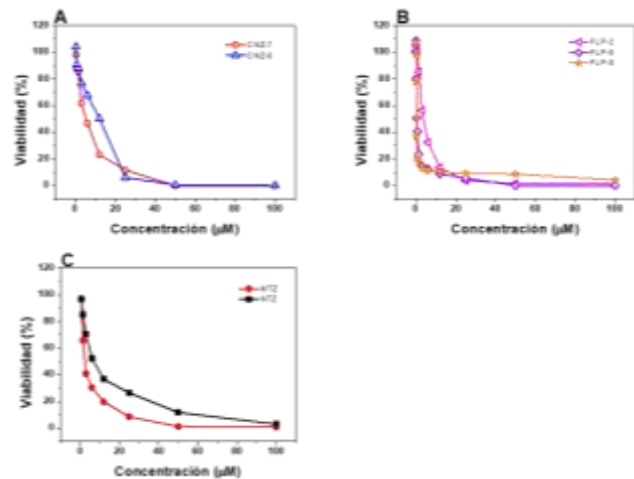


Figura 2. Curvas de crecimiento de cultivo de *G. lamblia* en presencia de los compuestos **A.** inhibidores de la enzima *GL-G6PD::6PGL*: CNZ-7, CNZ-8. **B.** inhibidores del cultivo de trofozoítos de *G. lamblia* FLP-2, FLP-6, FLP-8 y **C.** de los controles MTZ y NTZ. Los valores representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes, con errores estándar inferiores al 5 %.

Evaluación de citotoxicidad de los compuestos químicos en cultivos celulares CaCo-2 y HT29

Con la finalidad de evaluar el efecto de las moléculas inhibitoras en células humanas, se realizó el análisis de citotoxicidad utilizando dos líneas celulares humanas, las cuales pertenecen a estirpes celulares que se encuentran presentes en el microambiente donde se aloja el parásito *G. lamblia*. Se determinó el efecto dependiente de la concentración de los compuestos CNZ-7, CNZ-8, FLP-2, FLP-6 y FLP-8, en la viabilidad de las células Caco-2 y HT29, y se calcularon los valores de CC₅₀.

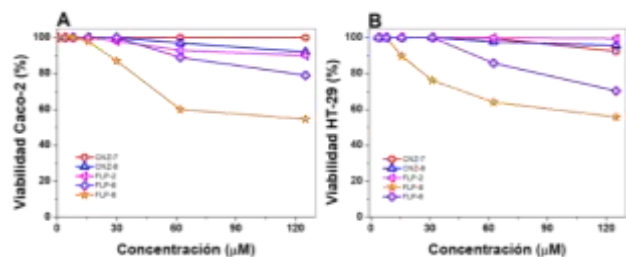


Figura 3. Efecto citotóxico de los compuestos en las curvas de concentración-respuesta de células Caco-2 y HT-29 para la viabilidad celular de **(A)** células Caco-2 y **(B)** células HT29 tratadas con CNZ-7, CNZ-8, FLP-2, FLP-6 y FLP-8. El análisis de proliferación celular se determinó mediante el ensayo XTT de viabilidad. Los valores representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes, con errores estándar inferiores al 5 %.

Los gráficos de viabilidad de las líneas celulares Caco-2 (Figura 3A) y HT29 (Figura 3B), mostraron baja toxicidad de los compuestos, es posible determinar que a las concentraciones IC₅₀ de los compuestos, calculadas para los cultivos de los parásitos las líneas celulares muestran disminución de viabilidad de 1% aproximadamente, Tabla 3.

Tabla 3. Actividad giardicida *in vitro* y citotoxicidad selectiva de compuestos. Los números entre paréntesis corresponden a la relación CC₅₀/IC₅₀ entre células de mamíferos y trofozoítos de la cepa ATCC 30957 (índice de selectividad).

Compu- esto	IC ₅₀ (μM)		CC ₅₀ (μM)	
	<i>G. lam- blia</i>	<i>G. lamblia</i> (NTZ resistente)	HT-29 (SI)	Caco-2 (SI)
	CNZ-7	5.26	2.5	529 (100)
CNZ-8	11.1	13.7	622 (56)	633 (57)
FLP-2	3.6	0.37	1912 (531)	3184 (884)
FLP-6	0.28	0.54	115.33 (411)	178.18 (636)
FLP-8	0.10	1.19	43.67 (436)	46 (460)
MTZ	3.4	No determinado	550 (161) (Martínez- Rosas et al., 2023)	545 (160) (Martínez- Rosas et al., 2023)
NTZ	4.3	7.29	634 (147) (Martínez- Rosas et al., 2023)	580 (134) (Martínez- Rosas et al., 2023)

Predicción de valores ADMET de las moléculas anti-giardiascas

Con la finalidad de establecer si los compuestos son buenos candidatos a fármaco y su biodisponibilidad, se determinaron los parámetros predictivos de Lipinski y ADMET de los compuestos CNZ-7, CNZ-8, FLP-2, FLP-6 y FLP-8, los resultados obtenidos se compararon con los resultados del fármaco nitazoxanida.

