



Estandarización de un método fluorométrico sobre trofozoitos de *Giardia lamblia*.

CONDO MONTERO, CLAUDIA¹
 SALAMANCA CAPUSIRI, EFRAÍN¹
 FLORES, NINOSKA¹
 GIMÉNEZ TURBA, ALBERTO¹

CORRESPONDENCIA: ALBERTO GIMÉNEZ
 AGIMENEZ@MEGALINK.COM

FECHA DE RECEPCIÓN: 25 DE MARZO DE 2015

FECHA DE ACEPTACIÓN 21 DE ABRIL DE 2015

Resumen

Giardia lamblia es un protozoo intestinal que causa procesos diarreicos de gran impacto epidemiológico en nuestro país, especialmente en niños. Las drogas utilizadas para el tratamiento son eficientes pero muchas producen efectos secundarios, debido a ello existen búsquedas de nuevos agentes antiparasitarios naturales y sintéticos por lo que existe la necesidad de contar con un método de evaluación antiparasitario *in vitro* sensible, cualitativo y rápido.

En el presente estudio se estandarizo *in vitro* una técnica fluorométrica con el indicador resazurina, el mismo que tiene como base los cambios de oxido-reducción del compuesto resazurina (no fluorescente) a resorufina (fluorescente) debido a la reducción química de las oxidoreductasas presentes en las células viables.

Abstract

Giardia lamblia is an intestinal protozoan that causes epidemiological impact of diarrheal in our country, especially in children. The drugs used for treatment are efficient but many have side effects due to this there are research for new natural and synthetic antiparasitic agents so there is important to uses a sensitive, qualitative and fast method of *in vitro* antiparasitic evaluation.

In this *in vitro* study it was standardized technique with a fluorometric indicator resazurin, the same which is based on redox changes from resazurin (nonfluorescent) to resorufin compound (fluorescent) due to chemical reduction present in oxidoreductases viable cells.

So for standardizing the fluorometric method we worked with a length of excitation and emission of 540 - 590nm respec-

¹ Unidad de Evaluaciones biológicas, Área de Química Farmacéutica, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. Av. Saavedra # 2224, Miraflores. La Paz, Bolivia

Así para la estandarización del método fluorométrico se trabajó con una longitud de excitación y emisión de 540 - 590nm respectivamente, determinando la población parasitaria de trabajo en un rango de $2,5 \times 10^5$ a $1,5 \times 10^6$ trofozoitos /mL, el tiempo óptimo de incubación se midió a las 2, 3, 4, 5, 6 y 7 horas y la concentración de resazurina de 4mM, 2mM, 1mM, 0.5mM y 0.25mM.

Una vez obtenidos los datos se determinó de manera *in vitro* la IC_{50} de varios antiparasitarios convencionales para el tratamiento de *Giardia*, trabajando con $7,5 \times 10^5$ trofozoitos /mL, tiempo de incubación 4 horas y concentración de aceptor de electrones 2mM, así mismo se trabajó con Alcaloides Totales de Corteza de la Evanta (*Galipea longiflora*) a una concentración de 100 ug/mL.

Obteniendo la IC_{50} de albendazol (0.4 uM), metronidazol (2.1 uM), tinidazol (1.5uM), mebendazol (0.81 uM) y CAT (77 ug/mL).

Logrando estandarizar finalmente un método fluorométrico, sensible y cuantitativo para las evaluaciones antiparasitarias dentro del I.I.F.B.

tively, determining the parasite population working in a range of 1.5×10^6 $2,5 \times 10^5$ trophozoites / mL, optimal incubation time from 2 to 7 hours and resazurin concentration 4mM, 2mM, 1mM, 0.5mM and 0.25mM.

Once the data determined was obtained, we worked in the IC_{50} of the conventional treatment of *Giardia*, working with $7,5 \times 10^5$ trophozoites / ml, 4 hours of incubation time and concentration of electron acceptor 2mM, we also determinate the anti-giardiasis activity of total alkaloids cortex, CAT, of Evanta (*Galipea longiflora*). Getting the IC_{50} of albendazole (0.46 uM), metronidazole (3.12uM), tinidazole (1.22uM), mebendazole (0.43 uM) and CAT (77 ug/mL).

