

Artículo de Revisión

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos

ENSAYOS FARMACOLÓGICOS *IN VITRO* PARA EVALUAR ACTIVIDAD ANTIGIARDIÁSICA

Marta Guerra Ordóñez¹

RESUMEN

Se realizó una revisión sobre los ensayos farmacológicos *in vitro* más empleados para evaluar la actividad anti*giardiásica*. Los primeros ensayos de susceptibilidad a drogas conllevaban a una tediosa observación microscópica del efecto de la droga sobre la motilidad y la morfología del parásito; tradicionalmente se ha empleado el método de inhibición de crecimiento mediante conteo visual. Un ensayo posterior de crecimiento clonal elimina este inconveniente pero es técnicamente demandado. Mas recientemente se destacan el ensayo radiométrico, basado en la incorporación de la timidina triada, el de inhibición de adherencia de los trofozoítos y un ensayo colorimétrico que emplea sales de tetrazolio, las cuales son metabólicamente reducidas en las células vivas para dar lugar a un producto coloreado. Cada uno de estos ensayos posee ventajas y desventajas; la tendencia actual está en desarrollar y combinar métodos que posibiliten obtener información acerca del mecanismo de acción de las drogas.

DeCs: RESISTENCIA A LAS DROGAS; GIARDIASIS/quimioterapia; GIARDIA LAMBLIA/efectos de drogas; GIARDIA LAMBLIA/aislamiento & purificación; AGENTES ANTIPARASITARIOS; "IN VITRO"; TEST DE SENSIBILIDAD MICROBIANA.

Diversos factores pueden contribuir a la ineficiencia de un tratamiento, entre ellos la existencia de cepas resistentes. Algunos estudios indican que la resistencia a drogas en *Giardia lamblia* puede ser responsable de la recurrencia de esta parasitosis, por

ello es necesaria la búsqueda de nuevos compuestos o la introducción de otros ya existentes.

El uso de técnicas *in vitro* para el estudio de la sensibilidad de *G. lamblia* a las drogas ofrece ciertas ventajas. Primero,

¹ Licenciada en Microbiología. Investigadora Auxiliar.

puede ser evaluada la actividad anti-giardíaca de gran número de muestras, segundo, un mejor entendimiento del modo de acción de las drogas en condiciones controladas de ensayos. Finalmente, pueden ser monitoreados de forma emergente aislamientos clínicos de pacientes que no responden al tratamiento.

MÉTODOS PARA EVALUAR ACTIVIDAD ANTI-GIARDÍACA IN VITRO

El desarrollo de un medio de cultivo apropiado para *Giardia intestinalis* abrió las posibilidades del estudio de la respuesta de los parásitos a las drogas. Entre los primeros reportes, *Diamond y Bartgis* describen un ensayo semicuantitativo de viabilidad para evaluar el efecto de drogas, por conteo de parásitos sobrevivientes *in situ*. Cuando se observaban al microscopio invertido (x 100) 50 parásitos por campo, eran contados 5 campos, si se observaban menos, 10 campos. Era calculado el porcentaje de viabilidad si la morfología, adherencia y motilidad eran normales. Este método se propuso adecuado para una selección inicial de drogas, sin embargo, no presentó diferencias cuantitativas (menores que 20 %) en el efecto de varios antibióticos sobre el crecimiento.¹ Catorce años después, se procede de forma similar para evaluar la tolerancia de un cultivo axénico de *G. lamblia* a diferentes agentes antimicrobianos y se alcanzan resultados de susceptibilidad similares a los obtenidos con ensayos posteriores de microscopía o formación de colonias.²