Los parámetros ADMET son parámetros relevantes en la investigación y desarrollo de nuevos fármacos, ya que permiten predecir cómo se comportará un compuesto en el organismo y si es seguro y eficaz antes de proceder con estudios clínicos en humanos. La Tabla 4 muestra los valores determinados para los 5 compuestos y para el fármaco NTZ, se observa que todos los compuestos cumplen con criterios aceptables para los parámetros farmacocinéticos.

Tabla 4. Valores predictivos farmacocinéticos calculados con ADMETLab 2.0 para los compuestos CNZ-7, CNZ-8, FLP-2, FLP-6, FLP-8 y nitazoxanida. Los valores de probabilidad de predicción se muestran con seis símbolos: 0-0.1 (---), 0.1-0.3 (-), 0.3-0.5 (-), 0.5-0.7 (+), 0.7-0.9 (++) and 0.9-1.0 (+++).

Modelo	Compuestos						
	CNZ-7	CNZ-8	FLP-2	FLP-6	FLP-8	Nitazoxanida	
A	Absorción Gastrointestinal	(---)	(---)	(---)	(---)	(---)	
	Caco-2 Permeabilidad	-4.839	-4.686	-4.798	-4.789	-4.908	-5.038
D	Unión a proteínas en plasma	98%	93.5%	96.4%	97.8%	96.6%	97.2%
	Permeabilidad de la barrera hematoencefálica	(---)	(---)	(++)	(---)	(---)	(+++)
	Volumen de distribución	1.899 L/kg	0.526 L/kg	1.32 L/kg	1.085 L/kg	0.633 L/kg	0.478 L/kg
M	CYP3A4 Sustrato	(---)	(-)	(---)	(---)	(---)	(---)
	CYP2D6 Sustrato	(+++)	(+++)	(+++)	(+)	(-)	(---)
E	CL plasma	3.832 mL/min/Kg	1.697 mL/min/Kg	4.826 mL/min/Kg	4.381 mL/min/kg	2.615 mL/min/kg	2.529 mL/min/kg
	Vida media (T _{1/2})	<3h	<3h	<3h	<3h	<3h	<3h
T	Bloqueadores hERG	(-)	(---)	(-)	(-)	(---)	(-)
	Toxicidad Aguda en ratas	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
	Carcinogénesis	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(++)

La absorción predice valores aceptables para absorción gastrointestinal y para permeabilidad a células Caco-2 las cuales se han utilizado ampliamente como modelo de permeabilidad en fármacos. En distribución, los valores de unión a plasma en sangre son mayores al 90% para todos los compuestos incluyendo a NTZ.

En cuanto a la permeabilidad de la barrera hematoencefálica FLP-2 y NTZ no son permeables y para volumen de distribución se predicen buenos valores en los 5 compuestos. Respecto al metabolismo, se determinó que los compuestos son sustratos de los citocromos CYP3A4 y CYP2D, ambos relevantes en el metabolismo de los fármacos.

La clarancia y la vida media son dos conceptos farmacocinéticos relacionados con cómo un fármaco se elimina del cuerpo y el tiempo que permanece en el organismo, los compuestos mostraron valores aceptables en estos parámetros.

Por último, en toxicidad mostraron baja probabilidad de bloqueo del canal hERG y podrían considerarse moléculas no cardiotoxicas, exhibieron una moderada toxicidad oral en ratas y en cuanto a cancerígenos, algunos compuestos demostraron poseer valores positivos, es importante resaltar que estos estudios bioinformáticos en general solo nos permiten predecir los posibles comportamientos de los compuestos, por lo que es importante el verificar experimentalmente sus posibles efectos en modelo animal para poder determinar estos parámetros y así asegurar que los compuestos sean seguros para su uso terapéutico.

Elucidación de las alteraciones celulares ocasionadas por los compuestos anti-giardíacos

La glucólisis es relevante en el metabolismo energético de *G. lamblia*, probablemente debido a la ausencia de mitocondrias en este parásito. Además, el parásito posee mecanismos que incrementan la eficiencia de la glucólisis, como los que involucran las enzimas piruvato fosfato dicinasa (PPDK) y fosfofructoquinasa dependiente de fosfato inorgánico (PFK) (Feng et al., 2008; Tian et al., 2010; Park et al., 1997). Se evaluó la expresión de genes que codifican proteínas de glucólisis para dilucidar si los efectos causados por los compuestos sobre la viabilidad del parásito están relacionados con cambios en la expresión de estos genes.