Achieving finally standardize a fluorometric, sensitive and quantitative method for antiparasitic assessments within the IIFB

PALABRAS CLAVE

Giardia lamblia, Susceptibilidad, fluorométrico, Resazurina, Concentración Inhibitoria media (IC_{50}).

KEY WORDS

Giardia lamblia, Susceptibility, fluorometric, Resazurin, half Maximal Inhibitory Concentration (IC_{50}).

INTRODUCCIÓN

Giardia lamblia, es un protozooario entérico patógeno capaz de vivir en el ser humano y otros mamíferos cuando es ingerido en su forma infectante, quiste, una vez en el intestino del huésped se convierte en trofozoito, la forma metabólica activa, la cual se multiplica por fisión binaria en la superficie de la mucosa intestinal. Las manifestaciones clínicas puede ir desde asintomática hasta un estado con diarrea aguda o crónica, pérdida de peso, mala absorción llevando a una desnutrición propias en la giardiasis, en algunos casos hay deficiencia de vitamina A, hierro y zinc, Atias (1998: 56). Afecta a cerca de 280 millones de personas cada año a nivel mundial (Upcroft 2001, Ali & Nozaki 2007), especialmente en países en vías de desarrollo ya que es una en-

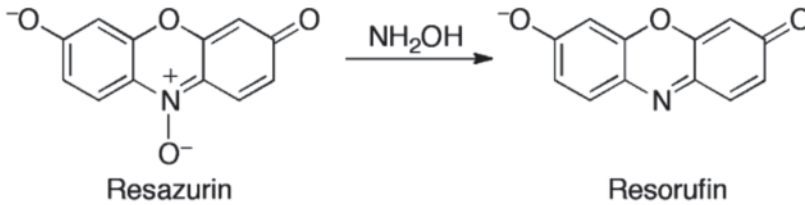
fermedad asociada a la pobreza, en Bolivia existen estudios que indican que alrededor del 25% de la población esta infectada (Condori 2008, Alparó I., 2005; Barrientos et al., 2008) afectando mayormente a niños, constituyéndose en un problema de salud pública.

El tratamiento para esta enfermedad es importante desde un punto de vista económico y social, entre los medicamentos utilizados comprende nitroimidazoles, quinacrina y furazolidona, la droga de elección es el metronidazol, aunque existen otras alternativas como el albendazol, sin embargo los efectos adversos que pueden producir que incluyen problemas gastrointestinales, náuseas, dolor de cabeza y leucopenia (Tracy & Webster, 1991) y la inaccesibilidad a estas drogas en ciertas comunidades, impulsa a probar terapias alternativas que ayuden a erradicar este problema, planteándose hipótesis de que ciertas plantas (semillas u hojas) contienen principios activos capaces de inhibir el crecimiento de *Giardia lamblia* tales son los estudios hechos a *Curcubita pepo* (Barron Gonzales, 2012), *Achyrocline satureioides*, *Eugenia uniflora*, *Feoniculum vulgare*, *Psidium guajava* (Costa et al, 2009), *Lippia spp.* (Ponce-Macotela et al, 2006), *Geranium niveum* (Calzada et al, 1999), *Hovenia dulcis* (Gadelha et al, 2005) entre otros que sostienen resultados prometedores a nuevas sustancias terapéuticas anti-giardiasicas.

Se han descrito diferentes métodos que permiten determinar la viabilidad celular *in vitro* facilitado el desarrollo de técnicas de tamizaje a nuevos componentes antiparasitarios (Martínez - Barrio 2011). La técnica espectrofotométrica de DPPH que emplea el radical 1,1-difenil-2-picrilhidracril puede dar variables dispersas debido a que es un radical nitrogenado de larga vida, en algunos casos puede ser inerte y reaccionar lentamente (Barrón et al, 2012). La técnica de recuento celular utilizando colorantes vitales es laboriosa, consume tiempo, no es sensible y es un proceso subjetivo (Marrero-Ponce et al. 2009). Los métodos basados en la reducción de la sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromide (MTT) por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables de cultivos de formazan, presentes en los cultivos. Estos métodos son ampliamente utilizados, sin embargo el producto final de esta sal (formazan) es insoluble en agua, por lo que se utiliza solventes orgánicos para solubilizarlo (Calzada et al, 1999), la utilización de análogos de MTT como el XTT sodio (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2-h-tetrazolium-5-carboxanilide) técnica también realizada en el IIFB sin tener resultados satisfactorio debido a la oxidación del medio de cultivo (TYIS-33). La mayoría presentan desventajas por ser de punto final, imposibilitando seguir el comportamiento celular después de ser sometidas a un tratamiento traumático.