Era necesario eliminar el empleo de métodos laboriosos o subcultivos.³ Dos acercamientos a los ensayos *in vitro* de drogas contra *G. lamblia* incluyen a *Jokipii L* y *Jokipii AM* en 1980, los cuales incuban

trofozoítos directamente extraídos de duodeno. La viabilidad fue determinada por examen microscópico de los organismos, por el movimiento flagelar.⁴ Al menos 100 trofozoítos son examinados microscópicamente (x 400) para evidenciar motilidad, el movimiento es observado durante 10 s, especialmente el del flagelo ventral, clasificándose no mótil aun cuando morfológicamente pudiera parecer normal. Claro que esta técnica no tenía en cuenta que los organismos podían ser reproductivamente no viables aunque mostraran actividad flagelar. Se mostró la actividad *in vitro* del metronidazol y el tinidazol, pero el método resultó confiable porque no fueron utilizados cultivos axénicos y algunos cultivos controles murieron espontáneamente. El otro, *Gillin y Diamond* (1981) los que emplean el criterio de concentración mínima letal, mediante un ensayo de crecimiento clonal.⁵ Estos autores habían desarrollado en 1980 este ensayo en medio semisólido. Las colonias eran contadas visualmente para evaluar la actividad anti-giardíaca *in vitro*, eliminando la necesidad de métodos laboriosos de microscopía o subcultivo.^{6,7} En contraste con las técnicas que empleaban medio líquido, se plantea que no es posible un sobrecrecimiento de un simple trofozoíto, cada colonia es formada originalmente por un organismo. Sin embargo, este ensayo es técnicamente demandado, pues los datos de susceptibilidad no estaban disponibles hasta 6-7 d, cuando los clones eran claramente visibles. No fue recomendado para el trabajo de rutina pues la eficiencia del conteo fue sólo del 25 %. La combinación de las técnicas descritas posibilitaba evaluar susceptibilidad y brindaba una mayor información de las drogas comúnmente usadas en el tratamiento de la giardiasis.

Tradicionalmente se ha empleado el ensayo de inhibición de crecimiento mediante conteo visual de parásitos, el cual utiliza cultivos de 72 h en fase logarítmica. Los trofozoítos están en contacto con el agente quimioterapéutico durante 48 h, pasadas las cuales son despegados en baño de hielo y realizado el conteo en cámara de Neubauer, calculándose la IC₅₀: concentración que inhibe el crecimiento del 50 % de la población de parásitos y en ocasiones la MLC: concentración mínima letal, para la cual no son observados parásitos (menos de 1 %) y la HNC: mayor concentración no inhibitoria. Para calcular el porcentaje de inhibición de crecimiento se emplea la expresión siguiente:

$$IC=100 - \frac{\text{Concentración de } Giardia \text{ en cultivo tratado con la droga}}{\text{Concentración de } Giardia \text{ en cultivo no tratado}} \times 100$$

Este método ha sido muy utilizado para evaluar la sensibilidad *in vitro* de *G. intestinalis* a diferentes agentes quimioterapéuticos, sus combinaciones, incluso para validar otras técnicas.⁸⁻¹²

Inicialmente fueron empleados aislamientos de origen no humano.⁷ Posteriormente fue descrita una técnica para el cultivo de rutina de trofozoítos de *G. lamblia* a partir de las aspiraciones duodenales humanas.^{13,14}

Hasta ese momento ningún método brindaba información rápida al médico y no resultaba fácil seleccionar nuevas drogas. Aunque fue importante el desarrollo y mejoramiento del cultivo de *G. intestinalis*,¹⁵⁻¹⁸ la falta de una técnica de microcultivo impedía un estudio detallado de la respuesta de los organismos a los agentes quimioterapéuticos y ya era impracticable el empleo de grandes volúmenes.