Los resultados indican una expresión diferencial de varios genes relacionados con el metabolismo después de la incubación con los cinco compuestos. Como se observa en la Figura 4, la expresión génica de *PFK* mostró una reducción en los trofozoítos cuando se expuso a CNZ-7, CNZ-8, FLP-2 y NTZ, aunque la disminución no fue estadísticamente significativa en comparación con el grupo control, mientras que FLP-6 y FLP-8 indujeron un aumento significativo ($P < 0.001$) en la expresión del gen *PFK*. Con respecto a la expresión del gen *TPI*, todos los compuestos y los fármacos NTZ indujeron una disminución significativa ($P < 0.001$) en la expresión. Por el contrario, los trofozoítos tratados con todos los compuestos y NTZ mostraron niveles aumentados de expresión génica de *GAPDH*, *PK*, *PPDK* y *PFOR*. El gen *GAPDH* que codifica una enzima reguladora de la vía de la glucólisis mostró una sobreexpresión significativa ($P < 0.001$) con los compuestos FLP-2 y NTZ (cambio de 18.3 y 17.2 veces, respectivamente) en comparación con el grupo control.

Este aumento podría estar relacionado con un mayor requerimiento energético para sobrevivir o proliferar en presencia de compuestos que afectan el metabolismo (Zhang et al., 2015; Sirover, 2017). También podría ser una respuesta a la muerte celular del parásito, ya que varios estudios han relacionado la enzima GAPDH con la apoptosis (Zhang et al., 2015; Nicholls et al., 2012).

Los genes *PK* y *PPDK* codifican enzimas que catalizan la conversión de fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato con la producción de una molécula de ATP que contribuye al acervo de ATP que *G. lamblia* necesita para su supervivencia (Han y Collins, 2012; Feng et al., 2014). La enzima PPDK utiliza AMP y pirofosfato (PPi) como sustratos para producir ATP. De esta manera, la enzima PPDK es esencial para la supervivencia del parásito en condiciones anaeróbicas, ya que le permite obtener energía sin depender del ADP, lo cual constituye una ventaja adaptativa en su entorno microaerófilo (Feng et al., 2014).

Los resultados de la expresión génica muestran un aumento en la expresión tanto de *PK* como de *PPDK*; sin embargo, los compuestos CNZ-7, CNZ-8 y FLP-2 mostraron una sobreexpresión significativa con un cambio de 15.8, 8.2 y 21.8 veces en *PPDK* en comparación con el grupo control.

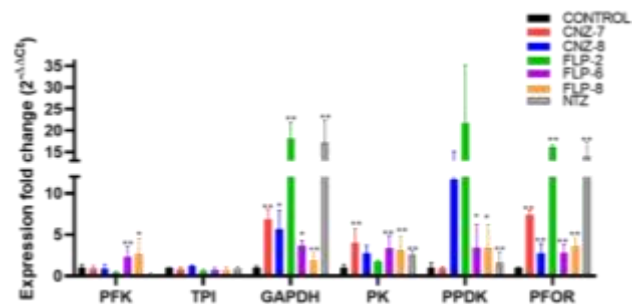


Figura 4. Expresión relativa de genes glucolíticos en *G. lamblia*, determinada mediante RT-qPCR. Se comparó la expresión génica entre parásitos cultivados sin tratamiento (control negativo) y trofozoítos expuestos a compuestos, utilizando la aldolasa como gen de referencia. Cada color corresponde a diferentes compuestos: rojo: CNZ-7; azul: CNZ-8; verde: FLP-2; morado: FLP-6; naranja: FLP-8; gris: NTZ; y negro: control negativo. El asterisco indica una diferencia significativa ($P < 0.05$) en la expresión. Los valores representan la media DE \pm de tres réplicas.

Con respecto a la expresión del gen *PFOR*, se determinó que los trofozoítos tratados con los compuestos CNZ-7, FLP-2 y NTZ mostraron una sobreexpresión significativa con un cambio de 7.4, 16 y 14 veces con respecto al grupo control.

El gen *PFOR* codifica una proteína relevante para el metabolismo de *G. lamblia* ya que, a través de la descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil-CoA y CO₂, los dos electrones generados a partir de la reacción PFOR se transfieren a la ferredoxina, esta enzima ayuda en los procesos de desintoxicación y producción de energía del parásito (Raj et al., 2015; Fox y Saravolatz, 2005). Previamente, se reportó que la enzima PFOR podría ser un blanco de NTZ dado que NTZ se comporta como un inhibidor catalítico de G6PD::6PGL (Martínez-Rosas et al., 2023). De manera similar, CNZ-7 y FLP-2 se comportan como inhibidores catalíticos de G6PD (Morales-Luna et al., 2022), por lo que el aumento en la expresión del gen *PFOR* probablemente está relacionado con la inhibición de la enzima PFOR, y el parásito intenta compensar esta inhibición con la mayor producción de ARNm de PFOR (Begaydarova et al., 2015).

