



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

Fraccionamiento e identificación de
compuestos del orégano (*Lippia graveolens*)
con actividad anti-giardíasis.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA)

PRESENTA

Yadira Rufino González

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Martha Ponce Macotela

MÉXICO, D.F.

Noviembre 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A Mi esposo Jaime Aldana Rivas gracias por darme tu apoyo incondicional en todo momento e impulsarme día a día.

A Mis hijos: Jaime, Ricardo Martín, Perla Yadira, son la chispa de mi vida.

A Mis padres: Adelina y Daniel, por sus sabios consejos, enseñanzas, y apoyo, se merecen mi admiración.

A Mi hermana y hermanos: Tatís, Daniel, Temo, por que en ellos siempre he visto un espíritu de superación.

A Mi tía Gela por el gran cariño que te tenemos.

A Mis cuñadas: Norma y Laura.

A mis sobrinas: Daniela, Ameyalli, Laura Fernanda y Andrea.

A mis tías (os), primas (os), cuñadas (as) de las siguientes familias: Rufino, González y Aldana.

A mis entusiastas compañeros del Lab. De Parasitología Experimental: Dra Martha, Mario, Lety, Gustavo, Jimena, Elvia, Silvia, Jorge, gracias por su apoyo y por compartir el trabajo.

A mis alumnos de la Facultad de Ciencias UNAM, del taller "Estudio Biológico y Molecular de los Parásitos de Importancia Médica": Gina, Aaron, David, Sandra, etc., sigan adelante.

A mis compañeros de diversos laboratorios de la UNAM y del INP de los cuales he recibido parte de su experiencia, consejos y en algún momento compartí con Uds. momentos agradables: Angeles, Simón, Elvia, Luis.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la gran oportunidad que me a dado en mi vida profesional.

Al Instituto Nacional de Pediatría, por el apoyo para realizar este trabajo.

Al la Dra. Martha Ponce Macotela, por la confianza que a depositado en mí, por sus sabios consejos y su apoyo incondicional en todo momento.

Al Laboratorio de Helmintología del Instituto de Biología, UNAM.

Al Laboratorio De Productos Naturales del Instituto de Química de la UNAM.

A la Bióloga Gilda Ortiz Calderón que me ayudó en la identificación Taxonómica del orégano.

Al jurado que revisó este trabajo: Dr. Marcos Rafael Lamothe Argumedo, Dra. Martha Ponce Macotela, Dr. Manuel Jiménez Estrada, Dr, Gerardo Pérez Ponce de León. y Dr. Adolfo Andrade Cetto, por acertadas y excelentes observaciones que realizaron.

Fraccionamiento e identificación de compuestos del orégano (*Lippia graveolens*) con actividad anti-giardíasis.

Trabajo que presenta la Biól. Yadira Rufino González para obtener el grado de M. en C. (Biología)

**Directora de Tesis
Dra. Martha Ponce Macotela**

Índice

1.0	Resumen	4
2.0	Introducción	5
2.1	Historia	5
2.2	Clasificación Taxonómica	6
2.3	Especies	6
2.4	Epidemiología	8
2.5	Morfología.....	10
2.5.1	Trofozoíto.....	10
2.5.2	Quiste	13
2.6	Ciclo de vida	14
2.6.1	Enquistamiento	15
2.6.2	Desenquistamiento	16
2.7	Mecanismos de transmisión	16
2.7.2	Mecanismos patogénicos	17
2.7.3	Mecanismos de defensa	20
2.8	Manifestaciones clínicas	22
	Diagnóstico	22
2.10	Tratamiento.....	24
2.11	Plantas con actividad anti-giardiasica.....	28
2.12	El orégano mexicano (<i>Lippia graveolens</i>)	29
2.12.1	Usos en la alimentación.....	29
2.12.2	Usos medicinales.....	30
2.12.3	Composición del orégano	30
3.0	Justificación	31
4.0	Objetivo.....	32
5.0	Hipótesis	32
6.0	Material y Métodos.....	33
6.1	Fecha y Lugar de colecta.....	33
6.2	Obtención del extracto.....	33
6.3	Experimentos <i>in vitro</i>	33
6.3.1	Aislados de <i>G intestinalis</i>	33
6.3.2	Bioensayos	34
6.3.2.1	Síntesis de formazán	34
6.3.2.2	Recultivo	35
6.4	Fraccionamiento del extracto de <i>Lippia graveolens</i>	35
6.4.1	Análisis por Densitometría	35
6.5	Bioensayos con las seis fracciones	36
6.6	Determinación estructural.....	36
6.7	Ensayo de citotoxicidad en linfocitos mediante el ensayo colorimétrico.....	37
7.0	Resultados.....	39
7.1	Localización Geográfica de Milpillás, Gto	39
7.2	Efecto anti-giardiasico del extracto total de <i>Lippia graveolens</i> en los aislados WB y B2	40

7.2.1 MTT	40
7.2.2 Recultivo	41
7.3 Fraccionamiento del extracto de <i>Lippia graveolens</i>	42
7.4 Cromatografía en capa fina y densitometría del extracto total de <i>Lippia graveolens</i> y de las fracciones (F.1 a F.6).....	43
7.5 Efecto antiardiásico de las fracciones (F.1 a F.6) de <i>Lippia graveolens</i> en el aislado B2	44
7.6 Efecto antiardiásico con menor concentración de las fracciones F.5 y F.6 y determinado por reducción por de las sales de tetrazolio	45
7.7 Efecto antiardiásico con menor concentración de la fracción F.6 y determinado por recultivo	46
7.8 Determinación estructural de la fracción F.6	47
7.8.1 Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno	47
7.8.2 Espectroscopía de infrarrojo	49
7.8.3 Espectrometría de masas por impacto electrónico.....	51
7.8.4 Polarimetría	53
7.8.5 Compuestos identificados.....	54
7.9 Ensayo de citotoxicidad del extracto total y la fracción F.6 en linfocitos mediante el ensayo colorimétrico	56
8.0 Discusión	57
9.0 Conclusiones	61
10.0 Anexo.....	62
11.0 Referencias.....	64

Resumen

Giardia intestinalis (sinónimo *G. duodenalis*, *G. lamblia*) tiene distribución mundial y según la OMS existen 200 millones de personas con giardiasis sintomática en el Mundo. Los niños son los más afectados; la parasitosis puede cursar asintomática, sintomática aguda ó crónica, en este último caso produce dolor abdominal, diarrea, hiporexia, pérdida de peso, mala-absorción de nutrientes y déficit intelectual. Los fármacos que se utilizan para combatirla son: metronidazol, tinidazol, albendazol, paramonicina y nitazoxanida. Todos producen efectos secundarios y algunos son mutagénicos o teratogénicos. Además, ya hay resistencia a los fármacos. Debido a los efectos adversos y a la resistencia, una estrategia para contrarrestar el efecto de esta parasitosis puede ser con principios activos de extractos de plantas con actividad anti-giardiasca. En una publicación previa demostramos el efecto anti-giardiasco del extracto de orégano (*Lippia* spp). En esta tesis el objetivo fue fraccionar el extracto de orégano e identificar los compuestos con actividad anti-giardiasca. El orégano se colectó en Milpillas, Guanajuato, se identificó en el MEXU-UNAM como *Lippia graveolens* HBK, el extracto etanólico (75%) se fraccionó en una columna de sílica-gel, se obtuvieron 32 fracciones, que de acuerdo a su migración por polaridad en cromatografía de capa fina se agruparon en seis. Los bioensayos se realizaron con dos aislados: WB (ATTC30957, cepa internacional) y el aislado nacional INP-B2 (INP020300B2, obtenido de un ovino) 1.5×10^6 trofozoítos se expusieron a 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de cada fracción y el efecto anti-giardiasco se determinó mediante la síntesis de formazán y recultivo. La fracción que presentó mayor actividad a menor concentración fue la F.6, el recultivo se inhibió con 6 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente, para conocer la estructura de los compuestos de la F.6, ésta se analizó mediante resonancia magnética nuclear, espectroscopía de infrarrojo, espectrometría de masas por impacto electrónico y polarimetría. Los compuestos que se identificaron en la F.6 fueron: naringenina, pinoembrina y timol. Finalmente, se descartó efecto citotóxico del extracto total y de la F.6.

2. Introducción.

2.1 Historia.

Con el descubrimiento del microscopio a finales del siglo XVII por Antonie van Leewenhoek, fué posible que él mismo observara por primera vez trofozoítos de *Giardia sp.*, aunque sus ilustraciones no fueron difundidas. Vilém Lambl (1859) al examinar las heces de un niño con diarrea, encontró y describió a los trofozoítos y les llamó *Cercomonas intestinalis*, hasta este momento el parásito recibió poca atención. El parasitólogo americano Charles Wardell Stiles, en 1902, lo relacionó con la diarrea; cuando se desarrollaba la primera guerra Mundial (1914-1918), los soldados con diarrea eliminaban quistes y tenían síntomas similares a los que presentaban animales de laboratorio cuando se les infectaba con éstos. En 1921, Clifford Dobell sugirió que *Giardia sp.*, era un patógeno y en 1926 Reginald Millar trabajando en Londres, mostró que algunos niños infectados con *Giardia sp.*, presentaban mala-absorción y otros eran reservorios y diseminadores de los quistes. En 1954, los estudios detallados del americano Robert Rendtorff arrojaron evidencias claras, que relacionaban al parásito con la enfermedad (Boreham *et al.*, 1990; Cox, 2002).

2.2 Clasificación.

Cavalier Smith (1998), en su trabajo " A revised six-kingdom system of life" propone la siguiente clasificación:

Reino: Protozoa. Goldfuss 1818 stat. nov. Owen 1858 em.

Subreino: Archeozoa. Cavalier-Smith, 1983 em.

Phylum: Metamonada. Grassé 1952 stat. nov. et em. Cavalier-Smith 1981

Subphylum: Eopharyngia. Cavalier Smith 1993.

Clase: Trepomonadea. Cavalier Smith 1993.

Orden: Diplomonadida. Wenyon. 1926 emed. Brugerolle, 1975.

Género: *Giardia*. Kunstler, 1882.

Especie: *Giardia intestinalis* (Stiles, 1915).

Sinonimias: *G. lamblia*

G. duodenalis







El taxón Archeozoa incluye a un grupo de protistas unicelulares carentes de mitocondrias. Los Metamonada son un extenso grupo de protozoos flagelados; incluye principalmente a Retortamonadida, Diplomonadida y posiblemente también a Parabasalia y Oxymonadida. Estos cuatro grupos son anaerobios y en su mayoría simbioses de animales. Algunos Metamonada son parásitos. Estos flagelados son inusuales por carecer de mitocondrias. En el pasado eran considerados los Eukarya más primitivos, divergiendo del resto antes de que aparecieran las mitocondrias. Sin embargo, ahora se sabe que han perdido las mitocondrias secundariamente y que conservan los orgánulos y genes nucleares derivados de ellos. Los vestigios mitocondriales incluyen los hidrogenosomas, que producen el hidrógeno y las pequeñas estructuras llamadas mitosomas. Estos subgrupos presentan flagelos en grupos característicos de cuatro, que a menudo se asocian al núcleo (Cavalier, 2003).

2.3 Especies.

En relación al hospedero de origen se han propuesto más de 40 especies (Kulda y Nohýnkova, 1995). Filice (1952), con base a la morfología del trofozoíto y del cuerpo medio describió tres especies, **Tabla 1**. Posteriormente, se describieron dos especies en aves, mediante el análisis ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión y de barrido. La especie encontrada en roedores, se basó en la morfología

del quiste y el análisis de la secuencia del gen de la pequeña subunidad del rRNA.
(Tabla 1)

Tabla 1 Características de las especies del género *Giardia*.

Especie	Hospedero	Características morfológicas	Dimensiones del trofozoíto largo/ ancho (µm)	
<i>G. duodenalis</i>	Mamíferos domésticos (animales de compañía) y silvestres, humanos	Piriformes, cuerpo medio en forma de clava	12-15/6-8	
<i>G. agilis</i>	Anfibios	Largos y angostos con cuerpo medio en forma redonda.	20-30/4-5	
<i>G. muris</i>	Roedores	Redondos con un cuerpo medio redondo	9-12/5-7	
<i>G. ardeae</i>	Hurones, Aves (garza azul real , ibis cuello de paja)	Redondos, con un prominente muesca en el disco ventral y un flagelo caudal rudimentario. Cuerpo medio redondeoval o en forma de clava .	~10/~6.5	
<i>G. psittaci</i>	Aves, (Loros australianos)	Piriformes, sin flanco ventrolateral, cuerpo medio en forma de clava.	~14/~6	
<i>G. microti</i>	Lobos y ratas de campo.	Trofozoíto piriformes, cuerpo medio en forma de clava . Los quistes presentan dos trofozoítos con los discos ventrales maduros.		

Fotos tomadas de Feely and Erlandsen, 1985; McRoberts *et al.*, 1996; Erlandsen and Bemrick, 1987; Van Keulen *et al.*, 1998.

2.4 Epidemiología.

La giardiasis la produce el protozoo parásito *Giardia intestinalis* (sinónimos *Giardia duodenalis*, *Giardia lamblia*). Tiene distribución mundial. En Asia, África y América Latina, aproximadamente 200 millones de personas tienen giardiasis sintomática, (World Health Organization, 1996; Upcroft and Upcroft, 1998) y se registran 2.8×10^8 de nuevos casos nuevos por año (Lane and Lloyd, 2002).

Esta parasitosis es prevalente en países en vías de desarrollo, en donde las infecciones correlacionan con las pobres condiciones higiénicas, así como un deficiente control de calidad en el agua, aunado a la sobrepoblación. Se estima que la incidencia total de las infecciones por *Giardia intestinalis* en países industrializados es entre 2 y 5 % de la población y de 20 a 30% en los países en vías de desarrollo (Mineno and Avery, 2003).

La giardiasis es más frecuente en la población infantil de países subdesarrollados y puede tener efectos devastadores, debido a que produce mala-absorción y por lo tanto malnutrición (Khan *et al.*, 2000).

En México, la prevalencia es variable, oscila entre el 4.4 al 68.5 % (Tay *et al.*, 1994; Cifuentes *et al.*, 2004). Se han realizado varios estudios en la población infantil y la frecuencia varía de acuerdo a la región, tipo de población y método de diagnóstico utilizado: en Minatitlán, Veracruz, de 110 niños analizados entre 4 y 12 años, la frecuencia fue del 54.5% (Rodríguez-Guzmán *et al.*, 2000), en Chiapas, en un grupo de 1 a 14 años fue del 18.3% (Morales-Espinoza *et al.*, 2003), en el Valle del Mezquital, la prevalencia fue del 20% (Cifuentes *et al.*, 2000), en la Ciudad de México, en niños menores de 6 años la frecuencia fue de 9.4% en temporada de lluvias y de 0.4% en época seca (Cifuentes *et al.*, 2004), en la Sierra de Nayarit, en niños indígenas entre 5 y 14 años fue de 22.2% y en niños mestizos de la misma región la frecuencia fue del 14% (Guevara *et al.*, 2003). Recientemente, en el D. F., en un estudio que se realizó en niños menores de un año se encontró una frecuencia del 50% (Sánchez-Vega *et al.*, 2006).

Debido a que la especie *G. intestinalis* tiene diversos hospederos y a que morfológicamente no se pueden diferenciar. Se han utilizado varias técnicas para poderlos discriminar: isoenzimas, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP) y secuenciación, entre otros. Los genes que se han analizado son: glutamato deshidrogenada (gdh), triosa fosfato

isomerasa, factor de elongación 1 α y la pequeña subunidad del RNA ribosomal. Con el análisis de segmentos de estos genes se han descrito siete ensamblajes A-G: A (A-I y A-II) y B (III y IV) zoonóticos, C y D en perros, E en animales de granja (artiodáctilos), F en gatos y G en roedores (Tabla 2) (Monis *et al.*, 1999; Read *et al.*, 2004; Thompson, 2004).

Tabla 2. Genotipos de *G.intestinalis*.

Ensamble	Grupos	Hospederos
A	I	Humanos, ganado, gatos, osos y cobayos
	II	Humanos, ganado, gatos, osos y cobayos
B	III	Humanos, ganado, gatos, osos y cobayos
	IV	Humanos, ganado, gatos, osos y cobayos
C		Perros
D		Perros
E		Ganado vacuno, ovino, caprino porcino, equino
F		Gatos
G		Ratas

2.5 Morfología.

G. intestinalis es un protozoo que coloniza la parte superior del intestino delgado de hospederos vertebrados y presenta dos formas distintas en su ciclo de vida: el trofozoíto y el quiste. El trofozoíto es la forma vegetativa, móvil, que produce el cuadro clínico y el quiste es la forma de resistencia, responsable de la infección y transmisión de la giardiasis, es eliminado en las heces de los hospederos infectados y permanece viable fuera de él.

2.5.1 Trofozoíto.

El trofozoíto tiene forma de gota de agua ó pera, es simétrico bilateralmente, redondeado en el extremo anterior y puntiagudo en el posterior, mide de 9 a 21 μm de largo por 5-15 μm de ancho y de 2 a 4 μm de grosor, es aplanado, tiene una superficie dorsal convexa y una ventral cóncava. La estructura más evidente en la región ventral es el disco adhesivo (disco estriado ó disco suctor), cuya función es adherirse a la mucosa proximal del duodeno ó yeyuno, el centro del disco es de consistencia rígida, de apariencia estriada, porque está formado de microtúbulos que se conecta con varillas dorsales formando un área de placas, paralela a la membrana citoplasmática y le proporciona rigidez. Ultraestructuralmente, el disco ventral incluye un grupo de microtúbulos con 13 protofilamentos que se unen a la membrana ventral. Estos microtúbulos forman la base de los microanillos ó cintas dorsales, que se extienden perpendicularmente a la membrana. La proteína constituyente de las cintas dorsales incluye a las giardinas (α , β , γ), que son proteínas específicas de *Giardia*, de aproximadamente de 29 a 38 kDa de tamaño, las tubulinas se encuentran en los microtúbulos. En contraste a la estructura rígida del disco suctor, el borde es flexible, que le permite su adhesión a la mucosa intestinal. En esta región también están las proteínas contráctiles, como la actina, miosina y tropomiosina. El disco ventral está rodeado anterior y lateralmente por el surco marginal y el flanco ventro-lateral (Owen, 1980; Nohria *et al.*, 1992; Adam, 2001; Meyer *et al.*, 2005).

Tiene cuatro pares de flagelos: anteriores (entre el borde de la célula y la superficie dorsal) y latero-posteriores (en el cuarto posterior, entre el margen y la superficie dorsal), éstos proveen el movimiento del trofozoíto cuando se desadhiere. Ventrales (en el surco del disco adhesivo), ayudan a expeler el fluido de la concavidad formada

por el disco adhesivo incrementando la succión contra la superficie de las microvellosidades y caudales (en la disminución terminal), se mueven vigorosamente de lado a lado, comprimen el citoplasma del trofozoíto y provee la circulación interna de los fluidos del citoplasma. Los flagelos emergen de los axonemas ó cuerpos basales, tienen la estructura clásica de nueve pares de microtúbulos, que están simétricamente colocados en la parte externa de cada flagelo con dos microtúbulos en el centro, todos ellos corren a través del citoplasma y se proyectan a través del cuerpo del trofozoíto hacia afuera envueltos por una cubierta de membrana para formar el flagelo (Owen, 1980; Adam, 2001) **(Fig.1)**.

Los dos núcleos se encuentran en la región anterior, colocados simétricamente uno al lado del otro; la membrana nuclear está en estrecho contacto con los ribosomas, los dos núcleos son transcripcionalmente activos durante la división celular, no presentan nucleolos. El par de cuerpos medios son grandes y curvados, su tamaño varía entre 0.8 μm a 8.0 μm (promedio 3.34 μm) de largo por 0.2 μm y 1.8 μm (promedio 0.84 μm) de grosor. Los cuerpos medios son estructuras únicas dentro del género *Giardia*, están formados de microtúbulos que corren perpendicularmente al eje principal de la célula y situados dorsalmente a los axonemas caudales. Cuando la membrana plasmática se elimina, el cuerpo medio no se visualiza, lo que lleva a pensar que hay una unión entre el cuerpo medio y la membrana plasmática. Su función no es muy clara, aunque se ha propuesto que soportan el extremo anterior del organismo (Piva and Benchimol, 2004). Además, se les ha atribuido la función de reserva de microtúbulos para la célula, progénesis del disco, inmovilización de los microtúbulos entre las divisiones celulares y participación en la flexión vertical del extremo caudal, prepolimerización de tubulina que provee templados para la formación de las fibras del disco, requeridas para una rápido ensamblaje de los discos adhesivos de las hijas durante la citocinesis. (Piva and Benchimol, 2004).

En el citoplasma también se encuentra el retículo endoplásmico rugoso y numerosas vacuolas ovoides de 0.1 a 0.4 μm de diámetro que están contiguas a la membrana, a lo largo de la región ventral y dorsal, pero, no en la región del disco ventral, estas vacuolas presentan una variedad de actividades: hidrolasas, fosfata ácida, DNA asa, RNasa, cistein proteínasa, debido a su localización probablemente tengan función lisosomal (Owen, 1980; Adam, 1991).