Es descrito un microensayo que aventaja este problema y da una medida más real de la viabilidad que la de muerte por exclusión o motilidad, este método evalúa la inhibición de la incorporación de un sustrato radiomarcado.¹⁹ El cultivo fue adaptado a una placa de microtitulación y el método comparado con microensayos de viabilidad por motilidad y exclusión, con el empleo en este último caso de una solución acuosa de tripán azul. Las tinciones desarrolladas con los denominados colorantes vitales han sido utilizadas para discriminar entre células vivas y muertas.²⁰ El ensayo de crecimiento con timidina tritriada ([³H] timidina) resultó ser marcadamente más sensible. Dicho ensayo consistió en poner en contacto trofozoítos en fase logarítmica con diferentes concentraciones de la droga y posteriormente con 50 µL de [³H] timidina (12 µCi/mL) durante 4 h. Fue estimada la timidina incorporada en un lector de centelleo y se calculó la ID₅₀; dosis de la droga que inhibe la incorporación de timidina en el 50 % de la población de parásitos. Este ensayo permite de forma rápida y sencilla determinar la sensibilidad a drogas de diferentes aislamientos de *G. lamblia* y denota cambios inmediatos que afectan la división.²¹⁻²³ Adjunto a este ensayo fueron realizados estudios autorradiográficos que indicaron que la timidina es incorporada solo en el núcleo de *Giardia*, lo que demuestra que no hay DNA extra nuclear. La incorporación de [³H] timidina al DNA refleja la replicación y en menor medida la reparación. Tres de cuatro drogas estudiadas actúan sobre el DNA y son notados cambios que afectan la división.

En 1985, *Seow* adapta la técnica descrita por *Thong y Currel* para ensayar adherencia de neutrófilos. El ensayo empleó microcolumnas de fibra de nylon y fue

recomendado para los estudios de sensibilidad a drogas *in vitro*;^{24,25} los resultados preliminares indicaron que el efecto inhibitorio del metronidazol en *G. lamblia* fue dosis dependiente. Trabajaron también en esta dirección otros autores,^{26,27} algunos comparan los resultados obtenidos empleando el ensayo de inhibición de adherencia con el de inhibición de crecimiento.^{9-11,28} Refiriéndonos brevemente, se emplean microcolumnas en ocasiones preparadas con fibra de nylon, las cuales aceptan fácilmente 130µL de la suspensión de *G. lamblia*. Después de la preincubación de la suspensión de trofozoítos con diferentes concentraciones del agente quimioterapéutico, es retirado un volumen definido y colocado en una incubadora de alta humedad a 37 °C. Transcurridos 30 min las columnas son removidas y colocadas en un aparato diseñado especialmente y en el cual se aplica una presión de succión. Los efluentes son depositados en tubos que a su vez se colocan en baño de hielo. La concentración de trofozoítos se determina mediante el conteo en cámara de Neubauer; los resultados son calculados mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Porcentaje de adherencia} = 100 - \frac{(\text{Ce} \times 100)}{\text{Co}}$$

donde:

Ce: concentración de *Giardia* en el efluente
Co: concentración en la suspensión original
Finalmente es calculado el porcentaje de inhibición de adherencia:

$$\text{Porcentaje de inhibición de adherencia (IA)} = \frac{\text{Adherencia en suspensión tratada c/droga}}{\text{Adherencia en suspensión no tratada}} \times 100$$

La adherencia a la mucosa intestinal ocurre por medio del disco ventral.²⁹ Han

sido identificadas proteínas contráctiles³⁰ y se conoce que la presión de succión, energía dependiente, es generada por el constante movimiento del flagelo ventral.²⁸ La adherencia parece ser un requisito importante en la patogenicidad de *G. intestinalis*.¹⁰ Al respecto se plantea la importancia de combinar ensayos para lograr penetrar en el mecanismo de acción de las drogas.

Los métodos anteriores consumían tiempo y algunos requerían el uso de reactivos radiomarcados. El más reciente, basado en la adherencia de los trofozoítos, era dependiente de la estimación visual del porcentaje de trofozoítos adheridos y asume que solo se adhieren los trofozoítos viables. Como señalan los propios autores, los organismos viables no se adhieren si ocurre un sobrecrecimiento. De esta forma en algunos casos la IC₅₀ puede parecer superior a lo que es realmente.³¹ No obstante se plantearon como ventajas su rapidez, simpleza y resultados confiables en poco tiempo, así como la posibilidad de medir eventos tempranos asociados con el metabolismo energético e integridad de la membrana antes de la etapa final del crecimiento, lo que posibilita penetrar en los mecanismos de acción de las drogas.