La resazurina es un colorante redox que se utiliza para cuantificar la proliferación y observar la citotoxicidad en diferentes tipos celulares (Skehan, 1992). En un utilizaba para determinar contaminación por bacterias u hongos. Exhibe cambios colorimétricos y fluorométricos relacionados a la actividad celular metabólica (Zhang H, 2004). La técnica se basa en la capacidad de células activas metabólicamente que reducen en la mitocondria la resazurina a resorufina y dihidroresorufina donde la forma oxidada, resazurina ingresa al citosol y es convertida a la forma reducida por la actividad enzimática mitocondrial aceptando electrones del NADPH, FADH, GMNH, NADH (Makiuchi, 2013).

Figura 1. Reducción de Resazurina (no fluorescente) a resorufina (fluorescente)



La reducción produce que la resazurina oxidada o no fluorescente la reduce o cambia a la forma fluorescente, resorufina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas utilizadas para los ensayos Los trofozoitos de *Giardia lamblia* fueron donados por la Unidad de Parasitología de la Universidad Complutense de Madrid, España (2009). Se conservaron en medio TYIS-33 modificado (pH 7.2), se llenó por completo el tubo con el medio debido a que son parásitos anaerobios facultativos, se incubaron de 37°C. Cada 100 ml. de medio contiene: 0.1g K_2HPO_4 , 0.06g de KH_2PO_4 , 0.1 g NaCl, 3g Extracto de levadura, 0.05g Bilis bovina deshidratada, 1g de glucosa, 0.2g L-cisteina HCl, 0.02g ácido ascórbico, 2.2mg citrato férrico amónico, suplementado con 15 % de suero bovino fetal (SBF) y 3% de solución de vitaminas (Sigma - Aldrich).

Curva de crecimiento de *Giardia lamblia* Para conocer la cinética de crecimiento parasitaria se realizó la curva de crecimiento, el proceso consistió en hacer una solución madre con una concentración final de 2×10^4 trofozoitos /mL con TYIS-33 modificado, luego alicuotar en 10 tubos de 1,5mL. El trabajo se hizo por triplicado. Realizando el recuento celular diariamente en cámara de Neubauer.

Estandarización de la técnica fluorométrica

Se hizo una dilución a partir de un cultivo *in vitro* de trofozoitos en fase de crecimiento logarítmico con una concentración de $1,5 \times 10^6$ trofozoitos/mL a partir de la cual se realizó diluciones seriadas 1/2 abarcando concentraciones entre $1,5 \times 10^6$ hasta $2,5 \times 10^5$ trofozoitos/mL, los cuales fueron distribuidos en placas de cultivo de 96 pozos (Cellstar) por duplicado a tres repeticiones, a cada pozo se añadió 10µL de la solución de resazurina (Sigma Aldrich) a diferentes concentraciones (4, 2, 1, 0.5, 0.25mM) los tiempos de incubación fueron 2,3,4,5, 6 y 7 horas. Las placas fueron leídas en un lector de Fluorescencia (SYNERGYHT, Biotek) a una longitud de excitación y emisión de 540 y 590 nm respectivamente. A partir de los datos, se obtuvo curvas de fluorescencia en función a las concentraciones de parásitos y concentración de Resazurina, para los diferentes tiempos de incubación.

Antiparasitarios convencionales fueron adquiridos en la farmacia institucional utilizados para la estandarización.

- Albendazol 400mg

- Metronidazol 100 mg
- Tinidazol 500 mg
- Mebendazol 1000 mg
- Corteza Alcaloides Totales de Evanta (CAT) 100ug/mL

Se disolvieron en Dimetil sulfoxido (DMSO) para obtener una concentración de 100ug/mL y se hicieron diluciones seriadas a partir de 1ug/mL hasta 0,007 ug/mL a partir de la solución madre.