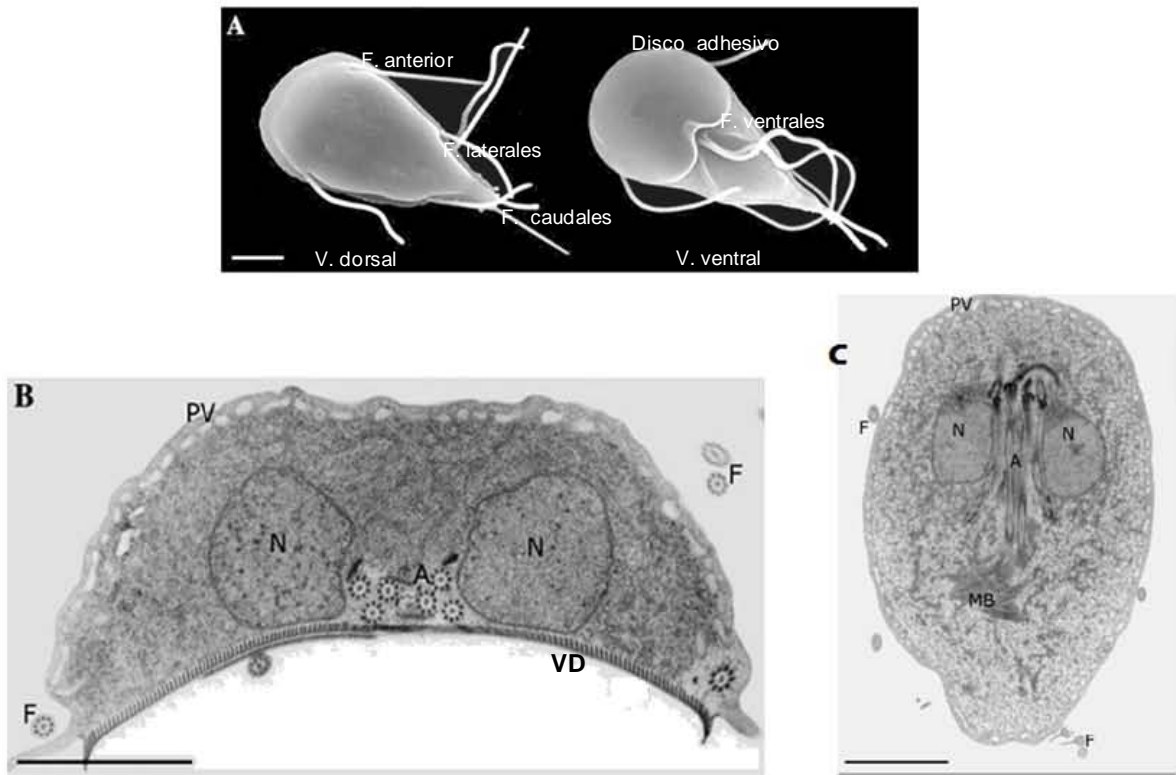


Fig. 1. Trofozoítos de *Giardia intestinalis* A) Microscopía Electrónica de Barrido que muestra la región dorsal y ventral de trofozoítos de la cepa WB. B) y C) Microscopía Electrónica de transmisión que muestra un corte transversal y longitudinal respectivamente. Se observa los Flagelos (F), Disco ventral (VD), Dos núcleos (N), Axonemas, (A), Vacuólas periféricas (pv), Cuerpo medio (MB) (Tomado de Mariante *et al.*, 2005).

Giardia intestinalis posee un citoesqueleto compuesto de microtúbulos que incluyen: disco adhesivo ventral, cuerpos medios, axonemas, proteínas contráctiles y giardinas. Las proteínas del citoesqueleto varían en tamaño de >200 hasta 20 kDa (Piva and Benchimol, 2004). No tiene aparato de Golgi ni mitocondrias típicos, peroxisomas ni hidrogenosomas (Lloyd and Wallis, 2001). Aunque, recientemente se ha evidenciado la presencia de mitosomas (Tovar *et al.*, 2003).

Por medio del método de campos pulsantes, se demostró que contiene cinco cromosomas y un genoma haploide de 12 Mb, codificando para un estimado de 5000 genes. (Adam, 2000; Eckmann and Gillin 2001), Svärd, 2003, demostró que durante el ciclo celular, cada ciclo nuclear entre un genoma diploide (2N) y un tetraploide (4N), resulta en una poliploidía celular de 4N y 8N (Svärd, *et al.*, 2003).

2.5.2 Quiste.

Tiene forma ovoide a elipsoidal, mide 8-12 μm de largo por de 7-10 μm ancho y 0.3 - 0.5 μm de grosor. Los quistes son resistentes a desinfectantes químicos, choque osmótico, cambios de temperatura y pH. El citoplasma se encuentra vacuolado, presenta fragmentos del disco ventral, cuerpos medios y flagelos. Las vacuolas periféricas tienen actividad lisosomal, tienen proteínasas que juegan un papel importante en el proceso de desenquistamiento (**Fig 2**).

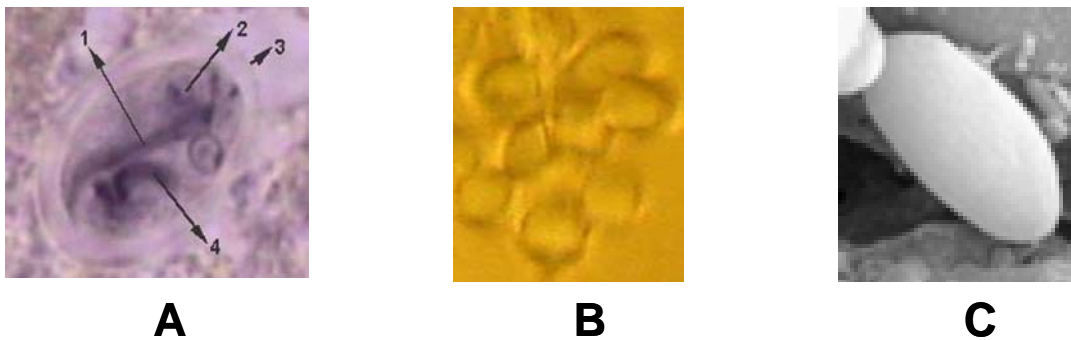


Fig. 2: Quistes de *Giardia intestinalis*: A) Provenientes de humanos y teñidos con sulfato-férrico. B) Obtenidos *in vitro* del asilado VGH- INP C) Microscopía electrónica de barrido de un quiste asociado a la mucosa intestinal de ratón. 1 Axonemas. 2 Núcleos. 3 Pared del quiste. 4) Cuerpo medio. Tomada de [http://www.telmeds.org](http://www.telmeds.org;); Lab. De Parasitología Experimental, VGH-INP y N. Müller, and N. von Allmen, 2005.

La pared del quiste está compuesta de una capa externa filamentosa de aproximadamente 0.25 μm de grosor y dos cubiertas celulares que están separadas de la membrana plasmática del parásito por un espacio peritrópico. Se ha asumido que la red filamentosa de la pared impide el paso de grandes moléculas, mientras que la membrana puede controlar la entrada de pequeñas moléculas. La pared quística está compuesta por un conjunto de proteínas (CWP1, CWP2 y CWP3) con pesos moleculares de 26 000, 39 000 y 27 300 respectivamente. De la pared filamentosa del quiste el 43 % en peso seco corresponde a carbohidratos, el 86% es N-acetil galactosamina y N-acetil-glucosamina (Lujan *et al.*, 1998; Adam, 2001; Mineno and Avery, 2003; Chávez-Munguía *et al.*, 2004; Gottig *et al.*, 2006)

Los quistes recién formados presentan dos núcleos y los que están maduros tienen cuatro.

2.6 Ciclo de vida.

Es de tipo directo. La infección del hospedero se inicia con la ingestión de los quistes, seguido por el desenquistamiento por el medio ácido del estómago y pH alcalino del duodeno, después de la liberación de los trofozoítos, éstos colonizan la parte superior del intestino delgado, en donde las condiciones para la proliferación son óptimas. Una vez en el intestino las formas vegetativas se adhieren a las células epiteliales y se dividen por fisión binaria longitudinal (**Fig. 3**).

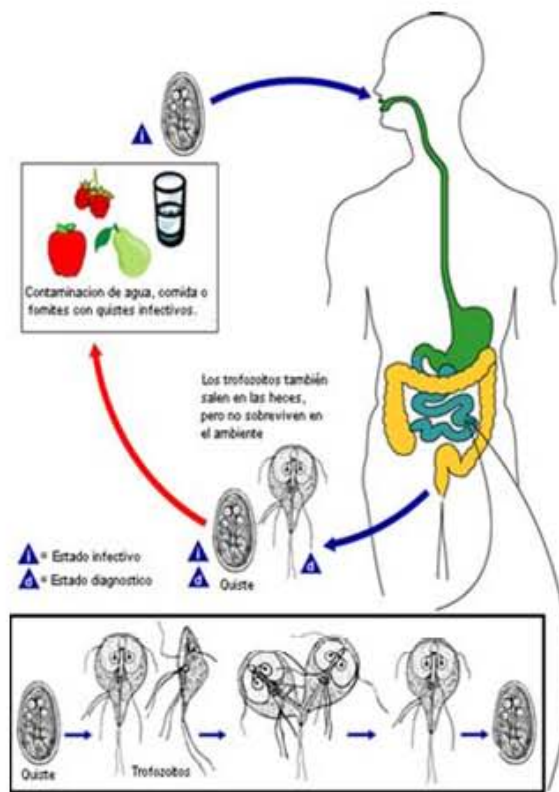


Fig. 3 Esquema que muestra el ciclo de vida de *Giardia intestinalis* (Tomado de Hawrelak, 2003)

El ciclo de vida puede completarse *in vitro* bajo condiciones similares a las que se encuentran en el tracto gastro-intestinal.

2.6.1 Enquistamiento.

Los trofozoítos empiezan a enquistarse cuando llegan a la última región del intestino delgado. El enquistamiento puede dividirse en una fase temprana y en una tardía. La primera fase involucra cambios en la división celular, metabolismo, ultraestructura, transporte de proteínas y expresión de genes. Los trofozoítos al inicio del enquistamiento se redondean, ya no pueden adherirse, el disco ventral se fragmenta en cuatro estructuras en forma creciente, disminuye la asimilación de glucosa y oxígeno gradualmente por lo tanto la toma de glucosa es indetectable en la fase tardía de enquistamiento (Paget *et al.*, 1998). Se forma el aparato de Golgi y grandes vesículas específicas de enquistamiento (ESV) para el transporte de los componentes de pared del quiste a la superficie del trofozoíto. La expresión de tres proteínas de pared del quiste ricas en leucina: CWP1, CWP2 y CWP3 que forman un complejo estable para el enquistamiento. La pared del quiste de *Giardia intestinalis* contiene altas concentraciones de carbohidratos y el 90% es galactosamina (Chávez-Munguía *et al.*, 2004).

Durante la fase tardía de enquistamiento ocurre una replicación completa del DNA, un evento sin intervención de la división celular y se ha demostrado que la división nuclear precede a la replicación del DNA. Esto puede ocurrir como consecuencias de señales de desarrollo y es llamado endoreplicación (Svärd *et al.*, 2003).

La absorción del colesterol ocurre casi completamente en el yeyuno mientras que la absorción de sales biliares ocurre en el ileon inferior. La población bacteriana en el intestino delgado inferior produce cambios químicos de las moléculas del colesterol, por lo tanto, se decrementa la cantidad de colesterol disponible para el crecimiento del parásito, cuando los trofozoítos llegan al ileon encuentran un medio progresivamente carente de colesterol y la inanición de colesterol dispara la diferenciación del parásito (Luján *et al.*, 1996).

El enquistamiento puede realizarse *in vitro*, al exponer a los trofozoítos a un pH de 7.8 y altas concentraciones de sales biliares primarias, ó alternativamente mediante la disminución de colesterol. El tiempo estimado para la síntesis de la pared del quiste es de aproximadamente de 14 horas. (Lloyd and Wallis, 2001).

2.6.2. Desenquistamiento.

Cuando los quistes llegan al estómago, son expuestos a altas concentraciones de H⁺, en el duodeno a una mezcla compleja de secreciones: sales biliares, bicarbonato y enzimas digestivas (proteasa y lipasas). El proceso involucra la salida rápida (completa en 15 min.) del trofozoíto. En este evento, los espacios peritrópicos aumentan y los trofozoítos emergen, separándose de la pared del quiste. La actividad de las cistein-proteasas, almacenadas en vacuolas periféricas son liberadas en el espacio entre el trofozoíto y la pared celular. Subsecuentemente, los flagelos emergen a través de una abertura en uno de los polos del quiste, seguido de la liberación de la célula completa. Se ha propuesto que esta estructura de vida corta llamada exquizoito, de forma oval, con ocho flagelos y un metabolismo intermedio entre quiste y trofozoíto, tiene cuatro núcleos con una poliploidía total de 16 N y sufre división celular dos veces sin replicación del DNA, generando dos trofozoítos causantes de la enfermedad, demostrando que la citoquinesis es importante en el desenquistamiento (Eichinger, 2001).

El desenquistamiento *in vitro* se induce al exponer los quistes a pH ácido, mimetizando el estómago, seguido de una solución alcalina. El proceso es rápido comparado, con el de enquistamiento: activación (5-10 min), ruptura del quiste (20-60 segundos), salida del trofozoíto (menos de 1 min.) y citoquinesis para dar dos células hijas (7-8 min). (Lloyd and Wallis, 2001).

2.7 Mecanismos de transmisión.

El más común es el fecal-oral por contaminación del agua para beber, por riego de frutas ó verduras con aguas residuales, alimentos de mala calidad sanitaria, contacto directo ano-mano-boca, manipuladores de alimentos, transmisores mecánicos, y por fecalismo de animales domésticos y de granja (Boreham *et al.*, 1990; Dawson, 2005; Di Giovanni *et al.*, 2006).

2.7.2 Mecanismos patogénicos.

Después del desenquistamiento, los trofozoítos se desplazan con sus flagelos y llegan a las microvellosidades, ahí se adhieren a los enterocitos, cubren la superficie del duodeno y yeyuno, causan daño que puede variar desde moderado hasta severo, mediante varios mecanismos: traumático, barrera mecánica y enzimático.

Traumático: por la presión negativa del disco succionador que se genera por la fuerza hidrodinámica generada por los flagelos ventrales.

Barrera mecánica: la adhesión de los trofozoítos al epitelio intestinal interfiere con la absorción de nutrientes (**Fig 4**). La rápida reproducción de los trofozoítos eventualmente crea una barrera física entre los enterocitos y el lumen intestinal, interfiriendo de esta manera con la absorción de nutrientes. Algunas zonas del duodeno “nichos” están cubiertas por trofozoítos, éstos producen inflamación en la mucosa duodenal, despolarizan de la membrana celular y alteración en la actividad secretora. Puede haber atrofia parcial de las microvellosidades y atrofia subtotal ó total en los casos severos, También produce varios grados de mala absorción. (Astiazarán-García *et al.*, 2000; Buret, 2005; Leder, *et al.*, 2007).

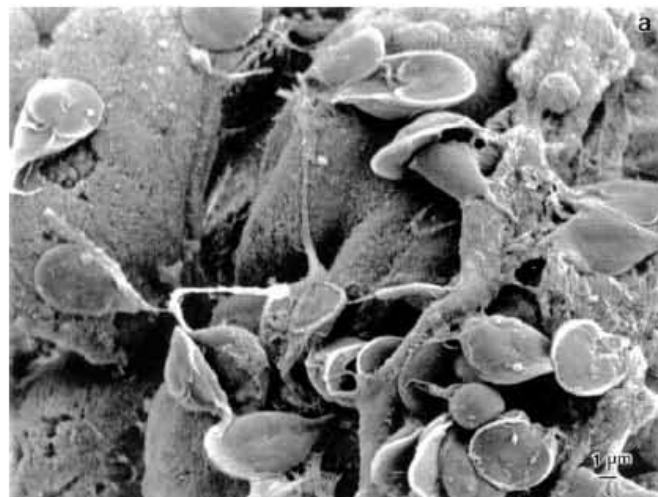


Fig.4 Microfotografía electrónica de barrido que muestra la colonización de los trofozoítos de *Giardia intestinalis* en duodeno (Tomado de Astiazarán-García *et al.*, 2000)

En un estudio que se realizó con ratones hembras de la cepa BALB/c inoculados con antígenos de excreción/secreción de *G. intestinalis* (Portland 1) y que se mantuvieron durante 21 semanas, el exámen histológico de duodeno, yeyuno e ileon mostró: infiltración eosinofílica, discontinuidad de los enterocitos, leucocitos intraepiteliales, edema en la submucosa, hiper celularidad y exfoliación celular (Fig 5). Se propone que estos antígenos estimulan la respuesta preferencial Th2 (Jiménez *et al.*, 2004).

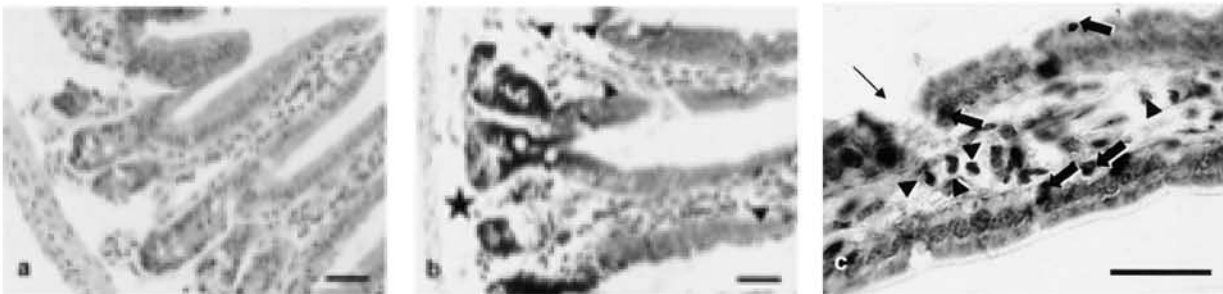


Fig. 5 Cambios histológicos del duodeno de ratones BALB-c inoculados con antígenos de excreción-secreción de *G. intestinalis*. a) control teñido con Hematoxilina-Eosina b) Las cabezas de flechas señalan a los eosinófilos y la estrella el edema c) Las cabezas de flecha muestran a los eosinófilos, flechas gruesa leucocitos intraepiteliales y las flechas delgadas señalan discontinuidad en los enterocitos. (Tomada de Jiménez *et al.*, 2004.)

Enzimático: los trofozoítos sintetizan algunas enzimas (sulfatasas, fosfatasa ácida, hidrolasas, cisteinproteínas y tiolproteínas) que pueden favorecer su adherencia al epitelio intestinal ya que atacan a las glicoproteínas de los enterocitos y alteran la integridad de las vellosidades (Ponce-Macotela, 2006).

Competencia: por sales biliares, colesterol, fosfolípidos (que no los puede sintetizar de novo), aminoácidos y por micronutrientes como el hierro y zinc. La disminución de sales biliares en el intestino, altera la formación de micelas y se produce la mala absorción de grasas, con la consecuente esteatorrea. Para producir energía, toma aminoácidos como la alanina, arginina y aspartato. La cisteína la utiliza para la formación de sus proteínas variables de superficie, la unión de estos aminoácidos forma puentes disulfuro que le dan estabilidad a la membrana y la protegen de los radicales libres. (Jaroll *et al.*, 1981; Das S *et al.*, 2001; Eckman and Gillin, 2001; Ponce, 2006,)

Toxinas: La clonación y secuenciación del gen de una proteína de superficie (VSP) CRP136 que se expresa una cepa de *G lamblia* resistente al metronidazol, mostró una homología del 57% con un grupo de toxinas de serpientes “sarafotoxinas” que causan síntomas intestinales similares a los observados en la giardiasis. Se propone que la giardiasis asintomática puede ser producida por una cepa no patogénica ó que la cepa secreta bajos niveles de CRPs. Por otro lado, probablemente un cambio en la regulación de los genes puede resultar en la expresión de una toxina, que puede reflejarse en un cambio de proceso asintomático a sintomático (Upcroft and Upcrofft, 1998).

Giardia intestinalis puede ser inactivada por diferentes clases de peptidos antimicrobianos como las α -defensinas que son producidas en el intestino. (Buzoni-Gatel *et al.*, 2006).

2.7.3 Mecanismos de defensa de *Giardia intestinalis*.

Todos los organismos tienen mecanismos de defensa que lo detoxifican de los radicales libres. El glutatión (GSH) es un primer mecanismo de defensa en los organismos, desde las bacterias hasta el hombre. Sin embargo, los trofozoítos de *Giardia intestinalis* consumen arginina, este aminoácido es necesario para la producción de óxido nítrico (ON) mediante la óxido nítrico sintasa (NOS). La toma activa de arginina en *Giardia intestinalis* inhibe la producción de óxido nítrico (NO) en las células epiteliales. La producción en el epitelio intestinal via inducible oxico nítrico sintasa (iNOS) es dependiente de la arginina como la fuente de nitrógeno. El óxido nítrico en *Giardia intestinalis* produce un efecto citostático, también previene del proceso de diferenciación entre desenquistamiento, enquistamiento (Eckman *et al.*, 2000; Kasper and Buzoni, 2001) (Fig. 6).

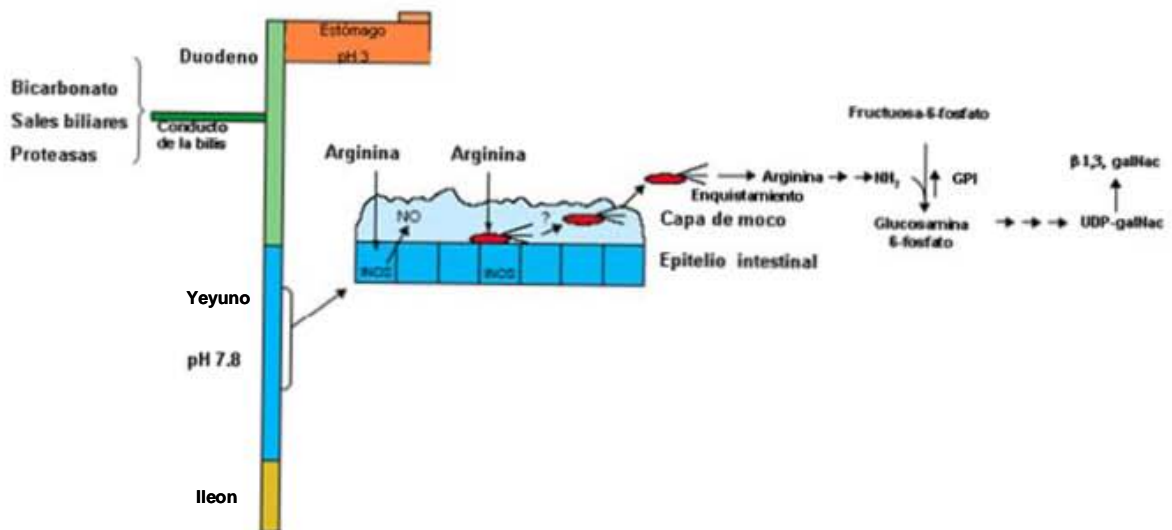


Fig 6 Mecanismo de defensa en *Giardia intestinalis* (Tomada de Eichinger D. 2001)

Además, los trofozoítos tienen proteínas variables de superficie (VSPs) ó CRP. Los genes de las VSPs se encienden espontáneamente y a una alta frecuencia (aproximadamente 10^{-3} a 10^{-4} por generación). *G. intestinalis* tiene en su genoma de 150 a 200 genes que codifican a estas proteínas, pero, solamente una VSP se expresa en la superficie de los trofozoítos en un momento dado., Estas proteínas presentan un dominio transmembrana altamente conservado y una porción carboxilo-terminal citosólica compuesta por solo cinco aminoácidos (CRGKA), su región es altamente variable, pero, todas son ricas en cisteína (aprox. 12 %). *Giardia intestinalis* cambia espontáneamente la expresión de sus VSPs ya sea en cultivo o en respuesta al ataque inmunológico. La variación antigénica se acompaña de la pérdida del ARNm del gen que codifica para una determinada VSP con la concomitante aparición de los transcritos derivados de la expresión de una nueva VSP. Los mecanismos mediante los cuales los trofozoítos cambian sus proteínas de superficie no se conocen, pero, se cree que la variación antigénica le permite a *Giardia intestinalis* evadir la respuesta inmune del hospedador (**Fig 7**) (Upcroft and Upcroft, 1998; Adam 2000; Eckman and Gillin, 2001; Lujan 2006).