En 1994, se evaluó la actividad de diferentes drogas sobre la adherencia a una línea celular de intestino humano; los resultados se compararon con la capacidad de inhibición del crecimiento de *Giardia*, mediante el ensayo de incorporación de timidina.³²

La ruptura de la sal de tetrazolium (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) en un producto coloreado azul (formazán) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, es potencialmente muy útil para ensayar la supervivencia y proliferación celular. La conversión solo se realiza en células vivas

y la cantidad de formazán producido es proporcional al número de células presentes. De hecho esta enzima no está presente en el suero (en contraste con la hexaminidasa), lo que permitió el desarrollo por *Mosmann* en 1983 de un ensayo rápido y simple, el cual ha sido usado para detectar factores de crecimiento de células T y linfotoxinas.

En 1986, *Francois Denizot y Rita Lang* introdujeron modificaciones al ensayo colorimétrico desarrollado por *Mosmann*, conveniente para estimar el crecimiento de células viables, el cual empleaba un espectrofotómetro *scanning* para microplacas automático y dependía de la reducción por las células vivas de la sal de tetrazolium: MTT, para formar el producto formazán azul.³³ La técnica original tenía varias limitaciones: una baja sensibilidad, resultados variables debido a la precipitación de proteínas en el momento de la adición del solvente orgánico para disolver el producto formazán azul, y una baja solubilidad del producto. Al respecto, los autores señalan que la aplicación directa del procedimiento tenía una sensibilidad menor que el ensayo con [³H] timidina y que los resultados fueron muchas veces irreales debido a la precipitación de las proteínas.

Los problemas fueron superados con las modificaciones siguientes: evitar el suero en el medio de incubación, así se eliminaban los problemas de precipitación con el solvente orgánico; evitar el fenol rojo en el medio, así se eliminaba el uso de ácido en el solvente final, el cual alteraba las propiedades del espectro del formazán; eliminación del medio que contenía MTT después de la reacción y posterior uso de propanol o etanol para solubilizar rápidamente el formazán; uso de una mayor concentración de MTT; uso de la mitad del área de la placa para incrementar la longitud de onda de referencia en un espectrofotómetro de longitud de onda dual. Con

estas modificaciones fue lograda una mayor confiabilidad y sensibilidad del ensayo, hasta el punto donde en muchos casos se pudo reemplazar el ensayo de la timidina triada como medida de la proliferación celular o supervivencia en ensayos de citotoxicidad.

Posteriormente, *Collin Wright* y otros desarrollan un nuevo método con el uso del reactivo XTT, (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5[(phenylamino) carbonyl]-2H) tetrazolium hydroxide) para determinar la viabilidad de una cepa de *G. lamblia*.³⁴ Esta sal de tetrazolio es metabólicamente reducida en las células viables para formar un producto naranja soluble en agua,³⁵ el cual puede ser medido directamente por absorción a 450 nm sin necesidad de estabilización, un paso que es necesario con otro cualquier reactivo de tetrazolio. Los autores concluyen que el método es selectivo para determinar la actividad anti-giardíosis *in vitro* de conocidos agentes antimicrobianos y que facilitaría la investigación de nuevas drogas para uso clínico.

Para evaluar la sensibilidad *in vitro* de *G. lamblia* a diferentes extractos de plantas, se reporta el empleo de la sal MTT.³⁶ Se emplean tubos de microcentrifuga y se calcula el porcentaje de mortalidad. Nuestra experiencia en ensayos realizados en colaboración con el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” confirma esta posibilidad (Guerra Ordóñez M. Tesis de Maestría en Parasitología, 1998).

