

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Tesina de Grado para optar por el título de Bióloga

**IVERMECTINA COMO HERRAMIENTA PARA
ESTUDIAR EL MECANISMO DE MUERTE CELULAR
PROGRAMADA EN *Giardia lamblia***

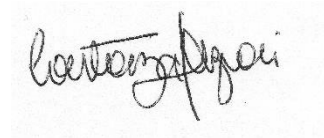
Alumna: Florencia Nicole Barzola

Firma:



Directora: Dra. Constanza Feliziani

Firma:



2023

Alumna: Barzola, Florencia Nicole

Directora: Feliziani, Constanza

Tribunal Examinador:

- Dra. Paraje, María Gabriela **Firma**
- Dr. Urcelay, Carlos **Firma**
- Dr. Almirón, Walter **Firma**

Calificación:

Fecha:

Agradecimientos

A la **Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, especialmente a la **Universidad Nacional de Córdoba** por abrirme las puertas y los caminos a la carrera que ame y amo.

Al **INIMEC CONICET** y a todas las excelentes personas y profesionales que lo integran: investigadores, becarios, técnicos y administrativos. Por brindar un cómodo y agradable ambiente de trabajo. También a la Beca Hugo Carrer estímulo a la vocación científica que me brindo la oportunidad de iniciar mi formación en investigación, en el marco de Proyectos de Investigación que se desarrollaron en el Instituto de Investigación Médica M y M Ferreyra-INIMEC-UNC.

A mis **Jefas Caro** y **Andrea** por recibirme en el laboratorio, primero como pasante y después como tesinista. Sobre todo, por confiar en mí y permitirme crecer en el ambiente científico, siendo grandes mentoras y ejemplos de mujeres a seguir. Y especialmente, gracias a mi directora **Coti**, por guiarme y enseñarme durante todo el proyecto, por las horas compartidas, la confianza depositada en mí, la empatía, pero principalmente, por acompañarme en el trayecto final de la carrera y enseñarme siempre con respeto, amparo, paciencia y más paciencia. Su apoyo durante esta tesina fue muy importante para mí.

A mis compañeros y maestros del LabMI: **Jero, Gabi, Luchi, Ro** y **Juli** por tanto cariño y risas, paciencia y consejos. Por las charlas, los mates y los almuerzos. Gracias por aguantar que les usara todos los tubos para los experimentos, por enseñarme las técnicas y por la motivación y buena onda con la que siempre me explicaban. Ya no les voy a gastar más la lavandina ni todo el medio de cultivo jaja. También gracias a **Sofi, Agus** y **Gon**, que fueron los primeros que brindaron su predisposición para enseñarme.

A mis amigos, **Tinu, Alasco, Mili, Carli, Lola, Melo, Karen, Agus, Jose, Giuli** y **Cande**. Por todas esas horas de cursado, los almuerzos, las lágrimas y risas compartidas. Son lo más lindo que me regaló la facultad, su amistad es eterna para mí y lo más valioso que me llevo de todo este camino recorrido. Sin ellos la carrera no hubiera sido tan hermosa. También a mis amigas de toda la vida **Carly** y **Jaz** que me bancaron desde que somos chicas en toda mi locura. A mi novio **Nico**, que fue mi apoyo y sostén en el final de este trayecto, mi pilar.

A toda mi familia, mis tíos y primos y sobre todo a mi abuela **Marta**, por todo su amor y comprensión, no solo a lo largo de la carrera sino también a lo largo de mi vida.

Pero todo esto, no hubiera sido posible sin el apoyo de mis **padres Daniel y Andrea**. Su acompañamiento incondicional y por brindarme no solo la mejor educación, sino la mejor vida que pude haber tenido. Son mi ejemplo a seguir y los pilares de mi vida. A ustedes dos, les dedico esta tesis.

ÍNDICE

RESUMEN	6
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN.....	8
1. Taxonomía y sistemática	8
2. Ubicación de <i>Giardia lamblia</i> en la historia evolutiva eucariota.....	9
3. Especies de <i>Giardia</i> y ensamblajes genotípicos.....	12
4. Biología celular de <i>Giardia lamblia</i>	13
4.1 Ciclo de vida.....	13
4.2 El trofozoito.....	14
5. Epidemiología en humanos	17
6. Patogénesis en humanos	18
7. Diagnóstico.....	18
8. Tratamiento.....	18
9. Muerte celular programada.....	20
10. Ivermectina	22
OBJETIVOS.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
Objetivo 1: Determinar la concentración de IVM que inhibe el 50% (IC50) del crecimiento de los trofozoitos de <i>Giardia lamblia</i>	26
Objetivo específico 2: Describir el mecanismo de muerte celular programada luego del agregado de IVM.....	28
Objetivo específico 3: Evaluar la progresión del ciclo celular de <i>Giardia lamblia</i> luego del tratamiento con IVM	32
RESULTADOS	34
Determinación de la concentración inhibitoria media (CI50) de IVM sobre los trofozoitos de <i>Giardia lamblia</i>	34
Mecanismo de muerte celular programada luego del agregado de IVM	35
Progresión del ciclo celular de <i>Giardia lamblia</i> luego del tratamiento con IVM...	40
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIÓN	44
BIBLIOGRAFIA	45

RESUMEN

Giardia lamblia es un protozoo parásito unicelular que causa una infección conocida como giardiasis, la cual puede ser asintomática o provocar una enfermedad aguda y, en algunos casos, llegar a ser crónica. El tratamiento actualmente utilizado ha sido el mismo durante los últimos 50 años y se basa en la administración de drogas derivadas de Nitroimidazol. Aunque estas drogas son efectivas, también pueden causar efectos adversos significativos, como neurotoxicidad y morbilidad en pacientes crónicos. En un estudio reciente realizado en el laboratorio, encontramos que Ivermectina (IVM), una lactona macrocíclica derivada de Avermectina, podría ser eficaz como tratamiento para la infección producida por este microorganismo. Observamos que IVM tenía un efecto letal sobre los trofozoitos del parásito a altas concentraciones. Estos resultados nos alentaron a considerar a esta droga para el estudio del daño celular y del mecanismo de muerte celular programada (MCP) durante el ciclo celular de *G. lamblia*, teniendo en cuenta especialmente que este organismo carece de mitocondrias. Así, nos planteamos como objetivo general de esta tesina de grado para optar por el título de bióloga; comprender cómo IVM afecta los mecanismos de MCP en *G. lamblia*. En primer lugar, se determinó cual era la concentración de la droga necesaria para inhibir la proliferación celular en un 50%, es decir, la concentración inhibitoria media (CI₅₀). El valor obtenido fue $39,51 \pm 6,65 \mu\text{M}$ y, además, se observó una disminución de la viabilidad celular a medida que aumentaba la concentración de IVM. Para analizar el mecanismo de MCP, se analizaron las poblaciones celulares marcadas con Anexina V-Alexa 488 e Ioduro de propidio por medio de citometría de flujo. Los resultados mostraron un aumento significativo de células en apoptosis temprana a concentraciones de 40, 60 y 80 μM de IVM en comparación con el control. Además, las concentraciones más altas de IVM (60 y 80 μM) exhibieron una mayor cantidad de células en apoptosis tardía/necrosis. La electroforesis en gel de agarosa confirmó la degradación del ADN con el aumento de la concentración de la droga. También, se demostró que la droga produce un arresto en la fase S del ciclo celular del parásito. Estos hallazgos confirman que IVM tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los trofozoitos de *G. lamblia* y que esta droga induce MCP en este parásito protozoario.

Palabras Clave: *Giardia lamblia*, protozoo, parásito, drogas antiparasitarias, Ivermectina, apoptosis, necrosis.

SUMMARY

Giardia lamblia is an unicellular parasitic protozoan that causes an infection known as giardiasis. The disease can be asymptomatic or lead to acute illness and, in some cases, it can become chronic. The treatment currently used has remained unchanged for the past 50 years and is based on the administration of Nitroimidazole-derived drugs. Although these drugs are effective, they can also cause significant adverse effects, such as neurotoxicity and morbidity in chronic patients. In our laboratory, we found that Ivermectin (IVM), a macrocyclic lactone derived from Avermectin, could be effective as a treatment for the infection caused by this microorganism. We observed that IVM had a lethal effect on trophozoites at high concentrations. These results encouraged us to consider this drug for the study of cellular damage and the programmed cell death (PCD) mechanism during the cell cycle of *G. lamblia*, especially considering that this organism lacks mitochondria. Thus, our general objective in this undergraduate Biology thesis is to understand how IVM affects the PCD mechanisms in *G. lamblia*. First, the concentration of drug required to inhibit cell proliferation by 50%, called mean inhibitory concentration (IC₅₀), was determined. The value obtained was 39.51±6.65 µM and we also observed that cell viability decreased as the drug concentration increased. To analyze the PCD mechanism, we examined cell populations labeled with Annexin V-Alexa 488 and Propidium Iodide using flow cytometry. The results showed a significant increase in early apoptosis cells at concentrations of 40, 60, and 80 µM of IVM compared to the control. Furthermore, higher concentrations of IVM (60 and 80 µM) exhibited a higher number of cells in late apoptosis/necrosis. Agarose gel electrophoresis confirmed DNA degradation with increasing drug concentration. Additionally, it was demonstrated that the drug induces a cell cycle arrest in the S phase of the parasite's cell cycle. These findings confirm that IVM has an inhibitory effect on the growth of *G. lamblia* trophozoites and that this drug induces PCD in this protozoan parasite.

Keywords: *Giardia lamblia*, protozoa, parasite, Ivermectin, antiparasitic drugs, apoptosis, necrosis.

INTRODUCCIÓN

1. Taxonomía y sistemática

Giardia lamblia (sin. *Giardia duodenalis*, *Giardia enterica*, *Giardia intestinalis*) se encuentra dentro del Supergrupo **Eukaryota**, Clado **Metamonada**; Phylum **Fornicata**; Orden **Diplomonadida** según la base de datos de taxonomía del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>; **Tabla 1**). Los diplomonadidos tienen como característica distintiva una organización celular “doble”, con dos núcleos de idéntico tamaño ubicados juntos en la mitad anterior de la célula, y dos (o más) aparatos flagelares (Simpson & Čepička, 2009). En este grupo se incluyen microorganismos de ambientes anaeróbicos o microaerófilos, los cuales carecen de aparato de Golgi típico y de una mitocondria aeróbica, entre otras características (Cavalier-Smith & Chao, 1996). Dentro del Orden Diplomonadida se encuentran la Familia **Hexamitidae**, la cual incluye las Subfamilias **Hexamitinae** y **Giardiinae**, según la última revisión sistemática realizada por Adl et al. (2019). La principal diferencia entre estas dos Subfamilias es que la primera posee el surco ventral (excavado) de alimentación y un codón alterativo para glutamina, mientras que la segunda, no. **Giardiinae** se caracteriza por presentar los dos aparatos flagelares cercanos entre sí en el centro de la célula y entre los dos núcleos, a diferencia de los “hexamítidos”, los cuales están ubicados separados unos de otros y generalmente hacia el "exterior" de la célula. El miembro más conocido dentro de Giardiinae es el género *Giardia*, dentro del cual encontramos a *G. lamblia*. Este organismo es verdaderamente inusual entre los diplomonadidos debido a que presenta una simetría bilateral superficial en vez de una simetría radial (Simpson & Čepička, 2009). El rasgo apomórfico de este parásito es que cuenta con la presencia del denominado disco adhesivo en la zona ventral de la célula, el cual al contraerse genera una presión negativa que le permite fijarse a las paredes del intestino de su hospedador (Sousa et al., 2001).

Tabla 1. Clasificación de *Giardia lamblia* según Adl et al. (2019). Se incluyen además algunos clados “excavados” importantes para comprender las relaciones del patógeno de interés con otros grupos.

	Phylum	Orden	Familia	Subfamilia	Especie
Metamonada	Fornicata	Diplomonadida	Hexamitidae	Hexamitinae	
				Giardiinae	<i>Giardia lamblia</i>
	Parabasalia				
	Preaxostyla	Oxymonadida			
Discoba					
Malawimonadidae					

2. Ubicación de *Giardia lamblia* en la historia evolutiva eucariota

Una comprensión precisa de las relaciones evolutivas es fundamental en biología. Para los parasitólogos, entender las relaciones entre organismos eucariotas permite la predicción de mecanismos de virulencia, comprensión de las interacciones hospedador-agente infeccioso, identificación de potenciales dianas farmacológicas y reconstrucción de vías metabólicas, entre otras (Dacks et al., 2008). Es por ello que consideramos pertinente la evaluación del recorrido taxonómico de la especie de interés en la historia de la sistemática eucariota.

Una revisión reciente de la clasificación de los eucariotas, con énfasis en los protistas, ha incorporado la información de secuencias de ADN de relevancia filogenética para esclarecer las relaciones evolutivas y mejorar la resolución de algunos nodos en conflicto. Entre los principales cambios que se propone en esta revisión encontramos, por un lado, la confirmación de que los eucariotas forman al menos dos dominios, y por el otro, la pérdida de monofilia en Excavata (Adl et al., 2019). Es importante mencionar que el término “protistas” es meramente informal, aunque muy utilizado, y hace alusión principalmente a “eucariotas unicelulares” o “eucariotas microbios”. Los protistas, en general, son microscópicos y unicelulares, sin embargo, dentro de este grupo parafilético también encontramos representantes de mayor tamaño o que forman agregaciones pluricelulares (Pawlowski, 2014). Desde una perspectiva evolutiva, el ancestro común de los protistas es también el ancestro de todos los eucariotas conocidos. Usualmente en la

bibliografía puede encontrarse el uso de “los cinco reinos” para clasificar la diversidad biológica, separando a los protistas (unicelulares y microscópicos) de otros taxa multicelulares y macroscópicos, como animales, plantas y hongos. Sin embargo, esta separación no tiene otra justificación que nuestra perspectiva antropocentrista. Por esta razón, se ha abandonado el sistema de los 5 reinos y ha sido reemplazado por un sistema más objetivo y filogenético en eucariotas (Pawlowski, 2014). De acuerdo a esto, los eucariotas son clasificados dentro de dos Dominios denominados Amorphea y Diaphoretickes (**Fig. 1**).

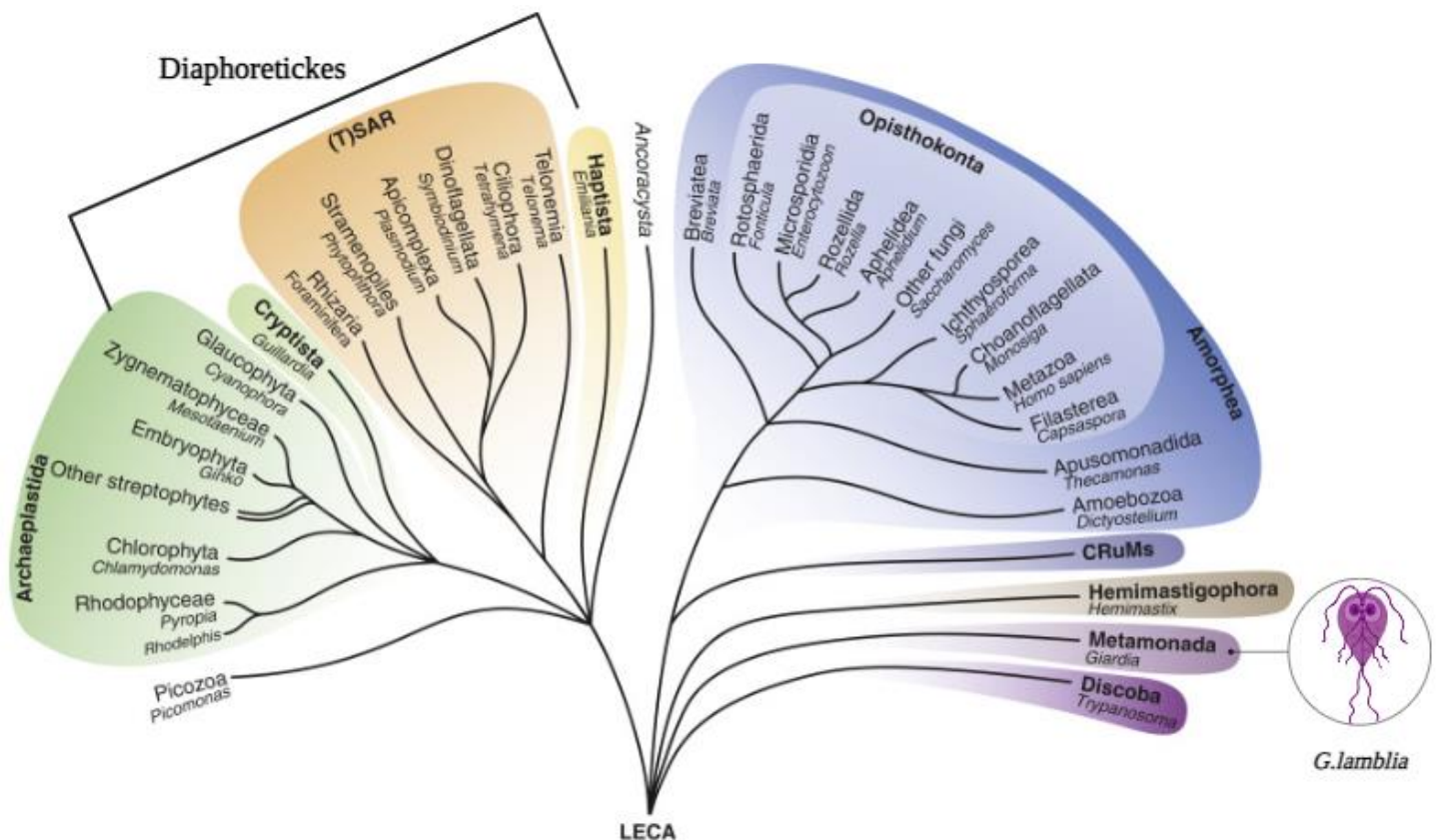


Figura 1. Esquema actual del árbol de la vida eucariótico. En la base del árbol se encuentra LECA por las siglas Last Eukaryotic Common Ancestor (aunque se discute que LECA sea una “única célula”, se considera que puede haber sido una población de células muy sofisticada, heterótrofas y generalistas) (More et al., 2020). A partir de este ancestro común se diversifican los principales supergrupos, que se encuentran referenciados en negrita. Se destaca Amorphea englobando a Opisthokonta y Amoebozoa; y a Diaphoretickes abarcando los supergrupos Archaplastida, (T)SAR y a Haptista y Criptista. Podemos observar que el microorganismo de interés se encuentra en Metamonada, cercano a Discoba, pero no incluido en Amorphea ni tampoco en Diaphoretickes. Esquema adaptado de More et al. (2020).