Además, se evaluó la expresión de genes involucrados en la vía de las pentosas fosfato, una vía estrechamente relacionada con diversos procesos metabólicos como la síntesis de nucleótidos, la producción de moléculas de NADPH, útiles en la respuesta al estrés oxidativo, la síntesis de lípidos y la síntesis de intermediarios de otras vías como el gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y la fructosa-6-fosfato (TeSlaa et al., 2023; Stinconcone et al., 2015). La expresión de los genes *G6PD::6PGL*, *6PGDH* y *TKT* mostró un perfil de expresión diferencial en presencia de los cinco compuestos en comparación con el grupo control (Figura 5).

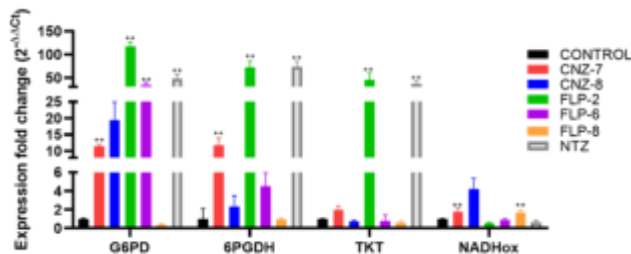


Figura 5. Expresión relativa de los genes de la vía de las pentosas fosfato en *G. lamblia*, determinada mediante RT-qPCR. Se comparó la expresión génica entre parásitos cultivados sin tratamiento (control negativo) y trofozoítos expuestos a compuestos, utilizando la aldolasa como gen de referencia. Cada color corresponde a la evaluación de diferentes compuestos: rojo: CNZ-7; azul: CNZ-8; verde: FLP-2; morado: FLP-6; naranja: FLP-8; gris: NTZ; y negro: control negativo. El asterisco indica una diferencia significativa ($P < 0.05$) en la expresión. Los valores representan la media DE \pm de tres réplicas.

Se ha reportado que los fármacos aromáticos de nitrotriazol, como NTZ, inducen un aumento significativo en la producción de radicales superóxido, una de las enzimas involucradas en la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno en *G. lamblia* es NADHox (TeSlaa et al., 2023; Castillo-Villanueva et al., 2016; Mastronicola et al., 2016). En este trabajo, determinamos los perfiles de expresión del gen NADHox en trofozoítos tratados con los cinco compuestos y NTZ; los perfiles mostraron diferentes efectos en la expresión génica. En presencia de los compuestos CNZ-7, CNZ-8 y FLP-8, hubo aumento de la expresión génica en 1.7, 4.2 y 1.7 veces más que el control; para FLP-2 y NTZ, la expresión disminuyó. El último gen analizado de la PPP fue *TKT*, una enzima que participa en la fase no oxidativa de la vía; CNZ-8, FLP-6 y FLP-8 disminuyeron su expresión en 1.4, 1.2 y 1.7 veces comparado con el control. Por otro lado, CNZ-7, FLP-2 y NTZ aumentaron su expresión 1.9, 45.1 y 36.1 veces en comparación con el control, lo que sugiere que los trofozoítos podrían requerir una mayor disponibilidad de intermediarios glucolíticos. Esto se debe a que uno de los productos de la fase no oxidativa de la vía de la pentosa fosfato actúa como intermediario en esta ruta metabólica.

Por último, se analizó la expresión de genes que codifican proteínas relevantes para la función estructural y la estabilidad de la membrana del parásito, Figura 6. Se evaluó la expresión de actina y δ -giardina, ambas proteínas del citoesqueleto, esenciales para la estructura, movilidad y división celular del parásito. La actina juega un papel relevante en el disco ventral ya que contiene filamentos de actina que ayudan en su ensamblaje y estabilidad, permitiendo al parásito resistir el flujo intestinal y permanecer anclada a su sitio de infección, lo que a su vez se asocia con la adhesión del parásito. En cuanto a la giardina, es una proteína que solo se encuentra en *G. lamblia*, y su función es brindar rigidez y estabilidad estructural de las células, está estrechamente asociada con el disco ventral y los flagelos, por lo que es relevante para la motilidad del parásito (Touz et al., 2018; Gadelha et al., 2020). La expresión de ACT aumentó en los tratamientos CNZ-7 y FLP-6 y tuvo una expresión 2.1 y 2.5 más alta en comparación con el control, en contraste, la expresión de FLP-2 disminuyó 10 veces. La expresión de GIA aumentó 2.6 veces, en presencia de CNZ-7, 12.5 veces CNZ-8, 20.1 veces en FLP-2 y para FLP-6, 2.6 veces más en comparación con el control, por su parte, FLP-8 y NTZ no mostraron cambios en su expresión. Finalmente, la expresión de VSP aumentó 47.8, 5.9 y 2.4 veces para los compuestos FLP-2, FLP-6 y FLP-8 con respecto al control, lo que indica que estos compuestos probablemente afectan en mayor medida la estabilidad estructural.