Otras sales de tetrazolio como el TTC (2,3,5-trifenil tetrazolio cloruro) han sido utilizadas como marcadores del crecimiento exponencial de cultivo de células,³⁷ las que bien pueden ser potencialmente empleadas para evaluar actividad anti-giardíosis.

Más recientemente, un nuevo ensayo colorimétrico se basa en la actividad de la nucleósido hidrolasa de *G. intestinalis*, sobre el sustrato análogo 4-nitrofenil beta-D-ribofuranósido.³⁸ Otro ensayo

utiliza la capacidad de los trofozoítos sobrevivientes para tomar oxígeno, después de expuestos al metronidazol, y se ha encontrado una buena correlación con el efecto inhibitorio según determinación de viabilidad celular.³⁹

CONCLUSIONES

Evaluar la susceptibilidad no es el principal problema de las investigaciones en *Giardia* s.p.p. Para realizar estudios *in vitro* de sensibilidad a drogas se han empleado diferentes ensayos y criterios de viabilidad como morfología, motilidad, exclusión por colorante vital, adherencia e incorporación de un sustrato radiomarcado. Los primeros, eran métodos de microscopía laboriosos o conllevaban a subcultivos posteriores, planteaban como inconveniente el sobrecrecimiento o consumían tiempo y materiales radiomarcados. Lo más reciente que hemos podido encontrar en la literatura, refiere el empleo de ensayos colorimétricos, basados en la actividad enzimática de *G. intestinalis* sobre sustratos específicos y un ensayo que evalúa la capacidad de los trofozoítos para tomar

oxígeno, lo que se correlaciona en todos los casos con la viabilidad celular.

Cada uno de los ensayos descritos posee ventajas y desventajas. Una limitante común a todos ellos es la solubilidad del compuesto evaluado. La tendencia actual está en desarrollar y combinar métodos que posibiliten obtener información acerca del mecanismo de acción de las drogas, lograr resultados en el menor tiempo posible, con la mayor reproducibilidad, confiabilidad y con el menor gasto de recursos.

Debe quedar claro, que la información sobre sensibilidad debe incrementarse y ganar en importancia para esclarecer las fallas medicamentosas, que aunque relacionadas con muchos más factores, algunas veces con los diferentes aislamientos de *G. lamblia* y otras con la posible resistencia a los medicamentos. Por ello se hace indispensable conocer la disponibilidad de ensayos farmacológicos *in vitro* para su utilización con estos fines.

No obstante, las conclusiones clínicas deben manejarse cuidadosamente a partir de un resultado *in vitro*, puede ocurrir por ejemplo, que una concentración menor a la mínima inhibitoria pueda ser suficiente para eliminar el parásito *in vivo*, si existe sinergismo de la droga con los mecanismos de defensa del hospedero.

SUMMARY

A review of the most used *in vitro* pharmacologic assays to evaluate the anti-giardial activity was made. The first tests of susceptibility to drugs lead to a tedious microscopic observation of the effect of the drug on the motility and morphology of the parasite. The method of growth inhibition by visual count has been traditionally used. A further assay of clonal growth eliminates this inconvenient, but it is technically demanded. The radiometric assay, based on the incorporation of titrated thymidine, that of adherence inhibition of the trophozoites and a colorimetric test using tetrazolium salts, which are metabolically reduced in the living cells to give rise to a colored product, are stressed at present. Each of these assays has advantages and disadvantages. The current trend is to develop and combine methods that make possible the obtention of information about the mechanism of action of the drugs.