Las filogenias están en constante revisión ya que los estudios de la ubicación taxonómica de los organismos en los árboles eucarióticos han sido interpretados según los conocimientos científicos disponibles en ese momento de la historia. *Giardia lamblia*

no está exenta de esto. De hecho, este parásito se agrupa, junto con otros grupos (principalmente parabasálidos y oximonadidos), bajo el nombre de “eucariotas amitocondriados”. Los organismos bajo esta terminología, históricamente han sido especialmente importantes desde el punto de vista evolutivo, ya que su estudio posibilitaba formular hipótesis sobre los primeros eventos de la evolución eucariota (Simpson & Čepička, 2009). Como se sabe, el origen de la célula eucariota se dio a través de varios procesos endosimbióticos, actualmente llamada “teoría endosimbiótica serial” (TES) postulada por Lynn Margulis en 1970 (Margulis, 1990). Brevemente, de esta teoría se destaca que las organelas como las mitocondrias habrían derivado de una célula procariota, específicamente una alfa proteobacteria, hace 1500 o 2000 millones de años. Esta bacteria habría formado una asociación simbiótica con la célula hospedera eucariota o "proto-eucariota", y luego, el simbiote se convertiría en una organela de la célula hospedera. Bajo este marco evolutivo, muchos investigadores propusieron que los eucariotas amitocondriados podrían ser ramas tempranas de la "línea principal" de descendencia eucariota que se habría separado antes de la adquisición de estas organelas. Y, además, proponían que los grupos que presentaban organelas “parecidas a las mitocondrias” (como los mitosomas de *G. lamblia*) habrían sido resultado de un evento de endosimbiosis posterior que involucraba a un procariota simbiote diferente. Sin embargo, a fines del siglo pasado, esta hipótesis de "mitocondrias tardías" fue refutada por la comunidad científica. Numerosas investigaciones genómicas demostraron que estos eucariotas amitocondriados, en realidad, derivan del mismo evento endosimbiótico que originó la “mitocondria propiamente dicha o canónica” (Simpson & Čepička, 2009).

De esta manera, los viejos paradigmas sobre los eucariotas han pasado de considerar a *Giardia* como un organismo “primitivo” a valorarlo como un representante de clados que han sufrido una ultra especialización para sus funciones específicas y su contexto ambiental. La gran cantidad de datos genómicos comparativos que actualmente se encuentran disponibles, han permitido postular incluso que el último ancestro común eucariota era aparentemente complejo, sugiriendo que las adaptaciones específicas de cada linaje y las pérdidas secundarias han sido realmente importantes en la historia evolutiva de la vida (Cavalier-Smith & Chao, 1996). Estos modelos de la evolución eucariótica permitirán a los parasitólogos hacer inferencias más precisas y confiables sobre los patógenos que causan enfermedades significativas en la salud a nivel global (Dacks et al., 2008).

3. Especies de *Giardia* y ensamblajes genotípicos

La nomenclatura taxonómica de las especies del género *Giardia* han sido discutidas durante más de un siglo (Wielinga et al., 2023). Hasta el momento, se aceptan ocho especies de *Giardia*, las cuales afectan a una amplia variedad animales filogenéticamente distintos que van desde anfibios hasta mamíferos (**Tabla 2**) (Adam, 2021). En este trabajo se utilizará la nomenclatura *G. lamblia*, la más utilizada en la investigación científica.

Tabla 2. Especies de *Giardia*. Extraído y modificado de Adam (2021) y Monis et al., (2009).

Especies	Hospedadores	Morfología determinada por microscopia óptica	Genotipo	Tamaño del trofozoito	
				Largo	Ancho
<i>G. lamblia</i>	Humanos y otros mamíferos	Trofozoito en forma de “pera”; cuerpos medios en forma de garra	AI AII B C D	12-15 μm	6-8 μm
<i>G. muris</i>	Roedores	Trofozoito corto y redondeado; cuerpos medios pequeños y redondeados		9-12 μm	5-7 μm
<i>G. agilis</i>	Anfibios	Trofozoito largo y delgado; cuerpos medios en forma de lágrima		20-30 μm	4-5 μm
<i>G. psittaci</i>	Aves psitaciformes	Igual a <i>G. lamblia</i>		~14 μm	~6 μm
<i>G. microti</i>	Roedores	Igual a <i>G. lamblia</i>		12-15 μm	6-8 μm
<i>G. ardeae</i>	Garzas	Trofozoito redondeado, con flagelos caudales rudimentarios. Cuerpos medios ovalados o en forma de garra.		~10 μm	~6.5 μm
<i>G. peramelis</i>	Isodon obesulus	Igual a <i>G. lamblia</i>			
<i>G. cricetarum</i>	Hámsteres	Trofozoito corto y redondeado; más similar a <i>G. muris</i> que a otras especies			

Se han encontrado diferencias significativas en la secuencia de genes que codifican enzimas y proteínas dentro de la especie *G. lamblia*. Estas diferencias han llevado a la creación de una nueva nomenclatura que agrupa genotipos similares en grupos genéticos o ensamblajes (Monis et al., 2003). Se han definido los grupos A, B, C, D, E, F, G y H, y se ha demostrado que la mayoría de los genotipos tienen preferencias por ciertos hospedadores (**Tabla 3**) (Thompson et al., 2000, Monis et al., 2003).

Existe un debate en curso sobre la reclasificación de los ensamblajes de *G. lamblia* en especies separadas. Se espera que los proyectos actuales de secuenciación del genoma y estudios fenotípicos arrojen luz sobre este tema y ayuden a llegar a un consenso científico (Wielinga et al., 2023).

De los grupos A y B que infectan humanos, los aislados pertenecientes al grupo A han sido los más estudiados a nivel celular y molecular (Caccio et al., 2008). Específicamente, en este trabajo se utiliza la cepa WB- grupo A de *G. lamblia*.

Tabla 3. Grupos genéticos de *Giardia lamblia* y sus hospedadores

Ensamblaje	Hospedador
A	Humanos, Perros, Gatos, Ovinos, Porcinos, Chinchillas, Bovinos, Caballos, Castores, Alpaca
B	Humanos, Perros, Ratas, Ratones, Chinchillas, Castores
C	Perros
D	Perros
E	Bovinos, Porcinos, Ovinos
F	Gatos
G	Ratas
H	Focas, Gaviotas

4. Biología celular de *Giardia lamblia*

4.1 Ciclo de vida

Giardia lamblia posee un ciclo de vida simple, presentando dos estadios bien diferenciados: el trofozoito, que coloniza el intestino, y el quiste, que es responsable de la infección y transmisión del parásito (**Fig. 2**).

El quiste es la etapa ambientalmente resistente del ciclo de vida y posee características que le permiten sobrevivir en condiciones cambiantes. Tiene una tasa metabólica reducida en comparación con el trofozoito y una pared que consta de dos capas (Adam, 2021).

El trofozoito de *G. lamblia* representa la fase vegetativa y replicativa del parásito. Durante esta etapa, coloniza y se multiplica en el intestino delgado de sus hospedadores. Se adhiere a las microvellosidades intestinales gracias a su disco ventral, lo que le permite resistir el peristaltismo (Barash et al., 2017). Este trabajo se centrará exclusivamente en

el estudio del estadio del trofozoito de *G. lamblia*. A continuación, se detallarán sus características morfológicas.

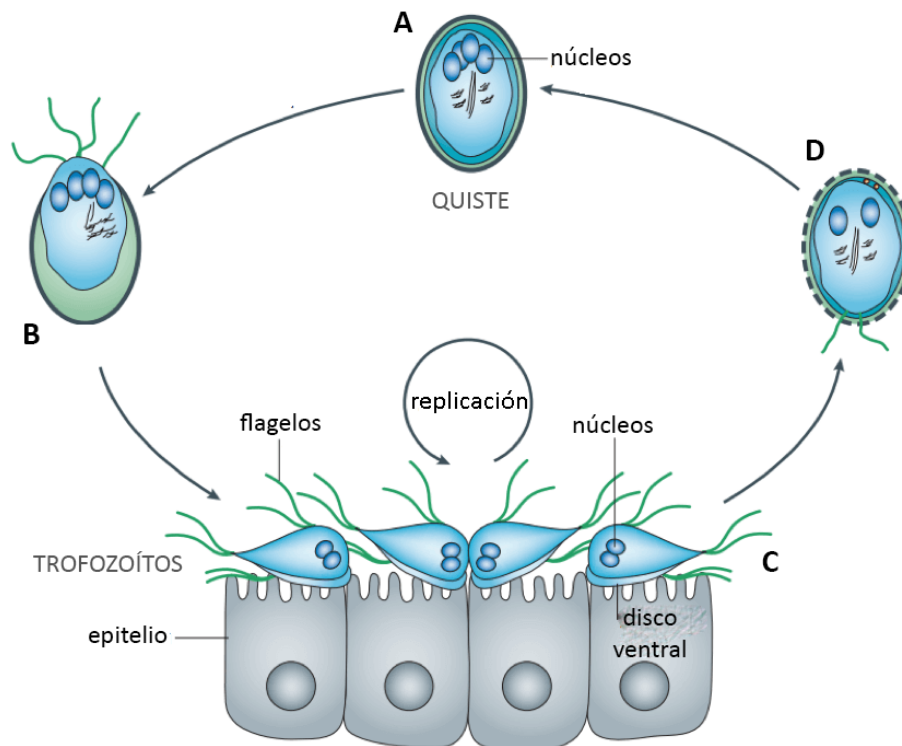


Figura 2. Ciclo biológico de *Giardia lamblia*. La infección comienza con la ingestión de quistes (A). A través de un proceso denominado desenquistamiento (B), que comienza en el estómago y culmina en el duodeno, se liberan los trofozoítos (C). Éstos, se duplican en el intestino delgado (fundamentalmente en el yeyuno) y, a medida que descienden por el intestino, son inducidos a enquistarse (D). Los quistes formados son finalmente eliminados con las heces cerrando el ciclo vital del parásito. Adaptado de Ankarklev et al., (2010).

4.2 El trofozoito

El trofozoito de *G. lamblia* tiene forma piriforme, con una cara posterior convexa y una cara anterior cóncava, siendo el único protozoario con simetría bilateral (Fig. 3).

Su tamaño oscila entre 9 a 15 μm de largo y 5 a 9 μm de ancho. Posee dos núcleos ovoides y diploides con envoltura nuclear y nucléolos (Adam, 2001).

El citoesqueleto del trofozoito incluye el disco ventral, los cuerpos medios y los 8 flagelos con sus cuerpos basales. El disco ventral (DV) es una matriz ordenada y compleja de microtúbulos que se contrae generando presión negativa para adherirse al epitelio

intestinal del hospedador (Sousa et al., 2001) o a las superficies inertes como los tubos de ensayo que se utilizan en laboratorios para su cultivo (Hagen et al., 2011).

(A)

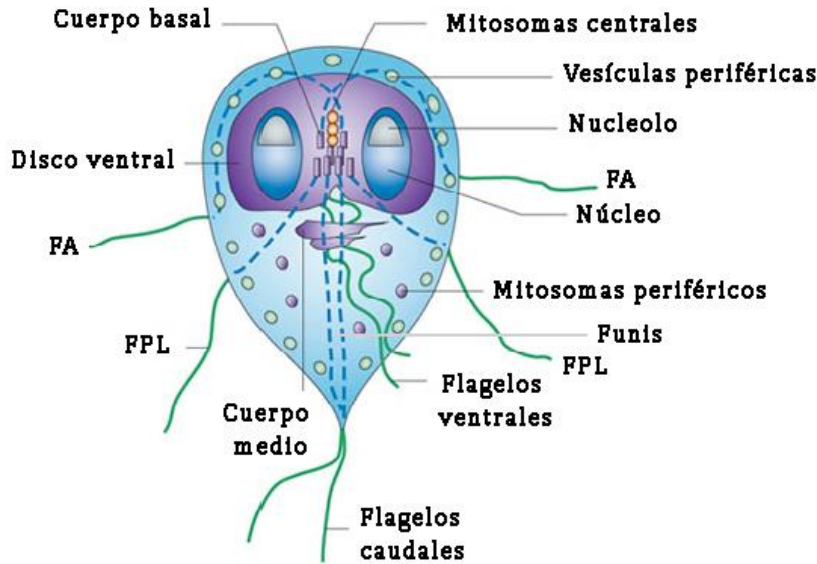
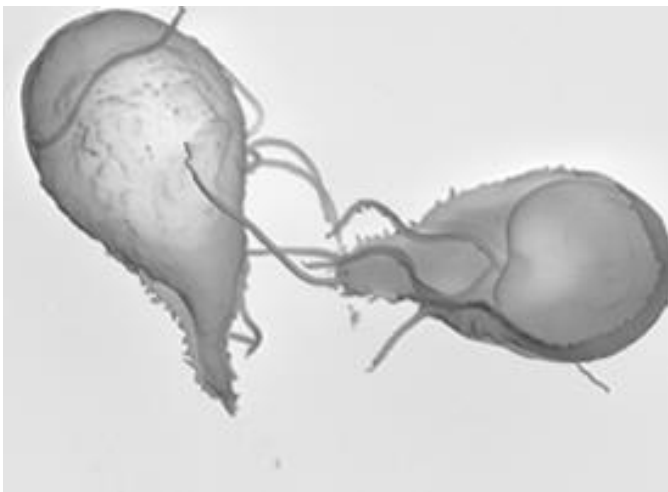


Figura 3. El trofozoito de *Giardia lamblia*.

A) Esquema del trofozoito de *Giardia lamblia* conteniendo dos núcleos, las vacuolas periféricas (PVs), el disco ventral, funis y los cuerpos medios. Los flagelos están organizados en cuatro pares; FA anteriores, FPL posterolaterales, FV ventrales y FC caudales. Adaptado de Ankarklev et al., (2010).

(B)



B) Microscopía de barrido de un trofozoito de *Giardia lamblia*.

Los cuatro pares de flagelos se organizan en la estructura convencional de microtúbulos eucarióticos 9+2 (presentan una estructura de axonema caracterizada por 9 pares de microtúbulos exteriores que rodean a un par central) y se denominan flagelos anteriores, posterolaterales, ventral y caudal (**Fig. 3**) (Adam, 2021). Los cuerpos basales, también llamados cinetostomas, están compuestos por tripletes de microtúbulos y hay ocho de ellos en *G. lamblia* (McInally & Dawson, 2016).

Dentro de las estructuras que componen el citoesqueleto también se encuentran los cuerpos medios (**Fig. 3**), cuya función es todavía desconocida (Adam, 2021). Perpendicularmente a los cuerpos medios se encuentra el funis (**Fig. 3**), compuesto por microtúbulos individuales que están involucrados en la contracción caudal (Benchimol et al., 2004, Carvalho & Monteiro-Leal, 2004).

Giardia lamblia tiene un par de núcleos simétricos (**Fig. 3**), que se replican sincrónicamente durante la etapa vegetativa de su ciclo de vida. Ambos núcleos son equivalentes en términos de ADN, secuencias de ADN ribosómico y actividad transcripcional (Simpson & Čepička, 2009). Cada núcleo contiene cinco cromosomas diferentes resultando en un genoma haploide de tamaño de 12 Mb. Durante G1, cada núcleo es diploide (2N), por lo que el trofozoito resulta así tetraploide (4N) (Svärd et al., 2003).

Una característica interesante de *G. lamblia* es la presencia de mitosomas (**Fig. 3**). Esta organela, también conocida como “organela similar a una mitocondria” según biólogos evolutivos, no se encuentra sólo en este parásito, sino también en otros diplomonadidos y en *Microsporidia* y *Entamoeba*, taxa que están evolutivamente alejadas de Diplomonadida y Parabasalia en el árbol filogenético (Simpson & Čepička, 2009). Los mitosomas de las especies de *Giardia* son formas altamente adaptadas de mitocondrias y tienen un tamaño aproximado de 100 nm. Están rodeados por dos membranas, pero a diferencia de las mitocondrias, no contienen ADN ni producen ATP (Martincova et al., 2015). La ausencia de mitocondrias en *G. lamblia*, como se mencionó con anterioridad, se cree que es el resultado de una pérdida secundaria en lugar de la divergencia de un eucarionte ancestral antes de adquirir esta organela (Simpson & Čepička, 2009).

Con respecto a las estructuras celulares internas, *G. lamblia* presenta un sistema de endomembranas particular, ya que carece de un aparato de Golgi morfológicamente discernible (Adam, 2001). La membrana que delimita cada uno de los núcleos se prolonga y conforma el retículo endoplasmático, el cual ocupa la mayor parte de la extensión citoplasmática de la célula (Soltys et al., 1996) e interviene, sumado a sus funciones clásicas, en el direccionamiento de proteínas (Touz & Zamponi, 2017). De modo característico, *G. lamblia* presenta un sistema de vacuolas periféricas que se localizan próximas a la superficie de la membrana plasmática del lado citosólico de la misma (Lanfredi-Rangel et al., 1998, Rivero et al., 2013) (**Fig. 3**). Dichas vacuolas han mostrado

tener actividad lisosomal, como así también estar relacionadas con procesos endosomales (Lanfredi-Rangel et al., 1998, Thirion et al., 2003, Touz et al., 2003, 2004) (**Fig. 3**).

5. Epidemiología en humanos

La giardiasis es una enfermedad intestinal causada por el parásito protozoario *G. lamblia* y es la principal causa de diarrea no viral y no bacteriana a nivel mundial (Adam, 2001). La infección comienza con la ingestión del quiste, el cual, puede provenir de agua no tratada y de alimentos contaminados (Adam, 2021), o mediante la manipulación de juguetes contaminados y/o arena provenientes de areneros infantiles (Benchimol et al., 2023). Una pequeña cantidad de 10 quistes es suficiente para causar la enfermedad (Farthing, 1997, Gillin et al., 1996).

Esta enfermedad es cosmopolita, siendo *G. lamblia* uno de los parásitos entéricos más prevalentes a nivel mundial (Li et al., 2023). En países en desarrollo, donde los recursos sanitarios son deficientes, se han informado que las tasas de prevalencia de la giardiasis son consistentemente altas en infantes, con altas tasas de infección repetida incluso dentro del primer año de vida. Por otra parte, en países desarrollados se reportan regiones con giardiasis endémica o brotes regulares (Gutiérrez, 2017), por ejemplo, Estados Unidos (EE. UU) presenta 1 millón de casos de giardiasis por año (Coffey et al., 2020). Incluso, el último informe realizado por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de EE. UU (CDC) a través del Sistema Nacional de Vigilancia de Enfermedades Notificables (NNDSS) expuso que durante el período 2012-2017 se reportaron 111 brotes de giardiasis en 26 estados (Connors et al., 2021).

Particularmente en América Latina, se ha descrito que las prevalencias de giardiasis oscilan entre el 30%, 22% y 16% para Argentina, Perú y Brasil respectivamente (Li et al., 2023). Aunque, más países de Latinoamérica deben realizar mayores esfuerzos para generar datos de prevalencia, incidencia e intensidad de esta enfermedad (Sarria-Guzmán et al., 2022). En Argentina, un estudio sobre la parasitosis intestinal en poblaciones infantiles y juveniles realizadas en 6 provincias determinó que entre las especies de parásitos más prevalentes se encontraba *G. lamblia* (17,0% de prevalencia) (Cociancic et al., 2021). En otra revisión reciente, se muestra que en Argentina existen infecciones por *G. lamblia* en 15 de las 23 provincias. Este parásito también se detectó en muestras de suelo y agua recogidas en las regiones de la Pampa, la Patagonia y el

noroeste del territorio argentino. Por lo tanto, este protozooario y la infección que causa, son de preocupación para la salud pública de nuestro país (Rivero et al., 2020). Entre los individuos con mayor vulnerabilidad a adquirir la infección se encuentran niños de entre 1 a 4 y de 5 a 9 años de edad, siendo este grupo en el que se reporta el mayor número de casos de giardiasis (Luján & Svard, 2011). Un segundo grupo corresponde al de individuos inmunosuprimidos (Ankarklev et al., 2010).

6. Patogénesis en humanos

La infección por *G. lamblia* puede causar diversas alteraciones en el intestino, como cambios en la permeabilidad, respuestas inmunológicas y deficiencias en la absorción (Thompson & Monis, 2004). La sintomatología suele aparecer entre 6 y 15 días después de la infección y varía desde casos asintomáticos o infecciones agudas auto limitadas, hasta la enfermedad crónica, con presencia de diarrea, deshidratación, distensión abdominal, náuseas, vómitos, hinchazón y/o malabsorción. Las consecuencias a largo plazo incluyen fatiga crónica, intestino irritable y, en niños pequeños, retraso en el crecimiento. Además, estudios recientes han sugerido que las personas con patologías gastrointestinales como colon irritable, estarían asociadas con una infección previa por *G. lamblia* (Ankarklev et al., 2010). La gravedad de la enfermedad depende de diversos factores, incluyendo los factores de virulencia del parásito y el estado de desarrollo, nutricional e inmunológico del hospedador (Thompson & Monis, 2004).

7. Diagnóstico

El diagnóstico de giardiasis se realiza mediante la detección del parásito en muestras fecales utilizando microscopía óptica. Esto puede lograrse mediante la observación de quistes o trofozoitos en una muestra fresca, aunque la precisión depende de la experiencia del operador y puede haber confusiones con otros compuestos en la muestra (Adam, 2021). Muchas veces para confirmar el diagnóstico es necesario utilizar técnicas más costosas y poco accesibles como ensayos de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), ensayos de inmunofluorescencia (IFA) o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), especialmente si persisten los síntomas después del tratamiento con antibióticos (Lujan & Svård, 2011).

8. Tratamiento

Tabla 4. Principales drogas contra *Giardia lamblia* utilizadas en el tratamiento de la giardiasis.

Extraído y modificado de Benchimol et.al, (2023).

Droga	Dosis	Mecanismo	Efectos adversos
Metronidazol	En adultos 250 mg tres veces al día x 5-7 días. Niños: 15 mg/kg tres veces al día x 5-7 días	Reduce grupos nitro; forma intermediarios toxicas	Sabor metálico, náuseas, dolor de cabeza, orina oscurecida. Con menos frecuencia: pancreatitis, toxicidad en el sistema nervioso central.
Albendazol	400 mg diarios una vez al día x 5 días en adultos. 15 mg/kg diarios x 5-7 días en niños mayores a 6 años	Se une a los microtúbulos y forma “caps” en los extremos positivos (Oxberry et.al, 1994)	Interacciones farmacológicas con Ampicilina. Los efectos adversos son más frecuentes en niños: malestar abdominal, náuseas, vómitos, dolor de cabeza, mareos y aumentos reversibles en las transaminasas hepáticas y anorexia.
Quinacrina	100 mg tres veces al día x 5-7 días en adultos. 6 mg/kg tres veces al día x 5 - 7 días en niños.	Inhibe la síntesis de ADN	Náuseas, vómitos, coloración amarillo-naranja de la piel, la esclerótica y la orina; pigmentación de uñas, dolor de cabeza, urticaria, dermatitis exfoliativa y alteraciones psiquiátricas.
Nitazoxanida	Dos dosis diarias de 500 mg x 3 días en adultos. 7.5 mg/kg dos veces al día x 3 días en niños.	Inhibe la actividad de ciertas enzimas como la nitroreductasa	Afecciones gastrointestinales, como diarrea y malestar abdominal los cuales parecen ser dosis dependientes. Puede ocasionar dolor de cabeza, mareos, somnolencia, insomnio e hipostesia.
Paramomicina	500 mg tres veces al día x 5-10 días en adultos. 25-30 mg/kg/ tres veces al día x 5-10 días en niños	Inhibe la síntesis de proteínas	Puede inducir ototoxicidad y nefrotoxicidad.
Furazolidona	400 mg tres o cuatro veces al día x 7-10 días en adultos. 2 mg/kg cuatro veces al día x 10 días en niños.	Reduce la furazolidona; forma intermediarios toxicas	Náuseas, vómitos, dolor de cabeza, malestar general, reacciones de hipersensibilidad, hipotensión, erupción cutánea y urticaria. Se ha comprobado su carcinogénesis en roedores y mutagenicidad en bacterias

La giardiasis puede ser tratada con varios fármacos (**Tabla 4**), siendo los nitroimidazoles como Metronidazol o Tinidazol los más efectivos debido al metabolismo anaeróbico de *G. lamblia*, el cual es muy similar a ciertas bacterias (Ahmed, 2023). Albendazol también se utiliza como tratamiento de primera línea. Sin embargo, se han informado efectos secundarios asociados a estos fármacos y se ha observado resistencia *in vitro* por parte del parásito (Lopez-Velazquez et al., 2019). En la búsqueda de fármacos alternativos, proponemos en este trabajo el estudio de Ivermectina (IVM) como nueva terapia efectiva contra la giardiasis, con el objetivo de aumentar la probabilidad de éxito en el tratamiento.

9. Muerte celular programada

La muerte celular (MC) se define como el colapso de los procesos metabólicos provocados por estímulos químicos y/o físicos. En los organismos multicelulares, la muerte celular es un paso esencial para una gran variedad de eventos fisiológicos, como la embriogénesis y la remodelación de tejidos (Menna-Barreto, 2019). Hace casi medio siglo, se postuló un aspecto no accidental de la muerte celular, relacionado con una secuencia de eventos sincronizados y se lo denominó muerte celular programada (MCP) (Lockshin & Williams, 1965). Más recientemente, se han propuesto diferentes fenotipos asociados con distintas vías de MCP, entre las que se incluyen; la apoptosis, la autofagia y la necrosis (Menna-Barreto, 2019).

La muerte celular puede ser predeterminada, programada y limpiamente ejecutada, como en el caso de la apoptosis, o puede ser abrupta, inflamatoria y estocástica, como ejemplifican muchos tipos de necrosis. Sin embargo, existe una variedad de tipos de MC dependiendo del organismo que se trate. Actualmente, no se conocen los mecanismos exactos involucrados de la MCP en eucariotas unicelulares, convirtiéndose en una temática de interés para la biología (Menna-Barreto, 2019), ya que permitiría ampliar los conocimientos sobre biología celular y, además, podría permitir el diseño de nuevas estrategias terapéuticas contra enfermedades infecciosas, proliferativas, degenerativas y autoinmunes (Nirmala & Lopus, 2020).

La apoptosis (MCP tipo I) es uno de los mecanismos más complejos debido a los diferentes componentes morfológicos y moleculares que involucra. Las características morfológicas de la apoptosis son la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear, la reducción del volumen celular, la formación de vesículas en la membrana, la modificación ultraestructural de organelas, la externalización de la fosfatidilserina (PS), la pérdida de la integridad de la membrana celular y la formación de cuerpos apoptóticos (D'Arcy, 2019, Menna-Barreto et al., 2009). También, hay cambios bioquímicos destacables, como la activación de caspasas (proteasas cisteína-aspartato específicas), la degradación de ácidos nucleicos y proteínas, y la alteración de la membrana celular (Duprez et al., 2009, Elmore, 2007, Felix et al., 2020, Galluzzi et al., 2007).

La apoptosis generalmente se puede ejecutar a través de tres vías diferentes; la vía extrínseca, la vía intrínseca (también llamada vía mitocondrial) y la vía inducida por estrés del retículo endoplásmico (estrés ER) (Nirmala & Lopus, 2020). Como se mencionó precedentemente, la ausencia de mitocondrias en *G. lamblia* planteó el

interrogante de si este parásito podría desencadenar un proceso apoptótico. Sin embargo, aún sin mitocondrias, en el año 2012 este protozoario se incluyó en el grupo de organismos unicelulares que podrían llevar a cabo la apoptosis para inducir la MCP (Bagchi et al., 2012). Además, algunas investigaciones postularon que, en este tipo de organismos unicelulares, la MCP podría estar más relacionada con la capacidad de cada célula para inducir o reprimir su autodestrucción, dependiendo de sus interacciones presentes y pasadas con las demás células que constituyen la comunidad y la integridad de sus componentes internos, más que con su destino individual (Touz et al., 2005, 2008). En un estudio en el que sometieron a trofozoitos de *G. lamblia* a estrés oxidativo y a condiciones de ayuno, se observó la presencia de un mecanismo similar a la apoptosis, pero sin la participación de caspasas, ya que no pudieron detectar la actividad de estas enzimas. Sin embargo, el estudio muestra que hay fragmentación del ADN nuclear y presencia de cambios morfológicos asociados con MCP (Ghosh et al., 2009). Todas estas evidencias sugieren que *G. lamblia* podría poseer una vía novedosa, no clásica, de inducción de muerte celular por apoptosis.

La autofagia (MCP tipo II) involucra el sistema autofagosoma-lisosoma. Los autofagosomas son vesículas de doble membrana responsable de la envoltura de componentes del citoplasma, durante el recambio de orgánulos (Bruchhaus et al., 2007, Li & He, 2017). Después de la fusión autofagosoma-lisosoma, se forma un autofagolisosoma en el que se digieren los residuos celulares. La autofagia es crucial para mantener el balance metabólico y el reciclado de estructuras celulares durante el crecimiento y desarrollo celular. La desregulación de dicho equilibrio puede iniciar la MC como resultado de un ayuno prolongado o estrés oxidativo (Bruchhaus et al., 2007). Aunque se sabe poco sobre la autofagia en *G. lamblia*, algunos estudios sugieren que este parásito unicelular podría tener un sistema de autofagia funcional ya que, en condiciones de ayuno, se describieron cambios que se asemejan a esta vía (Correa et al., 2009). Mediante un análisis bioinformático del genoma, se encontraron algunos genes putativos asociados con la autofagia en *G. lamblia*, entre ellos TOR, S6K1, PI3K, ATG1, ATG16, ATG7 y ATG8 (Bagchi et al., 2012, Cernikova, 2019). La falta de muchos otros genes relacionados con este mecanismo de MC, como p62 y ATG5, sugiere también una vía de autofagia incompleta o poco común en este parásito.

Claramente, estos procesos difieren de la necrosis, ya que esta última se encuentra asociada a daño celular extremo que causa alteraciones dramáticas en la función mitocondrial, vacuolización citoplasmática y, en última instancia, el colapso de la

membrana plasmática. El proceso de reciclaje de las células muertas en la necrosis es más lento y menos regulado, debido a la ausencia de señales celulares específicas, conduciendo a una importante respuesta inflamatoria (D'Arcy, 2019, Menna-Barreto et al., 2009). En el caso particular de *G. lamblia*, fue reportado que Linearolactona produce alteraciones ultraestructurales en los trofozoitos como ejemplo; cambios en la abundancia de vacuolas, aparición de espacios perinucleares y periplásmicos y el depósito de gránulos de glucógeno. De esta manera, es posible identificar un tipo de necrosis en este parásito, aunque los mecanismos moleculares subyacentes son todavía desconocidos (Arguello-García et al., 2022).

10. Ivermectina

Ivermectina es un compuesto orgánico que pertenece a la familia de las avermectinas, lactonas macrocíclicas producidas por la bacteria *Streptomyces avermitilis*. Algunos autores sugieren que IVM puede ser postulada como una droga que podría ayudar a mejorar la salud pública global mediante el tratamiento de una diversa gama de enfermedades, teniendo potencial como agente antibacteriano, antiviral de amplio espectro (ha demostrado ser eficaz contra varios virus de ADN y ARN) y antihelmíntico (Nabi-Afjadi et al., 2023). Se comenzó a utilizar en el año 1981 como un medicamento de aplicación en veterinaria y, seis años más tarde, fue aprobado para su uso en humanos para el tratamiento de oncocercosis, también conocida como ceguera del río (Crump, 2017, Gloeckner et al., 2010). La eficacia antiparasitaria de IVM no se limita a la oncocercosis, ya que también es efectiva para infecciones causadas por *Wuchereria bancrofti* y *Brugia malayi*. Además, IVM también elimina la coinfección con varios helmintos transmitidos por el suelo, incluidos *Ascaris lumbricoides* y *Strongyloides stercoralis*, y algunos ectoparásitos como *Sarcoptes sarna* (Laing et al., 2017). También, se emplea para tratar la tripanosomiasis, la malaria y la leishmaniasis (Global Burden of Disease et al., 2017). Los estudios llevados a cabo por el Dr. Campbell y el Dr. Omura relacionados al uso de IVM como un antiparasitario, les valieron el Premio Nobel en Fisiología y Medicina en el año 2015 (compartido con la Dra. Youyou Tu). Si bien la eficacia de IVM en el tratamiento de un amplio espectro de infecciones parasitarias está bien establecida, su modo de acción es menos claro. A concentraciones nanomolares, IVM afecta la motilidad, alimentación y reproducción de los nemátodos y actúa a través

de los canales de cloruro dependientes de ligando, específicamente los activados por el glutamato en *Caenorhabditis elegans* (Cully et al., 1994, Yates et al., 2003). Los canales de cloruro dependientes de glutamato (GluCl_s) no están presentes en los vertebrados, por lo que le confiere un amplio margen de seguridad a IVM. Así, a nivel celular, IVM actúa como un ionóforo y regula los canales de cloruro para generar apoptosis y muerte celular osmótica. En ensayos previos realizados en el laboratorio donde se desarrolla la presente tesina, se observó que IVM tenía un efecto letal sobre los trofozoitos si las concentraciones utilizadas eran mayores a 80 μM (Mayol et al., 2019). Estos resultados promisorios nos alentaron a considerar a esta droga para desentrañar los mecanismos asociados a la muerte celular programada, un evento poco estudiado en protozoarios parásitos.

Uno de los detalles más importantes sobre IVM es que es un compuesto utilizado por aproximadamente 250 millones de personas por año para tratar distintas parasitosis (Ashour, 2019). Las formas farmacéuticas de IVM incluyen tabletas de dosis única y lociones de uso tópico. Las dosis orales de esta droga presentan una farmacocinética de absorción intestinal con concentraciones plasmáticas de 62 μM , viaja conjugada a lipoproteínas y, luego de metabolizarse en el hígado, es excretada con las sales biliares (Al-Azzam et al., 2007, Baraka et al., 1996, Kitzman et al., 2006, Lanusse et al., 1997, Londoño et al., 2017, Okonkwo et al., 1993). Esto resulta interesante ya que es el intestino delgado el sitio que *G. lamblia* coloniza y donde estaría directamente expuesta a concentraciones de IVM, al menos, mayores a 60 μM . Estas características hacen de IVM una droga prometedora para tratar la giardiasis.

Particularmente en Argentina, la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) reporta en el Vademécum Nacional de Medicamentos, el cual es una fuente oficial de actualización permanente, que IVM se encuentra autorizada en dicho país, tanto para absorción sistémica en las formas farmacéuticas comprimidos y solución oral, como para la administración tópica en forma de crema al 0.5% y 1% para pediculosis y rosácea respectivamente. Un ejemplo de una forma farmacéutica avalada por la ANMAT es “IVER P” del laboratorio Elea Phoenix S.A. (IVER P comprimido, Cert. N° 55983, ANMAT) (ANMAT, 2023).

En la actualidad, muchos laboratorios intentan responder a la pregunta de si IVM es segura para bebés y niños. Hasta el momento, IVM oral se ha recomendado solo para adultos o personas cuyo peso superen los 15 kg. Sin embargo, los niños son los principales

afectados por *Giardia* en nuestro país. Recientemente, se realizó un estudio donde se probó que la droga era segura en niños infectados con helmintos. En dicho trabajo, evaluaron la eficacia y seguridad de IVM oral (200–600 $\mu\text{g kg}^{-1}$) en niños en edad preescolar y escolar infectados con *Trichuris trichiura*, demostrando que el medicamento podría ser seguro ya que presentó eventos adversos leves y ausencia de toxicidad en órganos según los biomarcadores séricos analizados (Wimmersberger et al., 2018). En otro estudio llevado a cabo en Francia, se evaluó la seguridad y la eficacia probable de IVM oral para el tratamiento de la sarna en bebés y niños, demostrando que era eficaz en el tratamiento de la escabiosis en el 85 % de los pacientes (Morris-Jones, 2020). La literatura médica publicada actualmente sugiere que IVM oral podría ser segura hasta la actualidad para la administración en niños que tienen un peso superior a los 15 kg. La lista modelo de la Organización Mundial de la Salud publicada en 2021 (que se actualiza cada dos años) para medicamentos esenciales en niños incluye IVM oral para el tratamiento de infecciones filarias, helmintos intestinales y ectoparásitos (World Health Organization. WHO Model List of Essential Medicines for Children - 8th list, 2021. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MHP-HPS-EML-2021.03>). Sin embargo, todavía se requieren estudios de eficacia y regímenes de dosificación óptimos para garantizar que los niños reciban un tratamiento adecuado con IVM oral para otras enfermedades como la giardiasis.

Una comprensión clara de cómo funciona una droga es la vía inteligente para aumentar la probabilidad de éxito del tratamiento. Además, conocer el mecanismo de muerte de *G. lamblia* causado por la acción de IVM puede ayudar a identificar posibles mecanismos de resistencia que los trofozoitos pueden desarrollar en respuesta al uso repetido de la droga, lo que a su vez puede guiar el diseño de nuevas terapias y el uso adecuado de la droga existente.

OBJETIVOS

Objetivo general: Estudiar el mecanismo de muerte celular programada en *Giardia lamblia* inducida por IVM.

Objetivos específicos

Objetivo específico 1: Determinar la concentración de IVM que inhibe el 50% (CI₅₀) del crecimiento de los trofozoitos de *G. lamblia*.

Objetivo específico 2: Describir el mecanismo de muerte celular programada luego del agregado de IVM.

Objetivo específico 3: Evaluar la progresión del ciclo celular de *G. lamblia* luego del tratamiento con IVM.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismos y cultivos *in vitro*: Los trofozoitos de *G. lamblia* utilizados en este estudio fueron adquiridos de la cepa WB, clon 1267, disponible en la American Type Culture Collection (ATCC 50582) (Gillin et al., 1990). Para el cultivo axénico de los trofozoitos, se empleó el medio TYI-S-33 suplementado con 10% v/v de suero bovino adulto y 5% p/v de bilis bovina, conocido como medio completo de crecimiento (Gillin & Diamond, 1981). Los cultivos se llevaron a cabo en tubos de borosilicato con tapa a rosca (Eurotubo® Deltalab) que se llenaron hasta alcanzar un volumen total de 14 mL, agregando 100 µL de trofozoitos de *G. lamblia*. Estos tubos se colocaron en una estufa de cultivo inclinados a un ángulo de aproximadamente 45°, permitiendo una mejor adhesión de los trofozoitos a las paredes del tubo. Después de 30 min, se puede observar la adhesión de los trofozoitos a través de su disco ventral. De manera similar a lo que ocurre *in vivo*, las células se dividen, formando una monocapa de trofozoitos en crecimiento después de 48 horas. Para recolectar los microorganismos, los tubos que contenían las células en crecimiento se enfriaron a 4°C durante 30 min y luego se recuperaron mediante centrifugación a 2500 rpm durante 15 min a 4 °C.

Tratamiento con IVM. La droga, adquirida de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.), se disolvió en DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) hasta alcanzar su máxima solubilidad, obteniendo una solución madre de concentración 56 mg/mL. Los parásitos (5×10^5 células) se cultivaron durante 16 h en presencia de IVM, el grupo control consistió en trofozoitos tratados con DMSO (vehículo) al 0,5% p/v.

Objetivo 1: Determinar la concentración de IVM que inhibe el 50% (IC₅₀) del crecimiento de los trofozoitos de *Giardia lamblia*

La concentración inhibitoria media (CI₅₀) representa la concentración de la droga, en este caso IVM, requerida para inhibir la proliferación celular en un 50 % (García Manzano et al., 2020).

Se evaluó la actividad giardicida de IVM en un rango de concentraciones decrecientes (1/2), partiendo de una concentración máxima de 80 µM. Se utilizó el ensayo colorimétrico MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) para determinar la CI₅₀ del compuesto, mediante regresión no lineal con el software Graphpad Prism 9.0 (Graphpad Software, Inc., CA, USA).

Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos. En el primer pocillo de cada columna, se añadieron 297 μL de medio de cultivo completo y 3 μL de IVM 80 μM previamente disuelta en el vehículo (DMSO). En los pocillos siguientes de la misma columna, se agregaron 150 μL de medio de cultivo completo. Después de una correcta homogeneización del primer pocillo, se procedió a realizar una dilución seriada, transfiriendo 150 μL al pocillo subsiguiente, repitiendo este proceso hasta completar toda la columna. Posteriormente, se agregaron 5×10^5 trofozoitos de la cepa WB, clon 1267, en cada pocillo, excepto en las columnas correspondientes a los blancos, en las que solo se agregó medio de cultivo. El mismo procedimiento se realizó en la columna con IVM a 60 μM .

En la placa se incluyeron controles de viabilidad (con DMSO) y blancos (con medio de cultivo), realizándose el ensayo por triplicado. El diseño de la placa se detalla a continuación en la **Fig. 4**.

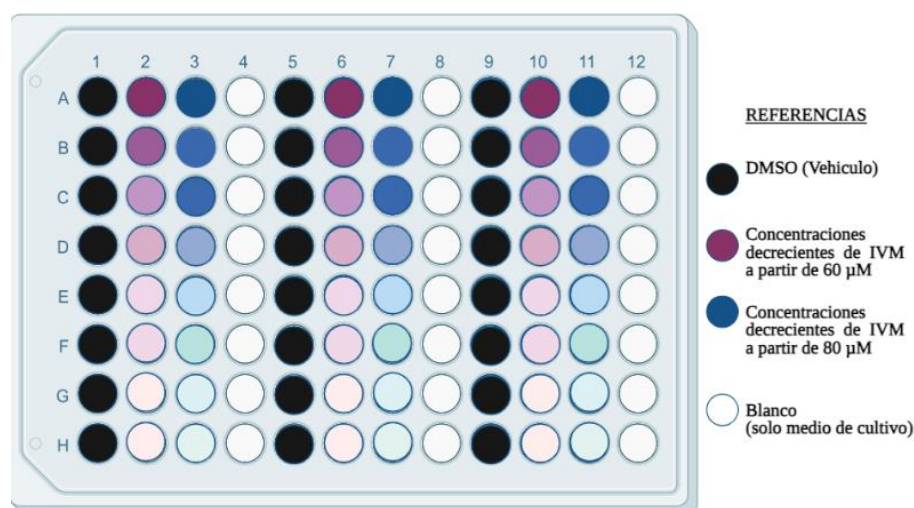


Figura 4. Diseño de la placa. Los pocillos correspondientes a los tratamientos contienen 150 μL de medio de cultivo, 3 μL de IVM 80 μM (ó 2 μL para el tratamiento de 60 μM según corresponda) previamente disuelta en DMSO y 150 μL de células (5×10^5 trofozoitos en medio de cultivo). En cuanto a los controles, los pocillos correspondientes al control de viabilidad poseen 150 μL de medio de cultivo + 3 μL de DMSO + 150 μL de células. Los que serán utilizados como blanco únicamente contienen 300 μL de medio. En la placa, se pueden observar columnas con colores en degradé, indicando que la concentración de IVM se diluye a la mitad en comparación con el pocillo de arriba.

Tras 48 h de incubación en anaerobiosis en una cámara de CO_2 (aproximadamente mayor al 90%) para placa diseñada por nuestro laboratorio, se lavó la placa 3 veces con PBS estéril mediante centrifugación. Los trofozoitos se resuspendieron en un volumen

final de 200 µL de PBS, se agregaron 20 µL de solución de MTT (5 mg/mL en PBS estéril pH 7,4) y se incubó por un período adicional de 4 h. Luego, se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min, los sobrenadantes fueron descartados y los cristales de formazán producidos por las células metabólicamente activas se solubilizaron en 100 µL de DMSO. La absorbancia se determinó empleando un lector de microplacas a 595 nm.

A partir de estas absorbancias se utiliza la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de citotoxicidad del fármaco (Joray et al., 2015):

$$\%Citotoxicidad = 1 - \frac{(Densidad\ óptica\ de\ células\ tratadas - Densidad\ óptica\ del\ blanco)}{(Densidad\ óptica\ de\ control\ con\ DMSO - Densidad\ óptica\ del\ blanco)} \times 100$$

El porcentaje de viabilidad celular se calcula como **% viabilidad = 1 - citotoxicidad**. Los valores obtenidos son utilizados para calcular la CI₅₀ del compuesto, mediante regresión no lineal utilizando el software Graphpad Prism 9.0 (Graphpad Software, Inc., CA, USA), siguiendo lo descrito por Mosmann (1983). Los resultados serán expresados como la media ± SE.

Objetivo específico 2: Describir el mecanismo de muerte celular programada luego del agregado de IVM

2.1 Análisis de Anexina-V y Ioduro de propidio por citometría de flujo e Inmunofluorescencia:

La Anexina V tiene la capacidad de unirse exclusivamente a la fosfatidilserina (PS) cuando este fosfolípido se encuentra en el lado externo de la membrana plasmática. Este fenómeno se produce durante la etapa temprana de la apoptosis. Así, cuando Anexina V está etiquetada con Alexa Fluor® 488 y se une a la PS (**Fig. 5**), se puede observar la formación de una marca verde característica en la membrana de células apoptóticas.

Por otro lado, el colorante IP, que es impermeable a la membrana, solo puede unirse al ADN cuando la misma se encuentra dañada, evento que se observa en la etapa tardía de la apoptosis o en la necrosis. De esta manera, se pueden monitorear los eventos de muerte celular, utilizando la marcación de la Anexina V (en verde) como indicador de

apoptosis temprana y el IP (en rojo) como indicador de apoptosis tardía/necrosis (Demchenko, 2013).

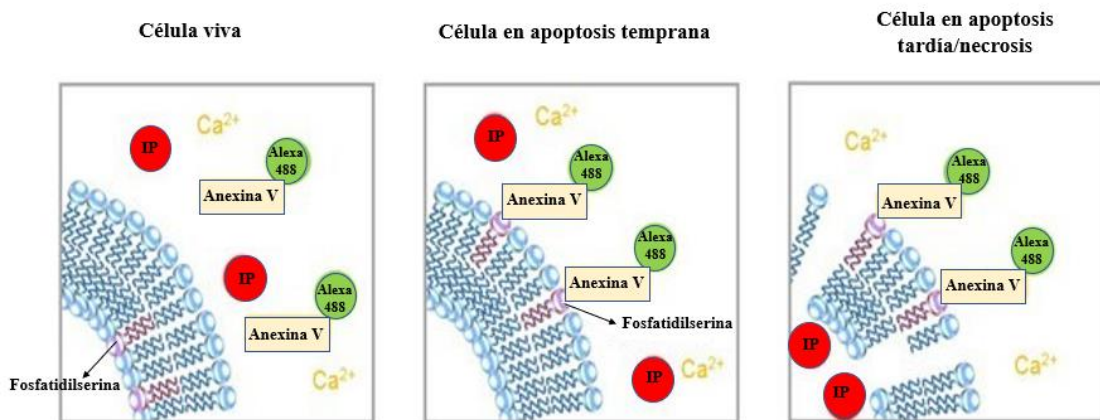


Figura 5. Marcación de células en apoptosis. La Anexina V etiquetada con la sonda Alexa 488 se une a la fosfatidilserina cuando se encuentra del lado extracelular una vez iniciada la apoptosis. Mientras que, el Ioduro de propidio, cuando la bicapa lipídica se encuentra dañada (característica de una apoptosis tardía), se intercala con el ADN celular marcándolo de rojo. Esquema modificado de la página web www.nacalai.com visitado el 26/6/23

La marcación con Anexina V e IP se puede realizar utilizando un Kit comercial (Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor™ 488 & Propidium Iodide). Este kit permite la identificación de diferentes poblaciones celulares en función de su estado de viabilidad y apoptosis mediante citometría de flujo. El análisis proporciona cuatro poblaciones principales distribuidas en cuadrantes (**Fig. 6**):

Células viables: las células que no se marcan con Anexina V ni incorporan IP. Tienen una membrana plasmática intacta y un ADN no teñido. Esta población se observa en el cuadrante 4 (Q4).

Células apoptóticas tempranas: Estas células muestran la unión de Anexina V con PS, pero no incorporan IP. Se encuentran en las etapas tempranas de la apoptosis y tienen una membrana intacta. Estas células se visualizan en el cuadrante 3 (Q3).

Células en apoptosis tardía: Estas células presentan tanto una unión de Anexina V con PS, como la incorporación de IP. Estas están en una etapa avanzada de la apoptosis y su membrana plasmática está dañada. Esta población se encuentra en el cuadrante 2 (Q2).

Células necróticas: Estas células no muestran la unión de Anexina V, pero incorporan IP. Tienen la membrana dañada y se consideran células muertas. Se observan en el cuadrante 1 (Q1).

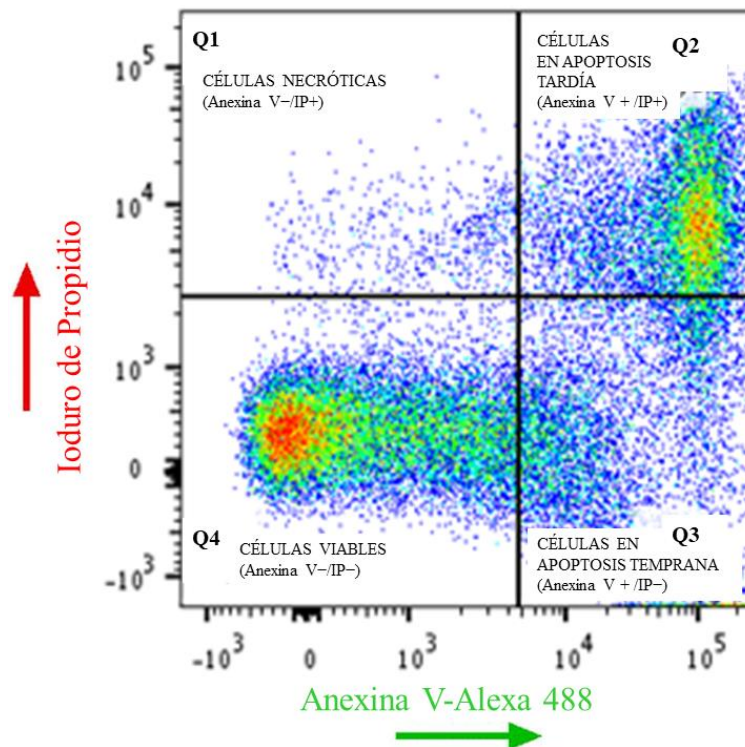


Figura 6. Esquema representativo de un Dot plot obtenido en citometría de flujo. Se distinguen cuatro subpoblaciones celulares: las células viables se encuentran en el cuadrante inferior-izquierda (Q4) con membrana intacta; las células en apoptosis temprana están en el cuadrante inferior-derecha (Q3) con membrana intacta, pero translocación de PS; las células en apoptosis tardía con membrana dañada y translocación de PS se sitúan en el cuadrante superior-derecha (Q2); y finalmente, las células necróticas se encuentran en el cuadrante superior-izquierda (Q1).

Los trofozoitos tratados y no tratados fueron despegados de las paredes de los tubos mediante enfriamiento a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio de cultivo durante 15 min y luego recuperados por centrifugación a 2500 rpm durante 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado primero con $200\text{ }\mu\text{L}$ de PBS 1X-medio 1% frío y luego con $100\text{ }\mu\text{L}$ de 1X tampón de unión de Anexina, centrifugando a 2500 rpm durante 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación, se descartó el sobrenadante, se resuspendieron las células en $100\text{ }\mu\text{L}$ de 1X tampón de unión de Anexina, se añadieron $5\text{ }\mu\text{L}$ de Anexina V Alexa Fluor® 488 (marcador de apoptosis temprana) y $1\text{ }\mu\text{L}$ de una solución de trabajo de IP (marcador de daño de la membrana, posiblemente apoptosis/necrosis tardía). Las células se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 15 min.

Los datos se recolectaron utilizando el Citómetro FACS Canto II (Becton & Dickinson, New Jersey, NY) ubicado en el CIBICI-CONICET-UNC. Paralelamente, se chequeó la fluorescencia usando un microscopio confocal FV300 (Centro de Micro y Nanoscopia de Córdoba. CEMINCO).

Análisis estadísticos: Los resultados serán expresados como la media \pm SE. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con la prueba post hoc de Tukey. Se utilizó Graphpad Prism 9.0, con un $p \leq 0,05$ como estadísticamente significativo. El experimento se llevó a cabo por triplicado.

2.2 Análisis de fragmentación de ADN

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica ampliamente utilizada para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN (Green & Sambrook, 2019). Es por ello que fue utilizada para complementar el estudio del efecto de IVM sobre los trofozoitos de *G. lamblia* a través del análisis de la fragmentación de su ADN luego de ser expuestos a la droga.

Las células, tanto tratadas como no tratadas, fueron recolectadas mediante centrifugación a 2500 rpm durante 15 min a 4 °C. Posteriormente, 100 mg de células se mezclaron con 1 mL de tampón de lisis, el cual estaba compuesto por Tris-HCl 100 mM, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, 10% SDS, y tenía un pH de 7.6. Además, se añadió 5 mg/mL de proteinasa K a este tampón de lisis. La mezcla resultante se incubó durante toda la noche a 40 °C en un baño. Al día siguiente, cada tubo se dividió en dos partes y se agregaron 500 μ L de fenol a cada una de ellas. Es importante mencionar que este procedimiento se llevó a cabo en una campana de extracción debido a que el fenol es un compuesto tóxico que requiere manipulación siguiendo las normas de higiene y seguridad. Luego se realizó una centrifugación 2000 rpm durante 5 min a 4 °C y se extrajo la fase superior acuosa que contiene el ADN y ARN, y se transfirió a otro tubo. A éste se le añadieron 500 μ L de una solución de Fenol/Cloroformo/Isoamílico (en una proporción de 25:24:1), se mezcló invirtiendo y luego se volvieron a separar las fases para recolectar la fase superior en otro tubo. Este último paso se repitió dos veces.

Posteriormente, se realizó la precipitación del ADN de la fase superior, agregando 1 mL de etanol puro y se incubó durante 5 horas a -20 °C. Después, se realizó otra centrifugación a 2000 rpm por 5 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 80% v/v y se continuó centrifugando a 2000 rpm por 5 min a 4 °C.

Una vez completado este proceso, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet en una campana de flujo laminar horizontal hasta que adquirió una coloración

blanquecina. Por último, el pellet se disolvió en 50 µL de agua libre de DNAsa y se incubó durante 2 horas a 55 °C.

El ADN total extraído se mezcló con un colorante de seguimiento (SYBR® Safe DNA gel stain, INVITROGEN) presente en tampón de muestra y fue corrido en un gel de agarosa al 1%. Las imágenes se obtuvieron en ImageQuant 800 (Amersham).

Objetivo específico 3: Evaluar la progresión del ciclo celular de *Giardia lamblia* luego del tratamiento con IVM

El ciclo celular es un proceso altamente ordenado que resulta en la duplicación y transmisión de información genética de una generación celular a la siguiente. Este ciclo se divide principalmente en dos fases: la interfase y la mitosis. La interfase, a su vez, se subdivide en las fases G1, S y G2. En la fase G1 (gap 1), la célula crece de tamaño y sintetiza todos los componentes necesarios para la duplicación del ADN. La fase S implica la duplicación del ADN, y la fase G2 (Gap 2) implica la reproducción de los orgánulos y un continuo crecimiento en tamaño. Luego de la fase G2, la célula entra en la mitosis, que también se divide en diferentes etapas (Dalton, 2015).

Para analizar del ciclo celular de los trofozoitos de *G. lamblia*, tratados o no tratados con IVM, se llevó a cabo la tinción con IP y su análisis mediante citometría de flujo. Se emplearon varios controles en el estudio: el control negativo consistió en el tratamiento de las células solo con el vehículo (DMSO), mientras que el control positivo involucró parásitos tratados con Metronidazol (MTZ), la droga de referencia para inducir la detención en la fase G2 en este parásito (Bagchi et al., 2012). Para ello, primero se procedió a recolectar 2×10^6 células en fase exponencial tanto de los cultivos tratados como de los no tratados. Luego, el pellet resultante se lavó con PBS 1X, centrifugando a 2000 rpm durante 10 min a 4 °C, y se resuspendió en 100 µL de PBS.

Para la fijación, se utilizó etanol al 70% v/v frío, añadiéndolo gota a gota a las muestras mientras se utilizaba un vortex para homogeneizar (volumen final de fijación: 5 mL por tubo). Las muestras se almacenaron a -20 °C durante 4 días.

Para la tinción, se recuperó el pellet mediante una centrifugación a 2000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se aspiró el etanol al 70% v/v y se realizó un lavado con PBS, dejando el pellet homogeneizado con el volumen mínimo. A continuación, se agregaron

RNAsa y IP a una concentración final de 50 µg/ml y 2 µg/ml, respectivamente, y se incubó durante toda la noche a 4 °C en oscuridad.

La recolección de los datos se llevó a cabo utilizando un citómetro de flujo FACS Canto II (CIBICI-CONICET- UNC) (Merino et al., 2014).

RESULTADOS

Determinación de la concentración inhibitoria media (CI50) de IVM sobre los trofozoitos de *Giardia lamblia*

Los resultados obtenidos se grafican en la **Fig. 7**, donde se presenta el porcentaje de la viabilidad celular en función del Log_{10} de la concentración de IVM (expresado en μM). Se puede observar que la viabilidad disminuye conforme aumenta la concentración de la droga. En el mismo gráfico, se muestra que el valor de CI_{50} para IVM fue de $39,51 \pm 6,65 \mu\text{M}$.

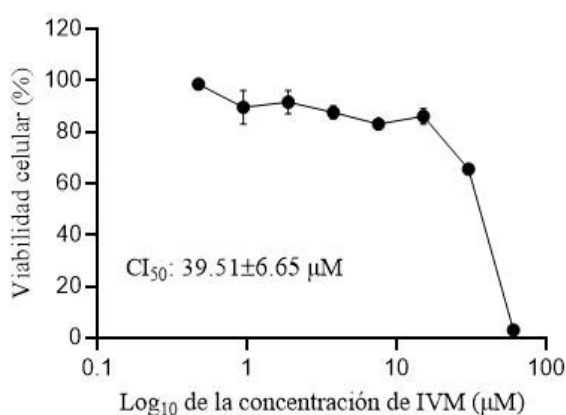


Figura 7. Gráfico de la relación dosis - respuesta de la variación de la viabilidad de los trofozoitos de *Giardia lamblia* en función del Log_{10} de la concentración de IVM. La viabilidad de los trofozoitos 48 h después del tratamiento con varias concentraciones de IVM fue determinada por el ensayo de MTT.

A partir de estos resultados, se tomó la decisión de avanzar en el estudio de los MCP en *G. lamblia* utilizando tres concentraciones diferentes: una igual a la CI_{50} ($40\mu\text{M}$), otra equivalente al doble ($80\mu\text{M}$) y una concentración intermedia ($60\mu\text{M}$). En los experimentos que se describen a continuación, haremos referencia a los trofozoitos tratados como aquellos que fueron incubados con concentraciones de IVM de $40\mu\text{M}$, $60\mu\text{M}$ y $80\mu\text{M}$ durante un período de 16 horas. Los trofozoitos no tratados se refieren a aquellos que fueron incubados con el vehículo (DMSO) durante el mismo período de tiempo.

Luego de calcular la CI_{50} pudimos determinar que la citotoxicidad de IVM sobre el crecimiento de los trofozoitos de *G. lamblia* fue del $85,251 \pm 3,425 \%$ y del $97,256 \pm 1,548 \%$, a $60 \mu\text{M}$ y a $80\mu\text{M}$, respectivamente.

Mecanismo de muerte celular programada luego del agregado de IVM

Análisis de Anexina-V y IP por citometría de flujo e Inmunofluorescencia:

Se analizó el efecto de la droga por citometría de flujo, evaluando los trofozoitos luego de 16 h de incubación con IVM a 40, 60 y 80 μM o con el control (DMSO).

En la **Fig. 8** se puede observar que el porcentaje de células vivas (Q4) disminuye a medida que aumenta la concentración de IVM, obteniendo en este estadio 99.2%, 64.5%, 49.8% y 21,8% para los trofozoitos incubados 16 h con DMSO al 0,5%, IVM a 40, 60 y 80 μM respectivamente.

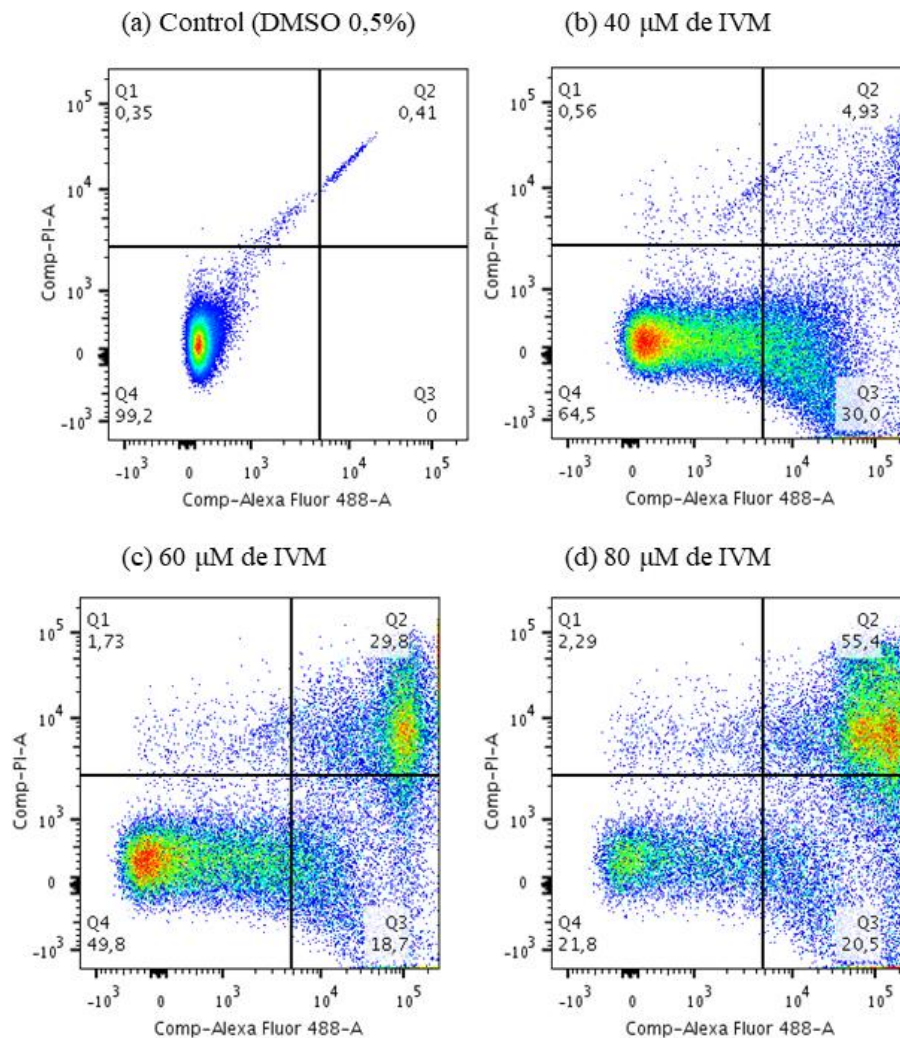


Figura 8. Dot-plots de muerte celular inducida por Ivermectina en trofozoitos de *Giardia lamblia*. Los trofozoitos fueron tratados con (a) DMSO al 0.5% (control negativo); (b) 40 μM de IVM; (c) 60 μM de IVM, y (d) 80 μM de IVM durante 16 h de incubación. Luego del tratamiento, los trofozoitos fueron suspendidos en tampón de unión de Anexina y teñidos con Anexina V conjugada con el marcador Alexa Flúor® 488 y IP.

En la **Fig. 8 b**, se puede visualizar que después de incubar las células con una concentración de 40 μM de IVM, se obtuvo un 30% de células en estado de apoptosis temprana (Anexina V+/IP-), el 4,93% en apoptosis tardía (Anexina V+/IP+) y el 0,56% en necrosis (Anexina V-/IP+), tal como lo indican los % en Q3, Q2 y Q1 respectivamente. Cuando las células se expusieron a una concentración de 60 μM de IVM, se encontró una disminución en el porcentaje de células en apoptosis temprana (18,7%), pero un aumento en la población de células en apoptosis tardía (29,8%) y necrosis (1,73%) (Fig. 9c). Finalmente, al tratar los parásitos con una concentración aún mayor de IVM, 80 μM , se obtuvieron los siguientes porcentajes de células: 20,5% en apoptosis temprana (Anexina V+/IP-), 55,4% en apoptosis tardía (Anexina V+/IP+) y 2,29% en necrosis (Anexina V-/IP+) (Fig. 9d).

Es importante destacar que los dot plots presentados anteriormente son representativos de tres experimentos independientes realizados en triplicado. El análisis estadístico realizado a estos datos se expone en la **Fig. 9**, donde se pueden observar los gráficos de barras que representan el porcentaje de células en apoptosis temprana (Q3), apoptosis tardía/necrosis (Q2), necrosis (Q1) y el porcentaje total de células muertas (Q3 + Q2 + Q1) después de la incubación con diferentes concentraciones de IVM (40, 60 y 80 μM), en comparación tanto con el grupo de control (DMSO) como con los diferentes tratamientos.

Al observar la **Fig. 9 A**, donde se esquematiza el porcentaje de células en apoptosis temprana (Q3) en relación a los diferentes tratamientos, se puede notar que el tratamiento con IVM a 40 μM presenta un 25% de células en apoptosis temprana, valor que es significativamente mayor que el control (DMSO) ($p < 0,001$). De manera similar, el tratamiento con 60 y 80 μM de IVM exhiben un porcentaje más alto de células apoptóticas tempranas, aproximadamente del 20%, en comparación con el control, y estas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0,001$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células en apoptosis temprana entre dos tratamientos con concentraciones altas de la droga (60 y 80 μM). Mientras que sí se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos con 40 μM y 80 μM de IVM.

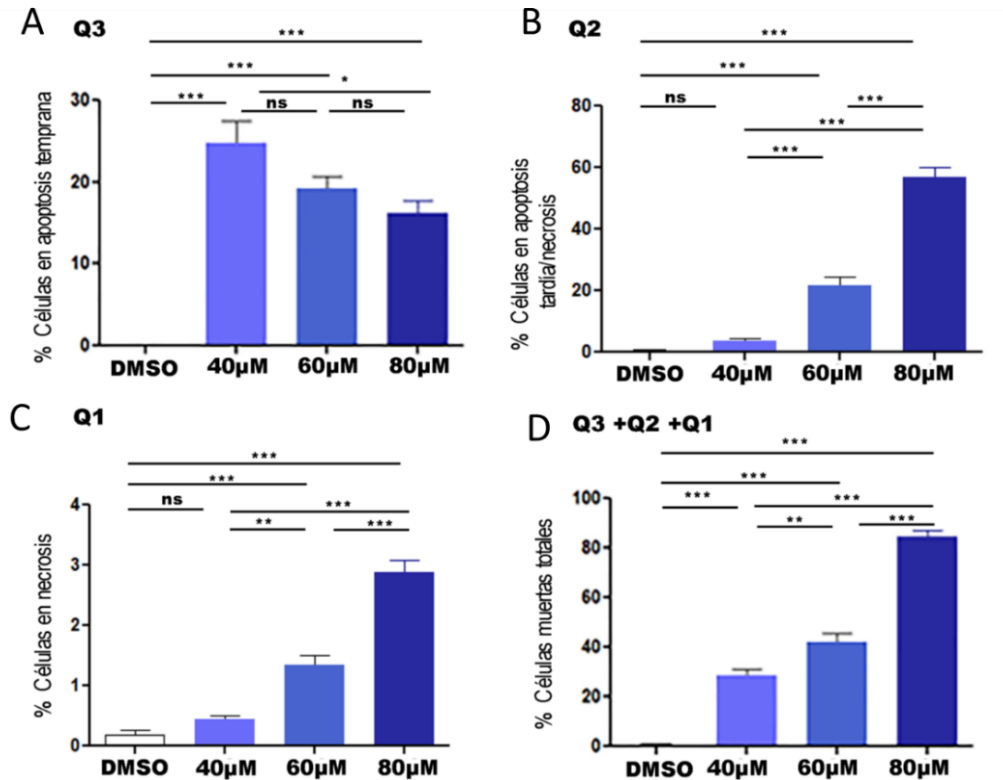


Figura 9. Gráficos de muerte celular realizados a partir de las citometrías de flujo. Luego tratar a las células con diferentes concentraciones de IVM (40, 60 y 80 μM) o con el vehículo (DMSO) se calculó el porcentaje de células en apoptosis temprana (panel superior izquierdo), en apoptosis tardía/ necrosis (panel superior derecho), en necrosis (panel inferior izquierdo) y porcentaje de células muertas totales (panel inferior derecho). Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos. Independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ANOVA seguido por Turkey's Multiple Comparasion Test.

Al analizar la **Fig. 9 B**, donde se representa el porcentaje de células en apoptosis tardía/necrosis (Q2) en relación a los diferentes tratamientos, se observa que no existen diferencias significativas en el porcentaje de células en este estadio entre el control (menos del 1%) y el tratamiento con 40 μM de IVM (4%). Por otro lado, las células tratadas con IVM a 60 μM y 80 μM muestran un 21% y un 57% de células en apoptosis tardía/necrosis, respectivamente, valores significativamente mayores en comparación con el control ($p < 0,001$). Además, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los tratamientos con IVM a 40 μM , 60 μM y 80 μM .

Si evaluamos la cantidad de células en necrosis (**Fig. 9 C**), se observa que no hay diferencias significativas entre el control y las células tratadas con 40 μM de IVM. Sin embargo, se encuentran diferencias estadísticamente significativas a concentraciones más altas de la droga analizado ($p < 0,001$). Los tratamientos con IVM a 60 μM y 80 μM

presentan un porcentaje de células en necrosis de 1,65% y 3%, respectivamente. Además, al comparar las células tratadas con diferentes concentraciones de la droga, también se observan diferencias significativas entre ellas (con un $p < 0,001$, excepto para las diferencias entre 40 μM y 60 μM de IVM, cuyo p fue menor a 0,01).

Finalmente, en la **Fig. 9 D**, se representa el porcentaje de células muertas totales ($Q1 + Q2 + Q3$), que incluye los tres tipos de poblaciones descritos en los párrafos anteriores, en función de las diferentes concentraciones de la droga administrado a los parásitos. Todos los tratamientos, tanto en comparación con el control como con las diferentes concentraciones de IVM, presentaron diferencias significativas (con un $p < 0,001$, excepto para las diferencias entre 40 μM y 60 μM de IVM, cuyo p fue menor a 0,01), mostrando un aumento en la cantidad de células muertas a medida que se incrementaba la dosis de la droga. Los trofozoitos tratados con 40 μM , 60 μM y 80 μM de IVM mostraron porcentajes de células muertas de 29%, 43% y 85%, respectivamente.

De forma complementaria al estudio cuantitativo realizado utilizando citometría de flujo, se realizó el mismo ensayo, pero se analizaron las células utilizando microscopía confocal. Este estudio nos permitió visualizar las marcaciones ya cuantificadas en células individuales utilizando un microscopio confocal FV300 del Centro de Micro y Nanoscopia de Córdoba (CEMINCO) con un aumento de 60X. En la **Fig. 10** se presentan los resultados obtenidos, representativo aproximadamente de 100 células de cada condición.

Como se puede observar en la **Fig. 10**, las células control sin tratamiento no muestran fluorescencia; sin embargo, cuando las células se expusieron a IVM se observó en verde la tinción de Anexina V en células tratadas con la droga a 40, 60 y 80 μM , y marcación de los núcleos rojos con PI solo a 60 y 80 μM (indicados con flechas). Se puede visualizar, además, que a mayor concentración de la droga se observa un aumento notable en la degradación del ADN nuclear, tal como lo evidencia la dispersión de la marca roja del IP (señalado con la flecha amarilla).

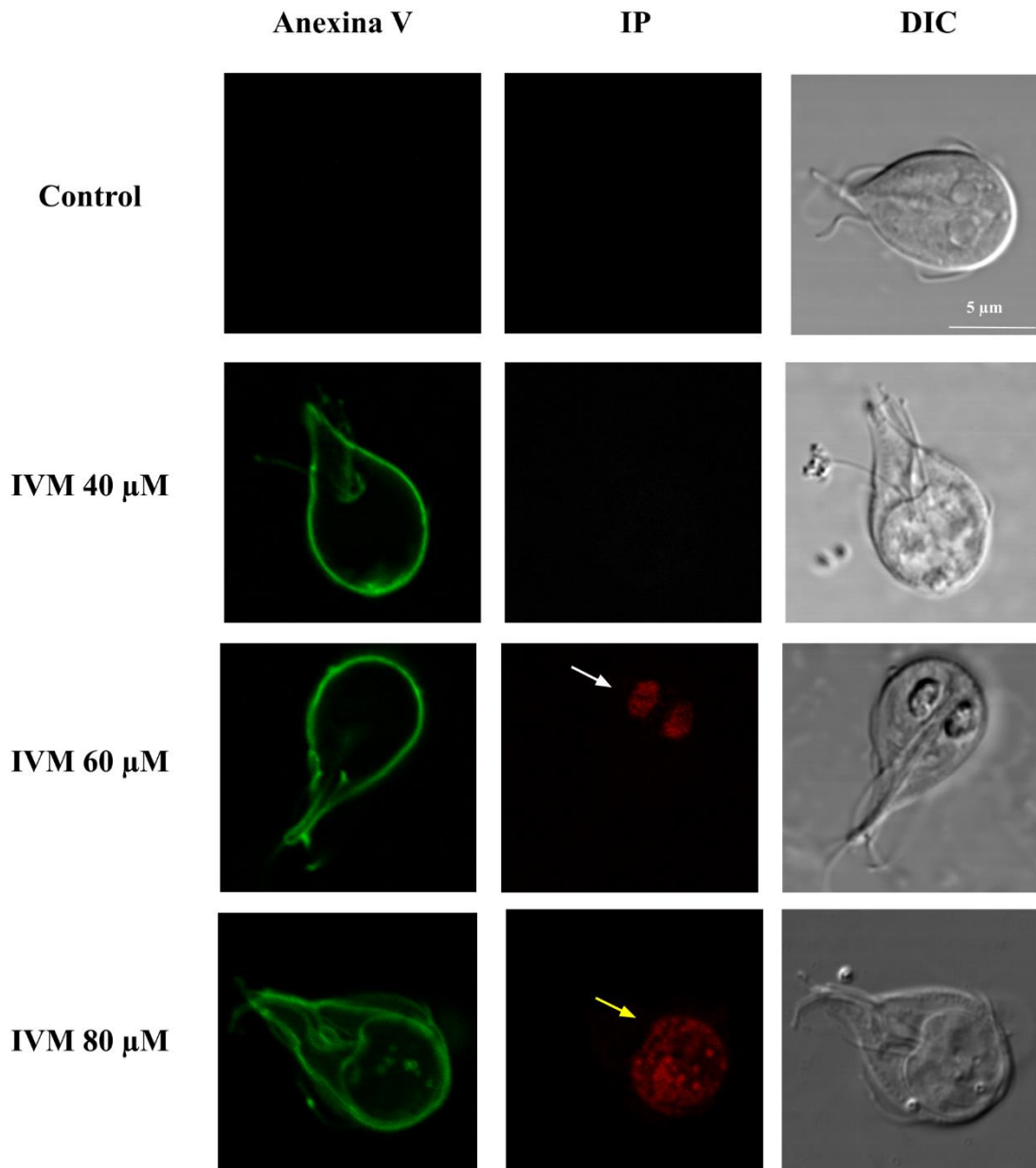


Figura 10. Análisis de la muerte celular programada en trofozoitos tratados con IVM, detectadas por microscopio confocal. Tinción con Anexina V (verde) y IP (rojo) en trofozoitos sin tratar (Control) y tratados con IVM 40, 60 y 80 μM durante 16 h. Con la flecha blanca se indican los núcleos del trofozoito, mientras que con la flecha amarilla se identifica el núcleo disperso.

Análisis de fragmentación de ADN

En la **Fig. 11**, se observa la imagen obtenida de una corrida de electroforesis en gel de agarosa donde en cada calle se sembró una alícuota del ADN extraído del parásito habiendo sido previamente sometido a diferentes concentraciones de IVM. Se puede observar una disminución en la integridad del material genético a medida que aumenta la

concentración de la droga. En el carril correspondiente al control se puede apreciar que el ADN no sufrió una fragmentación notable. En cambio, el ADN obtenido de los trofozoitos tratados con 80 μM de IVM se encuentra notablemente más degradado, obteniendo bandas de menor peso molecular con respecto a los controles.

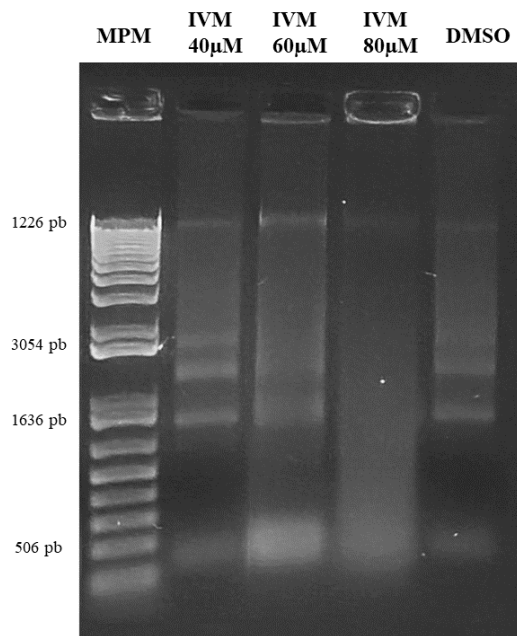


Figura 11. Degradación del ADN de *Giardia lamblia* en trofozoitos tratados con diferentes concentraciones de IVM, corrido en gel de agarosa. Los carriles que van de izquierda a derecha corresponden al marcador de peso molecular (pb), ADN extraído de las muestras tratadas con IVM a 40 μM , 60 μM , 80 μM y con DMSO (vehículo), respectivamente.

Progresión del ciclo celular de *Giardia lamblia* luego del tratamiento con IVM

El análisis del ciclo celular reveló un marcado arresto en la fase S que se correlaciona con el aumento de la dosis de IVM administrada. Como se presenta en la **Fig. 12. a, c, d, e y g** la fase G0/G1 a las 16 h del tratamiento con la droga mostró una tendencia decreciente en el porcentaje de trofozoitos, mientras que la fase S experimentó un aumento significativo. La fase G2/M, por otro lado, mostró una disminución notable en el porcentaje de células en los parásitos tratados con diferentes concentraciones de IVM en comparación con el control. En el caso de las células tratadas con Metronidazol 10 μM , se observó un arresto en G2 en comparación con el control con DMSO, como se muestra en la **Fig. 12. a, b y g**.

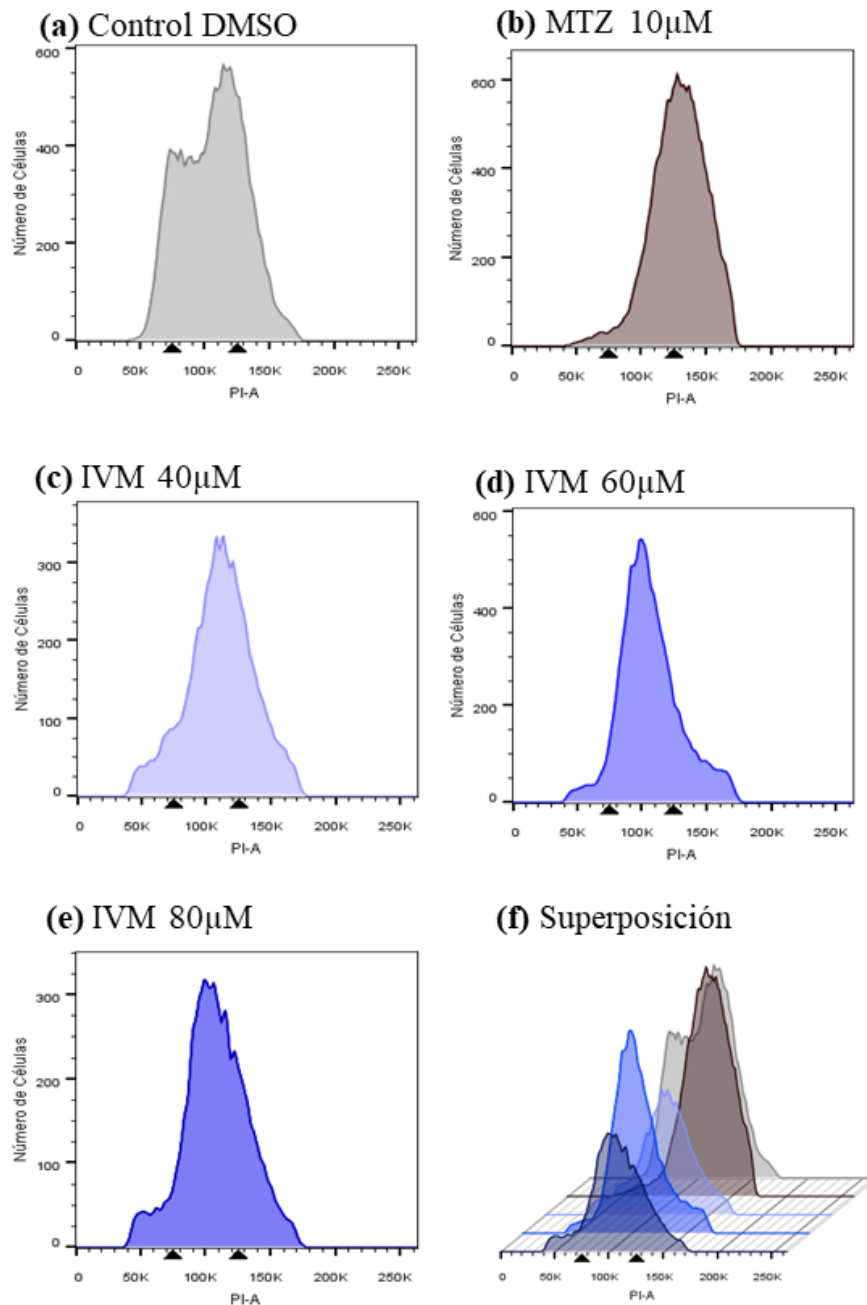


Figura 12. Análisis del ciclo celular de *Giardia lamblia*, en células tratadas con diferentes concentraciones de IVM y metronidazol, obtenido por citometría de flujo. Los histogramas corresponden a los trofozoitos luego ser incubados durante 16 h con (a) el vehículo (DMSO), (b) Metronidazol 10 µM, (c) IVM 40 µM, (d) IVM 60 µM y con (e) IVM 80 µM (f) superposición de todos los tratamientos con el control. (g) Porcentajes de células en cada fase del ciclo celular en las muestras descritas anteriormente. Luego de la incubación con la droga, los trofozoitos fueron fijados con etanol al 70% y teñidos con IP en presencia de RNAasa. Las flechas indican G0/G1 y G2/M respectivamente. IP-A corresponde al área marcada con IP. Los resultados corresponden a la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

(g)

Muestra	G0/G1	S	G2/M
DMSO	23,50 \pm 3,11	16,02 \pm 0,84	51,80 \pm 2,36
IVM 40µM	7,74 \pm 1,94	21,30 \pm 0,95	49,60 \pm 3,20
IVM 60µM	4,86 \pm 1,14	49,20 \pm 3,70	29,80 \pm 6,25
IVM 80µM	5,00 \pm 0,49	57,70 \pm 4,75	16,40 \pm 5,76
MTZ 10µM	1,15 \pm 0,06	22,00 \pm 6,95	64,90 \pm 6,95

DISCUSIÓN

Giardia lamblia ha sido un objeto de interés tanto para los parasitólogos como para los biólogos evolutivos, debido a su posición filogenética estratégica que permite la formulación de hipótesis sobre los primeros eventos en la evolución eucariota. Un aspecto destacado de su singularidad evolutiva es la ausencia de caspasas y proteínas similares a Bcl-2, componentes esenciales de la apoptosis (Ghosh et al., 2009). Además, carece de mitocondrias, donde ocurre la fosforilación oxidativa (Adam, 2021), un proceso crucial en las vías de muerte celular. Esto sugiere que este organismo no sigue una vía apoptótica clásica, en contraste con la mayoría de los eucariotas. Por lo tanto, la exploración de los mecanismos subyacentes de la MCP en este parásito protozoario no solo permitiría recopilar evidencias evolutivas, sino que también permitiría identificar nuevas dianas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad que causa.

La citometría de flujo nos proporcionó un panorama más detallado de la respuesta a IVM en los trofozoitos de *G. lamblia*. Nuestros resultados indican que esta droga induce tanto la apoptosis temprana, a concentraciones cercanas a la CI_{50} , como la apoptosis tardía/necrosis a concentraciones más elevadas. Estos hallazgos respaldan la noción de que IVM puede activar múltiples vías de MCP dependiendo de su concentración. Esta observación concuerda con investigaciones previas que han descrito cómo IVM puede inducir apoptosis, necrosis y autofagia en modelos murinos de cáncer de mama (Draganov et al., 2015) así como inhibir el crecimiento e inducir apoptosis en el glioblastoma humano (Liu et al., 2016) y cáncer de colon (Melotti et al., 2014). Nuestros resultados, sugieren que IVM podría desencadenar en *G. lamblia* un proceso semejante a la apoptosis, a pesar de las diferencias en las vías convencionales y la ausencia de mitocondrias y proteínas características que se han descrito previamente en otros organismos eucariotas.

Nuestros resultados revelaron un patrón de arresto en la fase S del ciclo celular en trofozoitos expuestos a concentraciones crecientes de IVM. Esto sugiere la posibilidad de que esta droga cause daño al ADN, y esta hipótesis se ve respaldada por la observación de fragmentación del ADN en el gel de electroforesis de agarosa. Además, observamos una relación dosis-dependiente entre el arresto en la fase S y la concentración de IVM, lo que coincide con investigaciones previas realizadas en células epiteliales mamarias bovinas (Park et al., 2020). Esta observación también concuerda con resultados previos

de nuestro laboratorio que indicaron efectos de IVM en la reproducción y el crecimiento de los trofozoitos de *G. lamblia* (Mayol et al., 2019).

Adicionalmente, es importante destacar que este arresto en la fase S podría desencadenar una vía apoptótica similar a la documentada en trofozoitos de *G. lamblia* después de ser tratados con Kaempferol. En ese estudio, los autores postularon que esto podría deberse a un efecto citostático precedido por una limitada replicación del ADN nuclear, lo que a su vez impide la citocinesis posterior (Argüello-García et al., 2020).

En comparación con Metronidazol, que interrumpe el ciclo celular cerca de la fase G2, destacamos las diferencias en los mecanismos de acción. Metronidazol es conocido por su efecto tóxico a través de radicales libres de nitro y nitroso, lo que provoca daños en el ADN mediante roturas de hebras y entrecruzamientos nucleotídicos (Bagchi et al., 2012). Esto sugiere que IVM, al inducir un arresto cerca de la fase S, podría probablemente alterar la integridad del ADN y, por lo tanto, evitar la finalización de la división celular. No obstante, para obtener una comprensión más detallada de lo que ocurre a nivel nuclear, sería pertinente realizar en el futuro estudios de microscopía electrónica que nos permitan observar posibles cambios en la estructura nuclear, como la condensación de la cromatina, entre otros.

Aunque nuestros hallazgos arrojan luz sobre el potencial de MCP inducido por IVM en *G. lamblia*, el entendimiento completo de este fenómeno exige investigaciones futuras. La caracterización molecular detallada y la identificación de las estructuras o moléculas afectadas por IVM en este parásito protozoario representan áreas prometedoras para la investigación venidera.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que IVM tiene un efecto inhibitor sobre la proliferación celular de los trofozoitos de *G. lamblia*, lo que podría ser prometedor para el desarrollo de nuevas terapias antiparasitarias. Asimismo, se demostró que IVM induce la muerte celular programada en los trofozoitos, ya sea en forma de apoptosis temprana o tardía/necrosis, dependiendo de la concentración utilizada. Además, el tratamiento con esta droga, afecta la integridad del ADN de *G. lamblia* y detiene su ciclo celular en la fase S. En conjunto, estos hallazgos podrían abrir nuevas perspectivas para el tratamiento de la giardiasis, señalando un camino prometedor hacia futuras investigaciones y posibles avances terapéuticos.

BIBLIOGRAFIA

- ADAM, R. D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev*, 14, 447-75.
- ADAM, R. D. 2021. *Giardia duodenalis*: biology and pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 34, e00024-19.
- ADL, S. M., BASS, D., LANE, C. E., LUKES, J., SCHOCH, C. L., SMIRNOV, A., AGATHA, S., BERNEY, C., BROWN, M. W., BURKI, F., CARDENAS, P., CEPICKA, I., CHISTYAKOVA, L., DEL CAMPO, J., DUNTHORN, M., EDVARSDEN, B., EGLIT, Y., GUILLOU, L., HAMPL, V., HEISS, A. A., HOPPENRATH, M., JAMES, T. Y., KARNKOWSKA, A., KARPOV, S., KIM, E., KOLISKO, M., KUDRYAVTSEV, A., LAHR, D. J. G., LARA, E., LE GALL, L., LYNN, D. H., MANN, D. G., MASSANA, R., MITCHELL, E. A. D., MORROW, C., PARK, J. S., PAWLOWSKI, J. W., POWELL, M. J., RICHTER, D. J., RUECKERT, S., SHADWICK, L., SHIMANO, S., SPIEGEL, F. W., TORRUELLA, G., YOUSSEF, N., ZLATOGURSKY, V. & ZHANG, Q. 2019. Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol*, 66, 4-119.
- AHMED, M. 2023. Intestinal parasitic infections in 2023. *Gastroenterology Res*, 16, 127-140.
- AL-AZZAM, S. I., FLECKENSTEIN, L., CHENG, K. J., DZIMIANSKI, M. T. & MCCALL, J. W. 2007. Comparison of the pharmacokinetics of moxidectin and Ivermectin after oral administration to beagle dogs. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 28, 431-438.
- ANKARKLEV, J., JERLSTROM-HULTQVIST, J., RINGQVIST, E., TROELL, K. & SVARD, S. G. 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol*, 8, 413-22.
- ANMAT. 2023. *Vademécum Nacional de Medicamentos* [Online]. Available: <https://servicios.pami.org.ar/vademecum/views/consultaPublica/listado.zul> [Accessed 18/9/2023 2023].
- ARGUELLO-GARCIA, R., CALZADA, F., CHAVEZ-MUNGUIA, B., MATUS-MEZA, A. S., BAUTISTA, E., BARBOSA, E., VELAZQUEZ, C., HERNANDEZ-CABALLERO, M. E., ORDONEZ-RAZO, R. M. & VELAZQUEZ-DOMINGUEZ, J. A. 2022. Linearolactone Induces Necrotic-like Death in *Giardia intestinalis* trophozoites: Prediction of a Likely Target. *Pharmaceuticals (Basel)*, 15.
- ARGÜELLO-GARCÍA, R., CALZADA, F., GARCÍA-HERNÁNDEZ, N., CHÁVEZ-MUNGUÍA, B. & VELÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, J. A. 2020. Ultrastructural and proapoptotic-like effects of Kaempferol in *Giardia duodenalis* trophozoites and bioinformatics prediction of its potential protein target. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 115,5-8.
- ASHOUR, D. S. 2019. Ivermectin: From theory to clinical application. *International journal of antimicrobial agents*, 54, 134-142.
- BAGCHI, S., ONIKU, A. E., TOPPING, K., MAMHOUD, Z. N. & PAGET, T. A. 2012. Programmed cell death in *Giardia*. *Parasitology*, 139, 894-903.
- BARAKA, O., MAHMOUD, B., MARSCHKE, C., GEARY, T., HOMEIDA, M. & WILLIAMS, J. 1996. Ivermectin distribution in the plasma and tissues of patients infected with *Onchocerca volvulus*. *European journal of clinical pharmacology*, 50, 407-410.
- BARASH, N., NOSALA, C., PHAM, J. K., MCINALLY, S. G., GOURGUECHON, S., MCCARTHY-SINCLAIR, B. & DAWSON, S. C. 2017. *Giardia* colonizes and

- encysts in high-density foci in the murine small intestine. *MSphere*, 2, e00343-16.
- BENCHIMOL, M., GADELHA, A. P. & DE SOUZA, W. 2023. Ultrastructural Alterations of the human pathogen *Giardia intestinalis* after drug treatment. *Pathogens*, 12, 2-25.
- BENCHIMOL, M., PIVA, B., CAMPANATI, L. & DE SOUZA, W. 2004. Visualization of the funis of *Giardia lamblia* by high-resolution field emission scanning electron microscopy--new insights. *J Struct Biol*, 147, 102-15.
- BRUCHHAUS, I., ROEDER, T., RENNENBERG, A. & HEUSSLER, V. T. 2007. Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. *Trends Parasitol*, 23, 376-83.
- CACCIO, S. M., BECK, R., LALLE, M., MARINCULIC, A. & POZIO, E. 2008. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *Int J Parasitol*, 38, 1523-31.
- CARVALHO, K. P. & MONTEIRO-LEAL, L. H. 2004. The caudal complex of *Giardia lamblia* and its relation to motility. *Exp Parasitol*, 108, 154-62.
- CAVALIER-SMITH, T. & CHAO, E. E. 1996. Molecular phylogeny of the free-living archezoan *Trepomonas agilis* and the nature of the first eukaryote. *J Mol Evol*, 43, 551-62.
- CENTRO NACIONAL DE INFORMACIÓN BIOTECNOLÓGICA (NCBI) [INTERNET]. BETHESDA (MD): BIBLIOTECA NACIONAL DE MEDICINA (EE.UU.), C. N. D. I. B. 1998. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy> [Accessed 2023].
- CERNIKOVA, L. 2019. Phosphoinositide-binding proteins mark, shape and functionally modulate highly-diverged endocytic compartments in the parasitic protist *Giardia lamblia*.
- COCIANCIC, P., TORRUSIO, S. E., GARRAZA, M., ZONTA, M. L. & NAVONE, G. T. 2021. Intestinal parasites in child and youth populations of Argentina: Environmental factors determining geographic distribution. *Revista Argentina de Microbiología*, 53, 225-232.
- COFFEY, C. M., COLLIER, S. A., GLEASON, M. E., YODER, J. S., KIRK, M. D., RICHARDSON, A. M., FULLERTON, K. E. & BENEDICT, K. M. 2020. Evolving epidemiology of reported giardiasis cases in the United States, 1995–2016. *Clinical Infectious Diseases*, 72, 764-770.
- CONNERS, E., MILLER, A., BALACHANDRAN, N., ROBINSON, B. & BENEDICT, K. 2021. Giardiasis outbreaks – United States, 2012–2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 70, 304-307.
- CORREA, G., VILELA, R., MENNA-BARRETO, R. F., MIDDLEJ, V. & BENCHIMOL, M. 2009. Cell death induction in *Giardia lamblia*: effect of beta-lapachone and starvation. *Parasitol Int*, 58, 424-37.
- CRUMP, A. 2017. Ivermectin: enigmatic multifaceted 'wonder' drug continues to surprise and exceed expectations. *J Antibiot (Tokyo)*, 70, 495-505.
- CULLY, D. F., VASSILATIS, D. K., LIU, K. K., PARESS, P. S., VAN DER PLOEG, L. H., SCHAEFFER, J. M. & ARENA, J. P. 1994. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 371, 707-11.
- D'ARCY, M. S. 2019. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*, 43, 582-592.
- DACKS, J. B., WALKER, G. & FIELD, M. C. 2008. Implications of the new eukaryotic systematics for parasitologists. *Parasitol Int*, 57, 97-104.

- DALTON, S. 2015. Linking the cell cycle to cell fate decisions. *Trends Cell Biol*, 25, 592-600.
- DEMCHENKO, A. P. 2013. Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology* 65, 157-172.
- DRAGANOV, D., GOPALAKRISHNA-PILLAI, S., CHEN, Y.-R., ZUCKERMAN, N., MOELLER, S., WANG, C., ANN, D. & LEE, P. P. 2015. Modulation of P2X 4/P2 X7/Pannexin-1 sensitivity to extracellular ATP via Ivermectin induces a non-apoptotic and inflammatory form of cancer cell death. *Scientific reports*, 5, 16222.
- DUPREZ, L., WIRAWAN, E., VANDEN BERGHE, T. & VANDENABEELE, P. 2009. Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect*, 11, 1050-62.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 495-516.
- FARTHING, M. J. 1997. The molecular pathogenesis of giardiasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 24, 79-88.
- FELIX, L. M., LUZIO, A., SANTOS, A., ANTUNES, L. M., COIMBRA, A. M. & VALENTIM, A. M. 2020. MS-222 induces biochemical and transcriptional changes related to oxidative stress, cell proliferation and apoptosis in zebrafish embryos. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 237, 108834.
- GALLUZZI, L., MAIURI, M. C., VITALE, I., ZISCHKA, H., CASTEDO, M., ZITVOGEL, L. & KROEMER, G. 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*, 14, 1237-43.
- GARCÍA MANZANO, M. F., JORAY, M. B., LAIOLO, J., PALACIOS, S. M. & CARPINELLA, M. C. 2020. Cytotoxic activity of Germacrane-Type Sesquiterpene lactones from *dimerostemma aspilioides*. *J Nat Prod*, 83, 1909-1918.
- GHOSH, E., GHOSH, A., GHOSH, A. N., NOZAKI, T. & GANGULY, S. 2009. Oxidative stress-induced cell cycle blockage and a protease-independent programmed cell death in microaerophilic *Giardia lamblia*. *Drug design, development and therapy*, 103-110.
- GILLIN, F. D. & DIAMOND, L. S. 1981. *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: growth responses to reducing agents. *Exp Parasitol*, 51, 382-91.
- GILLIN, F. D., HAGBLOM, P., HARWOOD, J., ALEY, S. B., REINER, D. S., MCCAFFERY, M., SO, M. & GUINEY, D. G. 1990. Isolation and expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 4463-7.
- GILLIN, F. D., REINER, D. S. & MCCAFFERY, J. M. 1996. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu Rev Microbiol*, 50, 679-705.
- GLOBAL BURDEN OF DISEASE, C., ADOLESCENT HEALTH, C., KASSEBAUM, N., KYU, H. H., ZOECKLER, L., OLSEN, H. E., THOMAS, K., PINHO, C., BHUTTA, Z. A., DANDONA, L., FERRARI, A., GHIWOT, T. T., HAY, S. I., KINFU, Y., LIANG, X., LOPEZ, A., MALTA, D. C., MOKDAD, A. H., NAGHAVI, M., PATTON, G. C., SALOMON, J., SARTORIUS, B., TOPOR-MADRY, R., VOLLSET, S. E., WERDECKER, A., WHITEFORD, H. A., ABATE, K. H., ABBAS, K., DAMTEW, S. A., AHMED, M. B., AKSEER, N., AL-RADDADI, R., ALEMAYOHU, M. A., ALTIRKAWI, K., ABAJOBIR, A. A., AMARE, A. T., ANTONIO, C. A. T., ARNLOV, J., ARTAMAN, A., ASAYESH, H., AVOKPAHO, E., AWASTHI, A., AYALA QUINTANILLA, B. P., BACHA, U., BETSU, B. D., BARAC, A., BARNIGHAUSEN, T. W., BAYE, E., BEDI, N., BENSENOR, I. M., BERHANE, A., BERNABE, E.,

- BERNAL, O. A., BEYENE, A. S., BIADGILIGN, S., BIKBOV, B., BOYCE, C. A., BRAZINOVA, A., HAILU, G. B., CARTER, A., CASTANEDA-ORJUELA, C. A., CATALA-LOPEZ, F., CHARLSON, F. J., CHITHEER, A. A., CHOI, J. J., CIOBANU, L. G., CRUMP, J., DANDONA, R., DELLAVALLE, R. P., DERIBEW, A., DEVEBER, G., DICKER, D., DING, E. L., DUBEY, M., ENDRIES, A. Y., ERSKINE, H. E., FARAON, E. J. A., FARO, A., FARZADFAR, F., FERNANDES, J. C., FIJABI, D. O., FITZMAURICE, C., FLEMING, T. D., FLOR, L. S., FOREMAN, K. J., FRANKLIN, R. C., FRASER, M. S., FROSTAD, J. J., FULLMAN, N., GEBREGERGS, G. B., GEBRU, A. A., GELEIJNSE, J. M., GIBNEY, K. B., GIDEY YIHDEGO, M., GINAWI, I. A. M., GISHU, M. D., GIZACHEW, T. A., GLASER, E., GOLD, A. L., GOLDBERG, E., et al. 2017. Child and adolescent health from 1990 to 2015: Findings from the global burden of diseases, injuries, and risk factors 2015 study. *JAMA Pediatr*, 171, 573-592.
- GLOECKNER, C., GARNER, A. L., MERSHA, F., OKSOV, Y., TRICOCHÉ, N., EUBANKS, L. M., LUSTIGMAN, S., KAUFMANN, G. F. & JANDA, K. D. 2010. Repositioning of an existing drug for the neglected tropical disease Onchocerciasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 3424-9.
- GREEN, M. R. & SAMBROOK, J. 2019. Analysis of DNA by agarose gel electrophoresis. *Cold Spring Harb Protoc*, 2019.
- GUTIÉRREZ, A. M. Q. 2017. Giardiasis epidemiology. *Current Topics in Giardiasis*, 13.
- HAGEN, K. D., HIRAKAWA, M. P., HOUSE, S. A., SCHWARTZ, C. L., PHAM, J. K., CIPRIANO, M. J., DE LA TORRE, M. J., SEK, A. C., DU, G., FORSYTHE, B. M. & DAWSON, S. C. 2011. Novel structural components of the ventral disc and lateral crest in *Giardia intestinalis*. *PLoS Negl Trop Dis*, 5, e1442.
- JORAY, M. B., TRUCCO, L. D., GONZÁLEZ, M. L., NAPAL, G. N., PALACIOS, S. M., BOCCO, J. L. & CARPINELLA, M. C. 2015. Antibacterial and cytotoxic activity of compounds isolated from *Flourensia oolepis*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 912484.
- KITZMAN, D., WEI, S.-Y. & FLECKENSTEIN, L. 2006. Liquid chromatographic assay of ivermectin in human plasma for application to clinical pharmacokinetic studies. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 40, 1013-1020.
- LAING, R., GILLAN, V. & DEVANEY, E. 2017. Ivermectin—old drug, new tricks? *Trends in parasitology*, 33, 463-472.
- LANFREDI-RANGEL, A., ATTIAS, M., DE CARVALHO, T. M., KATTENBACH, W. M. & DE SOUZA, W. 1998. The peripheral vesicles of trophozoites of the primitive protozoan *Giardia lamblia* may correspond to early and late endosomes and to lysosomes. *J Struct Biol*, 123, 225-35.
- LANUSSE, C., LIFSCHITZ, A., VIRKEL, G., ALVAREZ, L., SANCHEZ, S., SUTRA, J., GALTIER, P. & ALVINERIE, M. 1997. Comparative plasma disposition kinetics of Ivermectin, Moxidectin and Doramectin in cattle. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 20, 91-99.
- LI, F. J. & HE, C. Y. 2017. Autophagy in protozoan parasites: *Trypanosoma brucei* as a model. *Future Microbiol*, 12, 1337-1340.
- LI, J., QIN, H., LI, X. & ZHANG, L. 2023. Role of rodents in the zoonotic transmission of giardiasis. *One Health*, 100500.
- LIU, Y., FANG, S., SUN, Q. & LIU, B. 2016. Anthelmintic drug Ivermectin inhibits angiogenesis, growth and survival of glioblastoma through inducing

- mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications*, 480, 415-421.
- LOCKSHIN, R. A. & WILLIAMS, C. M. 1965. Programmed Cell Death--I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the Pernyi Silkworm. *J Insect Physiol*, 11, 123-33.
- LONDOÑO, L. A., BUCKLEY, G. J., BOLFER, L. & BANDT, C. 2017. Clearance of plasma Ivermectin with single pass lipid dialysis in 2 dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 27, 232-237.
- LOPEZ-VELAZQUEZ, G., FERNANDEZ-LAINEZ, C., DE LA MORA-DE LA MORA, J. I., CAUDILLO DE LA PORTILLA, D., REYNOSO-ROBLES, R., GONZALEZ-MACIEL, A., RIDAURA, C., GARCIA-TORRES, I., GUTIERREZ-CASTRELLON, P., OLIVOS-GARCIA, A., FLORES-LOPEZ, L. A. & ENRIQUEZ-FLORES, S. 2019. On the molecular and cellular effects of Omeprazole to further support its effectiveness as an anti-giardial drug. *Sci Rep*, 9, 8922.
- LUJÁN, H. D. & SVARD, S. 2011. *Giardia. A Model Organism. Giardia. A Model Organism. Austria, SpringerWeinNewYork.*
- MARGULIS, L. 1990. Words as battle cries--symbiogenesis and the new field of endocytobiology. *Bioscience*, 40, 673-7.
- MARTINCOVA, E., VOLEMAN, L., PYRIH, J., ZARSKY, V., VONDRACKOVA, P., KOLISKO, M., TACHEZY, J. & DOLEZAL, P. 2015. Probing the biology of *Giardia intestinalis* mitosomes using *in vivo* enzymatic tagging. *Mol Cell Biol*, 35, 2864-74.
- MAYOL, G. F., REVUELTA, M. V., SALUSSO, A., TOUZ, M. C. & ROPOLO, A. S. 2019. Evidence of nuclear transport mechanisms in the protozoan parasite *Giardia lamblia*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 118566.
- MCINALLY, S. G. & DAWSON, S. C. 2016. Eight unique basal bodies in the multi-flagellated diplomonad *Giardia lamblia*. *Cilia*, 5, 21.
- MELOTTI, A., MAS, C., KUCIAK, M., LORENTE-TRIGOS, A., BORGES, I. & RUIZ I ALTABA, A. 2014. The river blindness drug Ivermectin and related macrocyclic lactones inhibit WNT-TCF pathway responses in human cancer. *EMBO molecular medicine*, 6, 1263-1278.
- MENNA-BARRETO, R. F., GONCALVES, R. L., COSTA, E. M., SILVA, R. S., PINTO, A. V., OLIVEIRA, M. F. & DE CASTRO, S. L. 2009. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. *Free Radic Biol Med*, 47, 644-53.
- MENNA-BARRETO, R. F. S. 2019. Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill. *Cell Death Dis*, 10, 93.
- MERINO, M. C., ZAMPONI, N., VRANYCH, C. V., TOUZ, M. C. & ROPOLO, A. S. 2014. Identification of *Giardia lamblia* DHHC proteins and the role of protein S-palmitoylation in the encystation process. *PLoS Negl Trop Dis*, 8, e2997.
- MONIS, P. T., ANDREWS, R. H., MAYRHOFER, G. & EY, P. L. 2003. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect Genet Evol*, 3, 29-38.
- MORE, K., KLINGER, C. M., BARLOW, L. D. & DACKS, J. B. 2020. Evolution and natural history of membrane trafficking in Eukaryotes. *Curr Biol*, 30, R553-R564.
- MORRIS-JONES, R. 2020. Oral ivermectin for infants and children under 15 kg appears to be a safe and effective treatment for scabies. *Br J Dermatol*, 182, 835-836.

- MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65, 55-63.
- NABI-AFJADI, M., MOHEBI, F., ZALPOOR, H., AZIZIYAN, F., AKBARI, A., MORADI-SARDAREH, H., BAHREINI, E., MOEINI, A. M. & EFFATPANA, H. 2023. A cellular and molecular biology-based update for Ivermectin against COVID-19: is it effective or non-effective? *Inflammopharmacology*, 31, 21-35.
- NIRMALA, J. G. & LOPUS, M. 2020. Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Biol Toxicol*, 36, 145-164.
- OKONKWO, P. O., OGBUOKIRI, J. E., OFOEGBU, E. & KLOTZ, U. 1993. Protein binding and Ivermectin estimations in patients with onchocerciasis. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 53, 426-430.
- PARK, H., SONG, G. & LIM, W. 2020. Ivermectin-induced programmed cell death and disruption of mitochondrial membrane potential in bovine mammary gland epithelial cells. *Pestic Biochem Physiol*, 163, 84-93.
- PAWLOWSKI, J. 2014. Protist evolution and phylogeny. *eLS*.
- RIVERO, M. R., FELIZIANI, C., DE ANGELO, C., TIRANTI, K., SALOMON, O. D. & TOUZ, M. C. 2020. *Giardia* spp., the most ubiquitous protozoan parasite in Argentina: human, animal and environmental surveys reported in the last 40 years. *Parasitol Res*, 119, 3181-3201.
- RIVERO, M. R., JAUSORO, I., BISBAL, M., FELIZIANI, C., LANFREDI-RANGEL, A. & TOUZ, M. C. 2013. Receptor-mediated endocytosis and trafficking between endosomal-lysosomal vacuoles in *Giardia lamblia*. *Parasitol Res*, 112, 1813-8.
- SARRIA-GUZMÁN, Y., CHÁVEZ-ROMERO, Y., BERNAL, J. E., GONZÁLEZ-JIMÉNEZ, F. E., SERRANO-SILVA, N. & FUSARO, C. 2022. Molecular identification of *Giardia* spp. in Latin America: An updated systematic review on reports from 2017 to 2021. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 16, 392-401.
- SIMPSON, A. G. B. & ČEPIČKA, I. 2009. Amitochondriate protists (Diplomonads, Parabasalids and Oxymonads). In: MOSELIO, S. (ed.) *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*. Third Edition ed. Oxford: Academic Press.
- SOLTYS, B. J., FALAH, M. & GUPTA, R. S. 1996. Identification of endoplasmic reticulum in the primitive eukaryote *Giardia lamblia* using cryoelectron microscopy and antibody to Bip. *J Cell Sci*, 109 (Pt 7), 1909-17.
- SOUSA, M. C., GONCALVES, C. A., BAIROS, V. A. & POIARES-DA-SILVA, J. 2001. Adherence of *Giardia lamblia* trophozoites to Int-407 human intestinal cells. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8, 258-65.
- SVÄRD, S. G., HAGBLUM, P. & PALM, J. E. 2003. *Giardia lamblia* -- a model organism for eukaryotic cell differentiation. *FEMS Microbiol Lett*, 218, 3-7.
- THIRION, J., WATTIAUX, R. & JADOT, M. 2003. The acid phosphatase positive organelles of the *Giardia lamblia* trophozoite contain a membrane bound cathepsin C activity. *Biol Cell*, 95, 99-105.
- THOMPSON, R. & MONIS, P. 2004. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol*, 58, 69.
- THOMPSON, R. C., HOPKINS, R. M. & HOMAN, W. L. 2000. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol Today*, 16, 210-3.

- TOUZ, M. C., CONRAD, J. T. & NASH, T. E. 2005. A novel palmitoyl acyl transferase controls surface protein palmitoylation and cytotoxicity in *Giardia lamblia*. *Mol Microbiol*, 58, 999-1011.
- TOUZ, M. C., KULAKOVA, L. & NASH, T. E. 2004. Adaptor protein complex 1 mediates the transport of lysosomal proteins from a Golgi-like organelle to peripheral vacuoles in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Mol Biol Cell*, 15, 3053-60.
- TOUZ, M. C., LUJAN, H. D., HAYES, S. F. & NASH, T. E. 2003. Sorting of encystation-specific cysteine protease to lysosome-like peripheral vacuoles in *Giardia lamblia* requires a conserved tyrosine-based motif. *J Biol Chem*, 278, 6420-6.
- TOUZ, M. C., ROPOLO, A. S., RIVERO, M. R., VRANYCH, C. V., CONRAD, J. T., SVARD, S. G. & NASH, T. E. 2008. Arginine deiminase has multiple regulatory roles in the biology of *Giardia lamblia*. *J Cell Sci*, 121, 2930-8.
- TOUZ, M. C. & ZAMPONI, N. 2017. Sorting without a Golgi complex. *Traffic*, 18, 637-645.
- WIELINGA, C., WILLIAMS, A., MONIS, P. & THOMPSON, R. A. 2023. Proposed taxonomic revision of *Giardia duodenalis*. *Infection, Genetics and Evolution*, 111, 105430.
- WIMMERSBERGER, D., COULIBALY, J. T., SCHULZ, J. D., PUCHKOW, M., HUWYLER, J., N'GBESSO, Y., HATTENDORF, J. & KEISER, J. 2018. Efficacy and safety of ivermectin against *Trichuris trichiura* in preschool-aged and school-aged children: a randomized controlled dose-finding trial. *Clinical Infectious Diseases*, 67, 1247-1255.
- YATES, D. M., PORTILLO, V. & WOLSTENHOLME, A. J. 2003. The Avermectin receptors of *Haemonchus contortus* and *Caenorhabditis elegans*. *Int J Parasitol*, 33, 1183-93.