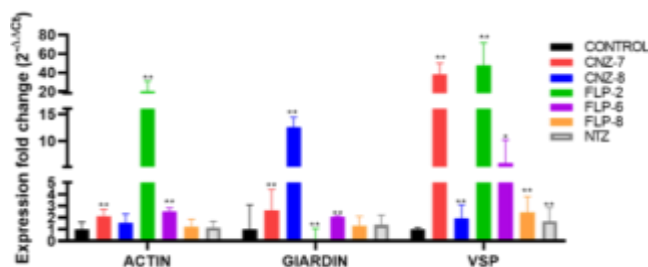


Figura 6. Expresión relativa de genes estructurales en *G. lamblia* determinada mediante RT-qPCR. Se comparó la expresión génica entre parásitos cultivados sin tratamiento (control negativo) y trofozoítos expuestos a los compuestos CNZ-7, CNZ-8, FLP-2, FLP-6, FLP-8 y nitazoxanida, utilizando la Aldolasa como gen de referencia. Cada color corresponde a la evaluación de diferentes compuestos: rojo: CNZ-7; azul: CNZ-8; verde: FLP-2; morado: FLP-6; naranja: FLP-8; gris: NTZ; y negro: control negativo. El asterisco indica una diferencia significativa ($P < 0.05$) en la expresión. Los valores representan la media $DE \pm$ de tres réplicas.

El análisis de expresión realizado mostró cambios significativos en los niveles de expresión de varios genes metabólicos en respuesta a la exposición de *G. lamblia* a la concentración IC_{50} de cada compuesto a las 48 horas. Los genes analizados mostraron variaciones en su transcripción, lo que sugiere una posible relación entre la regulación de estos genes y la muerte celular del parásito.

Estos resultados respaldan la hipótesis de que la alteración en la expresión de genes metabólicos podría contribuir a la eficacia de los compuestos en la eliminación del parásito. Se observó que los compuestos pertenecientes a la familia FLP: FLP-2, FLP-6 y FLP-8, fueron los más potentes y mostraron los valores IC_{50} más bajos, también, ocasionaron mayores alteraciones en los genes de las enzimas de la vía PPP, lo que a su vez causa mayores alteraciones en el metabolismo y afecta la homeostasis celular, alterando así la expresión de otras proteínas relevantes para la supervivencia del parásito, como las proteínas estructurales.

Elucidación del efecto de los compuestos sobre cepas resistentes a fármacos

Por último, se evaluó el efecto de los cinco compuestos sobre la viabilidad de la cepa de *G. lamblia* resistente a NTZ. Los trofozoítos se incubaron con diferentes concentraciones de los compuestos durante 48 h y se determinó el porcentaje de viabilidad para cada condición. Como se muestra en la Figura 7, se observó un comportamiento dependiente de la concentración.

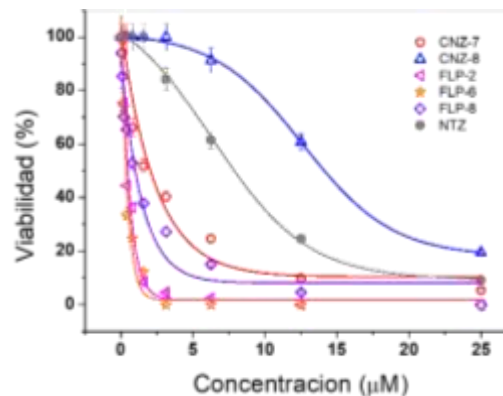


Figura 7. Curvas de crecimiento de una cepa de cultivo de *G. lamblia* resistente a NTZ en presencia de los compuestos CNZ-7, CNZ-8, FLP-2, FLP-6, FLP-8 y el fármaco NTZ. Los trofozoítos se incubaron con los compuestos durante 48 h a 37 °C, se utilizaron concentraciones crecientes de cada compuesto.

Los resultados indicaron que CNZ-8, FLP-6 y FLP-8 mostraron valores de IC_{50} más altos (13.7, 0.54 y 1.19 μM , respectivamente) en comparación con la cepa ATCC.

Sin embargo, aunque los valores de IC_{50} de FLP-6 y FLP-8 fueron mayores, estos valores son inferiores a los determinados para NTZ ($IC_{50} = 7.29 \mu M$), lo que indica una potencia de 6 a 13 veces mayor que la de este fármaco (Tabla 3). Por el contrario, los compuestos CNZ-7 ($IC_{50} = 2.5 \mu M$) y FLP-2 ($IC_{50} = 0.37 \mu M$) mostraron una disminución, reduciendo la IC_{50} de la cepa sensible a la nitazoxanida en 2 y 5 veces, respectivamente. Este efecto podría atribuirse a cambios específicos en la cepa resistente que la hacen más susceptible a estos compuestos. Los hallazgos sugieren que los compuestos evaluados en este estudio inhiben la viabilidad de los cultivos de cepas resistentes a la NTZ, lo que refuerza su potencial como prometedores agentes anti-giardíasicos.

Conclusiones

Se identificaron cinco moléculas con potencial efecto giardicida, las cuales mostraron baja citotoxicidad en líneas celulares humanas. Asimismo, se predijeron sus propiedades ADMET, cumpliéndose satisfactoriamente los parámetros farmacocinéticos y de seguridad evaluados. Adicionalmente, se analizaron las alteraciones inducidas por estos compuestos en la expresión de genes involucrados en rutas metabólicas clave del parásito, así como en proteínas esenciales para la estructura de *Giardia lamblia*. Entre los compuestos evaluados, los FLP destacaron por presentar el mayor efecto giardicida a bajas concentraciones, incluso frente a cepas resistentes nitazoxanida (NTZ).

Agradecimientos

Agradecemos por el financiamiento al programa de Fondos Federales del Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México, México (Recursos Fiscales para la Investigación INP 021/2022).

Referencias

- Adam, R. D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 447–475.
<https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.447-475.2001>
- Adam, R. D. (2021). *Giardia duodenalis*: Biology and pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(4), e00024-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00024-19>
- Argüello-García, R., Leitsch, D., Skinner-Adams, T., & Ortega-Pierres, M. G. (2020). Drug resistance in *Giardia*: Mechanisms and alternative treatments for giardiasis. *Advances in Parasitology*, 107, 201–282.
<https://doi.org/10.1016/bs.apar.2019.11.003>
- Auriostigue-Bautista, J. C., Hernández-Vázquez, E., González-Calderón, D., Figueroa-Romero, J. L., Castillo-Villanueva, A., Torres-Arroyo, A., Ponce-Macotela, M., Rufino-González, Y., Martínez-Gordillo, M., Miranda, L. D., Oria-Hernández, J., & Reyes-Vivas, H. (2022). Discovery of benzopyrrolizidines as promising anti-giardiasis agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 828100. doi.org/10.3389/fcimb.2021.828100
- Begaydarova, R., Yukhnevich, Y., Babenko, D., Kaliyeva, S., Azizov, I., Muldaeva, G., & Omarkulov, B. (2015). Determination of PFOR gene expression in strains of *G. intestinalis* with different inhibitory concentrations of metronidazole. *Journal of Infection in Developing Countries*, 9(5), 519–523.
<https://doi.org/10.3855/jidc.5768>
- Carter, E. R., Nabarro, L. E., Hedley, L., & Chiodini, P. L. (2018). Nitroimidazole-refractory giardiasis: A growing problem requiring rational solutions. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(1), 37–42.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.05.028>
- Castillo-Villanueva, A., Méndez, S. T., Torres-Arroyo, A., Reyes-Vivas, H., & Oria-Hernández, J. (2016). Cloning, expression and characterization of recombinant NADH oxidase from *Giardia lamblia*. *Protein Journal*, 35(1), 24–33. <https://doi.org/10.1007/s10930-015-9643-9>
- Cernikova, L., Faso, C., & Hehl, A. B. (2018). Five facts about *Giardia lamblia*. *PLoS Pathogens*, 14(9), e1007250. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007250>
- Efstratiou, A., Ongerth, J., & Karanis, P. (2017). Evolution of monitoring for *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. *Water Research*, 123, 96–112.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.042>
- Feng, X. M., Cao, L. J., Adam, R. D., Zhang, X. C., & Lu, S. Q. (2008). The catalyzing role of PPDK in *Giardia lamblia*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367(2), 394–398.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.139>
- Feng, X., Yang, C., Zheng, W., & Wen, J. (2014). Structural and evolutionary characteristics of pyruvate phosphate dikinase in *Giardia lamblia* and other amitochondriate protozoa. *Chinese Medical Journal*, 127(23), 4097–4103.
- Feng, Y., & Xiao, L. (2011). Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 110–140.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00033-10>
- Fletcher, S. M., Stark, D., Harkness, J., & Ellis, J. (2012). Enteric protozoa in the developed world: A public health perspective. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(3), 420–449. <https://doi.org/10.1128/CMR.05038-11>
- Fox, L. M., & Saravolatz, L. D. (2005). Nitazoxanide: A new thiazolide antiparasitic agent. *Clinical Infectious Diseases*, 40(8), 1173–1180. <https://doi.org/10.1086/428839>
- Gadelha, A. P., Benchimol, M., & de Souza, W. (2020). The structural organization of *Giardia intestinalis* cytoskeleton. *Advances in Parasitology*, 107, 1–23.
<https://doi.org/10.1016/bs.apar.2019.08.003>
- Gutiérrez-Cardona, J. Y., Calderón-Jaimes, E., Ortega-Cuellar, D., Sánchez-Carrillo, A., Castillo-Rodríguez, R. A., Canseco-Ávila, L. M., Rocha-Ramírez, L. M., Martínez-Rosas, V., Gómez-Manzo, S., & Hernández-Ochoa, B. (2024). Effect of trichomonacide 6-nitro-1H-benzimidazole derivative compounds on expression level of metabolic genes in *Trichomonas vaginalis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(8), 4568. <https://doi.org/10.3390/ijms25084568>
- Halliez, M. C., & Buret, A. G. (2013). Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World Journal of Gastroenterology*, 19(47), 8974–8985. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i47.8974>
- Han, J., & Collins, L. J. (2012). Reconstruction of sugar metabolic pathways of *Giardia lamblia*. *International Journal of Proteomics*, 2012, 980829. <https://doi.org/10.1155/2012/980829>

- Hernández-Ochoa, B., Navarrete-Vázquez, G., Nava-Zuazo, C., Castillo-Villanueva, A., Méndez, S. T., Torres-Arroyo, A., Gómez-Manzo, S., Marcial-Quino, J., Ponce-Macotela, M., Rufino-González, Y., Martínez-Gordillo, M., Palencia-Hernández, G., Esturau-Escofet, N., Calderon-Jaimes, E., Oria-Hernández, J., & Reyes-Vivas, H. (2017). Novel giardicidal compounds bearing proton pump inhibitor scaffold proceeding through triosephosphate isomerase inactivation. *Scientific Reports*, 7(1), 7810. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07612-y>
- Leitsch, D. (2015). Drug resistance in the microaerophilic parasite *Giardia lamblia*. *Current Tropical Medicine Reports*, 2(3), 128–135. <https://doi.org/10.1007/s40475-015-0051-1>
- Leung, A. K. C., Leung, A. A. M., Wong, A. H. C., Sergi, C. M., & Kam, J. K. M. (2019). Giardiasis: An overview. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 13(2), 134–143. <https://doi.org/10.2174/1872213X13666190618124901>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Liu, L. X., & Weller, P. F. (1996). Antiparasitic drugs. *New England Journal of Medicine*, 334(18), 1178–1184. <https://doi.org/10.1056/NEJM199605023341808>
- Loderstädt, U., & Frickmann, H. (2021). Antimicrobial resistance of the enteric protozoon *Giardia duodenalis*—A narrative review. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 11(2), 29–43. <https://doi.org/10.1556/1886.2021.00009>
- Marcial-Quino, J., Gómez-Manzo, S., Fierro, F., Vanoye-Carlo, A., Rufino-González, Y., Sierra-Palacios, E., Castillo-Villanueva, A., Castillo-Rodríguez, R. A., Rodríguez-Bustamante, E., Arreguin-Espinosa, R., & Reyes-Vivas, H. (2016). Stem-loop RT-qPCR as an efficient tool for the detection and quantification of small RNAs in *Giardia lamblia*. *Genes*, 7(12), 131. <https://doi.org/10.3390/genes7120131>
- Martínez-Rosas, V., Hernández-Ochoa, B., Morales-Luna, L., Ortega-Cuellar, D., González-Valdez, A., Arreguin-Espinosa, R., Rufino-González, Y., Calderón-Jaimes, E., Castillo-Rodríguez, R. A., Wong-Baeza, C., et al. (2023). Nitazoxanide inhibits the bifunctional enzyme Glg6PD::6PGL of *Giardia lamblia*: Biochemical and in silico characterization of a new druggable target. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11516. <https://doi.org/10.3390/ijms241411516>
- Mastronicola, D., Falabella, M., Forte, E., Testa, F., Sarti, P., & Giuffrè, A. (2016). Antioxidant defence systems in the protozoan pathogen *Giardia intestinalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 206(1–2), 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.12.002>
- Morales-Luna, L., Hernández-Ochoa, B., Martínez-Rosas, V., Navarrete-Vázquez, G., Ortega-Cuellar, D., Rufino-González, Y., González-Valdez, A., Arreguin-Espinosa, R., Franco-Vásquez, A. M., Pérez de la Cruz, V., et al. (2022). *Giardia lamblia* G6PD::6PGL fused protein inhibitors decrease trophozoite viability: A new alternative against giardiasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 14358. <https://doi.org/10.3390/ijms232214358>
- Mørch, K., & Hanevik, K. (2020). Giardiasis treatment: An update with a focus on refractory disease. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 33(5), 355–364. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000668>
- Navarrete-Vázquez, G., Chávez-Silva, F., Colín-Lozano, B., Estrada-Soto, S., Hidalgo-Figueroa, S., Guerrero-Álvarez, J., Méndez, S. T., Reyes-Vivas, H., Oria-Hernández, J., Canul-Canché, J., Ortiz-Andrade, R., & Moo-Puc, R. (2015). Synthesis of nitro(benzo)thiazole acetamides and in vitro antiprotozoal effect against amitochondriate parasites *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(9), 2204–2210. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.02.059>
- Nicholls, C., Li, H., & Liu, J. P. (2012). GAPDH: A common enzyme with uncommon functions. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 39(8), 674–679. doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05599.x
- Park, J. H., Schofield, P. J., & Edwards, M. R. (1997). Pyruvate kinase is present in *Giardia intestinalis*. *Experimental Parasitology*, 87(2), 153–156. <https://doi.org/10.1006/expr.1997.4206>
- Raj, D., Saini, P., Nozaki, T., et al. (2015). Involvement of pyruvate on oxidative stress management in the microaerophilic protozoan parasite *Giardia lamblia*. *International Journal of Advanced Research*, 4(7), 1148–1166.
- Reyes-Vivas, H., de la Mora-de la Mora, I., Castillo-Villanueva, A., Yépez-Mulia, L., Hernández-Alcántara, G., Figueroa-Salazar, R., García-Torres, I., Gómez-Manzo, S., Méndez, S. T., Vanoye-Carlo, A., Marcial-Quino, J., Torres-Arroyo, A., Oria-Hernández, J., Gutiérrez-Castrellón, P., Enríquez-Flores, S., & López-Velázquez, G. (2014). Giardial triosephosphate isomerase as possible target of the cytotoxic effect of omeprazole in *Giardia lamblia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(12), 7072–7082. <https://doi.org/10.1128/AAC.02900-14>

- Rogawski, E. T., Bartelt, L. A., Platts-Mills, J. A., Seidman, J. C., Samie, A., Havt, A., Babji, S., Trigos, D. R., Qureshi, S., Shakoor, S., Haque, R., Mduma, E., Bajracharya, S., Gaffar, S. M. A., Lima, A. A. M., Kang, G., Kosek, M. N., Ahmed, T., Svensen, E., Mason, C., Bhutta, Z. A., Lang, D. R., Gottlieb, M., Guerrant, R. L., Houpt, E. R., & Bessong, P. O. (2017). Determinants and impact of *Giardia* infection in the first 2 years of life in the MAL-ED Birth Cohort. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 6(2), 153–160. <https://doi.org/10.1093/jpids/piw082>
- Rufino-González, Y., Ponce-Macotela, M., García-Ramos, J. C., Martínez-Gordillo, M. N., Galindo-Murillo, R., González-Macié, A., Reynoso-Robles, R., Tovar-Tovar, A., Flores-Alamo, M., Toledano-Magaña, Y., & Ruiz-Azuara, L. (2019). Antigiardiasis activity of Cu(II) coordination compounds: Redox imbalance and membrane damage after a short exposure time. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 195, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.03.012>
- Sirover, M. A. (2017). GAPDH and hypoxia. In *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* (pp. 155–165). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809852-3.00009-1>
- Sorensen, C. G., Karlsson, W. K., Amin, F. M., & Lindelof, M. (2020). Metronidazole-induced encephalopathy: A systematic review. *Journal of Neurology*, 267(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00415-018-9147-6>
- Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N. M., Krüger, A., et al. (2015). The return of metabolism: Biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews*, 90(3), 927–963. <https://doi.org/10.1111/brv.12140>
- TeSlaa, T., Ralser, M., Fan, J., & Rabinowitz, J. D. (2023). The pentose phosphate pathway in health and disease. *Nature Metabolism*, 5(8), 1275–1289. <https://doi.org/10.1038/s42255-023-00863-2>
- Tian, H. F., Chen, B., & Wen, J. F. (2010). Giardiasis, drug resistance, and new target discovery. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 10(4), 295–302. <https://doi.org/10.2174/187152610791591629>
- Touz, M. C., Feliziani, C., & Rópolo, A. S. (2018). Membrane-associated proteins in *Giardia lamblia*. *Genes*, 9(8), 404. <https://doi.org/10.3390/genes9080404>
- Zhang, J. Y., Zhang, F., Hong, C. Q., Giuliano, A. E., Cui, X. J., Zhou, G. J., Zhang, G. J., & Cui, Y. K. (2015). Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells. *Cancer Biology & Medicine*, 12(1), 10–22. <https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2014.0019>