Subject headings: DRUG RESISTANCE; GIARDIASIS/drug therapy; GIARDIA LAMBLIA/drug effects; GIARDIA LAMBLIA/isolation & purification; ANTIPARASITIC AGENT; "IN VITRO"; MICROBIAL SENSITIVITY TESTS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Diamond LS, Bartgis IL. Axenic cultures for *in vitro* testing of drugs against *Entamoeba histolytica*. Arch Invest Med (Méx) 1971;2(Suppl 1):339-48.
2. Gault MJ, Reiner DS, Guillin FD. Tolerance of axenically cultured *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to a variety of antimicrobial agents. Trans R Soc Trop Med Hyg 1985;79:60-2.
3. Tanowitz HB, Wittner M, Rosenbaum RM, Kress Y. *In vitro* studies on the differential toxicity of metronidazole in protozoa and mammalian cells. Ann Trop Med Parasitol 1975;69:19-28.
4. Jokipii L, Jokipii AM. *In vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites to metronidazole and tinidazole. J Infect Dis 1980;141:317-25.
5. Gillin FD, Diamond LS. Inhibition of clonal growth of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* by metronidazole, quinacrine and other antimicrobial agents. J Antimicrob Chemother 1981;8:305-16.
6. Gillin FD, Diamond LS. Clonal growth of *Giardia lamblia* trophozoites in a semisolid agarose medium. J Parasitol 1980;66:350-2.
7. Smith PD, Gillin FD, Spira WM, Nash TE. Chronic giardiasis: studies on drug sensitivity, toxin production and host production and host immune response. Gastroenterology 1982;83:797-803.
8. Weinbach EC, Jonathan LC, Stephen CW. Antidepressant drugs growth of the human pathogenic protozoan *Giardia lamblia*. Chem Pathol Pharmacol 1985;47(1):145-8.
9. Crouch AA, Seow WK, Thong YH. Effect of twenty-three chemotherapeutic agents on the adherence and growth of *Giardia lamblia* in vitro. Transac R Soc Trop Med Hyg 1986;80:893-6.
10. Crouch AA, Seow WK, Thong YH. Sensitivity in vitro of *Giardia intestinalis* to dyadic combination of azithromycin, doxycycline, mefloquine, tinidazole and furazolidone. Transac R Soc Trop Med Hyg 1990;84:246-8.
11. Crouch AA, Seow WK, Whitman LM, Smith S, Thong YH. Inhibition of adherence of *Giardia intestinalis* by human neutrophils and monocytes. Transac R Soc Trop Med Hyg 1991;85:375-9.
12. Johns T, Faubert GM, Kokwaro JO, Mahunnah RLA, Kimanani EK. Anti-giardial activity of gastrointestinal remedies of the Luo of East Africa. J Ethnopharmacol 1995;46:17-23.
13. Gordts B, Retoré P, Cadranel S, Hemelhof W, Rahman M, Butzler JP. Routine culture of *Giardia* trophozoites from human duodenal aspirates. Lancet 1984;11:137.
14. Gordts B, Hemelhof W, Tiborgh C Van, P Retoré, Cadranel S, Butzler JP. Evaluation of new method for routine *in vitro* cultivation of *Giardia lamblia* from human duodenal fluid. J Clin Microbiol 1985;22:702-4.
15. Diamond LS. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*- like amebae. J Parasitol 1968;54:1047.
16. Diamond LS, Harlow Dr, Cunnick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other Entamoebas. Transac R. Soc Trop Med Hyg 1978;72:431-2.
17. Visvesvara GS. Axenic growth of *Giardia lamblia* in Diamond's TPS-1 medium. Transac R Soc Trop Med Hyg 1983;77:487-8.
18. Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S33 medium supplemented with bile. Transac R Soc Trop Med Hyg 1983;77:487-8.
19. Boreham PFL, Phillips RE, Shepherd RW. The sensitivity of *Giardia intestinalis* to drugs *in vitro*. J Antimicrob Chemother 1984;14:449-61.
20. Merchant DJ, Karin RH, Murphy WH. Handbook of cell and organ cultures. Minneapolis: Burgess, 1965:157-68.
21. McIntyre P, Boreham PF, Phillips RE, Shepherd RW. Chemotherapy in giardiasis: clinical responses and *in vitro* drug sensitivity of human isolates in axenic culture. J Pediatr 1986;108:1005-10.
22. Inge PM, Fathing MG. A radiometric assay for anti-giardial drugs. Transac R Soc Trop Med Hyg 1987;81:345-7.
23. Boreham PFL, Phillips R, Shepherd RW. Altered uptake of metronidazole *in vitro* by stocks of *Giardia intestinalis* with different drug sensitivities. Transac R Soc Trop Med Hyg 1988;82:104-6.
24. Seow WK, Crouch AA, Thong Yh. The adherence of *Giardia lamblia* trophozoites to nylon fibre microcolumns: effect of fluoride, cyanide and metronidazole. Transac R Soc Trop Med Hyg 1985;79:359-62.
25. Thong YH, Currell JM. Development of a microassay technique for neutrophil adherence. J Immunol Methods 1983;63:229-36.