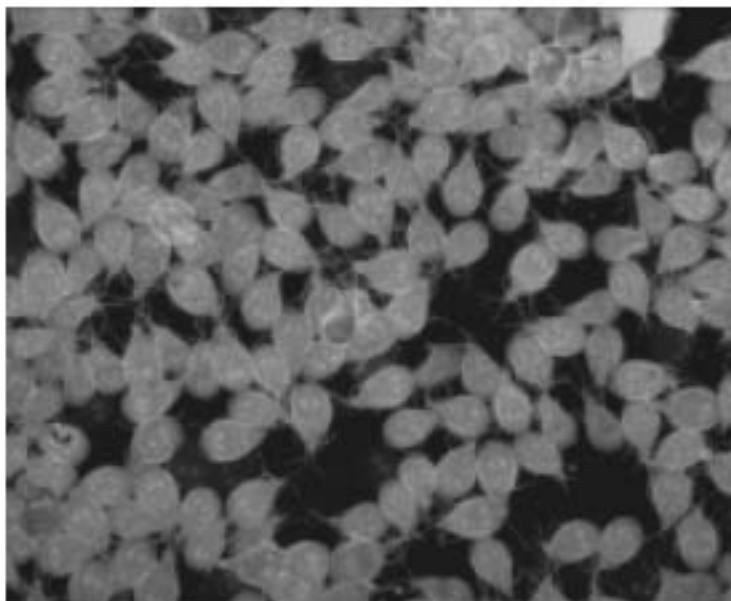


Fig 7. Variación antigénica de *G.intestinalis* en donde se observa que se marcaron los trofozoítos para la detección de la VSP 9B10 usando un anticuerpo monoclonal específico. En esta población algunos trofozoítos han dejado de expresar la VSP9B10, expresando en su superficie otra VSP que no fue detectada con el anti-VSP9B10. (Tomada de Luján 2006)

2.8 Manifestaciones clínicas.

El período de prepatente es entre 6-15 días y el período de incubación es entre 7-21 días. La giardiasis puede ser asintomática, sintomática aguda o crónica. El cuadro clínico es relativamente de corta duración y en adultos normales raramente excede de tres meses (Knight, 1980).

En la giardiasis asintomática, se eliminan quistes en la materia fecal y generalmente se autolimita en individuos inmunocompetentes. Los pacientes con giardiasis sintomática aguda se caracterizan por presentar evacuaciones diarreicas, explosivas, fétidas y esteatorreicas. Es frecuente la aparición de náuseas, vómitos y distensión abdominal, así como dolor en región epigástrica. No aparecen signos de invasión de la mucosa, como sangre en las heces. Se han reportado síntomas extraintestinales como: infiltrados pulmonares, linfadenopatía, poliartritis y urticaria (Clyne and Eliopoulus, 1989; Nenoff *et al.*, 2006). La fase crónica dura varios meses ó hasta años y es devastadora en la población infantil. Las evacuaciones son diarreicas o pastosas y espumosas, que se alternan con períodos en que las evacuaciones son de consistencia normal. Los pacientes también tienen flatulencia y meteorismo, mala absorción de grasas, proteínas, carbohidratos (xilosa, lactosa, maltosa y sucrosa), Vitaminas A y B₁₂, En los niños puede ocurrir desarrollo retardado. (Cañete *et al.*, 2004; Flissser *et al.*, 2006; Grazioli *et al.*, 2006).

2.9 Diagnóstico.

Para evidenciar la presencia de trofozoítos y/o quistes de *Giardia intestinalis* en las heces es necesario realizar:

Estudios coproparasitoscópicos (CPS): la elección de la técnica (CPS) dependerá de la consistencia de la materia fecal. En las heces blandas o diarreicas se encuentran más trofozoítos que quistes y en las heces formadas se encuentran más quistes que trofozoítos. El CPS directo en fresco se indica en los pacientes con evacuaciones líquidas y las técnicas de concentración (Faust) en los pacientes con evacuaciones formadas. Se recomienda realizar una serie de tres CPS ya que la sensibilidad aumenta cuando se procesan más muestras (con una muestra la sensibilidad es del

76-86%, con dos es del 90% y con tres hasta el 97.6%) (Hiatt *et al.*, 1995; Ponce Macotela 2006).

Sondeo duodenal: es indispensable cuando los coproparasitoscópicos son negativos, aquí se utiliza una cápsula de gelatina que contiene una bolita de plomo al final, sostenida por un hilo de nylon. El paciente en ayuno deglute la cápsula ayudándose con la ingestión de líquido, el extremo del hilo de la cápsula se sujeta a la mejilla del paciente, se le pide que camine de 2 a 3 horas, se le acuesta del lado derecho durante 30 minutos, para ayudar a que la cápsula llegue al duodeno. Posteriormente, se retira el hilo y la parte coloreada de amarillo verdoso se exprime sobre un portaobjetos, se cubre y se revisa bajo un microscopio para la búsqueda de trofozoítos (Tay y Sánchez, 2002).

Estudios inmunológicos: Actualmente existen diversos enzimoimmunoensayos comerciales con una especificidad superior al 99% (99.3-100 %) y sensibilidad que varía entre 88.6 y 100%. Algunos utilizan anticuerpos monoclonales en la detección del antígeno GSA 65 o CWP1 (ProSpecT ®*Giardia* Rapid, ProSpecT ®*Giardia* EZ Microplaca, PsoSpecT ®*Giardia* new Microplaca, CELISA ® TechLab) ó bien anticuerpos policlonales (ProSpecT ®*Giardia* Microplaca, Cambridge Microwell ELISA, Meridian Premier, Trend *G. lamblia* Direct Detection System, Trend *Giardia* Detection RS Test System). La tira de Biosite Triage I es una membrana de inmunocromatografía que permite la detección simultánea de antígenos del complejo *Entamoeba histolytica-E-dispar*, *G lamblia* y *Cryptosporidium parvum*. El anticuerpo monoclonal para la detección de *Giardia intestinalis* es contra la giardina y tiene una sensibilidad y especificidad del 83% y 100% respectivamente (Hashkes *et al.*, 1994; Guimarães *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2003).

Estudios moleculares: las técnicas moleculares basadas en la amplificación de segmentos de genes mediante la PCR y los RPFL se están utilizando para el diagnóstico epidemiológico molecular de la giardiasis. A partir de muestras de heces se ha evaluado por diversos autores, utilizando diversos indicadores que amplifican secuencias específicas de diversos genes (giardina, HSP, SS-rRNA, triosa fosfato isomerasa ó de la región intergénica del gen rRNA) y diferentes condiciones de amplificación: PCR anidada y múltiple. La sensibilidad analítica oscila entre 1 a 10 quistes por mezcla de reacción. (McIntyre *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2006; Haque *et al.*, 2007).

2.10 Tratamiento.

Los fármacos utilizados para el tratamiento de la giardiasis son: 5-Nitroimidazoles (Metronidazol, Secnidazol, Tinidazol y Ornidazol). Benzimidazoles (Albendazol, Mebendazol). Quinacrina (Atabrine y Mepacrine), Paromomicina (Hematina), Furazolidona (Furoxona) y 5-Nitrotiazol (Nitazoxanida).

Los **5-nitroimidazoles**, el Metronidazol (Flagyl) y Tinidazol tienen el siguiente mecanismo de acción: entran a los micro-organismos por difusión pasiva, el fármaco compete con la piruvato-ferrodoxin oxidoreductasa (PFOR) y la ferrodoxina por los electrones y se reduce el compuesto nitrotóxico. **Fig 8** (Moreno and Do Campo, 1985; Gillis and Wiseman 1996; Upcroft and Upcroft, 1998).

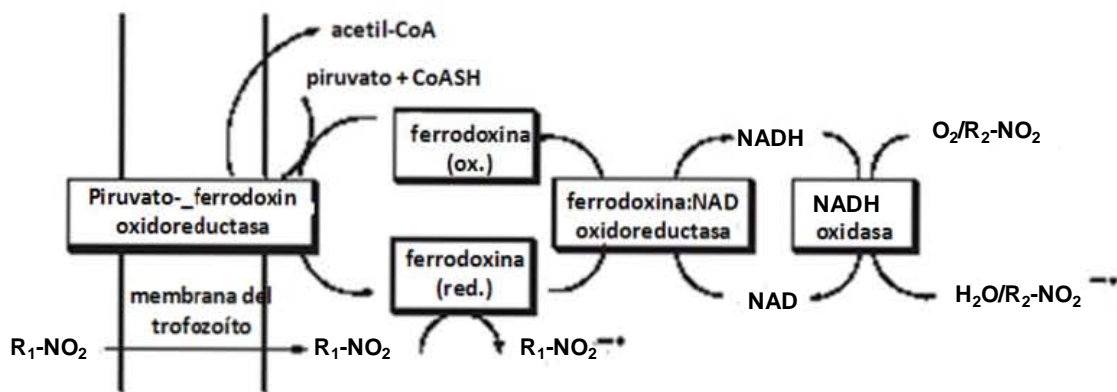


Fig 8. Diagrama de flujo de la Piruvato Ferrodoxin Oxido Reductasa (PFOR)

El DNA es el blanco del metabolito nitrotóxico. En estudios realizados con linfocitos de ratones y de humanos se ha visto pérdida de la estructura helicoidal y ruptura de las cadenas del DNA (Rodríguez Ferreiro *et al.*, 2001,2002; Menéndez D *et al.*, 2001; Celik and Ates, 2006).

En los Estados Unidos, el metronidazol no está aprobado por la FDA para el tratamiento de esta parasitosis. Su eficacia es variable oscila entre del 80 al 100% (López-Cifra *et al.*, 1982; Sadjjadi SM *et al.*, 2001) y del tinidazol es del 81.97% (Canete *et al.*, 2006).

Efectos adversos de los 5-nitroimidazoles. Del 2 al 10% de los pacientes que toman secnidazol presentan: náusea, vómito, glositis, anorexia, dolor epigástrico y sabor

metálico (Gillis J.C and Wiseman L.R. 1996). El metronidazol produce: diarrea, cefalea, náusea, leucopenia y sabor metálico (consecuencia de su eliminación en la saliva). Además es genotóxico, citotóxico, carcinogénico, teratogénico y mutagénico. Se contraindica en personas que consumen alcohol debido a que produce el efecto disulfiram, ya que se ve afectada la inhibición de la aldehído deshidrogenada por el metronidazol y puede causar cefalea, vómito y dolor gastrointestinal (Connor T.H. *et al.*, 1977; Gardener *et al.*, 2001; Sisson *et al.*, 2002; Celik A. and Ates, 2006).

Estudios *in vitro* realizados con linfocitos de humanos se documentó que el tinidazol es genotóxico y citotóxico (Lopez Nigro *et al.*, 2001). Mujeres embarazadas no deben ingerirlo durante el primer trimestre (Gardener and Hill, 2001).

Los benzimidazoles son recomendadas en las siguientes dosis para adultos y niños: Mebendazol (200 mg/día/ 3 veces al día durante 5 días) y Albendazol (400 mg/día/ una sola toma/7días). Actúan uniéndose a la β -tubulina, inhibiendo así la polimerización y por lo tanto la ruptura del citoesqueleto de *Giardia intestinalis*, dificultando la toma de la glucosa. El albendazol es inicialmente oxidado a sulfóxido de albendazol, un metabolito activo y después a sulfona de albendazol, que es inactivo. El albendazol induce las enzimas del citocromo P-450 que son las responsables de su metabolismo, que inhibe el sistema del citocromo P-450, llegando al efecto total de producir niveles de sulfoxido de albendazol (Upcroft and Upcroft, 1998, Venkatesan P. 1998).

La eficacia del albendazol (400 mg/día/ 5días) en 100 niños con giardiasis, en edades entre de 4 a 11 años, fue del 90% (Romero-Cabello *et al.*, 1995) y del mebendazol (200 mg/ 3 veces al día/1 día) en un grupo de 61 niños, entre 5-15 años de edad fue del 63.93% (Cañete *et al.*, 2006).

Estudios comparativos en donde se evaluó la eficacia del albendazol o metronidazol en pacientes pediátricos con giardiasis se encontró que el albendazol (10 mg/kg por 5 días) fue más efectivo (90%) que el metronidazol (20 mg/kg/día en tres dosis/ 7 días) 89.1% (Yereli K. *et al.*, 2004). Por otro lado, en pacientes adultos tratados con albendazol (400 mg /día/5 días) o metronidazol (500 mg / 3 veces al día/5 días), se encontró una eficacia del 96 y 100% respectivamente (Karabay O *et al.*, 2004).

Los efectos-secundarios del albendazol son: diarrea, vértigo, alergia, y alopecia (Karabay *et al.*, 2004); además, es teratogénico en animales. No se debe administrar en mujeres embarazadas y durante la lactancia (Romero-Cabello *et al.*, 1995; Venkatesan P. 1998).

Quinacrina (Atabrine): es un agente que inicialmente se utilizó contra la malaria. Después de la segunda Guerra Mundial, se usó como fármaco primario para el tratamiento de la giardiasis, las dosis en adultos es de 100 mg/ tres veces día/7 días y en niños es de 6 mg/ tres veces día/7 días; es altamente efectivo con una eficacia de 92 a 95% (Gardner and Hill, 2001). En un estudio realizado con 61 niños con giardiasis sintomática se les administró (2 mg / Kg de peso/ 5 días) y su efectividad fue del 83.6%.(Cañete R. *et al.*, 2006). Los efectos secundarios incluyen: vértigo, cefalea, vómito, respuesta psicópata y pigmentación de la piel (azul ó amarilla). Sin embargo, para el tratamiento de la giardiasis se sigue usando (Genel *et al.*, 2002; Mineno and Avery, 2003).

El mecanismo de acción de la quinacrina no es bien conocido pero se propone que se intercala con el DNA de *Giardia intestinalis* e interfiere la síntesis de ácidos nucleicos. (Mineno and Avery 2003).

Paramomicina (Humatin): la dosis recomendada en adultos es de 500 mg/ tres veces al día/ 5-10 días y en niños es de 30 mg/kg/día en tres dosis/ 5-10 días: el fármaco es efectivo en el tratamiento de la giardiasis en niños y mujeres embarazadas (Gardner and Hill, 2001). El mecanismo de acción de los aminoglucósidos es mediante la inhibición de la síntesis de proteínas, ya que se une a la subunidad-pequeña del rRNA y evita la lectura de los codones de RNAm. (Mineno and Avery 2003). Es un aminoglucósido que casi no se absorbe y tienen una eficacia del 60-70%. La paramomicina se excreta en las heces sin ser metabolizada. Los efectos secundarios incluyen: náusea, aumento del peristaltismo, dolor abdominal y diarrea. Como todos los aminoglucósidos, es ototóxico y nefrotóxico (Brugueras and Morejón, 1998, Mingeot-Leclerq and Tulkes, 1999).

Furazolidona (Furoxone): las dosis recomendadas para adultos y niños es: 400 mg/día/tres veces al día/7-10 días y 8 mg/kg/al día/3 veces al día/10 días respectivamente. Forma parte de los fármacos nitroheterocíclicos, es reducido a su metabolito citotóxico de manera similar a los 5-nitriimidazoles, pero, no por la vía de la ferredoxina, sino por la enzima NADH oxidasa. El mecanismo de acción de la furazolidona no está completamente entendida: en el trofozoíto, el fármaco se reduce, posiblemente por la vía de la NADH oxidasa, el efecto de muerte, se correlaciona con la toxicidad de los productos reducidos que pueden dañar componentes celulares importantes incluyendo el DNA (Upcroft and Upcroft, 1998). Su presentación es en suspensión y favorece su uso en niños, su eficacia varía entre 80 al 89 %. Entre los

efectos secundarios están: cólicos, diarrea, cefalea, náusea ó vómito, raramente fiebre, prurito, salpullido eritema de la piel y artralgias (http://www.conapeme.org.mx/manual_antibioticosnitrofuranos.pdf), anemia hemolítica, reacciones de hipersensibilidad y pigmentación amarilla oscura ó marrón de la orina, produce reacción semejante al disulfiram en pacientes que ingieren bebidas alcoholicas y hay evidencia de carcinogénesis en ratones (Adam, 1991; Gardner and Hill 2001). No es recomendado en mujeres durante el embarazo.

Nitazoxanida: las dosis (tabletas) recomendadas para adultos es: 500 mg/ 2 veces al día/ 3 días, para niños de 12 a 47 meses de edad se recomienda la suspensión (5 ml cada 12 horas por 3 días) y para edades de 2 a 11 años la dosis es de 10 ml/ 2 veces al día/ 3 días. Es un nitrothiazolyl-salicilamide, su estructura química es 2-acetyloxy-N-(5-nitro-2thiazolyl) benzamide.

La nitazoxanida actúa en la misma ruta metabólica que los 5-nitro-imidazoles (Inhibición de la ferrodioxina reductasa) pero sin síntesis de radicales libre y daña la estructura del DNA de la célula blanco. El fármaco es rápidamente transformado a su metabolito desacetilado la tizoxanida. Tanto la tizoxanida y su derivado glucuornyl (tizoxanida glucuronido) tienen actividad antiparasitaria (protozoarios y helmintos) y antibacteriana (Dupouy-Camet J, 2004; White, 2004).

Se ha documentado que la nitazoxanida (25 µg/mL) no daña el DNA de *Helicobacter pylori*, mientras que el metronidazol (25 µg/mL) si lo daña (Sisson G. *et al.*, 2002). La eficacia en niños es del 78% (Rodriguez-Garcia *et al.*, 1999).

En un paciente con HIV y giardiasis crónica, el tratamiento con metronidazol, albendazol ó secnidazol por separado no fueron efectivos; sin embargo, el tratamiento con nitazoxanida (1.5 g/dos veces al día/ durante 30 días) si fue efectiva (Abboud *et al.*, 2001).

Los efectos secundarios son: náuseas, cefalea anorexia, meteorismo, flatulencia y ocasionalmente dolor abdominal tipo cólico. (Díaz *et al.*, 2003).

Varios estudios *in vitro* muestran su eficacia. Se documentó que es más efectiva que el metronidazol, con valores de IC₅₀ menores al 0.1 µg/ml (Adagu *et al.*, 2002 ; Cedillo *et al.*, 2002); por otro lado, se publicó que es menos efectivo que el tinidazol, ya que el 100% de trofozoítos muertos se obtuvieron con 1 a 7 µg/ml de nitazoxanida y de 1 a 4 µg/ml de tinidazol, Ponce-Macotela (2001) .

2.11 Plantas con actividad anti-giardíaca.

Desde tiempos inmemoriales, los seres humanos han utilizado plantas como fuentes de: cobijo, vestido, tinte, armas, instrumentos musicales, medicina para tratamientos empíricos desde dolores de cabeza hasta infecciones parasitarias, entre otros. El papiro de Ebers, enumera 85 plantas, algunas de las cuales como la menta, se utilizan en forma de infusión de modo parecido a como se sigue utilizado. La OMS publicó que el 80% de los 4 000 millones de habitantes de nuestro planeta, confía en medicinas tradicionales, para sus principales necesidades de salud. Sin embargo, en menos del 10% de las 250 000 a 500 000 especies de plantas florecientes del mundo, se han documentado estudios científicos que muestren sus propiedades. Los científicos, en los pasados 20-30 años, han iniciado investigaciones en fitoquímica y han aislado y caracterizado más de 110 mil metabolitos secundarios (Camacho *et al.*, 2003).

Las plantas son una fuente importante para la obtención de fármacos antiparasitarios (Shealy, 1999; Delgado, 2005; Camacho *et al.*, 2003; Anthony *et al.*, 2005).

De los 110 mil metabolitos de las plantas, algunos con actividad antiparasitaria son: ácido kaínico (*Digenea simplex*) y la santonina (*Artemisia marítima*) como ascaricidas, emetina (*Cephaelis ipecacuanha*) y glaucarrubina (*Simarouba glauca*) como amebicidas (Farnsworth *et al.*, 1989).

En México, en 1994, se publicó el primer registro de plantas que se usan en la medicina tradicional como antidiarreicos y/o antiparasitarios y que tuvieron efecto anti-giardíaco *in vitro* (Ponce-Macotela *et al.*, 1994). Actualmente, existen diversos estudios de plantas con efecto anti-giardíaco: "Pippali Rasayana", mezcla de *Butea monosperma* y *Piper longum* (Agrawal *et al.*, 1997), *Alpinia galanga*, *Boesenbergia pandulata*, *Piper chaba*, *Zingiber zerumbet*, (Sawangjaroen *et al.*, 2005) *Justicia spicigera*, (Ponce-Macotela *et al.*, 2001) *Yucca schidigera*, (McAllister *et al.*, 2001), alicina de *Allium sativum* (Harris *et al.*, 2000), asarinina (*Zanthoxylum liebmannianun*), (Arrieta *et al.*, 2001), isoflavonas de la corteza de *Dalbergia frutescens* (Khan *et al.*, 2000), extracto etanólico de *Artemisia absinthium* (Guerra Ordoñez *et al.*, 2001), el extracto de *Petiveria alliacea* (Echeverría y Torres, 2001), la raíz de *Crossopetalum gaumeri*. (Ankli *et al.*, 2002), flavonoles glicosilados de *Conyzia filaginoides*, Geraninas A y B. de *Geranium niveum* y el extracto obtenido con metanol-diclorometano, de las raíces de *G. mexicanum*. (Calzada *et al.*, 1999, 2001, 2005). El extracto de cúrcuma (Perez-Arriaga *et al.*, 2006). Extracto de *Mentha x piperita* (Vidal

F. *et al.*, 2007). Recientemente publicamos la actividad anti-giardiasica del orégano (*Lippia* sp.) (Ponce-Macotela *et al.*, 2006).

2.12 Orégano mexicano (*Lippia graveolens*).

Sinónimos: *Lippia graveolens* Kunth (Syn. *L. amentacea* M.E. Jones; *L. berlandieri* Mill sp.; *L. berlandieri* Schau.; *L. graveolens* Schau.; *L. tomentosa* Sessé et Moc.).

Esta planta pertenece a la Familia Verbenaceae y se conocen aproximadamente 200 especies que crecen en Sud-América, América Central y Africa (Terblanché y Cornelius, 1996). En nuestro país se conocen aproximadamente 40 especies de plantas herbáceas pertenecientes a cuatro familias botánicas. La característica que distingue a la mayoría de estas especies es su extraordinario poder saborizante, fácil de percibir (Huerta, 1997).

Lippia graveolens H.B.K. conocido comúnmente como orégano mexicano, oregamon, salvia mexicana, salvia silvestre mexicana, crece silvestremente en áreas áridas y semiáridas de al menos 24 estados de la República Mexicana, sobre todo en regiones extensivas de la parte norte central (Estado de Jalisco, Durango, Guanajuato, Querétaro, San Luis Potosí y Zacatecas), la mayor producción de orégano es para fines comerciales (Uribe-Hernández *et al.*, 1992; Huerta, 1997; Mata-González y Meléndez-González, 2005). Los arbustos del género *Lippia* alcanzan hasta 2.5 m de alto y desarrollan un promedio de 1.20 m de follaje. La planta tiene sus tallos ramificados con gran cantidad de hojas que son opuestas, alternas y de forma ovalada con borde dentados, tienen una textura rugosa y con ligeras vellosidades, miden de 1 a 3 cm. de largo y de 0.5 a 1.5 cm. de ancho. Las flores son pequeñas, de color blanco y forman inflorescencias en racimos. Los frutos son pequeñas cápsulas que contienen semillas de color pardo no mayores de 0.25 mm. (Uribe-Hernández *et al.*, 1992, Arcila-Lozano *et al.*, 2004).

2.12.1 Usos en la alimentación.

Para la preparación de alimentos frescos como guisados (pipián, adobo), sopas, estofados de carnes, platillos típicos (pozole, menudo), chilpozonte, callos, barbacoa, etc. En las pizzas y otras comidas italiana, fabada asturiana, caldo gallego, etc. A la mezcla de orégano con laurel (*Laurus nobilis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) popularmente se le conoce como "hierbas de olor". Industrialmente, el orégano se añade al salmón, atún, sardinas, abulón, salsas, aderezos, aceitunas, encurtidos, chiles en escabeche, polvos y pastas para sazonar, quesos, sopas precocidas, frijoles, moles para rehidratar, etc. (<http://www.infojardin.com/aromaticas/Fichas/Oregano.htm>)

2.12.2 Usos medicinales.

En la medicina tradicional se utiliza como antiasmático (las hojas frescas y secas en forma de infusión acuosa al 0.5%), antiespasmódico, antitusígeno, emenagogo (regulador de la menstruación), estimulador del apetito, antiséptico, anti-inflamatorio y para la infertilidad (Uribe *et al.*, 1992). Es efectivo en las quemaduras, heridas y úlceras (Velasco-Negueruela y Pérez-Alonso, 1993; Terblanché *et al.*, 1996) y se le atribuye un efecto antioxidante (Arcila *et al.*, 2004).

Es antibacteriano: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *S. camarum*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhii*, *S. enterica*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris* y *Vibrio cholerae* (Hernández T. *et al.*, 2003). Antifúngico: (*Candida albicans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus níger*, *A. fumigatus*, *Penicillium*, *Geotrichum* y *Bipolaris*) (Kunle *et al.*, 2003; Bassole *et al.*, 2003; Salgueiro *et al.*, 2003; Portillo-Ruiz *et al.*, 2005). Antiparasitario: *Plasmodium falciparum*, (Valentin *et al.*, 1995), *Blastocystis hominis* (Force *et al.*, 2000) y contra la pediculosis (*Pediculus humanus corporis* y *P. h. capitatis*) (Oladimeji *et al.*, 2000).

2.12.3 Composición del orégano.

La obtención de los compuestos del orégano (*L. graveolens*) varían de acuerdo al tipo de solvente que se use, a la época de colecta y la localidad (Compadre *et al.*, 1987). En extractos metanólicos se identificaron: iridoídes (ácido carioptosídico y sus derivados 6'-O-p-coumaroil y 6'-O-cafeoil, en menor proporción loganina, secologanina, secoxiloganina, dimetilsecologanosido, ácido logánico, ácido 8-epi-logánico y carioptosido) (Rastrelli *et al.*, 1998). Flavanonas como la pinocembrina y naringenina (Domínguez *et al.* 1989; Lin LZ *et al.*, 2007). Entre sus aceites esenciales están los monoterpenos (timol, carvacrol, 1,8-cineole, p-cimeno, β- felandreno, α-pineno) y sesquiterpenos (β- cariofileno, α-humuleno, óxido de cariofileno). (Terblanché *et al.*, 1996; Vernin G. *et al.*, 2001; Senatore and Rigano 2001).

3.0 JUSTIFICACIÓN.

La giardiasis es la protozoosis intestinal que frecuentemente se registra en la población infantil. Aunque hay varios grupos de fármacos utilizados para el tratamiento de esta protozoosis, la eficacia es variable (55-95%), la mayoría de ellos produce efectos secundarios indeseables, algunos son mutagénicos o teratogénicos y se están generando aislados de *Giardia intestinalis* resistentes. Actualmente hay un creciente interés en el uso de productos naturales derivados de plantas (fitofármacos) como terapéuticos, por ejemplo: Digoxina (*Digitalis* sp), Quinina y quinidina (*Chinchona* sp), vincristina y vinblastina (*Catharanthus roseus*), atropina (*Atropa belladonna*), morfina y codeína (*Papaver somniferum*). En los últimos 12 años se han realizados diversos estudios de plantas con efecto anti-giardiasis; nuestro laboratorio tiene la finalidad el continuar con la línea de investigación de la búsqueda de plantas con actividad anti-giardiasis.

4.0 OBJETIVO.

- Identificar el principio activo del extracto etanólico de *L. graveolens* (Orégano)
- Evaluar la seguridad del principio activo de *L. graveolens*.

5.0 HIPÓTESIS.

El principio activo de *Lippia graveolens* tendrá mayor efecto antiulceroso que el fármaco de referencia (tinidazol)

6.0 MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1 Fecha y lugar de colecta.

El orégano se colectó en octubre del 2001 en Milpillas, Municipio de Victoria, Guanajuato (localizado a 1740 m. sobre el nivel del mar y situado a 100° 13'09'' de longitud oeste del Meridiano de Greenwich y a los 21°12'53''' de Latitud Norte).

Algunos de los ejemplares se procesaron para su identificación en el Herbario Nacional de México (MEXU) del Instituto de Biología, de la Universidad Nacional Autónoma de México (MEXU-IB-UNAM).

6.2 Obtención del extracto.

Las hojas secas se trituraron en un mortero con hielo seco, se hidrataron con etanol al 75% por 48 horas a 4°C con agitación, el sobrenadante se recuperó y el solvente se evaporó utilizando el equipo Centrivap- Concentrator.

Para los bioensayos, la muestra se hidrató con dimetilsulfóxido (DMSO), se esterilizó por filtración con una membrana de 0.2 µm FGLP, 13 mm y las concentraciones se ajustaron a 100, 200, 300, 400 µg/mL del extracto total (Ponce-Macotella *et al*, 2006).

6.3 Experimentos *in vitro*.

6.3.1 Aislados de *G. intestinalis*.

Los bioensayos se realizaron con dos aislados, uno de referencia internacional WB (ATTC30957) y el aislado nacional INP-B2 (INP020300B2) que se aisló de un borrego, ambos corresponden al grupo genético A-I (manuscrito en preparación). Para los bioensayos los trofozoítos se cultivaron en el medio TYI-S-33 suplementado con 10% de suero bovino fetal; posteriormente, se lavaron con solución salina fosfatos (PBS) y se determinó el número de células con una cámara de Neubauer.

6.3.2 Bioensayos.

Para determinar el efecto anti-giardíaco del extracto total, se realizaron dos tipos de ensayos: a) síntesis de formazán: el fundamento se basa en que solo las células metabólicamente activas reducen la sal (amarilla) de tetrazolium MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5, diphenyl tetrazolium bromid] y la reacción es agilizada por el catalizador PMS (N- methyl dibenzopyrazin methyl sulfate) a cristales de formazán (de color morado). Los cristales se solubilizaron con isopropanol ácido al 0.04% y la solución coloreada se cuantificó en un espectrofotómetro a 570 nm., y b) recultivo: después de la exposición de los trofozoítos a las diferentes concentraciones del extracto, se lavaron con PBS y se sembraron en medio de cultivo nuevo durante 48 horas a 37°C, posteriormente, se monitorearon cualitativamente bajo el microscopio invertido.

Los controles fueron: trofozoítos sin extracto, con el solvente (DMSO) o con 250 µg de tinidazol. Para el control de células muertas, 1.5X10⁶ trofozoítos en 1000 µL de PBS se lisaron mediante tres ciclos de congelación-descongelación (Nitrógeno líquido-agua en ebullición) (Ponce-Macotela *et al.*, 1994). Los bioensayos se realizaron por triplicado con un mínimo de tres repeticiones.

Tubos Eppendorf de 1.5 mL contenían: 1.5X10⁶ trofozoítos, el extracto (100, 200, 300 o 400 µg/mL), 250 µg /mL de tinidazol, DMSO (menor al 0.5%/mL) o trofozoítos sin extracto, en un volumen de 1.0 mL con PBS y se incubaron dos horas a 37° C.

Posteriormente, los trofozoítos se lavaron dos veces con PBS (4°C) y el precipitado celular se resuspendió en un volumen final de 700 µL con PBS.

6.3.2.1 Síntesis de formazán.

Para el análisis de viabilidad mediante la reducción de las sales de tetrazolio, a cada tubo se le agregó 700 µL de PBS, 40 µg de MTT y 20 µg de PMS, se incubaron durante 45 min a 37°C., posteriormente, se centrifugaron a 5000 rpm/5 min. El sobrenadante se decantó y a cada tubo se le adicionó 700 µL de isopropanol ácido al 0.04%. La concentración de formazán se cuantificó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm.

Para obtener la viabilidad celular se aplicó la fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = 100 - (\text{D.O. vivas} - \text{D.O. experimentales} / \text{D.O. vivas} - \text{D.O. muertas} \times 100)$$

6.3.2.2 Recultivo.

Para la determinación de la viabilidad mediante recultivo, una serie de cada experimento que contenían 1.5×10^6 trofozoítos por cada tubo, se incubaron en 1.5 mL de medio nuevo TYI-S-33 durante 48 horas a 37° C con 5% de CO₂. Posteriormente, los tubos se revisaron con un microscopio invertido.

6.4 Fraccionamiento del extracto de *Lippia graveolens*.

Un total de 2.0316 g del extracto total de orégano se colocaron en una columna con sílica gel desecante (Activada) (Grece Davison, Chemical, tamaño de malla: 200-325) y el eluyente fue Hexano- Acetato de etilo (4:1). La columna se conectó al vacío y se colectaron fracciones de 100ml. Se colectaron 32 fracciones y cada fracción se concentró en el rotovapor.

Posteriormente se monitorearon todas las fracciones en placas de sílica gel para cromatografía vertical de capa fina, eluidas con la misma proporción de solventes. Las placas se revelaron en una cámara con cristales de yodo o con sulfato cérico al 2%. De acuerdo a la migración por su polaridad, las 32 fracciones se agruparon en seis:

Fracción 1

Fracción 2

Fracción 3

Fracción 4

Fracción 5 (de la 5-10)

Fracción 6 (de la 11-32)

6.4.1 Análisis por Densitometría.

Para cuantificar el extracto total de *L. graveolens* y las fracciones que se obtuvieron del fraccionamiento (F.1-F.6), se utilizaron placas de Sílica Gel de 20 x 10 cm., las muestras (100µg/1.0 µl de fracción) se aplicaron de manera semiautomática (CAMAG Nanomat III) y el corrimiento se realizó en una cámara Horizontal (CAMAG Horizontal Developing Chamber), el eluyente fue hexano: acetato de etilo (4:1). Se dejó 35 minutos y por capilaridad la mezcla de solventes llegó al otro extremo de la placa. Se reveló con sulfato cérico al 1 % en solución de ácido sulfúrico 2N y la densitometría se cuantificó en el equipo CAMAG a 560 nm.

6.5 Bioensayos con las seis fracciones.

Para comprobar la actividad anti-giardíaca de las fracciones se utilizaron las mismas estrategias que anteriormente se describieron para el extracto total: síntesis de formazán y recultivo.

Después de determinar que fracción presentó mejor efecto anti-giardíaco con la menor cantidad analizada, se procedió a determinar la estructura del compuesto mayoritario de la fracción seleccionada mediante cuatro técnicas: resonancia magnética nuclear, espectroscopía de infrarrojo, espectrometría de masas por impacto electrónico y polarimetría.

6.6 Determinación Estructural.

La determinación de la estructura de la fracción seleccionada se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Química, bajo la supervisión del Dr Manuel Jiménez Estrada.

a) Resonancia Magnética Nuclear RMN- H^1

Con esta técnica se analiza la estructura molecular de compuestos que presentan átomos con momento nuclear magnético de spin., en particular el hidrógeno. La fracción seleccionada se analizó en un equipo Varian Gemini-200 MHz.

b) Espectroscopía de Infrarrojo:

Técnica analítica complementaria que permite la identificación de los grupos funcionales de una muestra y su posible caracterización e identificación. Las sustancias también absorben energía electromagnética en la región infrarroja del espectro. La radiación infrarroja no tiene suficiente energía para ocasionar la excitación de los electrones, pero da lugar a que los átomos y grupos de los compuestos orgánicos vibren alrededor de los enlaces covalentes que los conectan. Las vibraciones son cuantizadas y conforme ocurren, los compuestos absorben energía infrarroja en regiones específicas del espectro, se utilizó la radiación del espectro electromagnético en una longitud de onda comprendida entre los 800 y 400000 nm.

c) Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico (EM-IE⁺):

Es una técnica analítica instrumental de gran sensibilidad, capaz de identificar de forma inequívoca cualitativa y cuantitativamente, cualquier tipo de mezclas de sustancias. Esta técnica también permite determinar la masa molecular de un compuesto y de los diversos fragmentos que resultan de la rotura controlada del mismo. Para ello la muestra que se analiza, se ioniza y por lo tanto se destruye. Se bombardea con una fuente de corriente de electrones de alta velocidad, el compuesto pierde a su vez algunos electrones, se fragmenta y da diferentes iones, radicales y moléculas neutras. Para el análisis de la fracción seleccionada se utilizó un equipo Espectro de Masas: Equipo Joel RX 505 HA.

d) Polarimetría:

La polarimetría es una técnica no destructiva que se utiliza para medir la rotación óptica que presentan compuestos orgánicos e inorgánicos. Un compuesto se dice que es ópticamente activo si la luz polarizada es girada cuando pasa a través de él. La cantidad de rotación óptica es determinada por la estructura molecular y la concentración del compuesto.

6.7 Ensayo de citotoxicidad en linfocitos mediante la reducción de las sales de tetrazolio.

Para evaluar la seguridad del extracto total y de la fracción seleccionada se realizaron ensayos de citotoxicidad en linfocitos de individuos aparentemente sanos.

Los linfocitos se aislaron por medio de un gradiente de Ficol y se cuantificaron con una cámara de Neubauer.

Las diferentes concentraciones del extracto total (100, 200, 300, 400 µg/mL) o las diferentes concentraciones de la F.6 (2, 4, 6, 8 µg/mL) y 300 000 linfocitos se llevaron a un volumen final de 1.0 mL con medio RPMI-1640, como control se utilizaron linfocitos que no se expusieron al extracto ni a la fracción. Se incubaron durante 2 horas a 37°C, con 5% de CO₂, se lavaron dos veces con PBS 1X y se llevaron a un volumen final de 300 µL. Posteriormente, se transfirieron a una placa de 96 pozos, colocando 100 000 linfocitos/100µL de medio RPMI, 49 µL (1mg/mL) de XTT (sodium 3'- [phenylamino- carbonyl] -3,4- tetrazolium]- bis (4- metoxi- 6- nitro)benzene sulfonic acid hydrate) y 1.0 µL (0.383 mg/mL) de PMS (N- methyl dibenzopyrazin methyl

sulfate), se incubaron 24 horas a 37°C con 5% de CO₂ y la concentración de formazán sintetizado se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm.

La viabilidad celular se determinó:

% viabilidad = D.O. experimentales X 100 / D.O. vivas

7.0 Resultados.

7.1 Localización Geográfica de Milpillas, Gto.

El orégano se obtuvo en el Municipio de Victoria, Gto. **Fig. 9.** El ejemplar enviado al Herbario Nacional de México (MEXU) del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (MEXU-IB-UNAM) correspondió a *Lippia graveolens* y se le asignó el número de referencia **1 022 934.**

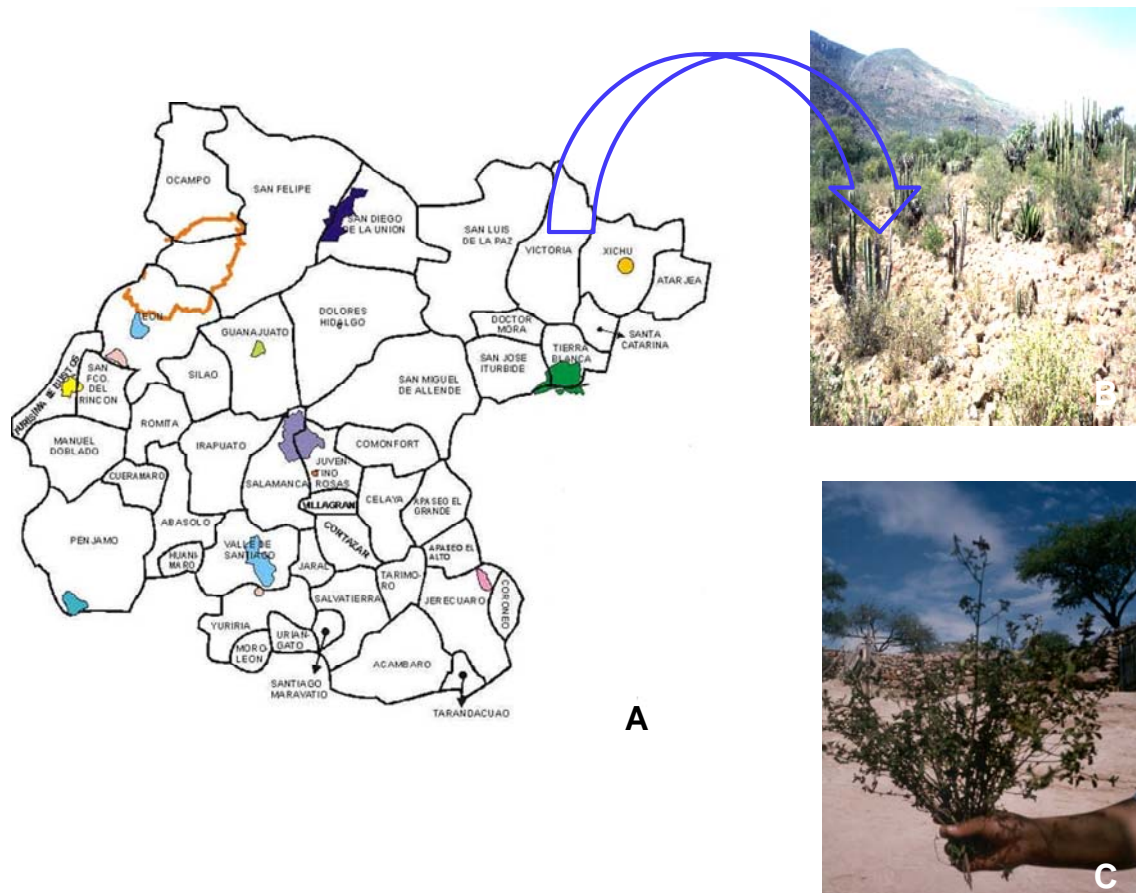


Fig.9 A) Localización geográfica de Milpillas, Municipio de Victoria, Gto. B) Lugar de colecta del orégano C) Ejemplar que se determinó taxonómicamente.

7.2 Efecto anti-giardíaco del extracto total de *Lippia graveolens* en los aislados WB y B2.

7.2.1 MTT.

El porcentaje de viabilidad de los trofozoítos de los aislados WB y B2, expuestos a las diferentes concentraciones del extracto de orégano y determinado mediante la reducción de las sales de tetrazolio (MTT-PMS) se muestra en la **Fig 10**. Con 400 $\mu\text{g/mL}$ del extracto, el porcentaje de trofozoítos muertos de la cepa WB fue del 94.35 % y para el aislado B2 fue del 84.29 %. Mientras que con el tinidazol (250 $\mu\text{g/mL}$), el aislado más sensible fue el el B2 (54.13%).

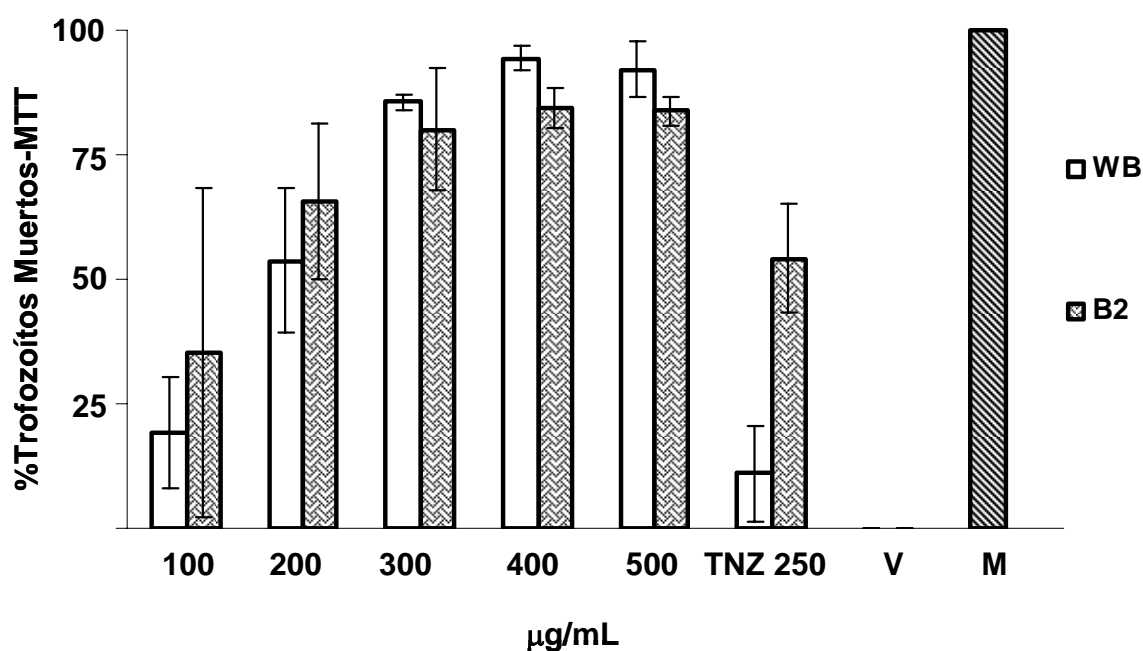


Fig. 10. En la gráfica se muestra el porcentaje de trofozoítos muertos con las diferentes concentraciones del extracto total de orégano ($\mu\text{g/mL}$) en los dos aislados, mediante la técnica de reducción de sales de tetrazolio, T tinidazol, V vivas y M muertas.

7.2.2 Recultivo.

La determinación de la viabilidad de los trofozoítos mediante la técnica de recultivo se muestra en la **Tabla 3**. La inhibición del recultivo de la cepa WB fue con 200 µg/mL del extracto y para el aislado B2 fue con 300 µg/mL. Con el tinidazol (250 µg/mL) no encontramos trofozoítos vivos en el aislado WB.

Tabla 3. Inhibición del recultivo de trofozoítos previamente expuestos al extracto de *L. graveolens*.

	Extracto total de <i>L. graveolens</i> (µg/mL)					OH	TNZ	V
	100	200	300	400	500	75%	250	
WB	si	no	no	no	no	si	no	si
B2	si	si	no	no	no	si	si	si

Sí: trofozoítos vivos

No: trofozoítos muertos.

7.3 Fraccionamiento del extracto de *Lippia graveolens*.

El fraccionamiento del extracto total de *L. graveolens* generó un total de 32 fracciones, cada una de 100 ml, que de acuerdo a su migración en placas para cromatografía en capa fina se agruparon en seis (**Tabla 4**). El rendimiento total que se obtuvo de todas las fracciones fue de 327.2 mg.

Tabla 4 Fracciones del extracto total de *Lippia graveolens*, rendimiento, color y consistencia.

Número de fracción	Fracción asignada	Rendimiento (mg.)	Coloración	Consistencia
1	1	92.2	Ámbar	Oleosa
2	2	47.3	Ámbar	Pastosa
3	3	42.9	Ámbar con gránulos	Pastosa
4-5	4	30.3	Verde con gránulos	Pastosa
6-9	5	53.0	Verde oscuro	Pastosa
10-32	6	61.5	Verde	Pastosa

7.4 Cromatografía en capa fina y densitometría del extracto total de *Lippia graveolens* y de las fracciones (F.1 a F.6).

El extracto total y las fracciones contienen compuestos que son más o menos polares. En el extracto total se observan cuatro bandas. La F.1 está enriquecida con un compuesto polar. El 50% de la F.2 corresponde a un compuesto polar. La F.3 tiene cuatro bandas, La F.4 cinco bandas. En la F.5 se registraron seis bandas y en la F.6 se observan cuatro bandas **Tabla 4 y Fig. 11**.

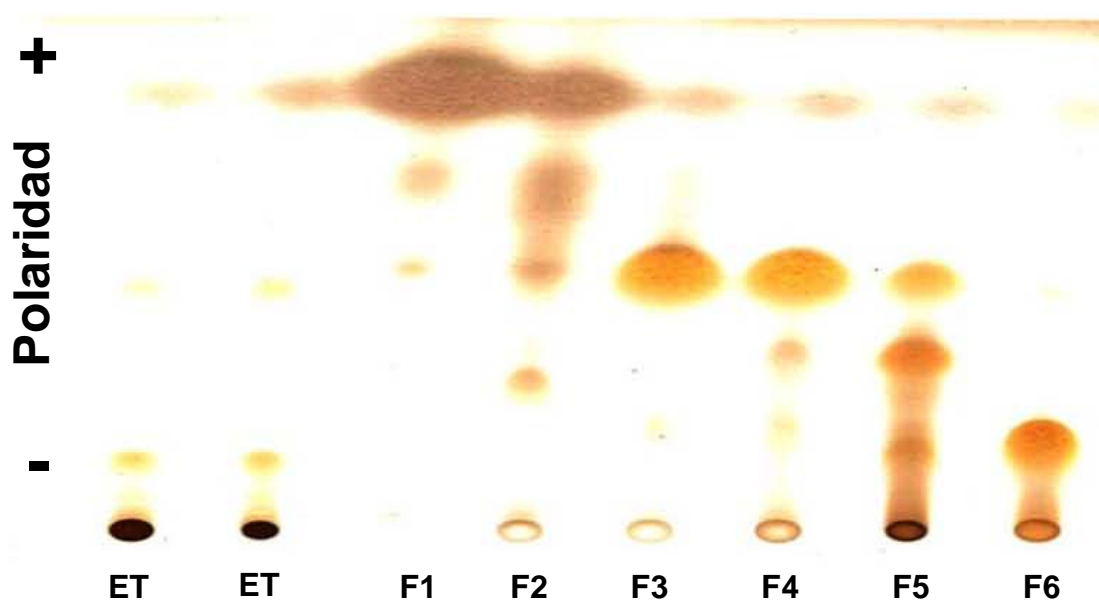


Fig 11. Fotografía de la Cromatografía en capa fina del extracto total (ET) y las seis fracciones (F.1 a F.6) de *Lippia graveolens*

7.5 Efecto anti-giardíaco de las fracciones (F.1 a F.6) de *Lippia graveolens* en el aislado B2.

El efecto anti-giardíaco de las seis fracciones y que se determinó mediante la reducción de las sales de tetrazolio se muestra en la **Fig 12**. El mayor porcentaje de trofozoítos muertos y con la mínima concentración (10 $\mu\text{g/mL}$) se observó en la fracción F.5 (76%) y en la F.6 (80%). Por otro lado, todas las fracciones con 50 $\mu\text{g/mL}$ produjeron más del 70% de trofozoítos muertos.

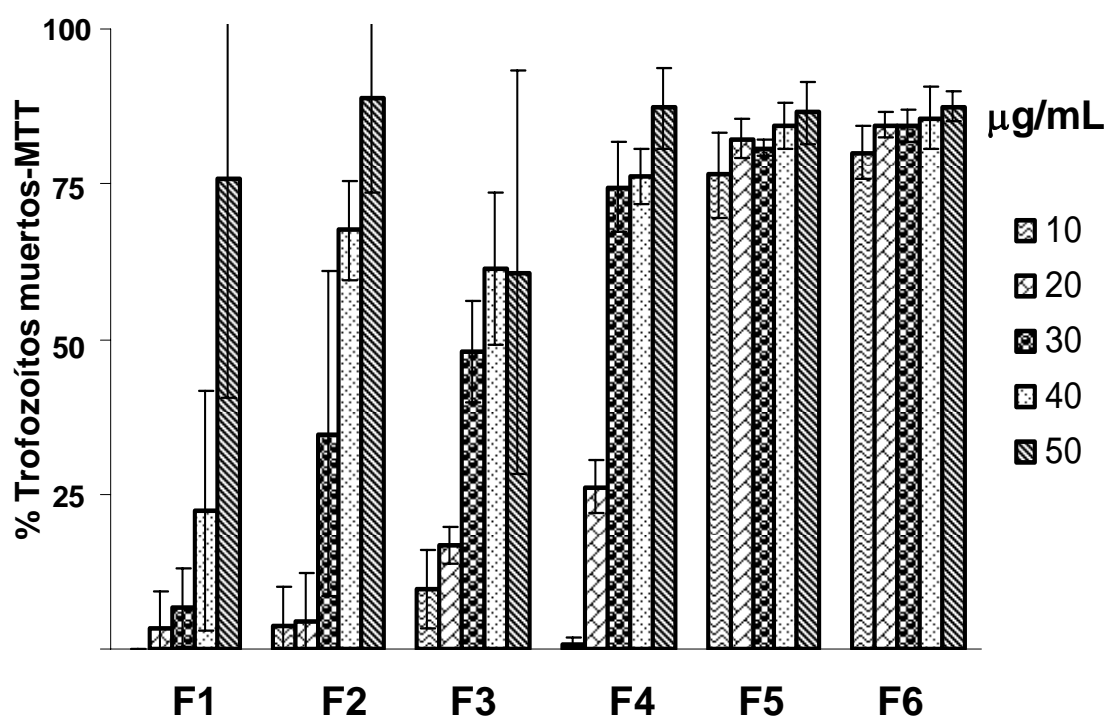


Fig. 12. En la gráfica se muestra el porcentaje de trofozoítos muertos con las diferentes concentraciones ($\mu\text{g/mL}$) de las seis fracciones.

7.6 Efecto anti-giardíaco con menor concentración de las fracciones F.5 y F.6 y determinado por reducción de las sales de tetrazolio.

Debido a que con 10 $\mu\text{g/mL}$ de las fracciones F.5 y F.6 se encontró el 76 y 80 % de trofozoítos muertos respectivamente **Fig12**. Se decidió bajar la concentración de estas dos fracciones a 2, 4, 6 y 8 $\mu\text{g/mL}$ y realizar los bioensayos **Fig. 13**. Con 4 $\mu\text{g/mL}$ de la fracción F.6 se encontró el 74.36% de trofozoítos muertos. Este porcentaje fue superior al que se obtuvo con 300 $\mu\text{g/mL}$ del extracto total (76.2%) y con 250 $\mu\text{g/mL}$ de tinidazol (48.87%).

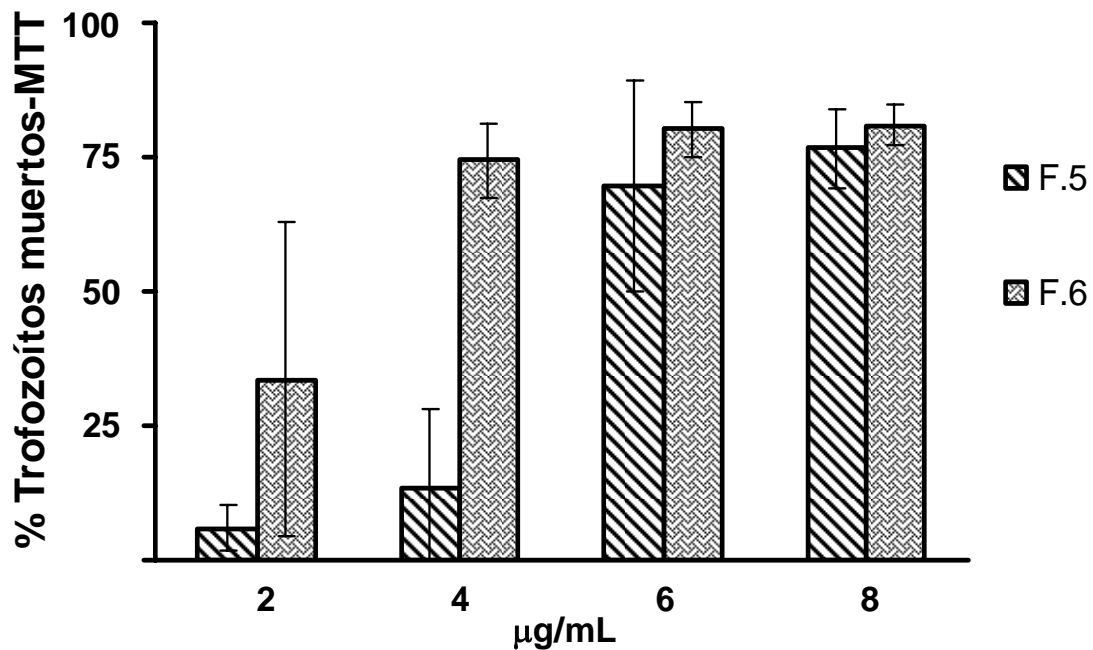


Fig.13. En la gráfica se muestra el efecto anti-giardíaco con 2, 4, 6, y 8 $\mu\text{g/mL}$ de las Fracciones F.5 y F.6

7.7 Efecto anti-giardíaco con menor concentración de la fracción F.6 y determinado por recultivo.

El daño irreversible de la F.6 en la cepa de referencia WB, determinado mediante recultivo fue con 6.0 $\mu\text{g/mL}$. **Tabla 5.**

Tabla 5. Efecto anti-giardíaco de la F.6, determinado por recultivo

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Fracción F-6					ET	T	DMSO	Crt
	2	4	6	8	10	300	250	0.5%	M
Trofozoítos muertos (%)	97	99	100	100	100	100	99	0	100

ET extracto total, T tinidazol, DMSO solvente y Crt trofozoítos muertos por congelación descongelación.

7.8 Determinación estructural de la fracción F.6.

Ya que la fracción F.6 presentó el mejor efecto antihipertensivo (74%) a la menor concentración (4µg/mL), se decidió analizar esta fracción para conocer su estructura mediante: resonancia magnética nuclear (RMN ^1H), espectroscopía de infrarrojo (IR), espectrometría de masas por impacto electrónico (EM) y polarimetría.

7.8.1 Resonancia magnética nuclear de hidrógeno

- 1.- El espectro de RMN ^1H mostró que el compuesto mayoritario de la fracción F.6 tiene un esqueleto característico de una flavanona (**Figura 13**).
- 2.- Adicionalmente, también se identificó otro compuesto que presentó el esqueleto de otra flavanona (**Figura 14**).

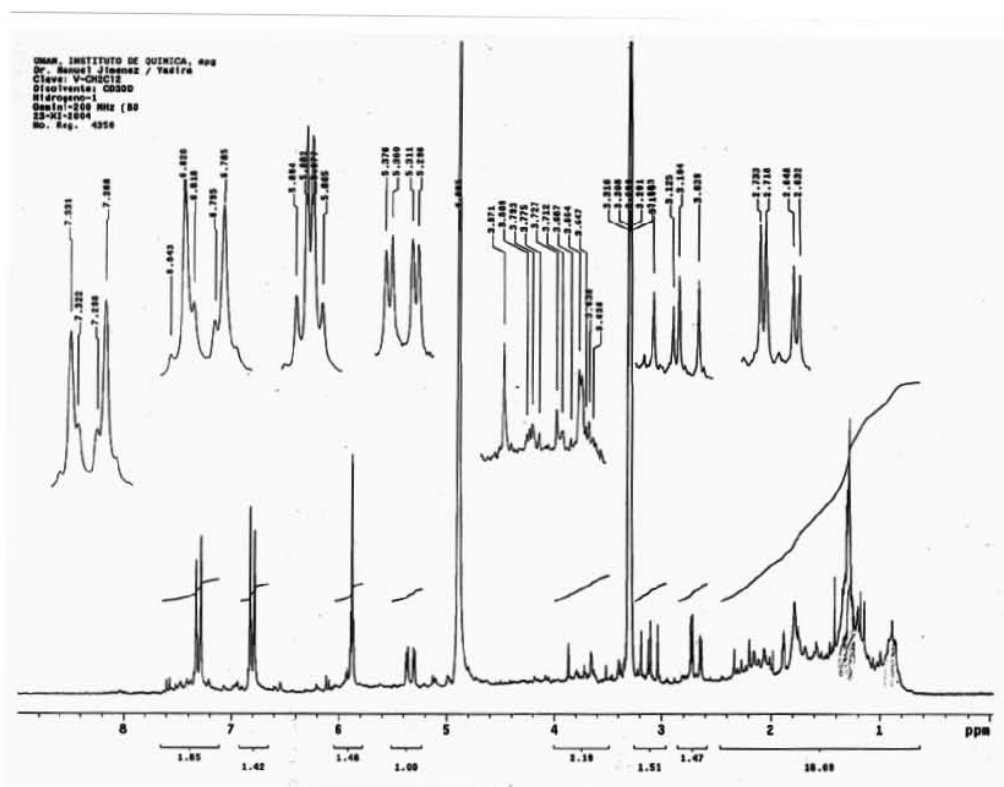


Fig. 13. Resonancia Magnética Nuclear- H^1 del compuesto mayoritario de la F.6 de *L. graveolens*.

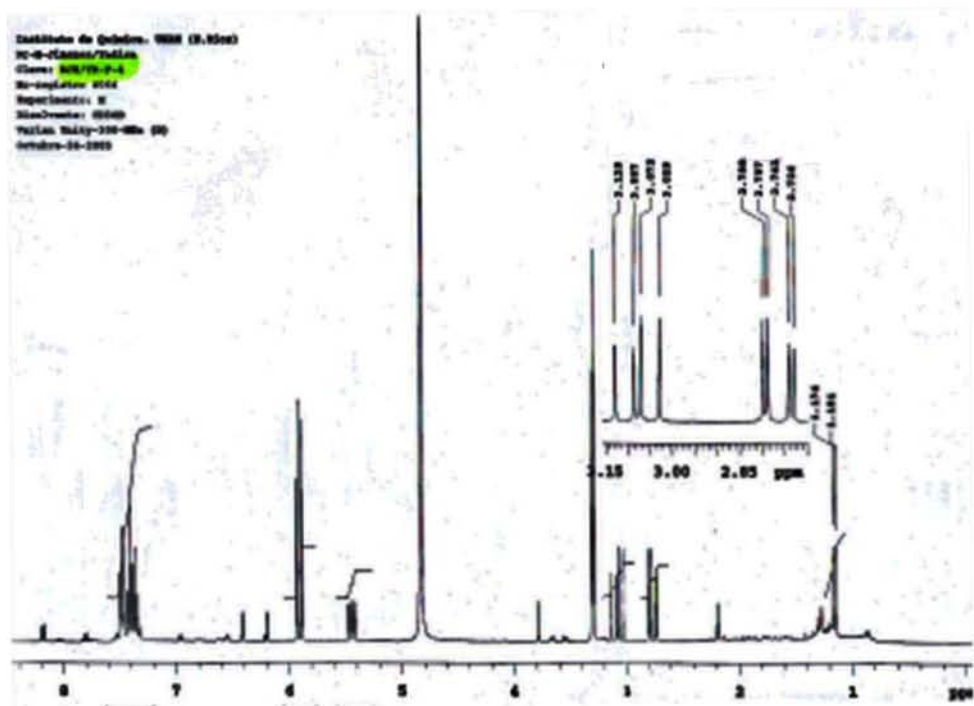


Fig.14. Resonancia Magnética Nuclear-H1 del segundo compuesto de la F.6 de *L. graveolens*.

7.8.2 Espectroscopía de infrarrojo.

1.- El espectro IR del compuesto mayoritario de la fracción F.6 mostró una banda de absorción de doble enlace aromático en 1640 cm^{-1} , las bandas en 3373 y 1459 indicaron la presencia de grupos fenólicos y la banda en 1720 cm^{-1} fue asignada como grupo carbonilo (**Figura 15**).

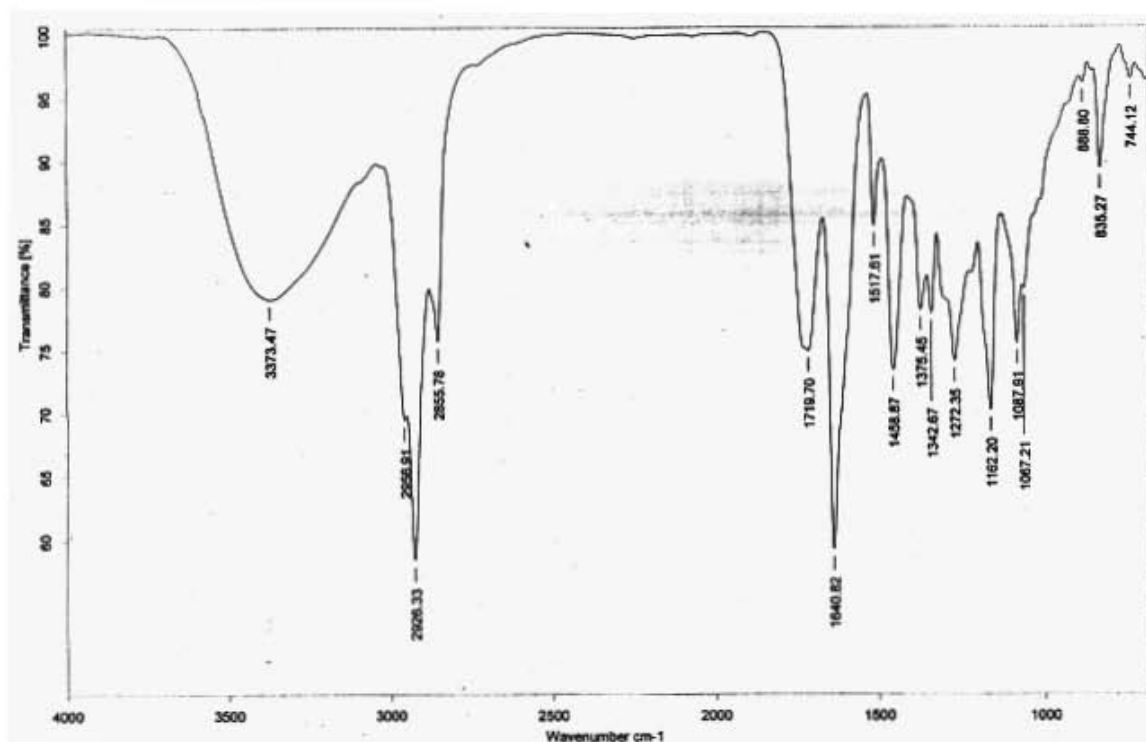


Fig. 15. Espectro Infrarrojo de la F.6 de *L.graveolens*

2.- Por otro lado, el segundo compuesto de la fracción F.6 mostró una banda de absorción de doble enlace aromático en 1604 cm^{-1} , las bandas en 3327 y 1459 cm^{-1} indicaron la presencia de grupos fenólicos, la banda en 1638 cm^{-1} fue asignada como grupo carbonilo y el de 1273 fue un anillo de pirano. (Figura 16).

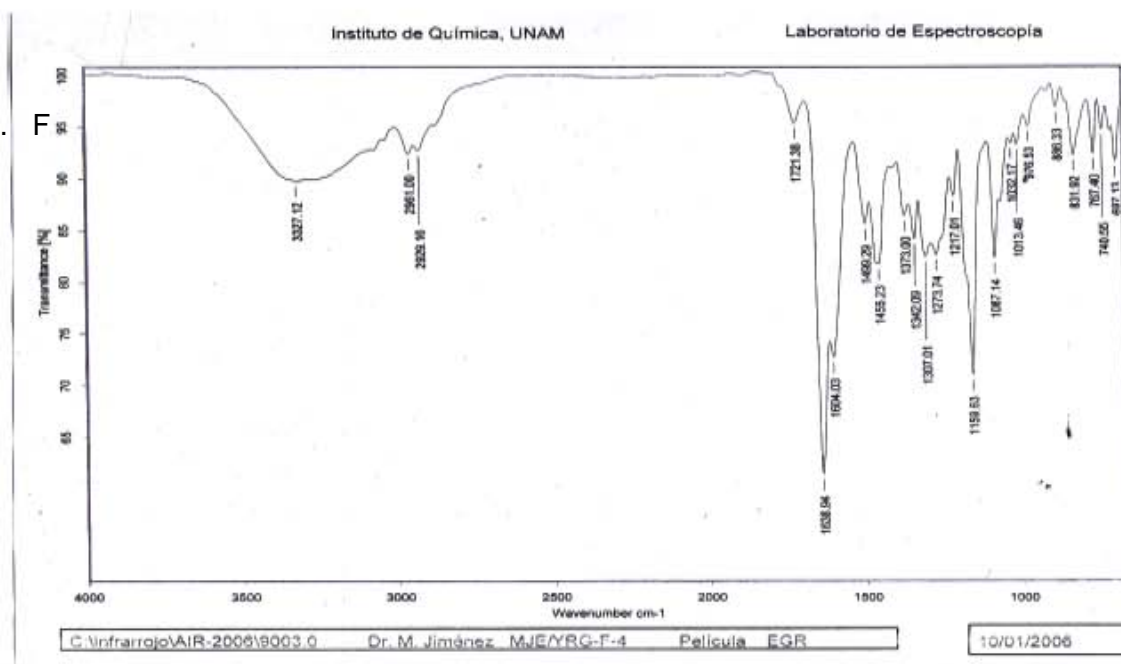


Fig. 16. Espectro Infrarrojo del segundo compuesto identificado de *L. graveolens*

7.8.3 Espectrometría de masas por impacto electrónico

1.- El EM muestra un ión molecular de 272 (con 90% abundancia relativa) que corresponde a una fórmula molecular $C_{15}H_{12}O_5$, confirmando el esqueleto carbonado de la flavanona, además de los fragmentos m/z 271 (50%), 179 (42%), 153 (100%), 120 (65%), 43 (78%). (Figura 17).

2.- El análisis del otro compuesto de la fracción F.6 mostró un ión molecular de 256 (con 100% abundancia relativa) que corresponde a una fórmula molecular $C_{15}H_{12}O_4$, confirmando el esqueleto carbonado de la flavanona, además de los fragmentos m/z 255 (42%), 238 (12%), 180 (47%), 179 (63%), 153 (59%), 152 (77%), 125 (46%), 124 (63%), 104(35), 103(35%), 96(22%), 78(23%), 77 (42%), 69(42%), 51 (23%), 39(16%) (Figura 18).

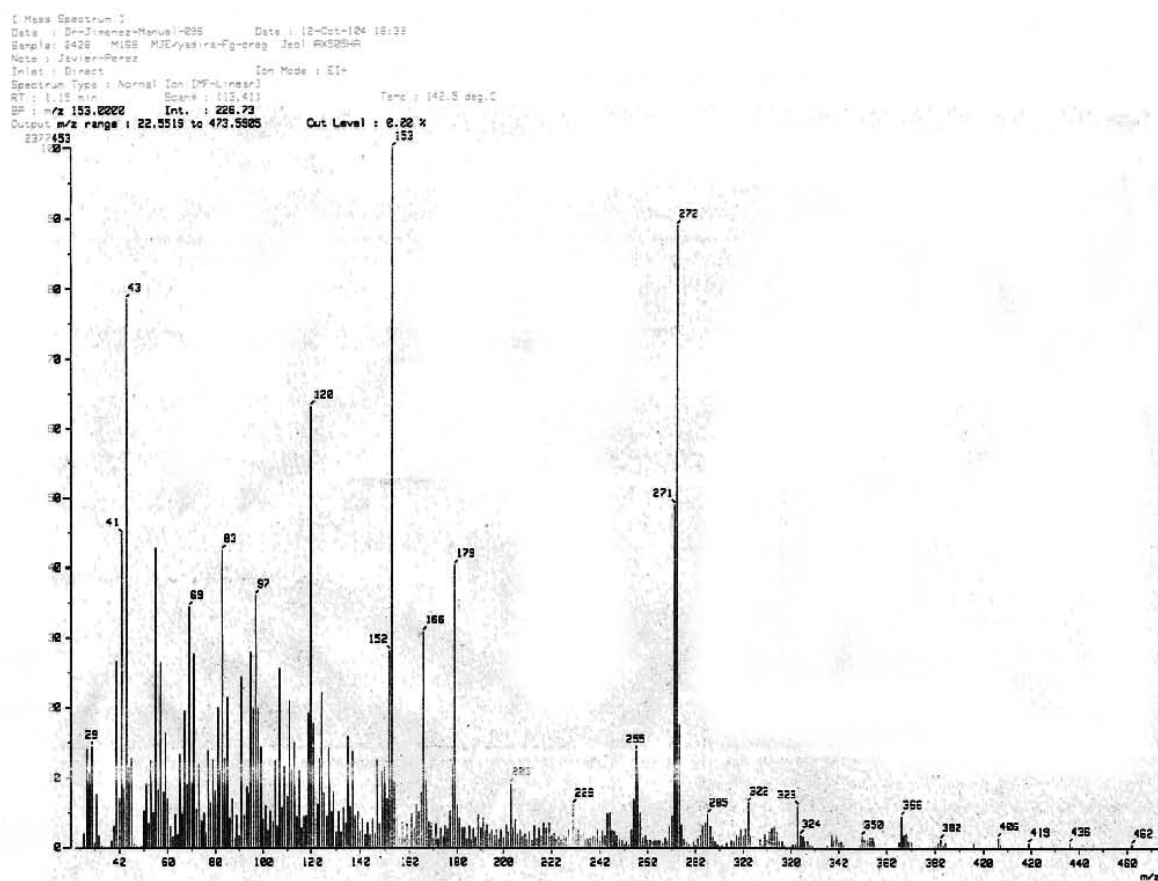


Fig. 17. Espectro de Masas por Impacto Electrónico de la F.6 de *L. graveolens*

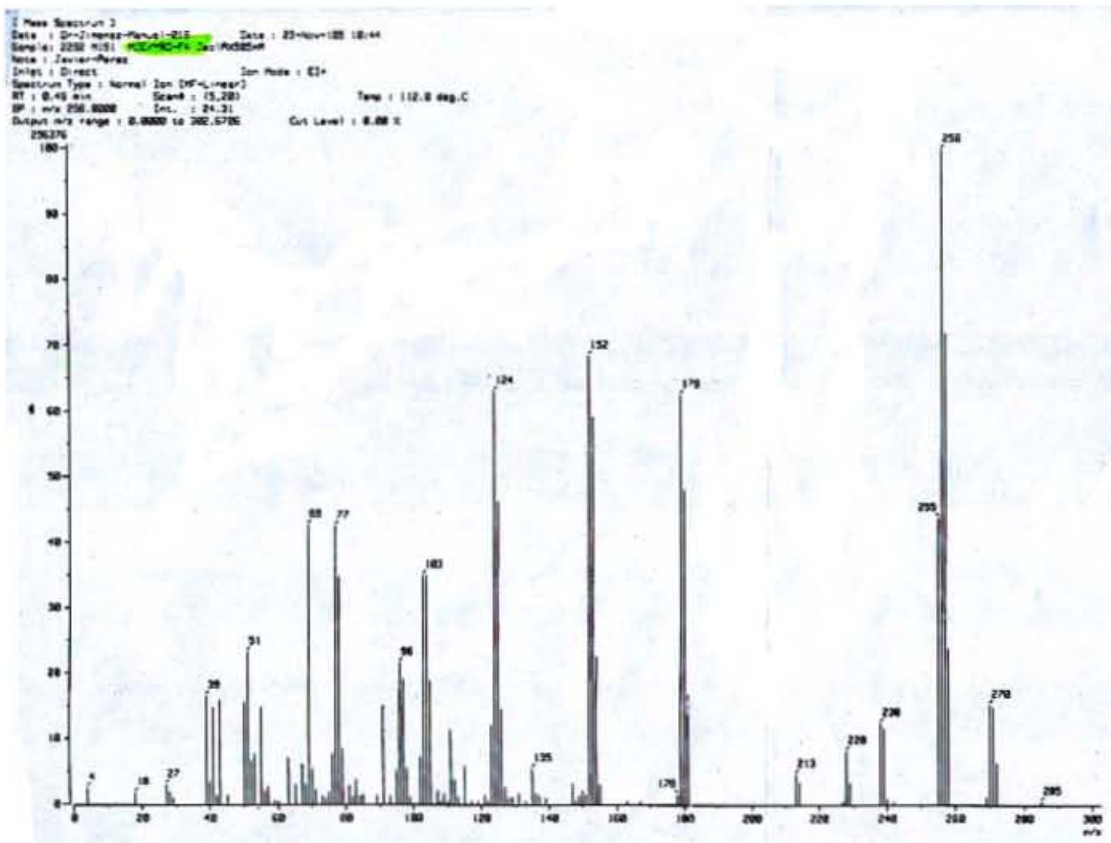


Fig. 18. Espectro de Masas por Impacto Electrónico del segundo compuesto identificado de la F.6 de *L. graveolens*.

7.8.4. Polarimetría

1.- El análisis de la fracción F.6 mediante polarimetría dio un α de -20, indicando la presencia de actividad. (Figura 19).


	INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM	POLARIMETRÍA
Muestra: <u>MJE/Y-Flor</u>	Investigador: <u>Dr. M. Jiménez</u>	
Disolvente: <u>CHCl₃</u>	α : <u>-0.011</u> a 589 nm (Na)	
Concentración: <u>1.1 mg/mL</u>		
Longitud de celda: <u>1 dm</u>		
Tiempo de Integración: <u>1 s</u>		
Observaciones: _____	Operador: Eréndira García Ríos	
_____	No. de registro: <u>6791</u>	
_____	Fecha: <u>1-febrero-2005</u>	

Fig. 19 Resultado de la polarimetría de la F.6 de *L. graveolens*

7.8.5 Compuestos identificados.

1.- El análisis estructural de todos los ensayos (IR, RMN1H y EM) a los que se sometió la fracción F.6 mostró que el compuesto mayoritario corresponde a la 5,7,4'-trihidroxi flavanona. **Fig. 20 A.**

2.- El segundo compuesto de la fracción F.6 correspondió a la 5,7,-dihidroxi flavanona. **Fig. 20 B.**

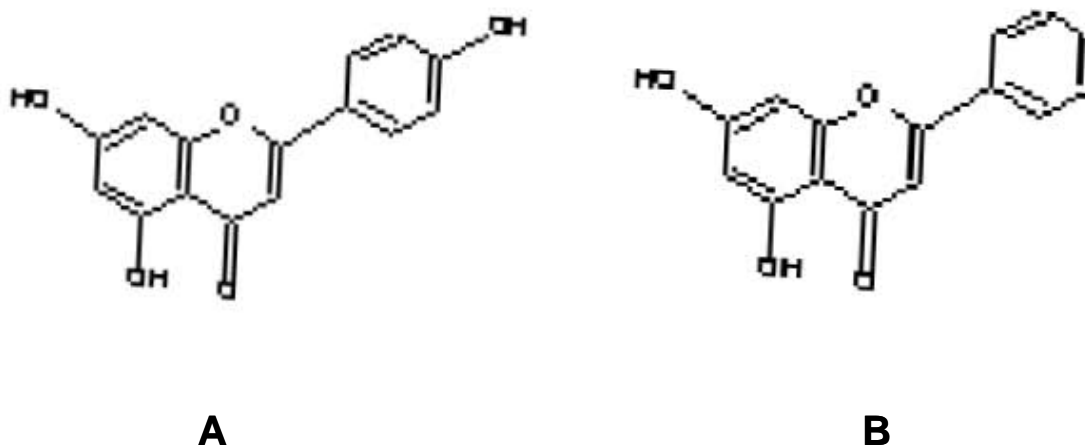


Fig. 20. A) Naringenina (5, 7, 4'-trihidroxi flavanona) y **B)** Pinocembrina (5, 7,-dihidroxi flavanona).

3.- Adicionalmente, el análisis de la fracción F.6 mediante HPLC en fase reversa mostró los patrones característicos de la naringenina y pinocembrina. También se identificó a un tercer compuesto que fue el timol. **(Figura 21).**

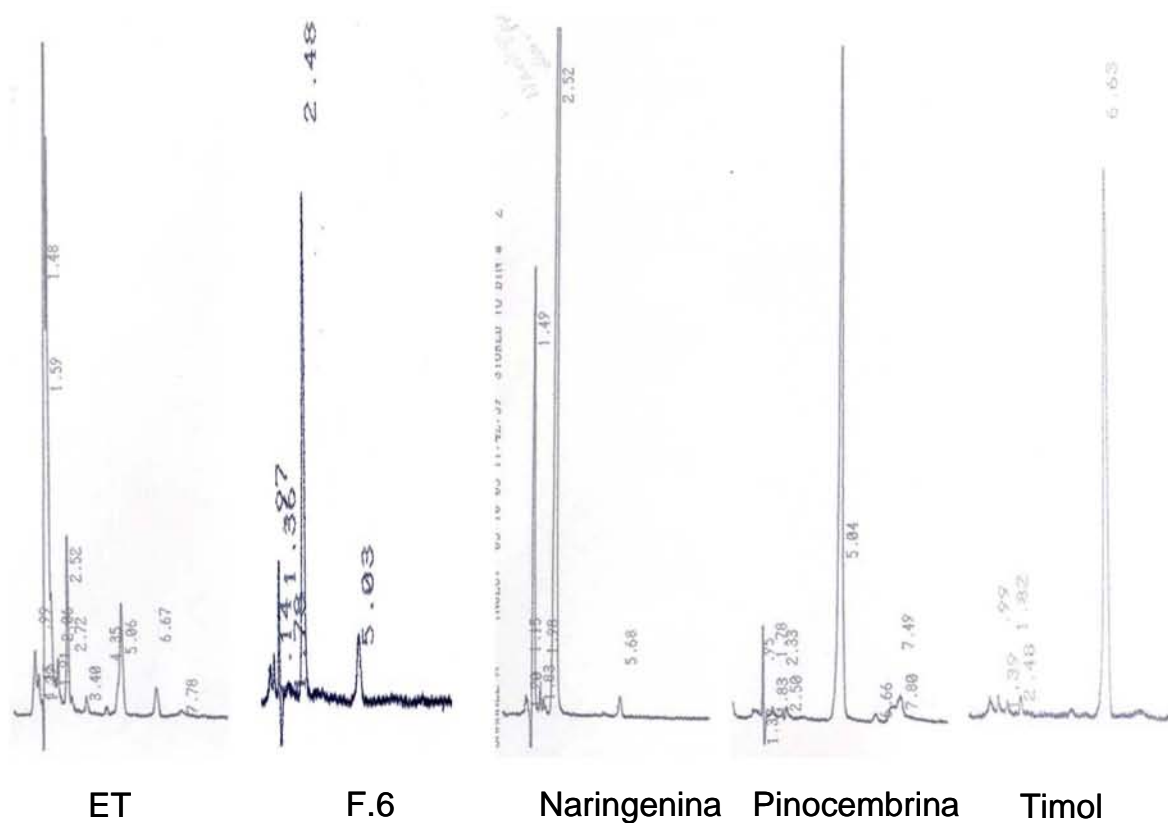


Fig. 21 HPLC en fase reversa. Extracto total (ET), F.6 y los compuestos identificados en esta fracción.

7.9. Ensayo de citotoxicidad del extracto total y la fracción F.6 en linfocitos.

Las diferentes concentraciones del extracto total de orégano y de la fracción F.6 no produjeron efecto citotóxico en los linfocitos, el porcentaje de viabilidad fue del 94.68% y 95.92% respectivamente. (Fig. 22).

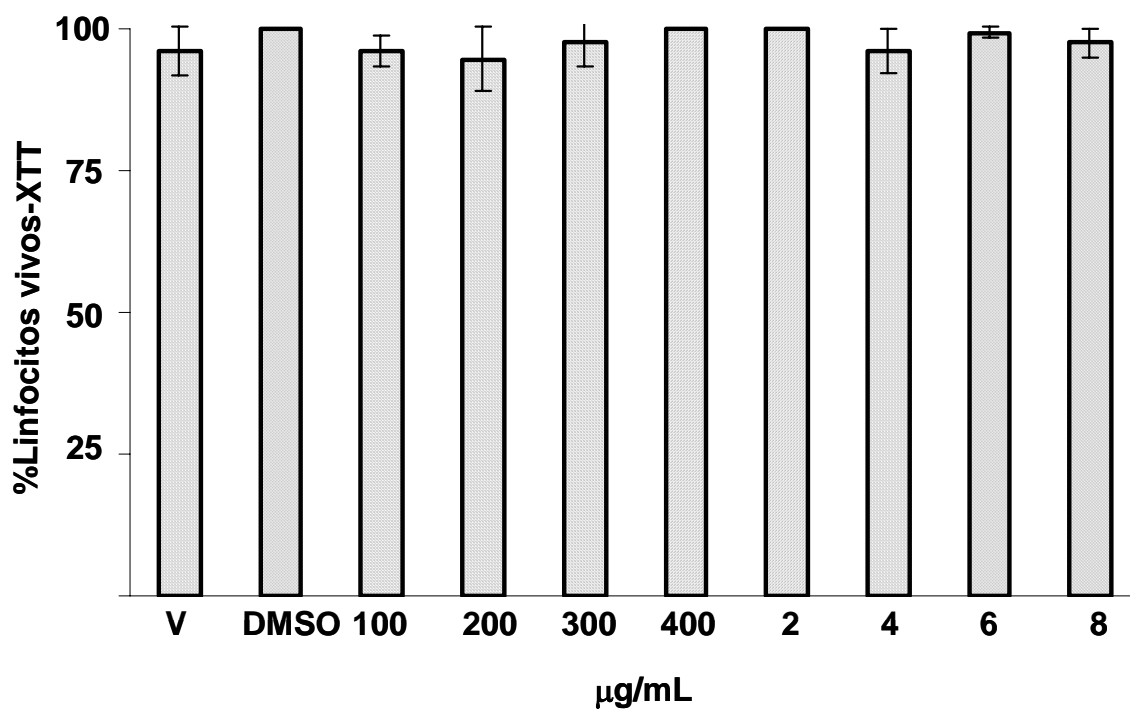


Fig. 22 Porcentaje de viabilidad de linfocitos expuestos al extracto total de *Lippia graveolens* y a la F.6 V= vivas, DMSO= 0.5% de DMSO, 100-400 µg/ mL del Extracto total; 2-8 µg/ mL de la F.6.

8.0. Discusión.

En esta tesis demostramos que 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la fracción F.6 de orégano produjo un efecto irreversible en los trofozoítos de *Giardia*. En un estudio previo, nuestro grupo de trabajo mostró que el extracto acuoso de orégano tuvo mejor efecto anti*giardiásico* que el fármaco de referencia (Ponce-Macotela *et al.*, 1994), también encontramos que 58.8 y 117.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto etanólico de *Lippia* spp tuvieron efecto irreversible en trofozoítos de *Giardia* de los aislados INP231088MM, obtenido de un paciente pediátrico e INP203000B2 que se aisló de un ovino, respectivamente (Ponce-Macotela *et al.*, 2006). Pero, en ambos casos, no se determinó la especie de orégano. Para obtener y determinar cuáles son los compuestos bioactivos de las plantas, es necesario tener la certeza del origen del material biológico, del género y la especie, ya que se ha registrado que las diferentes estaciones del año y la altura sobre el nivel del mar en donde se cultive, pueden influir en la cantidad de sus compuestos y en algunos casos quizá se hacen los ensayos con mezclas de géneros (Kofidis *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2004; Vázquez and Dunford, 2005). En este trabajo el orégano se obtuvo en una sola temporada, en una localidad del Estado de Guanajuato y el análisis taxonómico en el MEXU del Instituto de Biología de la UNAM la ubicó como *Lippia graveolens*.

La obtención del extracto de orégano con hielo seco (-78°C) tiene la ventaja de que se muele de manera más eficaz; además, el hielo seco pasa del estado sólido al gaseoso, sin pasar por el estado líquido, esto permite que la muestra se mantenga en forma sólida (polvo) sin mojarse, para poderla recuperar fácilmente. El hielo seco se utiliza para la conservación de muestras biológicas, vacunas, ornamental, atrayente de mosquitos, refrigeración de mariscos, helados y frutas (http://es.wikipedia.org/wiki/Hielo_seco; Oli *et al.*, 2005; Jeyasekaran *et al.*, 2006; Stoops *et al.*, 2007). Los resultados de esta tesis muestran un uso más, obtención de extractos provenientes de plantas, para evaluar su actividad antiparasitaria.

Existen varias técnicas para evaluar la viabilidad celular (Pearce *et al.*, 1996; Upcroft & Upcroft, 2001; Adagu *et al.*, 2002). Una de las más utilizadas para el análisis de sensibilidad de los aislados de *Giardia intestinalis* a los diferentes fármacos o extractos es el ensayo colorimétrico, mediante la reducción del MTT a formazán, el fundamento se basa en que solo las células metabólicamente activas son capaces de convertir el colorante a formazán a un producto de color violeta que es insoluble en agua

(Wright *et al.*, 1992; Ponce-Macotela *et al.*, 1994, 2001, 2006; Bruggiser R. *et al.* , 2002; Lirussi D. *et al.*, 2004). Con esta técnica el resultado es rápido; sin embargo, tiene la desventaja de que las células con daño irreversible, pero, que aún están vivas siguen sintetizando el formazán, también los trofozoítos con daño reversible lo sintetizan. Como se puede observar en la **Fig. 10** con 400 µg/ml del extracto total en la cepa de referencia WB hubo 94.3% de trofozoítos muertos y en el aislado nacional B2 fue del 84%. Este resultado, aunque es interesante, nos deja la incertidumbre de que pasa con el 6 y 16% restante de trofozoítos ¿serán capaces de reestablecerse? ¿se podrán multiplicar? Para evitar esta incertidumbre, se utiliza la prueba de recultivo, tiene la desventaja de ser más larga, porque los trofozoítos después de exponerlos a los extractos, se lavan y se resiembran en medio nuevo y sin extracto, ni antibióticos. La ventaja es que presenta mayor sensibilidad, porque los trofozoítos con daño irreversible ya no son capaces de multiplicarse (Ponce-Macotela *et al.*, 2001, 2006) Los parámetros que utilizamos para considerar a los trofozoítos muertos son: cambio en la morfología y sin movimiento flagelar.

Cómo puede observarse en la **Tabla 3** con 200 µg/mL del extracto, los trofozoítos de la cepa WB tuvieron daño irreversible, ya no pudieron multiplicarse y el daño irreversible de los trofozoítos del aislado B2 fue con 300 µg/mL del extracto.

Cuándo comparamos la técnica colorimétrica (MTT) contra el recultivo, encontramos que en el segundo, la concentración del extracto que produce efecto irreversible es menor que la que se obtiene con el ensayo colorimétrico, por lo que consideramos que el recultivo debe considerarse como el estándar de oro.

El efecto anti-giardiasis irreversible (inhibición de recultivo) del extracto total de *Lippia graveolens* en la cepa de referencia WB fue con 200 µg/mL y para el aislado nacional B2 fue con 300 µg/mL, estas concentraciones fueron mayores a las previamente registrado en el aislado MM (58.8 µg/mL) y el B2 (117.7 µg/mL) con el extracto total de *Lippia* spp (Ponce-Macotela *et al.*, 2006), probablemente, en este caso, el orégano correspondía a otro género, a otra especie o a mezcla de géneros. Por otro lado, la respuesta heterogénea de la susceptibilidad de los aislados de *Giardia intestinalis* a los extractos o a los fármacos, puede atribuirse a varios factores (Majewska *et al.*, 1991; Farbey *et al.*, 1995; Ponce-Macotela *et al.*, 2001; Argüello *et al.*, 2004), entre ellos, al origen de los aislados: el WB se aisló de un paciente con giardiasis crónica y multitratado, con quinacrina, metronidazol o una mezcla de quinacrina-metronidazol (Smith *et al.*, 1982), el aislado B2 se obtuvo de un borrego en Tepetlayuca Hidalgo,

en donde los animales se alimentan a base de pastoreo, esquilmos ó restos de comida de la familia (Cordero, 2001).

La actividad del aceite de orégano también se ha documentado contra *Blastocystis hominis* (Force, 2000), bacterias (Kunle *et al.*, 2003; Bassole *et al.*, 2003; Salgueiro *et al.*, 2003; Hernandez *et al.*, 2003). Y en *Pediculus humanus corporis* y *P. h. capitis* (Oladimeji *et al.*, 2000).

El resultado de esta tesis mostró que la dosis letal del extracto total determinada por recultivo fue de 200 µg/mL para el aislado B2 y 300 µg/mL para el WB, esta cantidad es menor a la que se registró para *Teloxys graveolens* IC₅₀ 392.1 µg/mL (Calzada *et al.*, 2003); para *Mentha piperita* los valores que se encontraron con un extracto metanólico con IC₅₀ fueron de 0.8 mg/mL, después de 48 h of incubation (Vidal *et al.*, 2007), aceites esenciales de *Ocimum basilicum* presentaron 100% de mortalidad durante 1 hora con 850 µg/mL (De Almeida *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha registrado el uso tradicional de *Lippia graveolens*, en la comunidad de Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México, como antibacteriano (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*), pero, a una concentración de 0.75 mg/mL. (Hernández 2003, 2005).

Debido al efecto anti-giardiasico del extracto total de *L. graveolens* decidimos fraccionarlo por medio de técnicas analíticas para detectar el o los compuestos bioactivos. Las 32 fracciones que se obtuvieron se agruparon en seis. Con 50 µg/mL de cada una de las seis fracciones se encontró mejor efecto anti-giardiasico que el extracto total (400 µg/mL) y que el tinidazol (250 µg/mL) **Fig 10 y Fig 12**. Con 10 µg/mL, solamente las fracciones F.5 y F.6 seguían presentando mejor actividad contra *Giardia intestinalis* **Fig 12**, por lo que fue indispensable valorar estas dos fracciones a menor concentración, para discernir cuál de ellas sería analizada por métodos espectrofotométricos. Se escogió a la fracción F.6 porque con 4 µg/mL se obtuvo el 74.3% de trofozoítos muertos y con la F.5 fue del 13.52%. **Fig 13**.

El análisis de la fracción F.6, mediante resonancia magnética nuclear, espectroscopía de infrarrojo, espectrometría de masas por impacto electrónico, polarimetría y HPLC en fase reversa, permitió identificar a tres compuestos, los cuales fueron comparados con los ya descritos (Pelter and Stainton, 1967; Suga and Asakawa, 1972; Miyakado *et al.*, 1976; Camacho *et al.*, 1991; Chapman and Hall, 2004). El mayoritario fue un flavonoide y correspondió a la naringenina, la cuál ha sido aislada por Asakawa,

1971; Donnelly and Thompson, 1973; Agrawal *et al.*, 1989; Chapman and Hall, 2004. El otro compuesto también fue un flavonoide (pinocembrina) y el último fue un aceite esencial monoterpeno (timol).

Estos compuestos ya habían sido identificados en *L. graveolens*: las flavononas fueron caracterizadas por Domínguez *et al.*, 1989; el aceite esencial por Terblanché *et al.*, 1996 y también han sido aislados iridoides por Rastrelli *et al.*, 1998.

Este es el primer registro que muestra el efecto antiangiogénico *in vitro* de tres compuestos de la F.6 de *L. graveolens*: naringenina, pinocembrina (flavonoides) y timol (aceite esencial). Debido a que no se realizaron bioensayos, con cada uno de los tres compuestos de la fracción F.6, ignoramos si los tres compuestos potencian el efecto antiangiogénico de la F.6 o solamente uno de ellos es el que corresponde al compuesto bioactivo. Consideramos que es necesario evaluar a cada uno de ellos por separado. También se necesita evaluar el efecto de la fracción F.6 o de cada uno de sus compuestos en modelos *in vivo* con animales de bioensayo.

Adicionalmente, consideramos que faltan realizar estudios que muestren el daño ultraestructural de los trofozoítos expuestos a la fracción F.6 o a cada uno de sus componentes, así como evaluar su efecto en el quiste, que es la fase de resistencia e infección.

Por otro lado, se ha señalado que algunos otros flavonoides (compuestos fenólicos) evitan o retardan la oxidación lipídica (unión del oxígeno a los lípidos formando radicales libres que provocan alteraciones químicas). La oxidación de lípidos puede favorecer las enfermedades del corazón, arteriosclerosis, cáncer y el proceso de envejecimiento (Middleton *et al.*, 2000; Arcila *et al.*, 2004). Pero, no se ha documentado que la naringenina y pinocembrina tengan efecto antioxidante, por lo tanto, los proponemos como compuestos "candidato" y en un futuro evaluar su probable efecto antioxidante.

Finalmente las pruebas de citotoxicidad que se aplicaron tanto al extracto total y de la F.6 a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 $\mu\text{g/mL}$ y de 2, 4, 6, 8 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente no mostraron efecto citotóxico.

9.0 Conclusiones.

El orégano que se recolectó en Milpillás, Gto.; correspondió a *Lippia graveolens*

La cepa de referencia internacional WB y el aislado nacional B2 fueron sensibles al extracto total y a la fracción F.6.

De las seis fracciones que se obtuvieron del extracto total, la fracción F.6 presentó mejor actividad anti-giardíasis que el extracto total y que el fármaco de referencia.

En la Fracción F.6 se identificaron tres compuestos: naringenina, pinocembrina y timol.

Ni el extracto total ni la fracción F.6 fueron citotóxicos.

Es necesario evaluar el efecto anti-giardíasis de la fracción F.6 en animales de bioensayo.

10.0 Anexo.

MEDIO TYI-S-33

Citrato de hierro	30 mg
Ac. Cítrico (Ascórbico)	0.2 g
Bilis bovina	0.5 g
KH_2PO_4	0.6 g
K_2HPO_4	1.0 g
Cloruro de cisteína	2.0 g
Cloruro de sodio	2.0 g
Glucosa	10 g.
Extracto de Levadura	10 g.
Triptona	20 g
Suero Fetal	100 ml
Gentamicina	10 mg.
Ceftazidina	5 mg

Hidratar con agua desionizada

Añadir antibiótico

Ajustar pH a 7.02 con NaOH

Aforar al volumen indicado

Añadir el suero.

Prefiltrar y filtrar con membrana de 0.22 μm .

PBS 1X- 1lt

	800 mg
NaCl	
KCl	201 mg
Na_2HPO_4	601 mg
KH_2PO_4	190 mg

Etanol al 75%

7.5 partes de etanol absoluto y 2.5 partes de agua destilada

Isopropanol ácido. 0.04 M

0.173 ml de HCl + 99.82 ml de 2-propanol

MTT

Stock 5mg/mL

PMS

Stock 2.5 mg/ mL

Hexano : Acetato de etilo (4:1)

Sulfato cérico

H₂SO₄ 40 g ó 22.2 ml

CeSO₄ 12 g.

Hielo 350 g

Colocar sobre el hielo los 12 g de CeSO₄, agregar 22.2 ml de H₂SO₄ concentrado y agitarse con una varilla y calentar hasta que se disuelva.

Medio RPMI-1640

Medio DMEM

Kit II de proliferación celular XTT (1 mg/ml) PMS (0.383 mg/ml) Roche.

11.0 Referencias.

Abboud P, Lemée V, Gargala G, Brasseur P, Ballet JJ, Borsa-Lebas F, Caron F and Favennec L. Successful Treatment of Metronidazole and Albendazole-Resistant Giardiasis with Nitazoxanide in a Patient with Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Clinical Infectious Diseases*. 2001; 32: 1792-1794.

Adagu I S, Nolder, D. Warhurst D C and Rossignol J F. In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002; 49:103-111.

Adam R D. The biology of *Giardia* spp. *Microbiological Reviews*. 1991; 55(4): 706- 732.

Adam Rodney D. The *Giardia lamblia* genome. *International Journal for Parasitology* 2000; 30: 475-484

Adam R. D. The Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001; 14(3): 447-475

.Agrawal P.K., Thaku RS and Bansal MC. Studies in Organic Chemistry Chapter Three Flavonoids. Pag 95-105. Elsevier Science Publishers. 1989

Agrawal A.K., Sahai R. Gupta N. Saxena R.P., Puri A., Sing M., Misra R.N., Dubey C.B., Saxena K.C. Management of Giardiasis by a herbal drug "Pippali Rasayana": a clinical study. *J Ethnopharmacol*. 1997; 56: 233-6

Ankli A, Heinrich M, Bork P, Wolfram L, Bauerfeind P, Brun R, Schmid C, Weiss C, Bruggiser R, Gertsch J, Wasescha M, Sticher O. Yucatec Mayan Medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *J Ethnopharmacol* 2002; 79: 43-52

Anthony J P, Fyfe L and Smith. Plant active components a resource for antiparasitic agents? *Trends Parasitology*. 2005; 21 (10): 462-468.

Arcila-Lozano C.C., Loarca-Piña G., Lecona-Urbe S. y González de Mejía E. El orégano: propiedades, Composición y Actividad Biológica de sus Componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 2004 Mar; 54 (1): 100-11.

Arguello-Garcia R, Cruz-Soto M, Romero-Montoya L, Ortega-Pierres G. Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles in vitro. *J, Antimicrob Chemother*. 2004 Oct 54(4): 711-21.

Arrieta J., Reyes B., Calzada F., Cedillo-Rivera R., Navarrete A. Amoebicidal and giardicidal compounds from the leaves of *Zanthoxylum liebmannianum*. *Fitoterapia*. 2001; 72: 295-7.

Asakawa Y. Chemical Constituents of *Alnus sieboldiana* (Betulaceae) II. The Isolation and Structure of Flavonoids and Stilbenes. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 1971; 44: 2761-2766.

Aztiazarán-García H, Espinosa-Cantellano M, Castañón G, Chávez-Munguía B, Martínez – Palomo A. *Giardia lamblia*: Effect of Infection with Symptomatic and Asymptomatic Isolates on the Growth of Gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Exp. Parasitol*. 2000 95: 128-135

Bassole I .H.N., Ouattara A.S., Nebie R., Outtara C.A.T., Kabore Z.I., Traore S.A. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry* 2003 ; 62 : 209-12.

Boreham P F L, Upcroft J.A. and Upcroft P. Changing approaches to the study of *Giardia* *Epidemiology*: 1681-2000. *International Journal for Parasitology*. 1990; 20 (4): 479-487.

Bruggisser R, von Daeniken K, Jundt G, Schaffner W, Tullberg-Reinert H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med.* 2002 May; 68(5):445-8.

Brugueras M.C. y Morejón G. M. Antibacterianos de acción sistémica. Parte II. Otros grupos de antibióticos. *Rev Cubana Med Gen Integr.* 1998; 14(4): 362-73

Buret AG: Immunopathology of giardiasis: the role of lymphocytes in intestinal epithelial injury and malfunction. *Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 2005; 100 (Suppl. I): 185-190

Buzoni-Gatel D., Schulthess J, Menard L.E and Kasper L.H. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasite, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. *Cellular Microbiology.* 2006; 8(4): 535-544.

Calzada F., Cerda-García-Rojas C.M., Meckes M., Cedillo-Rivera R., Bye R. and Mata R. Geranios A y B, New Antiprotozoal A-Type Proanthocyanidins from *Geranium niveum*. *J Nat Prod* 1999; 62: 705-9.

Calzada F., Cedillo-Rivera R. and Mata R. Antiprotozoal Activity of the Constituents of *Conyza filaginoides* *J Nat Prod* 2001; 64: 671-73.

Calzada F, Velazquez C, Cedillo-Rivera R, Esquivel B. Antiprotozoal activity of the constituents of *Teloxys graveolens*. *Phytother Res.* 2003 Aug; 17(7):731-2.

Calzada F, Cervantes-Martínez J.A., Yépez-Mulía L. In Vitro antiprotozoal activity from roots of *Geranium mexicanum* and its constituents of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *J Ethnopharmacol.* 2005; Apr 8, 98(1-2): 191-3.

Camacho M. De R. Sánchez B, Quiroz H, Contreras JL and Mata R. Pinocembrine: A Bioactive Flavanone from *Teloxys graveolens*. *Journal of Ethnopharmacology.* 1991; 31: 383-389.

Camacho M. d R., Philipson J.D., Croft S.L., Solis P.N., Marshal S.J., Ghazanfar S.A. Screening of plant extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 89: 185-191.

Cañete R, Escobedo A.E., González M.E., Almirall P. Randomized clinical study of five days' therapy with mebendazole compared to quinacrine in the treatment of symptomatic giardiasis in children. *World J. Gastroenterol.* 2006. October 21; 12 (39): 6366-6370.

Canete R, Escobedo AA, González M E Almirall P, Cantelar N. A randomized, controlled, open-label trial of a single day of mebendazol versus a single dose of tinidazole in the treatment of Giardiasis in children. *Curr. Med Res. Opin.* . 2006; Nov.; 22(11): 2131-6.

Cañete R, González ME, Almirall P, Figueroa I. Infección por Giardia y Giardiasis. *Revista Panamericana de Infectología* 2004; 6(3):41-48

Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev* 1998; 73:203-266

Cavalier-Smith T. The excavate protozoan phyla Metamonada Grassé emend. (Anaeromonadea, Parabasalia, *Carpodimonas*, Eopharyngia) and Loukozoa emend. (Jakobea, *Malawimonas*): their evolutionary affinities and new higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003; 53: 1741-1758.

Cedillo-Rivera R, Chávez B., González- Robles A. Tapia A. and Yépez-Mulía L. In vitro effect of Nitazoxanida Against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Tricomonas vaginalis* Trophozoites. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2002; 49(3):201-208.

Celik Ayala and Ates Surcan Aras. The frequency of Sister Chromatid Exchange in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocyte Treated with Metronidazole in Vitro. *Drug and Chemical Toxicology*. 2006; 1: 85-94

Cifuentes E, Gómez M, Blumenthal U, Tello-Rojo M.M., Romieu I, Ruiz-Palacios G and Ruiz-Velazco S. Risk Factors from *Giardia intestinalis* infection in agricultural villages practicing wastewater irrigation in Mexico. *Am. J. Trop. Med Hyg.* 2000; 62(3): 388-392.

Cifuentes E., Suárez L., Espinoza M., Juárez-Figueroa L. and Martínez-Palomo A. Risk of *Giardia intestinalis* infection in children from an artificial recharged groundwater area in Mexico City. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2004; 71(1): 65-70.

Clyne CA, Eliopoulos GM. Fever and urticaria in acute giardiasis. *Arch Inter Med.* 1989 Apr; 149(4):939-40.

Compadre C.M., Hussain R.A., Leon I. And Enríquez R.G. Volatile Constituents of *Montana tomentosa* and *Lippia graveolens*. *Planta Med.* 1987 : 495-6.

Connor T H, Stoeckel M, Evrard J and Legator M.S. The contribution of Metronidazole and two metabolites to the Mutagenic Activity Detected in Urine of Treated Humans and Mice. *Cancer Research* 1977; 37: 629-633.

Cordero Hernandez José. Determinación de la cinética de crecimiento y grupo genético en aislados de *Giardia duodenalis* obtenidos de borregos, cabras y humanos. Tesis Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. 62 pp.

Cox F.E.G. History of Human Parasitology. *Clinical Microbiology Reviews.* 2002; 15(4): 595-612.

Chapman and Hall. Dictionary of Natural Products on CD-ROM. Version 12.2 January 2004

Chávez-Munguía B, Cedillo-Rivera R and Martínez-Palomo A. The Ultrastructure of the Cyst Wall of *Giardia lamblia*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2004; 51(2): 220-226.

Das S, Castillo C and Stevens T. Phospholipid remodeling/ generation in *Giardia*: The role of the Lands cycle. *Trends in Parasitology.* 2001; 17(7): 316-319.

Dawson D. Foodborne protozoan parasites. *Inter J Food Microbiology.* 2005; 103: 207-227.

De Almeida I, Alviano DS, Vieira DP, Alves PB, Blank AF, Lopes AH, Alviano CS, Rosa Mdo S. Antigiardial activity of *Ocimum basilicum* essential oil. *Parasitol Res.* 2007 Jul; 101(2):443-52.

Delgado G. Los productos naturales orgánicos: su diversidad estructural y origen químico. *CIENCIA.* Abril-junio. 2005: 6-16

Di Giovanni GD, Betancourt WQ, Hernandez J, Assadian NW, Flores Margez JP, Lopez EJ. Investigation of potential zoonotic transmission of cryptosporidiosis and giardiasis through agricultural use of reclaimed wastewater. *Int J Environ Health Res* 2006; Dec 16 (6): 405-18

Díaz E., Mondragón J., Ramírez E. and Bernal RM. Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanide in children in Mexico. *Am J. Trop. Med.* 2003; 68(4): 384-385.

Dominguez X.A. S., Sánchez H.V., Suárez M., Baldas J.H. and González M.R. Chemical Constituents of *Lippia graveolens*. *Planta Med* 1989; 55:208-9.

Donnelly DMX and Thompson JC. Phytochemical Examination of *Dalbergia stevensonii* Standl. *J Chem Soc Perkin I.* 1973 I: 1737-1745

Dupouy-Camet J. New drugs for the treatment of human parasitic protozoa. *Parassitologia.* 2004 Jun; 46(1-2):81-4.

Dupouy-Camet J. Les antiprotozoaires: des médicaments orphelins en médecine humaine? *Parassitologia* 2004;46: 81-84.

Echeverría A, Torres Idavoy D. Efecto de un extracto de *Petiveria alliacea* sobre el crecimiento de *Giardia lamblia* *in vitro*. *Rev Cubana Med Milit.* 2001; 30 : 160-5

Eckamn L, Laurent F, Langford D, Hetsko M, Smith J.R., Kagnoff M.F. and Gillin F.D. Nitric Oxide Production by Human Intestinal Epithelial Cells and Competition for Arginine as Potential Determinants of Host Defense Against the Lumen-Dwelling Pathogen *Giardia lamblia*. *The Journal of Immunology.*2000; 64:1 478-1487.

Eckman Lars and Gillin F. D. Microbes and Microbial Toxins: Paradigms for Microbial-Mucosal Interactions I. Pathophysiological aspects of enteric infections with the lumen-dwelling protozoan pathogen *Giardia lamblia*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001; 280: G1-G6.

Eichinger D. Encystation in parasitic protozoa. *Current Opinion in Microbiology.*2001; 4: 421-426.

Erlandsen SL, Bemrick WJ. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. *J Parasitol.* 1987 Jun; 73(3):623-9.

Farbey MD, Reynoldson JA, Thompson RC. In vitro drug susceptibility of 29 isolates of *Giardia duodenalis* from humans as assessed by an adhesion assay. *Int J Parasitol.* 1995 May; 25 (5): 593-9.

Farnsworth R.N., Akerele O., Bingel A.S., Soejarto D.D. y Guo Z. Las plantas medicinales en la terapéutica. *Bol Of Sanit Panam* 1989; 107(4): 314-328.

Feely DE, Erlandsen SL. Morphology of *Giardia agilis*: observation by scanning electron microscopy and interference reflexion microscopy. *J. Protozool.* 1985 Nov; 32(4):691-3.

Filice FP. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *Univ Cal Publ Zool.* 1952; 57:53-146

Flisser A. and Pérez Tamayo 2006. Aprendizaje de la Parasitología basado en problemas. Cap. 40. Giardiasis: 381-393. Editores de Textos Mexicanos.

Force M., Sparks W.S. and Ronzio R.A. Inhibition of Enteric Parasites by Emulsified Oil of Oregano *in vivo*. *Phytother Res* 2000 ; 14 :213-14

Gardener T. B. and Hill D.R. 2001. Treatment of Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews.*2001: 14 (1):114-128.

Genel F., Erermis G, Asku G., Ozturk C., Kutukculer N. Quinacrine-induced psychiatric in A child with common variable immunodeficiency and chronic giardiasis. *Human Psychopharmacol Clin Exp.* 2002; 17: 357-359.

Gillis JC and Wiseman L.R. Secnidazole. A Review of its Antimicrobial Activity Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Use in the Management of Protozoal Infections and Bacterial Vaginosis. *Drug* 1996. Apr: 51 (4): 621-638.

Gottig N, Elías E V, Quiroga R Nores M.J., Solari A.J, Tou M.C., and Luján H.D., Active and Passive Mechanisms Drive Secretory Granule Biogenesis during Differentiation of the Intestinal Parasite *Giardia lamblia*. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281 (26): 18156–18166.

Grazioli B., Matera G., Laratta C., Schipani G, Guarnieri G., Spinello E., Imeneo M., Amorosi A. Foca A., Luzza F. *Giardia lamblia* infection in patients with irritable bowel syndrome and dispepsia: A retrospective study. *World J Gastroenterolo.* 2006; March 28; 12(12): 1941-1944.

Guerra Ordonez M., Torres Idavoy D., Martínez Pol L. Validación del uso Tradicional de plantas medicinales cultivadas en Cuba. Rev Cubana Plant Med 2001; (2):48-51.

Guevara Y., De Haro I, Cabrera M., García de la Torre G. y Salazar-Schettino P.M. Enteroparasitosis en poblaciones indígenas y mestizas de la Sierra de Nayarit, México. Parasitol Latinoam 2003; 58: 30-34.

Guimarães S and Sogayar L MI. Detection of anti-*Giardia lamblia* serum antibody among children of day care centers. Rev Saúde Pública 2002; 36(1):63-8

Haque R, Roys S, Siddique A, Mondal U, Rahman SM, Mondal D, Houp E, Petri WA. Multiplex real-time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium spp.* Am. J. Trop. Med. Hyg. 2007 Apr.; 76(4):713-7

Harris JC, Plummer S, Turner MP, Llyd D. The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: *Allium sativum* (garlic) is an effective anti-giardial. Microbiology 2000; 146: 3119- 27.

Hashkes P J, Spira DT, Deskelbaum RJ, Granot E. Salivary IgA antibodies to *Giardia lamblia* in day care center children. Pediatr Infect Dis. 1994. Nov; 13(11):953-8

Hawrelak J. Giardiasis: Pathophysiology and Management. *Altern Med Rev* 2003; 8(2):129-142

Hernández T, Canales M, Avila JG, Duran A, Caballero J, Romo de Vivar A, Lira R . Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). Journal of Ethnopharmacology 2003 (88): 181–188

Hernández T, Canales M, Caballero J, Durán A y Lira R. Análisis cuantitativo del Conocimiento tradicional sobre plantas utilizadas para el tratamiento de Enfermedades Gastrointestinales en Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México. Interciencia 2005 30 (9): 529-535.

Hiatt R A, Markell E.K and Ng. E. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? Am. J. Trop. Med. Hyg. 1995: 53: 36-39.

http://es.wikipedia.org/wiki/Hielo_seco

<http://www.infojardin.com/aromaticas/Fichas/Oregano.htm>.

http://www.conapeme.org.mx/manual_antibioticosnitrofuranos.pdf

<http://www.telmeds.org>

Huerta C. Orégano Mexicano: Oro vegetal. Biodiversitas (CONABIO) 1997; 3(15): 8-13

Jaroll EL, Muller PJ, Meyer EA, Morse SA. Lipid and carbohydrate metabolism of *Giardia lamblia*. Mol Biochem Parasitol 1981; 2: 187-96

Jeyasekaran G, Ganesan P, Anandaraj R, Jeya Shakila R, Sukumar D Quantitative and qualitative studies on the bacteriological quality of Indian white shrimp (*Penaeus indicus*) stored in dry ice. Food Microbiol. 2006 Sep; 23(6):526-33. Epub 2005 Dec 13

Jiménez JC, Fontaine J, Grzych JM, Dei-Cas E, Capron M. Systematic and Mucosal Responses to Oral Administration of Excretory and Secretory Antigens from *Giardia intestinalis*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 2004 Jan.; 11 (1): 152-160.

Johnston S.P., Ballard M.M., Beach M.J., Causer L and Wilkins P.P. Evaluation of Three Commercial Assays for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* Organisms in Fecal Specimens. Journal of Clinical Microbiology, Feb. 2003; 41 (2): 623–626.

- Johnson CB, Kazantzis A, Skoula M, Mitteregger U, Novak J. Seasonal, populational and ontogenic variation in the volatile oil content and composition of individuals of *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*, assessed by GC headspace analysis and by SPME sampling of individual oil glands. *Phytochem Anal.* 2004 Sep-Oct; 15(5):286-92
- Karabay O., Tamer A., Gunduz H., Kayas D., Arinc H., Selebi H. Albendazol versus metronidazole treatment of adult giardiasis: An open randomized clinical study. *World J Gastroenterol* 2004; 10(8): 215-217.
- Kasper LH and Buzoni-Gatel D. Ups and Downs of Mucosal Cellular Immunity against Protozoan Parasites. *Infection and Immunity.* 2001; 69(1): 1-8.
- Khan I.A., Avery M.A., Burandt C.L., Goins D.K., Mikell J.R., Nash T.E., Azadegan A. and Walker L.A. Antigiardial Activity of Isoflavones from *Dalbergia frutescens* Bark. *J Nat Prod* 2000; 63: 1414-16.
- Knight R. Epidemiology and transmission of giardiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1980; 74 (4): 433-435.
- Kofidis G, Bosabalidis AM, Moustakas M. Contemporary seasonal and altitudinal variations of leaf structural features in oregano (*Origanum vulgare* L.). *Ann Bot (Lond).* 2003 Nov: 92(5):635-45.
- Kunle O., Okogun J., Egamana E., Emojevwe E. and Shok M. Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. *Phytomedicine.* 2003 Jan. 10 (1):59-61
- Kulda J, Nohýnková E. *Giardia* in humans and animals, In P- P- Kreir, ed. *Parasitic Protozoa.* Academic Press, San Diego. 1995; 225-42
- Lane S., Lloyd D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit. Rev. Microbiol.* 2002. 28:123-147.
- Leder K, and Weller P.F. Epidemiology, clinical manifestations and diagnosis of giardiasis. 2007. <http://patients.update.com/topic.asp?file=parasite/7013&title=Giardiasis>
- Lin LZ, Mukhopadhyay S, Robbins RJ, Harnly JM. Identification and quantification of flavonoides of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2007; 20(5):361-369.
- Lirussi D, Li J, Prieto JM, Gennari M, Buschiazzo H, Ríos JL, Zaidenberg A. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* by plant extracts used in Chinese medicine. *Fitoterapia.* 2004 Dec; 75(7-8):718-23
- Lloyd David and Wallis Peter. A *Giardia* feast. *Trends in Parasitology* 2001; 17(3): 115-117
- López-Cifra H, Javier M, Rodríguez SV, Santos Ocampo PD. The efficacy of metronidazole in the treatment of giardiasis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1982 Sep 13(3):432-4.
- López Nigro M.M., Gadano A.B., Carballo M.A. Evaluation of genetic damage induced by a nitroimidazole derivative in human lymphocytes: Tinidazole (TNZ). *Toxicol In vitro.* 2001; Jun 15(3): 209-213.
- Luján D.H, Mowatt M M R, Byrd G L, Nash T E. Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1996; 93: 7628-7633.
- Luján H.D., Morowat M.R. and Nash T.E. The Molecular Mechanisms of *Giardia* Encystation. *Parasitology Today.* 1998; 14(11): 446-450
- Lujan D.H. *Giardia* y *Giardiasis.* *Medicina (Buenos Aires)* 2006; 66: 70-74.

Mariante RM, Vancini RG, Melo AL, Benchimol M. *Giardia lamblia*: evaluation of the in vitro effects of nocodazole and colchicines on trophozoites. *Exp Parasitol* 2005 May; 110 (1): 62-72.

Mata-González Ricardo and Meléndez-González Ruben. Growth characteristics of Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) under salt stress. *The Southwestern Naturalist*. 2005; 50 (1):1-6.

Majewska AC, Kasprzak W, De Jonckheere JF, Kaczmarek E. Heterogeneity in the sensitivity of stocks and clones of *Giardia* to metronidazole and ornidazole. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991 Jan-Feb;85(1):67-9

McAllister T.A., Annet C.B., Cockwill C.L., Olson M.E., Wang Y., Cheeke P.R. Studies on the use of *Yucca schidigera* to control giardiasis. *Vet Parasitol* 2001; 97: 85-99.

McIntyre, L. Hoang, C. S. L. Ong, P. Lee, J. L. Isaac-Renton. Evaluation of Molecular Techniques to Biotype *Giardia duodenalis* Collected During an Outbreak. *Journal of Parasitology*. 2000; 86(1):172-177.

McRoberts KM, Meloni BP, Morgan UM, Marano R, Binz N, Eriandson SL, Halse SA, Thompson RC. Morphological and molecular characterization of *Giardia* isolated from the straw-necked ibis (*Threskiornis spinicollis*) in Western Australia. *J Parasitol*. 1996 Oct; 82(5):711-8

Menéndez D., Rojas E., Herrera L.A., López M.C., Sordo M., Elizondo G., Ostrosky-Wegman P. DNA breakage due to metronidazol treatment. *Mutation Research* 2001; 478: 153-158.

Meyer R.M., Gomes V R, Melo AL and Benchimol M. *Giardia lamblia*: Evaluation of the in vitro effects of nocodazole and colchicine on trophozoites *Experimental Parasitology*. 2005; 110(1):62-72.

Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000 Dec; 52(4):673-751

Mineno Tomoko and Avery Mitchell A. Giardiasis: Recent Progress in Chemotherapy and Drug Development. *Current Pharmaceutical Design*. 2003; 9: 841-855.

Mingeot-Leclercq MP and Tulkens M.P. Aminoglycosides: Nephrotoxicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999; 43 (5): 1003–1012.

Miyakado M, Kato T, Ohno N and Mabry T.M. Pinocembrin and (+)-b-Eudesmol from *Hymenoclea monogyra* and *Baccharis glutinosa*. *Phytochemistry*. 1976; 15: 846

Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G and Ey PL. Molecular Systematics of the Parasitic Protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol. Biol. Evol*. 1999; 16 (9): 1135-1144.

Morales-Espinoza EM, Sánchez-Pérez HJ, García-Gil MM, Vargas-Morales G, Méndez-Sánchez JD, Pérez-Ramírez M. Intestinal parasites in children in highly deprived areas in the border region of Chiapas, México. *Salud Pública México*. 2003; 45:379-388.

Moreno S N J and Docampo R. Mechanism of toxicity of Nitro Compounds used the chemotherapy of Trichomoniasis *Environmental Health Perspectives* 1985; 64: 199-208.

Müller N, von Allmen N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *Int J Parasitol*. 2005 Nov; 35(13):1339-47.

Nenoff P, Domula E, Willing U, Herrmann J. *Giardia lamblia*-cause of urticaria and pruritus or accidental association? *Hautarzt* 2006 Jun; 57(6):518-20.

- Nohria A, Alonso R A, Peattie D.A. Identification and characterization of α -giardin and the β -giardin gene from *Giardia lamblia*. Molecular and Biochemical Parasitology.1992; 56:27-38
- Oladimeji F.A., Orafidiya O.O., Ogunniyi T.A.B., Adewunmi T.A. Pediculocidal and sacabicial properties od *Lippia multiflora* essential oil. J Ethnopharmacol 2000 ; 72 : 305-11.
- Oli K, Jeffery J, Vythilingam I. A comparative study of adult mosquito trapping using dry ice and yeast generated carbon dioxide.Trop Biomed. 2005 Dec; 22(2):249-51.
- Owen R.L. The ultrastructural basis of *Giardia* function. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1980; 74(4): 429-433.
- Paget TA, Macechko PT, Jaroll EL. Metabolic changes in *Giardia intestinalis* during differentiation. J Parasitol.1998 Apr; 84(2) : 222-226.
- Pearce DA, Reynoldson JA, Thompson RC. A comparison of two methods for assessing drug sensitivity in *Giardia duodenalis*. Appl Parasitol. 1996 Jun; 37(2):111-6
- Pelter A and Stainton P. The Mass Spectra of Oxygen Heterocycles. Part (V). The Mass Spectra of 2'-Hydroxyflavonoids. J. Chem. Soc (C) 1967 :1933-1937.
- Perez-Arriaga L, Mendoza-Magaña ML, Cortes-Zarate R, Corona-Rivera A., Bobadilla-Morales L., Troyo-Sanroman R, Ramírez-Herrera Ma.Cytotoxic effect of curcumin on *Giardia lamblia* trophozoites. Acta Trop. 2006 May 98(2):151-61.
- Piva B, Benchimol M. The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. Biology of the Cell. 2004; 96: 735-746.
- Ponce Macotela Martha. Caracterización de los aislados de *Giardia intestinalis* mediante la amplificación de segmentos de genes de tres proteínas variables de superficie. Tesis Doctoral. 2006. 102 pp.
- Ponce-Macotela M, Navarro-Alegría I., Martínez Gordillo M.N., Alvarez-Chacón R. Efecto anti-giardiasico *in vitro* de 14 extractos de plantas. Rev Invest Clin 1994; 46:343-7.
- Ponce-Macotela M, Rufino-González Y, González-Maciel A, Reynoso-Robles R, Martínez-Gordillo MN. Orégano (*Lippia* spp.) kills *Giardia intestinalis* trophozoites *in vitro*: anti-giardiasic activity and ultrastructural damage. Parasitol Res. 2006. Jan 20: 1-4.
- Ponce-Macotela M., Gómez Garduño J., González-Maciel A., Reynoso-Robles R., Anislado-Tolentino V., Martínez-Gordillo M. Determinación *in vitro* de la susceptibilidad a la nitazoxanida de cuatro aislados de *Giardia duodenalis* obtenidos de diferentes huéspedes. 2001. Rev. Invest. Clín. 53(1): 41-45.
- Ponce-Macotela M., Rufino-González Y, De la Mora-De la Mora J.I., González-Maciel A., Reynoso-Robles R. & Martínez-Gordillo M.N. Mortality and Morphological Changes in *Giardia duodenalis* Induced by Exposure to Ethanolic Extracts of *Justicia spicigera*.Proc West Pharmacol Soc. 2001; 44:151-2.
- Portillo-Ruiz MC, Viramontes-Ramos S, Muñoz-Castellanos LN, Gastelum-Franco MG and Nevarez-Morillón V. Antifungal Activity of Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Shauer). Journal of Food Protection 2005; 68(12):2713-2717
- Rastrelli L., Caceres A., Morales C., De Simone F and Aquino R. Iridoids from *Lippia graveolens* .Phytochemistry. 1998 ; 49(6) : 1829-1832.
- Read C.M., Monis P.T. and Thompson A. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. Infection, Genetics and Evolution. 2004; 4:125-130.

Rodríguez Ferreiro G., Cancino Badias Lourdes, Prieto González E. y Espinoza Aguirre J. 2001. El tinidazol induce roturas de simple cadena en leucocitos de ratón. Anuario Toxicología. 1(1): 57-64

Rodríguez Ferreiro G., Cancino Badias Lourdes, López- Nigro Marcela, Palermo Ana, Mudry Marta, González Elio Prieto, Carballo Marta Ana. DNA single strand breaks in peripheral blood lymphocytes induced by three nitroimidazole derivatives. Toxicology Letters. 2002; 132: 109-115

Rodríguez- García R, Rodríguez-Guzmán LM, Cruz del Castillo AH. Effectiveness and safety of mebendazol compared to nitazoxanida in the treatment of *Giardia lamblia* in children. Rev Gastroenterol Mex.1999; 64:122-6.

Rodríguez-Guzmán L., Hernández-Jerónimo E.J., Rodríguez-García Roberto. Parasitosis intestinal en niños seleccionados en una consulta ambulatoria de un hospital. Revista Mexicana de Pediatría. 2000; 67(3):117-122

Romero-Cabello R., Robert L., Muñoz-García R. & Tanaka J. Estudio Aleatorio para Comparar seguridad y Eficacia de Albendazol y metronidazol en el Tratamiento de Giardiasis en Niños. Rev. Lat.-Amer. Microbiol. 1995; 37: 315-323.

Sadjjadi SM, Alborzi AW, Mostovfi H. Comparative clinical trial of mebendazole and metronidazole in giardiasis of children. J Trop Pediatr. 2001 Jun;47(3):176-8

Salgueiro L.R., Cavaleiro C., Gonçalves M.J., Proença da Gunha. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of the Essential Oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. Planta Med. 2003 ; 69 : 80-3.

Sanchez-Vega JT, Tay-Zavala J., Aguilar-Chiu A., Ruiz Sánchez D, Malagon F, Rodríguez-Covarrubias JA, Ordóñez-Martínez J, Calderon-Romero L. Cryptosporidiosis and other intestinal protozoan infections in children less than one year of age in Mexico City. Am J Trop Med Hyg 2006; Dec; 75 (6): 1095-1098.

Sawangjaroen N., Subhadhirasakul S., Phongpaichit S., Siripanth C., Jamjaroen K., Sawangjaroen K. The *in vitro* anti-giardial activity of extracts from plants that are used for self-medication by AIDS patients in southern Thailand. Parasitol Res.2005; 95:17-21.

Senatore F and Rigano D Essential oil of two *Lippia* spp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala. Flavour and Fragrance Journal. 2001; 16 (3): 169-171.

Shealy C. N. 1999. Enciclopedia Ilustrada de Remedios Naturales. Ed. Kônemann. España. 496 pp

Sisson G., Goodwin A., Raudonikiene A., Hughes N.J., Mukhopadhyay A.K., Berg D.E. and Hoffman P.S. Enzymes Associated with Reductive Activation and Action of Nitazoxanide, Nitrofurans and Metronidazole in *Helicobacter pylori*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2002; 46(7): 2116-2123.

Smith HV, Caccio SM, Tait A, McLauchlin J, Thompson RC. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in Humans. Trends Parasitol. 2006 Apr; 22(4): 160-7

Smith PD, Gillin FD, Spira WM, Nash TE. Chronic giardiasis: studies on drug sensitivity, toxin production, and host immune response. Gastroenterology. 1982 Oct; 83(4):797-803

Stoops MA, Bond JB, Bateman HL, Campbell MK, Levens GP, Bowsher TR, Ferrell ST, Swanson WF. Comparison of different sperm cryopreservation procedures on post-thaw quality and heterologous in vitro fertilisation success in the ocelot (*Leopardus pardalis*). Reprod Fertil Dev. 2007; 19(5):685-94

- Suga T, Iwata N and Asakawa Y. Chemical Constituents of the Male Flower of *Alnus pendulata* (Betulaceae). Bulletin of the Chemical Society of Japan. 1972; 45(7): 2058-2060.
- Svärd S.G., Hagblom P. and Palm J.E. D. *Giardia lamblia*- a model organism for eukaryotic cell differentiation. FEMS Microbiology Letters .2003; 218: 3-7.
- Tay J, Ruiz A, Schenone H y col. Frecuencia de las protozoosis intestinales en la República Mexicana. Bol CGIL Parasitol 1994; 49: 9-15.
- Tay Z J y Sánchez VT. Características de protozoarios y helmintos capaces de causar diarrea aguda en humanos. Rev. Fac. Med. UNAM. 2002; 45(2): 64-70
- Terblanché FC and Kornelius G. Essential Oil Constituents of the Genus *Lippia* (Verbenaceae)- A Literature Review. J.Essent.Oil Res., 1996; 8: 71-485(Sep/Oct).
- Thompson R.C.A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. Vet. Parasitol. 2004; 126: 15-35..
- Tovar J, León-Avila G, Sutak R, Tachezy J, Van der Giezen M, Hernández M, Müller M, Lucocq JM. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* Function in iron-sulphur protein maturation. Nature. 2003; 426:172-6
- Upcroft J and Upcroft P. My favorite cell: *Giardia*. BioEssays. 1998. (20): 256-263
- Upcroft JA and Upcroft P. Drug susceptibility testing of anaerobic protozoa. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Jun; 45(6):1810-4
- Uribe-Hernandez C, Hurtado-Ramos J.B, Olmedo-Arcega E, Martínez-Sosa M.A. The Essential Oil of *Lippia graveolens* H.B.K. from Jalisco, Mexico. J. Essent. Oil Res.1992; 4: 647-649.
- Valentin A., Péliissier Y., Benoit F., Marion Ch., Kone D., Mallie M., Bastide J.M. and Bessièrre J.M. Composition and antimalarial activity *in vitro* of volatile components of *Lippia multiflora*. Phytochemistry. 1995 ; 40(5) : 1439-42.
- Van Keulen H, Feely DE, Macechko PT, Jarroll EL, Erlandsen SL. The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasitized by a unique species *Giardia microti*. J Parasitol. 1998 Apr; 84(2):294-300
- Vázquez Silva Ramón and Dunford N.T. Bioactive Components of Mexican Oregano Oil as Affected by Moisture and Plant Maturity. J. Essent. Oil Res 2005; Nov.-Dic;17(6):668-671
- Velasco-Negueruela Arturo and Pérez-Alonso M. Volatile Constituents of Four *Lippia* Species from Córdoba (Argentina). J Essent. Oil Res. 1993 ; 5 (Sep/oct) : 513-524
- Venkatesan P. Albendazole. J. Antimicrobial Chemotherapy.1998; 41: 145-147.
- Vernin G, Lageot C., Gaydou M, Parkanyi C. Analysis of the essential oil of *Lippia graveolens* HBK from El Salvador. Flavour and Fragrance Journal.2001;16 (3) : 219 – 226.
- Vidal F, Vidal J.C., Gadelha A.P.R., Lopes C.S., Coelho M.G.P., Monteiro-Leal L.H. *Giardia lamblia*: The effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Li. (Lamiaceae) on trophozoites. Exp. Parasitol.2007; 115: 25-31.
- White C. Jr. 2004. Nitazoxanide: a new broad spectrum antiparasitic agent.. Expert Rev. Anti-infect. Ther.2004; 2(1):43-50.
- Wright C.W., Melwanni S.I., Phillipson J.D. & Warhurst D.C. Determination of anti-giardial activity *in vitro* by means of soluble formazan production. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1992; 517-519.

Yereli K, Balcioglu IC, Ertan P, Limoncu E. and Onag A. Albendazole as an alternative therapeutic agent for childhood giardiasis Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 527-529