Mientras que de CAT se hicieron diluciones de 100, 50, 25 y 12,5ug/mL.

Tabla 1. Concentraciones de antiparasitarios convencionales y CAT utilizados para la estandarización del método.

Diluciones antiparasitarias con DMSO ug/mL	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015	0.007
Diluciones de CAT con DMSO ug/mL	100		50		25		12,5	

Preparación de placa de 96 pozos para evaluación de drogas control

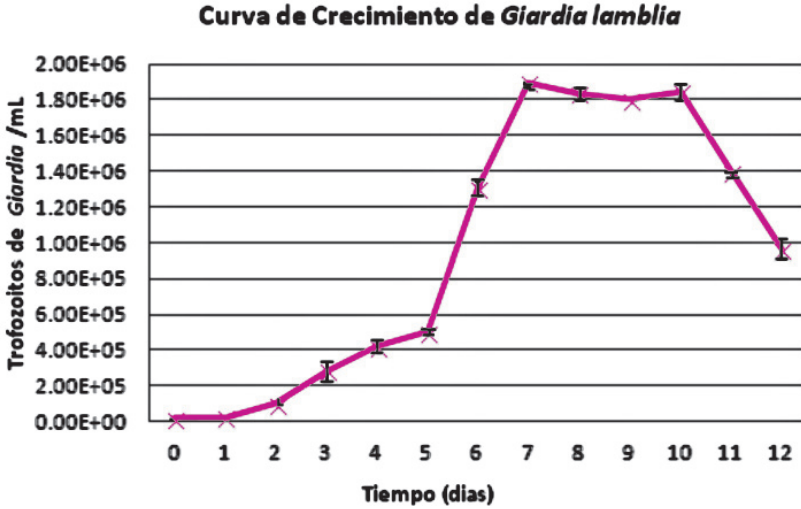
Se hizo una dilución 1/10 del cultivo de trofozoitos con glutaraldehido 2.5% para fijar los parásitos y realizar el recuento en cámara de Neubauer. Se ajusto la población a $7,5 \times 10^5$ trofozoitos/mL con medio TYIS-33 modificado, se los distribuyo en placas de 96 pozos (Cellstar) en un volumen de 100µL. A continuación se procedió a añadir las distintas concentraciones de las drogas control a evaluar en volumen similar al de los parásitos, se realizo un control de crecimiento parasitario es decir 100 uL de parásitos ajustados a la concentración ideal mas 100µL medio TYI-S-33, como blanco se utilizo el medio de cultivo. A la placa se añadió (10µL/pozo) una solución de resazurina en buffer fosfato salino (pH 7.0) dentro de un CandleJarr un recipiente cerrado de vidrio con una llave de paso en la tapa y una vela encendida en su interior de tal modo que permita la salida del oxígeno y la saturación en el interior del anhídrido carbónico, requerida para el crecimiento de los trofozoitos de *Giardia*. Las placas se incubaron durante 4 horas a 37°C.

Obtención de la CI_{50} por el método fluorométrico

Pasado el tiempo de incubación se procedió a la lectura de fluorescencia y determinación de la IC_{50} , con longitud de excitación y emisión de 540 y 590 nm respectivamente, el análisis de datos fue realizado en el programa Gen5, transformando el índice de fluorescencia en porcentaje de viabilidad de los parásitos, donde el 100% representa la fluorescencia del control de parásitos sin droga.

RESULTADOS

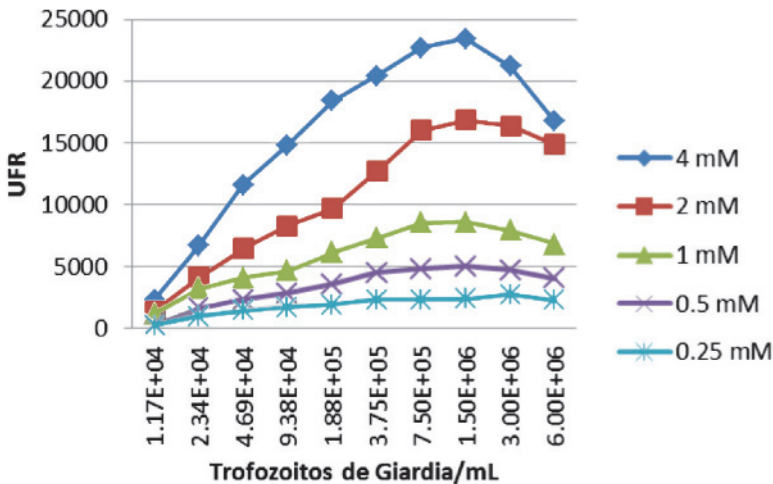
Fig.2. Curva de crecimiento de trofozoitos de *Giardia* con recuento diario (12 días).
*cada recuento se realizo por triplicado.



Se realizo la curva de crecimiento de *Giardia* observándose que en los días 5, 6 y 7 hubo el máximo crecimiento por mL y a partir del día 11 las concentraciones parasitarias disminuyen.

Emisión de fluorescencia por población parasitaria utilizando diferentes concentraciones de resazurina

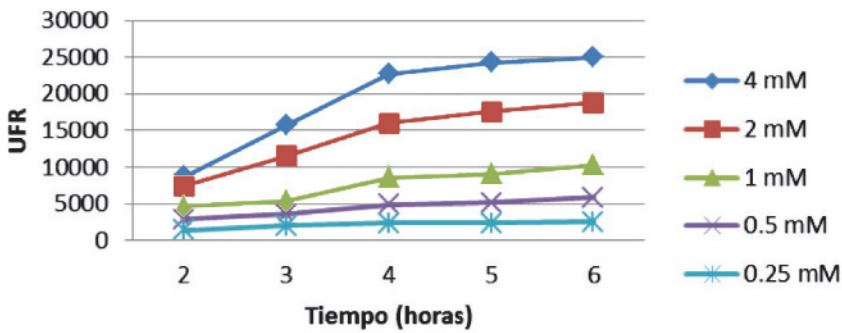
Fig. 3. Para la estandarización del método Fluorométrico la mejor linealidad ($R^2=0.96$) se obtuvo con la concentración de 2mM de resazurina.



La medición de la fluorescencia a diferentes concentraciones de resazurina y población parasitaria, nos muestra que la mayor emisión de fluorescencia es con una concentración de 4mM de resazurina pero la mejor linealidad ($R^2= 0,96$) se obtiene con la concentración de 2mM y la concentración parasitaria que presente una fluorescencia significativa es de 7.5×10^5 trofozoitos/mL.

Correlación entre la emisión de fluorescencia de trofozoitos y las diferentes concentraciones de resazurina

Fig.4. Comparación de la emisión de fluorescencia (UFR) por la resazurina en diferentes tiempos con una concentración de 7.5×10^5 trofozoitos de *Giardia* /mL



En cuanto a la determinación del tiempo se observa que a las 4 horas la emisión de fluorescencia empieza a ser significativa para las concentraciones de resazurina 2 y 4 mM.

Tabla 2. Resultados de la Concentración Inhibitoria media IC_{50} de antiparasitarios convencionales y CAT frente a *Giardia lamblia*. Obtenido del programa Gen5.

Antiparasitarios convencionales	IC_{50} obtenida con el programa Gen5 +SD	IC_{50} obtenido por otros autores
Albendazol 400mg	0.4 + 0.03 uM	0.21 uM (Arguello et al,2004)
Metronidazol	2.1 +0.18 uM	1,96 uM (Busatti H, 2007)
Tinidazol	1.5 +0.15 uM	4.1 uM (Arguello et al, 2004)
Mebendazol	0.81+ 0.012 uM	0,7 uM (Arguello et al,2004)
CAT	73.3 + 3.5 ug/mL	

DISCUSIÓN

Se determino la curva de crecimiento *in vitro* de los cultivos de trofozoitos de *Giardia* pudiendo observarse que el día 2, luego de la etapa de adaptación, empieza el crecimiento logarítmico de *Giardia* teniendo así los días 5, 6 y 7 como máximos picos de crecimiento logarítmico (Figura2). similares a los que obtuvo Karapetyan en 1963; mientras que Gonzales y Castro en 1986, mostraron que los mayores crecimientos fueron durante los días 4, 5, y 6 indicando un descenso del crecimiento en los días sucesivos utilizando medio BI-S-33. Por lo que para los ensayos de estandarización se utilizo cultivos de parásitos de 2 días de incubación puesto que los parásitos se encuentran adaptados al medio de cultivo y metabólicamente activos.

En la Figura 3, se observa una respuesta lineal de la fluorescencia al incremento del número de parásitos siendo la población de $7,5 \times 10^5$ trofozoitos/mL a una concentración de 2mM de resozurina la que presenta un R^2 de 0,96 mostrando cambios de URF de fluorescencia significativos a los cambios de población, variable importante a la hora de medir la IC_{50} de los compuestos antiparasitarios.

Si bien existen trabajos en donde se utilizan concentraciones bajas de trofozoitos 2×10^4 trofozoitos/mL (Barron Gonzales, 2007), 5×10^4 trofozoitos/mL (Cedillo – Rivera, 1992) estas no serían significativas para determinar cambios de población buscados y no existirían cambios en la fluorescencia ideales; según Arguello-García et al., 2004, trabajo con poblaciones de alrededor de 1×10^6 trofozoitos/mL y Ponce Macotela et al $1,5 \times 10^6$ trofozoitos/mL en nuestro caso produciría una saturación en cuanto a la emisión de fluorescencia.

Por otro lado en base a los resultados obtenidos de población parasitaria y concentración de resazurina se determinó el tiempo de incubación (figura 4) pudiendo observar una correlación lineal al aumento de tiempo de incubación teniendo una linealidad significativa a 2mM y 4 horas de incubación con un buen coeficiente de correlación lineal ($R^2=0,91$)

Mediante estos parámetros se confirmó la eficacia antiparasitaria *in vitro* de varios compuestos usados para el tratamiento de esta enfermedad así se verificó la mejor respuesta del albendazol y mebendazol respecto al metronidazol frente a trofozoitos de *Giardia* con IC_{50} de albendazol (0,4 uM), metronidazol (2.1 uM), tinidazol (1,5 uM) y mebendazol (0.81 uM) acercándose a resultados obtenidos anteriormente por estudios de susceptibilidad. (Arguello et al, 2004; Busatti et al, 2007; Echevarría A, 2001) permitiéndonos confirmar la validez de la técnica, trabajando con una concentración de parásitos de $7,5 \times 10^5$ trofozoitos/mL con un tiempo de incubación de 4 horas validando de esta manera el método fluorométrico.

Las enfermedades parasitarias son un problema de salud pública en todo el mundo especialmente en países en vías de desarrollo si bien existen tratamientos estos presentan efectos secundarios indeseables como ser molestias gastrointestinales, náuseas, dolor de cabeza y leucopenia incluso provocando casos de resistencia, por lo que surge la necesidad de encontrar nuevos agentes o entidades químicas con actividad antiparasitarias, utilizando nuevas técnicas laboratoriales constituyéndose la estandarización de este método fluorométrico en una herramienta sensible y cuantitativa de evaluación no solo de drogas antiparasitarias sino que además sirve para iniciar la búsqueda de una bioprospección de plantas medicinales en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue parcialmente financiado por el proyecto ASDI-SAREC 2014 a quien expresamos un especial agradecimiento. Asimismo a la doctora María Auxiliadora Dea Ayuela, profesora en Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, España, por la donación de cepas parasitarias.

REFERENCIAS

- Ali V, Nozaki T (2007) Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by "Amitochondriate" protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev* 20:164-187
- Atias, A., (1998). *Parasitología Médica*. Chile: Mediterráneo.
- Alparo L., (2005). Giardiasis y desnutrición. *Bol. ped.* 44(3), 163-173.
- Arguello-García R., Cruz-Soto M., Romero-Montoya L. y Ortega-Pierres G. (2004). Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles *in vitro*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (54), 711-721.
- Barrientos Galarza PO, Torrico MC, Suárez Barrientos E, (2008) Detección de *Cryptosporidium* spp y *Giardia lamblia* en niños inmunodeprimidos del Hospital del niño Ascencio Villarreal de Cochabamba en agosto de 2007. *Gaceta Médica Boliviana*.
- Barrón Gonzalez M., (2012). Inhibición del crecimiento de *Giardia lamblia* por acción del extracto acuoso y metanólico de semillas de *Curcubita pepo*. *Rev. Iberoamericana para la investigación del Desarrollo Educativo*. 9. 1-17.
- Busatti H., Vieira A., Viana J., Silva H., Souza-Fagundes E., Martins O., Alves R. y Gomes M. (2007). Effect of metronidazole analogues on *Giardia lamblia* cultures. *Parasitol Res.* 102, 145-149.
- Calzada F, Cerda García C., Mecks M., Cedillo Riveravera R., Mata R. (1999). Geranins A and B new antiprotozoal Atype proanthocyanidins from *Geranium niveum*. *J. Nat. Prod.* 1999 (62), 705 – 709.
- Calzada F, Velázquez C, Cedillo-Rivera R, Esquivel B (2003) Antiprotozoal activity of the constituents of *Telexys graveolens*. *Phytother Res* 17: 731-732
- Cedillo – Rivera R. y Muñoz O. (1992). *In vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *J Med. Microbiol.* 37. 221-224.
- Condori S., (2008). Frecuencia de *Giardia lamblia* en niños de 0 – 15 años de edad que acuden al Hospital La Paz durante los meses de junio- agosto 2007. 1.
- Costa Brandelli C., Brandt R., Attilio G., Tasca T. 2009. Indigenous traditional medicine: *In vitro* anti-giardial activity of plants used in the treatment of diarrhea. *Parasitol Res* 2009 (104), 1345-1349.
- Gadelha A.P.R., Vidal F., Castro T., Lopes C.S., Albarello N., Coelho MGP, YCeú Figueiredo SFL. (2005). Susceptibility of *Giardia lamblia* to *Hovenia dulcis* extracts. *Parasitol Res* (97), 399-407.
- González Castro, J., Bermejo Vicedo, M. T y Palacios González, F. (1986). Desenquistamiento y cultivo de *Giardia muris*. *Rev Ibérica de Parasitología*, 46 (1),21-25
- Karapetyan A.E., 1963, Determination of growth rate of *Lamblia intestinalis* cultivation *in vivo*. *Acta Protozool*, 1:321-326.
- Makiuchi T, Nozaki T. Highly (2013) divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. *Biochimie.* (13)00427-6.
- Marrero-Ponce, Y., Torrens, F., Alvarado, Y.J., Rotondo, R., 2006c. Bond-Based Global and Local (Bond, Group and Bond-Type) Quadratic Indices and Their Applications to ComputerAided Molecular Design. 1. QSPR Studies of Diverse Sets of Organic Chemicals. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 20, 685-701
- Martínez - Barrios E. (2011). Prevalencia de Giardiasis en guarderías infantiles de Tiabaya- Arequipa, Perú. *Neotrop. Helminthol., Asociación Peruana de Helminthología e Invertebrados Afines (APHIA)*, 5(2), 257-263.
- Ponce-Macotela, M.; Peralta-Abarca, G.; Martínez-Gordillo, M. 2005. *Giardia intestinalis* and other zoonotic parasites: prevalence in adults dogs from the southern part of Mexico City. *Vet. Parasitol.*, 131:1-4.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *J Natl Cancer Inst.* 1990; 82 (13): 1107-1112.
- Tracy, J.W., Catto, B.A., and Webster, Jr., L.T. (1991). Formation of N-(5-nitro-2-thiazolyl)- N'-carboxymethylurea from 5-hydroxyniridazole: Role of aldehyde dehydrogenase in the oxidative metabolism of niridazole. *Drug Metab. Dispos.* 19: 508-515.
- Upcroft, P. & Upcroft, J. A. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 150-164 (2001).
- Wright C., Anderson M., Allen D., Phillipson J.D., Kirby G., Warhurst D. Y Chang H. (1993). Quassinoids Exhibit Greater Selectivity Against *Plasmodium falciparum* Than Against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* Or *Toxoplasma gondii* *In Vitro*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology.* 40(3), 244-246.
- Zhang H., Du G., (2004). Assay of mitochondrial functions by resazurin *in vitro*. *Acta Pharmacol Sinica*, 25, 385-389.