26. Meloni BP, Thompson RCA, Reynoldson JA, Seville P. Albendazole, a more effective anti-giardial agent in vitro than metronidazole or tinidazole. *Transac R Soc Trop Med Hyg* 1990;4:375-98.
27. Morgan UM, Reynoldson JA, Thimpson CA. Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. *In vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37(2):328-31.
28. Crouch AA, Seow WK, Whitman L, Mand Thong YH. Effect of human milk and infant milk formulae on adherence of *Giardia intestinalis*. *Transac R Soc Trop Med Hyg* 1991;85:617-9. 1980;74:429-33.
29. Owen RL. The ultrastructural basis of *Giardia* function. *Transac R Soc Trop Med Hyg* 1980;74:429-33.
30. Feely DE, Schollmeyer JV, Erlandsen SL. *Giardia* spp.: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Exp Parasitol* 1982;53:145-54.
31. Wahl SM, Gilman RH, O'Hare J, Keister DB, Spira WM. A new miniculture technique for determining in vitro antimicrobial agent sensitivity of axenically cultivated strains of *Giardia lamblia*. En: Hammond BR, Wallis PM. *Advances in Giardia research*. Calgary: University of Calgary Press, 1988:21-4.
32. Katelaris PH, Naem A, Farthing MJ. Activity of metronidazole, azitromycin and three benzimidazole on *Giardia lamblia* growth and attachment to a human intestinal cell line. *Aliment Pharmacol Ther* 1994;8(2):187-92.
33. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J Immunol Methods* 1986;89:271-7.
34. Wright CW, Melwani SI, Phillipson JD, Warhurst DC. Determination of anti-giardial activity in vitro by means of soluble formazan production. *Transac R Soc Trop Med Hyg* 1992;86:517-9.
35. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Noefziger TH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumour cells lines. *Cancer Res* 1988;48:4827-33.
36. Ponce M, Navarro I, Martínez MN, Álvarez R. Efecto anti-giardiasico in vitro de 14 extractos de plantas. *Rev Invest Clin* 1994;46(5):343-7.
37. Otero AJ, Rodríguez I, Falero G. 2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) reduction as exponential growth phase marker for mammalian cells in culture and for myeloma hybridization experiments. *Cytotechnology* 1991;6:137-42.
38. Kang EW, Clinch K, Furneaux RH, Harvov JE, Schotioid PJ, Goro AM. A novel and simple colorimetric method for screening *Giardia intestinalis* and anti-giardial activity in vitro. *Parasitology* 1998;117(3):229-34.
39. Sousa MC, Polares Da-Silva J. A new method for assessing metronidazole susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;42(12):2039-42.

Recibido: 10 de agosto del 2000. Aprobado: 26 de septiembre del 2000.

M.Sc. *Marta Guerra Ordóñez*. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Ave. 26 No. 1605 entre Rancho Boyeros y Calzada del Cerro, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba.