



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Valoración *in vitro* de extractos metanólico,
etanólico y acuoso de *Piqueria trinervia* Cav.
durante el proceso de enquistamiento de
Giardia intestinalis.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ANA VALERIA NÚÑEZ RAMÍREZ



DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. Yadira Rufino González
2017

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.



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.

1. Datos del alumno

Núñez

Ramírez

Ana Valeria

5536337888

Universidad Nacional Autónoma de

México

Facultad de Ciencias

Biología

305341286

2. Datos del tutor

M. en C.

Yadira

Rufino

González

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Ricardo

Reyes

Chilpa

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Manuel

Jiménez

Estrada

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Martha

Ponce

Macotela

6. Datos del sinodal 4

Dr.

Rogelio

Aguilar

Aguilar

7. Datos del trabajo escrito

Valoración *in vitro* de extractos metanólico, etanólico
y acuoso de *Piqueria trinervia* Cav. durante el proceso
de enquistamiento de *Giardia intestinalis*

66 p

2017

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias, mi segundo hogar e impulsor de mi amor a la Ciencia.

A mi tutora de tesis, M. en C. Yadira Rufino González, por su paciencia y apoyo en este trabajo, por sus consejos siempre tan acertados y su asesoría que fueron elementos esenciales en este trabajo. Por su calidad humana la cual se transmite en cada una de sus enseñanzas.

A la Dra. Martha Ponce Macotela, por darme la oportunidad de realizar mi trabajo en su laboratorio, por sus consejos, enseñanza, paciencia y confianza otorgada.

A mi comité tutorial, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dr. Manuel Jiménez Estrada, Dr. Rogelio Aguilar Aguilar, por sus observaciones y acertados consejos, su otorgarme su tiempo y conocimientos.

Dedicatoria

A mi Mamá, por su apoyo incondicional, por su fuerza y tenacidad de salir adelante ante las adversidades, a ella dedico este trabajo por otorgarme esta oportunidad, por su paciencia y comprensión absoluta y sobre todo por confiar y creer en mí siempre. Te quiero Mama.

A mis hermanos, Aurea, Nadia y Jesús, por enseñarme a derribar obstáculos, por su apoyo absoluto y su tolerancia infinita, por sus consejos, por compartir las locuras y momentos de felicidad, por mostrarme sus sueños y sus mundos. Los quiero y admiro mucho.

A Sergio, por compartirme un pedacito de su vida, por su apoyo, por su fortaleza, sus enseñanzas y su cariño, por mostrarme nuevos mundos y otras posibilidades de ver la vida.

A toda mi familia de la que he recibido apoyo, siempre están presentes en mis pensamientos.

A mis Amigos, desde los más antiguos hasta los más recientes que se han sumado en éste viaje llamado vida, por su compañía, sus consejos, las experiencias, por todos esos momentos de locura y diversión, todos y cada uno han aportado algo a mi ser.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades de la giardiasis	1
1.2 Clasificación taxonómica	1
1.3 Criterios para clasificar a <i>Giardia</i>	3
1.4 Epidemiología	6
1.5 Morfología.....	7
1.5.1 Trofozoíto	8
1.5.2 Quiste.....	11
1.6 Ciclo de vida.....	12
1.6.1 Enquistamiento	14
1.6.2 Desenquistamiento.....	18
1.7 Mecanismos de Transmisión	19
1.7.1 Mecanismos patogénicos	20
1.7.2 Mecanismos de defensa	21
1.8 Manifestaciones clínicas.....	22
1.9 Diagnóstico.....	23
1.10 Tratamiento	23
1.11 La Medicina Tradicional Mexicana	26
1.11.1 Plantas con actividad contra quistes de <i>Giardia</i>	27
1.12 <i>Piqueria trinervia</i> Cav.....	29
1.12.1 Descripción botánica	29
1.12.2 Clasificación taxonómica.....	30
1.12.3 Distribución geográfica	31
1.12.4 Usos en la medicina tradicional	32
1.12.5 Actividad biológica de extractos y compuestos.....	32
2.0 JUSTIFICACIÓN	35
3.0 OBJETIVOS	35
4.0 HIPÓTESIS.....	35
5.0 MATERIAL Y MÉTODOS.....	36
5.1 Obtención de extractos naturales.....	36
5.2 Aislado de <i>Giardia intestinalis</i>	36

5.3 Experimentos <i>in vitro</i>	36
5.3.1 Ensayos de Enquistamiento	36
5.3.2 Ensayos de enquistamiento para la valoración de extractos de <i>Piqueria trinervia</i> Cav.....	37
5.4 Microscopia de Interferencia Diferencial de Contraste (DIC Nomarsky)	37
5.5 Análisis Estadístico	38
6.0 RESULTADOS.....	39
6.1 Ensayos de enquistamiento	39
6.2 Inhibición de enquistamiento <i>in vitro</i> con extractos de <i>Piqueria trinervia</i> Cav	41
6.3 Microscopia de Contraste de Interferencia Diferencial (DIC Nomarsky)	42
6.3.1 Inhibición de enquistamiento de <i>G. intestinalis</i> por extractos de <i>P. trinervia</i>	42
6.3.2 Maduración de quistes de <i>Giardia intestinalis</i>	43
7.0 DISCUSIÓN	44
8.0 CONCLUSIONES	47
9.0 PERSPECTIVAS	48
10.0 REFERENCIAS.....	49
ANEXO.....	61

Resumen

Giardia intestinalis (Sin. *G. duodenalis*, *G. lamblia*) es uno de los diez parásitos entéricos que más afecta a los humanos en todo el mundo, se distribuye tanto en países industrializados como en países en desarrollo. En México la frecuencia de esta parasitosis es muy variable, con cifras que fluctúan entre 2% y 39%, prevaleciendo en la población infantil. *G. intestinalis* posee dos fases en su ciclo de vida: el trofozoíto es la forma infectiva y el quiste la estructura de resistencia fuera del hospedero.

El tratamiento de la giardiasis es atendido con cualquiera de los siguientes fármacos: 5-Nitroimidazol (Metronidazol, Tinidazol, Ornidazol, y Secnidazol); Quinacrinas; Furazolidonas; Paromocinas; Benzimidazoles (Albendazol, Mebendazol); Nitazoxamida. Sin embargo se ha reportado resistencia de las diferentes cepas de *G. intestinalis* y presencia de efectos secundarios durante de su administración. Una alternativa a los tratamientos convencionales es el uso, efecto y propiedades de plantas con actividad antiparasitaria. Los reportes sobre plantas con actividad anti-giardiasis en su mayoría están enfocados sobre la fase infectiva (Trofozoíto), mientras que sobre la fase de resistencia y propagación (quiste) los trabajos son escasos.

En el presente trabajo se valoró el efecto cisticida de extractos totales de *Piqueria trinervia*, específicamente durante el proceso de enquistamiento *in vitro*, se realizó diferentes ensayos con diferentes condiciones para lograr el rendimiento óptimo de enquistamiento de *G. intestinalis*, finalmente se implemento una población de 50,000 trofozoítos por mL del aislado HGINV en un medio de pre-enquistamiento, posteriormente en medio de enquistamiento (5 mg/mL de bilis bovina, pH 7.8. en tubos de borosilicato de 4mL por 24 hrs. a 37°C) donde se obtuvo un rendimiento de enquistamiento de 18.7 %.

Para la valoración del efecto de *P. trinervia*, el extracto etanólico y metanólico presentaron mayor inhibición de enquistamiento de *G. intestinalis*. El extracto etanólico tuvo un efecto cisticida en las concentraciones de 25 y 400 µg/mL ya que presentaron un porcentaje de enquistamiento de 1.9% y 0.5% respectivamente. El extracto metanólico presento un efecto cisticida en las concentraciones de 25 µg/mL (3.03%), 100 µg/mL (3.3 %), 200 µg/mL (3.04%), 400 µg/mL (0.7). El efecto no se pudo considerar dosis dependiente. Por medio de Microscopia de Interferencia de Contraste (DIC), se pudo determinar algunas alteraciones en la morfología de los quistes posterior a los tratamientos.

En extracto etanólico de *P. trinervia* presento un efecto mayor a menor concentración durante el enquistamiento de *G. intestinalis* (25 µg/mL 1.6%).

Valoración *in vitro* de extractos metanólico, etanólico y acuoso de *Piqueria trinervia* Cav. durante el proceso de enquistamiento de *Giardia intestinalis*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de la giardiasis

La giardiasis es una patología causada por el protozoo parasito *Giardia* que infecta muchas especies de vertebrados, entre ellos un gran número de mamíferos. *Giardia intestinalis* (Sin. *G. duodenalis*, *G. lamblia*) es uno de los diez parásitos entéricos que más afecta a los humanos en todo el mundo ([Sulaiman-Cama, 2006](#)), la giardiasis muestra manifestaciones clínicas que van desde asintomáticas a la enfermedad aguda o crónica. Se considera la infección más común por protozoarios en humanos y se encuentra frecuentemente tanto en países industrializados como en países en desarrollo ([Hawrelak, 2003](#)), considerándola una enfermedad de alto impacto de salud pública con una alta prevalencia y una carga de infección que está propensa a causar brotes de emergencia en todo el mundo, la giardiasis también es una enfermedad común en granjas y animales de compañía, siendo también de importancia en salud veterinaria ([Feng-Xiao, 2011](#)).

Las diferentes especies de *Giardia* tienen dos estadios en su ciclo de vida. La infección del hospedero ocurre inicialmente por el quiste, en la ingesta de alimentos ó agua contaminada, entre otras vías. El quiste es relativamente inerte y es resistente a diferentes condiciones ambientales, después de exponerse a un medio ácido en el estómago dentro del hospedero éste desenquista dando lugar a al trofozoíto quien se divide en el intestino delgado y es causante de síntomas como diarrea y mala-absorción ([Adam, 2001](#)).

1.2 Clasificación taxonómica

Giardia intestinalis se observó por primera vez en 1681 por Antonie Van Leeuwenhoek examinando en el microscopio sus propias muestras diarréicas, pero fue hasta 1859 que Vilém Labm la describe a gran detalle y nombra al género *Cercomonas*. Kunstler en 1882 describe y nombra por primera vez al género *Giardia*. Stiles en 1902 quien propone el nombre a esta especie como *Giardia duodenalis* ([Adam, 2001](#)).

En este trabajo tomaremos la clasificación propuesta por [Cavalier-Smith, 2003](#).

Dominio Eucaryota

Reino Protozoa

Infrareino Excavata (Cavalier-Smith, 2002)

Phylum Metamonada

Superclase Eopharyngia (Cavalier-Smith 1993)

Clase Trepomonadea

Subclase Diplozoa

Orden Giardiida (Cavalier-Smith, 1996)

Familia Giardiidae

Genero Giardia (Kunstler, 1882)

Especie *Giardia intestinalis*; sin. *G. duodenalis*,

G. lamblia (Kafoid, 1915).

Giardia es considerado un organismo eucarionte por presentar núcleos, una membrana nuclear y un citoesqueleto, clasificado dentro del grupo de los protistas (Eucariontes unicelulares) que se caracterizan por presentar: un solo tipo de núcleo, reproducción asexual, poseer flagelos, pseudópodos, o ambos. El infrareino Excavata se caracteriza por presentar microtúbulos ciliares dorsales y ventrales y ausencia de alveolos corticales, además de no presentar mitocondrias. Los organismos del phylum Metamonada han perdido el aparato de Golgi y presentan mitosomas.

La clase Trepomonada se caracteriza por la ausencia de microtúbulos corticales. Dentro del orden Giardiida, familia Giardiidae; agrupa a protozoos que presentan axostilo, dos núcleos y simetría bilateral ([Cavalier-Smith, 2003](#)).

1.3 Criterios para clasificar a *Giardia*

La clasificación de *Giardia* a nivel de especie ha sido complicada y confusa, muchas de sus especies se describieron inicialmente por el tipo de hospedero y su diferente morfología.

Desde 1859 se ha reportado un total de 51 especies de *Giardia* de las cuales se describieron dos en el humano, 28 de otros mamíferos, una en peces, 14 de aves, cuatro de anfibios y dos de reptiles ([Thompson et al., 2004](#)). Fue hasta 1952 que Filice relocaliza la mayoría de las especies descritas anteriormente en tres, utilizando la morfología del cuerpo medio: *Giardia duodenalis*, *G. muris* y *G. agilis*. Posteriormente se realizó la caracterización por microscopía ultraestructural de aislados de *Giardia* en aves, demostrando por caracteres morfológicos, y ordenándolos en dos especies: *Giardia psittaci* y *Giardia ardeae* ([Erlandsen et al., 1990](#)). Y una especie adicional en mamíferos, *Giardia microti* que fue descrita básicamente por la morfología del quiste ([Feely, 1988](#)). **Tabla 1**

Debido a insuficiencia de las herramientas empleadas el estudio de la descripción y clasificación de las especies de *Giardia intestinalis*, no se lograba establecer conclusiones acerca de las características específicas en la taxonomía y epidemiología de las diferentes especies descritas hasta entonces. Con la implementación de herramientas moleculares como: Polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP), Isoenzimas, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación de genes, se han alcanzado grandes avances en el conocimiento de las especies de *Giardia*. Después de que fue revelado la heterogeneidad del genoma de *Giardia* se pudo determinar que los aislados obtenidos en humanos, pertenecían a dos tipos de ensamblajes genéticos: Ensamble A y B (**Tabla 2**), caracterizando así a partir de diferentes aislados de *Giardia*, sus posibles relaciones zoonóticas. ([Adam, 2001](#); [Monis et al., 2003](#)).

Por otro lado de las diferentes especies en sus distintos hospederos se han determinado los genotipos asociados a la preferencia de hospedero como son el ensamblaje C, F y G que corresponden a cánidos, felinos y ratas respectivamente, y el ensamblaje E relacionado particularmente con animales de granja (artiodáctilos). Recientemente en 2010 Lasek y colaboradores, describieron un nuevo ensamblaje de *G. intestinalis*, presente en vertebrados marinos, al cual fue denominado ensamblaje H ([Thompson y Monis, 2004](#); [Lasek-Nesselquist, 2010](#); [Read et al., 2004](#)).

Tabla 1. Especies del género *Giardia*

Especie	Hospedero	Características Morfológicas	Tamaño del trofozoíto Alto/Ancho(µm)
<i>G. duodenalis;</i> <i>intestinalis.</i>	Humanos, mamíferos domésticos y silvestres	Trofozoíto piriformes con cuerpos medios en forma de uña de martillo.	12-15/6-8
<i>G. agilis</i>	Anfibios	Trofozoíto largos y estrechos, cuerpos medios en forma de lágrima.	20-30/4-5
<i>G. muris</i>	Roedores	Trofozoíto redondeado y cuerpos medios pequeños y redondos.	9-12/5-7
<i>G. ardeae</i>	Aves	Trofozoíto redondeados, con muesca prominente en disco ventral y flagelo caudal rudimentario. Cuerpos medios ovalados.	~10/ ~6-5
<i>G. psittaci</i>	Aves	Trofozoíto piriformes, sin flagelos ventrales, cuerpos medios en forma de mazo.	~14/ ~6
<i>G. microti</i>	Roedores	Los trofozoítos son similares a <i>G.</i> <i>duodenalis</i> . Los quistes contienen dos trofozoítos completamente diferenciados.	12-15/ 6-8

(Modificado de [Thompson y Monis, 2011](#))

Tabla 2. Ensambls dentro del género *Giardia*

Especie	Hospedero	Características Morfológicas	Tamaño del trofozoíto Alto/Ancho(µm)
<i>G. duodenalis;</i> <i>intestinalis.</i> (= Ensamble A)	Humanos, mamíferos domésticos y silvestres	Trofozoíto piriformes con cuerpos medios en forma de uña de martillo.	12-15/6-8
<i>G. entérica</i> (= Ensamble B)	Humanos y otros primates, perros y algunas especies de mamíferos silvestres.	Trofozoítos piriformes y cuerpos medios en forma de gancho.	12-15/6-8
<i>G. canis</i> (= Ensamble C/D)	Perros, y otros caninos	Trofozoítos piriformes y cuerpos medios en forma de gancho.	12-15/6-8
<i>G. cati</i> (= Ensamble F)	Gatos	Trofozoítos piriformes y cuerpos medios en forma de gancho.	12-15/6-8
<i>G. bovis</i> (= Ensamble E)	Ganado y otros ungulados	Trofozoítos piriformes y cuerpos medios en forma de gancho.	12-15/6-8
<i>G. simondi</i> (= Ensamble G)	Ratas	Trofozoítos piriformes y cuerpos medios en forma de gancho.	12-15/6-8
(= <i>Ensamble H</i>)	Foca Gris, Gaviota	_____	rRNA

(Modificado de [Thompson y Monis, 2011](#); [Lasek-Nesselquist, 2010](#))

1.4 Epidemiología

Las infecciones intestinales por protozoarios constituyen aún un importante problema de salud a nivel mundial, infectando principalmente a la comunidad infantil. Tiene altas tasas de prevalencia y amplia distribución mundial, sobre todo en las regiones tropicales y subtropicales. En 2004 la Giardiasis es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como “Enfermedades Desatendidas”, que consiste en un grupo de enfermedades parasitarias, bacterianas y virales, con distribución heterogénea y que se presentan principalmente en países en desarrollo donde el clima, la pobreza y la falta de acceso a los servicios básicos influyen en el presencia de estas enfermedades, que en su conjunto constituyen una problemática global considerable y creciente que pone en riesgo a las personas afectadas alcanzando todo su potencial infectivo ([Savioli et al., 2006](#)).

En el continente Europeo, en poblaciones infantiles, la frecuencia es variable: En Lisboa, Portugal de 844 niños entre 0 a 15 años la frecuencia fue de 1.9% utilizando exámenes coproparasitoscópicos y 6.8% por medio de pruebas de ELISA ([Júlio et al., 2012](#)). En el Reino Unido en una población de 230 niños asintomáticos, la prevalencia fué de 1.3 % ([Puw Davies et al., 2009](#)).

En Estados Unidos, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDCP) por sus siglas en inglés, reporto en 48 estados y dos ciudades que durante el periodo de 2009 a 2010 presentaron un incremento de 19,403 a 19,888 casos respectivamente, destacando una mayor frecuencia en niños de uno a nueve años de edad. ([Yoder et al, 2012](#)).

En América Latina las frecuencias son variables: Brasil 15.5% para el ensamble A y 74.1% ensamble B y el 10.3% presentaron infección mixta (([Kohli et al, 2010](#)). Colombia las prevalencias fueron 13.60%, 12,84% y 15,16% para los años 2001, 2002 y 2005 respectivamente ([2007 Chaves](#)). En Ecuador la frecuencia fué de 21.1% ([Jacobsen et al, 2007](#)).

En México la frecuencia de esta parasitosis es muy variable, con cifras que fluctúan entre 2% y 39%. Está reportado en el boletín semana 11 de vigilancia epidemiológica de la SINAVE (<http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/>), un acumulado de 2,180 casos en toda la República Mexicana para el 2016.

Las prevalencias en la población infantil son de 30-33% para la Ciudad de México ([Sánchez-Vega et al., 2006](#); [Paniagua, 2007](#)), 31 % para Oaxaca, 23% Sinaloa ([Quihui, 2006](#)), 44.3% en Durango ([Ávila-](#)

Rodríguez *et al.*, 2010), 51.4 % para Michoacán ([Zamora-Espinosa, 2010](#)), 51.4% par Veracruz ([Rodríguez-Guzmán *et al.*, 2000](#)).

En el [2003 Morales-Espinosa y colaboradores](#) realizaron en 32 comunidades del estado de Chiapas, México, un estudio con 1,478 muestras de niños entre 1 y 14 años de edad, y reportaron un prevalencia de parasitosis global de 67%, de los cuales 18.3% dieron positivos de infección por *Giardia*. En Guadalajara de una muestra de 288 prescolares y lactantes se encontró una prevalencia de 2.4% para *G. intestinalis* ([Larrosa-Haro *et al.*, 2002](#)). En San Luis Potosí se llevó a cabo un estudio en 14 comunidades, de 3,359 muestras analizadas de niños de entre 3 a 19 años en diferentes niveles escolares, arrojó una presencia de 4.9% infectados por *G. intestinalis*, además de presentar otros parásitos ([Sánchez de la Barquera-Ramos *et al.*, 2011](#));). En el 2009 Cedillo-Rivera y colaboradores realizaron un estudio seroepidemiológico para *G. intestinalis* en toda la Republica Mexicana, dividida en cuatro regiones caracterizadas por sus condiciones socioeconómicos y demográficos, encontrando el siguiente resultado: De un total 1,914 muestras el 55.3% fueron positivas para anticuerpos IgG de *G. intestinalis*, asociado al género masculino entre la mayor prevalencia en los positivos encontrados. Sin embargo no se encontró relación significativa con las condiciones socioeconómicas, educativas y culturales con los resultados obtenidos ([Cedillo-Rivera *et al.*, 2009](#)).

Otro grupo susceptible a esta parasitosis, son las personas inmunocomprometidas o pacientes con VIH/SIDA, en Perú [Carcamo *et al* 2005](#) realiza un estudio donde se reportó una prevalencia de *Giardia lamblia* de 5.69% en pacientes infectados con VIH. En Cuba se reporta en un estudio transversal con 60 personas con diagnóstico de infección por VIH/SIDA con diarreas crónicas, el resultado arrojó 80% de infección por *Giardia intestinalis* asociados a otros parásitos. ([González-López *et al* 2007](#)).

1.5 Morfología

La diferenciación de *G. intestinalis*, involucra dos principales transiciones; desde que el quiste se ingiere, es activado el excyzoito que va a dar lugar al trofozoíto (Desenquistamiento), la forma infectiva que invade las microvellosidades de intestino delgado, los trofozoítos móviles se replican, hasta que se presentan ciertas condiciones para dar lugar al quiste infeccioso (Enquistamiento).

1.5.1 Trofozoíto

El trofozoíto es el estadio vegetativo de *G. intestinalis*, tiene una forma piriforme con simetría bilateral mide de 12 a 15 μm de largo y 5 a 9 μm de ancho, convexo dorsalmente y con una concavidad ventral. Presenta dos núcleos, en la parte anterior que son simétricos al eje transversal. El citoesqueleto está compuesto por un cuerpo medio, ocho axonemas y sus cuerpos basales, cuatro pares de flagelos, el funis (microtubulos asociados a los axonemas de los flagelos caudales) y un disco adhesivo ventral. Además de estructuras como vesículas periféricas, ribosomas y gránulos de glicógeno ([Adam, 2001](#); [Benchimol et al., 2011](#)). **Figura. 1**

El núcleo es bilateralmente simétrico, ambos son ovalados de aproximadamente 1 μm de diámetro, se creía que *Giardia* era un organismo anucleado, pero en estudios recientes se reportó que cada uno de los dos núcleos presentan pequeños gránulos teñidos y DNAr, que demuestra la presencia de nucléolos ([Jiménez-García et al., 2008](#)). Estudios morfológicos siguieron que los dos núcleos no son funcionalmente iguales; son diferentes en número y distribución de los poros nucleares. *Giardia* se divide por fisión binaria, tiene mitosis semi-abierta, donde la envoltura nuclear no desaparece durante el ciclo celular, pero aberturas en esta permiten que los microtúbulos del huso puedan entrar al núcleo ([Sagolla et al., 2006](#)).

En el citoesqueleto, los cuerpos medios están situados transversalmente al eje mayor de la célula, es una estructura formada por microtubulos, siendo una herramienta muy utilizada en diferenciación y clasificación taxonómica de las especies de *Giardia*. Su función no ha sido del todo establecida, pero se ha propuesto que representa un sitio para la nucleación microtubular, progenesis del disco, inmovilización de microtubulos entre las células en división y participación en la flexión de la región terminal del trofozoíto ([Piva et al., 2004](#); [Elmendorf et al., 2003](#)).

Cada trofozoíto tiene ocho flagelos móviles con un arreglo de (9+2 de microtubulos) asociados a axonemas estructurales, están organizados en cuatro pares de flagelos de manera bilateral: los anteriores que se extienden hacia el extremo anterior de la célula, cruzando y girando hacia los flagelos ventrales y surgen del cuerpo celular llevándolos en dirección posterior. Los flagelos caudales recorren a lo largo del cuerpo celular, que se extienden desde el extremo posterior de la célula en una variedad de longitudes diferentes. Los postero-lateral emergen cerca de dos tercios de la vuelta a lo largo del cuerpo celular. Por último los flagelos ventrales surgen del lado ventral del parasito justo en la parte posterior de disco ventral. El funcionamiento flagelar es importante para la supervivencia en el hospedero y juegan un papel

crucial en la motilidad y la división celular, y probablemente en la fijación, en el enquistamiento y desenquistamiento ([Dawson et al., 2010](#)).

En la región ventral de *G. intestinalis* se observa el "disco ventral" o "disco adhesivo", macroscópicamente se observa como una estructura cóncava con una profundidad máxima de 0,4 mm, que mediante complejos mecanismos de hidroadhesión le confieren al parásito su capacidad de adherencia a la mucosa intestinal. Se compone de una capa en espiral de microtubulos que están conectados a la membrana plasmática adyacente. Los mayores componentes del disco adhesivo consiste en varias formas de tubulinas y giardinas ([Adam, 2001](#)).

El funnis se compone de láminas de microtúbulos, que van de los axonemas al flagelo caudal, entre los dos núcleos en una región proximal a los cuerpos basales. Se ha propuesto que el funnis modula el plegamiento de los axonemas, resultante de la flexión dorsal/lateral de la cola ([Benchimol et al., 2004](#); [Dawson, 2010](#)). **Figura 2**

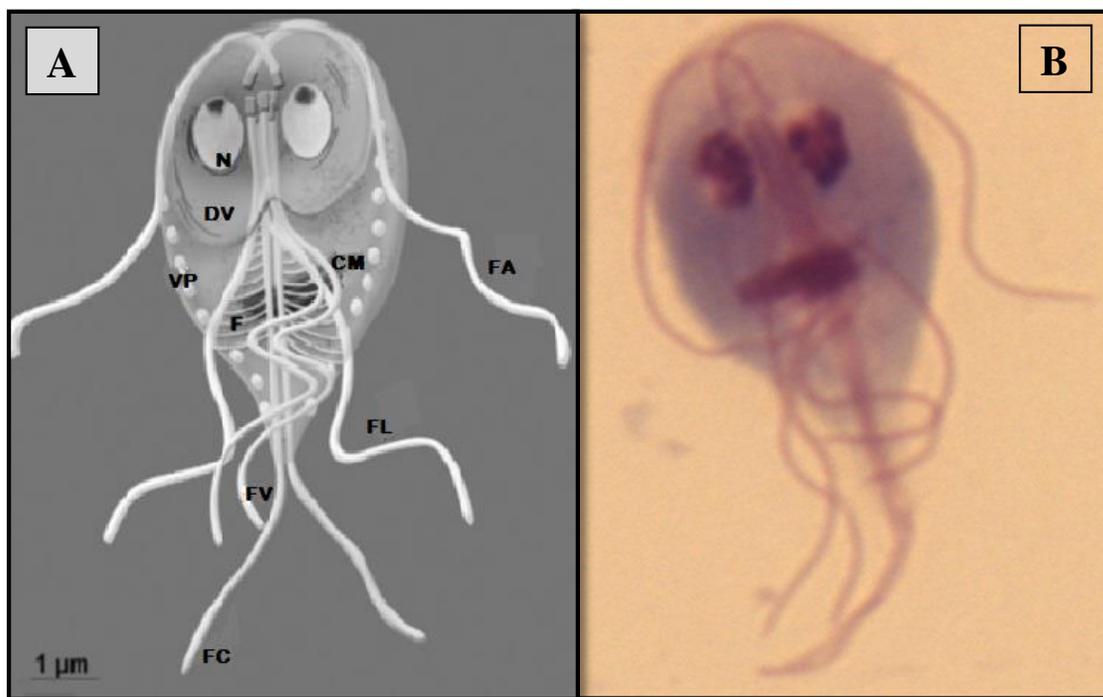


Figura 1. A) Diagrama de estructuras en trofozoíto de *Giardia intestinalis*; (DV) Disco ventral, (N) Núcleos, (CM) cuerpo medio, (F) el funnis, formado por microtúbulos en conexión con el axonema central; (FA) flagelo anterior, (FL) flagelo lateral, (FV) flagelo ventral, (FC) flagelo caudal y (VP) vesículas periféricas. B) Fotografía de trofozoíto tinción Giemsa, se observa claramente los flagelos ventrales, caudales y anteriores, así como sus dos núcleos y el cuerpo medio (A, Tomado de Benchimol y Souza, 2001; B Cortesía M. en C. Yadira Rufino González. Lab. Parasitología Experimental (INP), 100x).

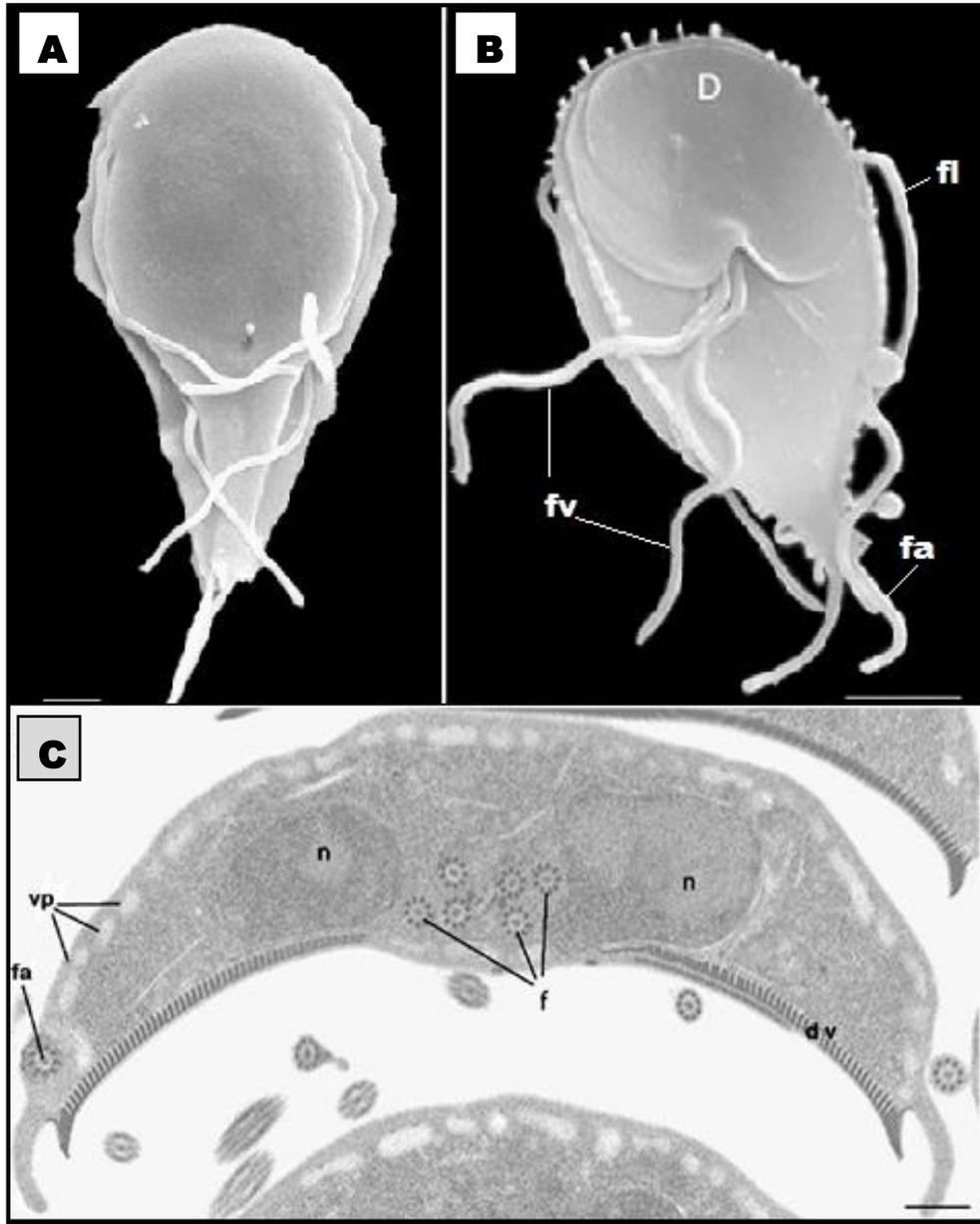


Figura 2. Microscopio electrónica de barrido (A, B) vista dorso-ventral, se observan los flagelos (fv, fa, fl) ventrales, anteriores y laterales. C) Microscopio electrónica de transmisión, corte transversal del trofozoíto de *Giardia intestinalis*, se observa (n) dos núcleos, (dv) disco ventral, (f, fa) flagelos ventrales y laterales respectivamente. (Tomado de Elmendorf et al., 2003; Midlej *et al*, 2009)

1.5.2 Quiste

El quiste de *G. intestinalis* es la estructura de resistencia, puede soportar circunstancias adversas del ambiente, esta es la fase infectiva del parásito.

El quiste es ovalado, mide cerca de 8-12 μm de largo y de 7 a 10 de ancho, está cubierto por una pared quística de 0.3-0.5 μm de espesor, compuesta por una red de filamentos de 7-20 nm. La pared del quiste está formada por 60% carbohidratos y 40% proteínas de las cuales, las glicoproteínas (CWP) identificadas, tiene un peso de 102, 88, 75 y 28 kDa. y el carbohidrato predominante la (β 1-3-*N*-acetyl-*D*-galactosamina), además de presentar lectinas. Lo cual le proporciona protección frente a la lisis hipotónica en el ambiente ([Ankarklev et al, 2010](#); [Adam, 2001](#)).

El citoplasma del quiste se puede observar ocho axonemas, asociados a microtúbulos, numerosos ribosomas, vacuolas y fragmentos del disco ventral. Los núcleos se localizan en un extremo del quiste, presentando en un inicio dos núcleos y posteriormente cada quiste maduro es tetranucleado. La actividad metabólica de los quistes es solo de un 10 a 20%, en comparación de la desarrollada por los trofozoítos.

Figura 3 y 4 ([Adam, 2001](#); [Jaroll et al., 2001](#); [Benchimol y De Souza, 2011](#)).

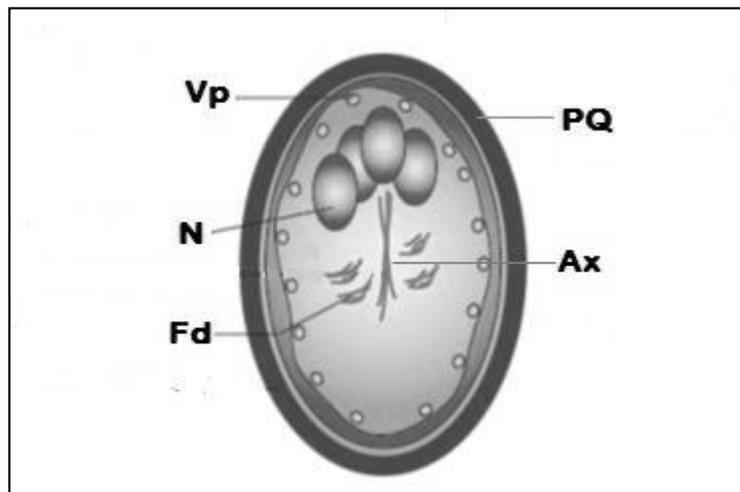


Figura 3. Diagrama de un quiste maduro de *Giardia intestinalis* con algunas de sus estructuras; (Vp) Vesículas periféricas; (PQ) Pared quística; (N) Núcleos; (Ax) Axonemas; (Fd) fragmentos de disco. (Modificado de [Ankarklev et al, 2010](#)).

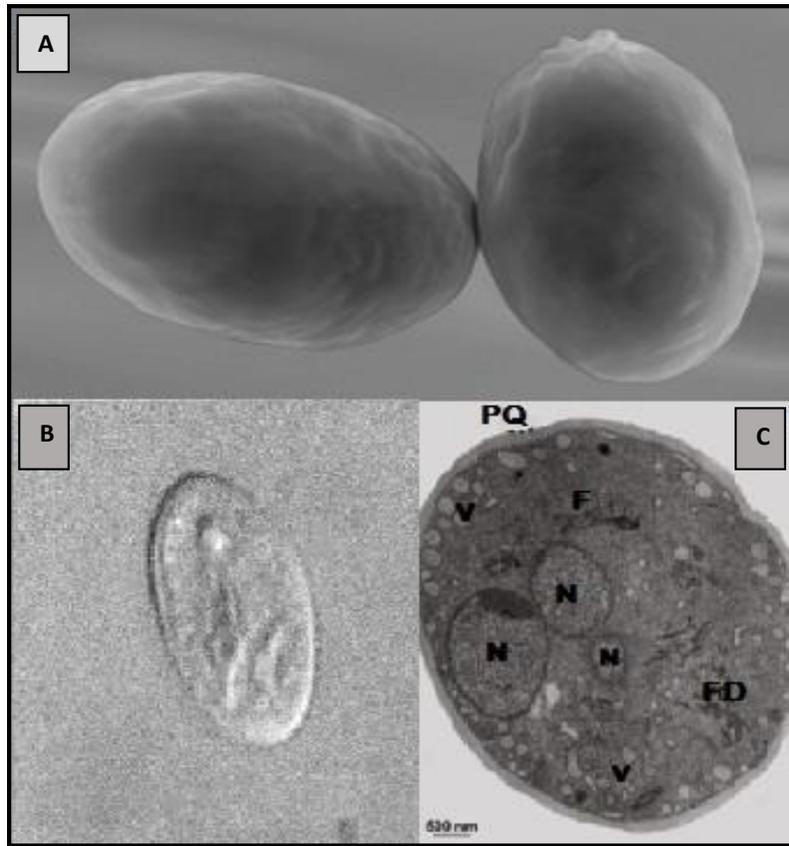


Figura 4. A) Quiste de *Giardia intestinalis* por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB); B) Quiste bajo microscopía de contraste de interferencia DIC 1000x (INP). C) Estructuras de quiste maduro por microscopía electrónica de transmisión (MET): (F) flagelo; (FD) fragmentos del disco; (N) núcleos; (PQ) pared del quiste. (Modificadas: De Copyright Dennis Kunkel Microscopy, Inc. 1996 ([Benchimol et al., 2011](#)); CDC, 2014; [Cruz et al., 2003](#); Ana Valeria Núñez Ramírez. *Lab. Parasitología Experimental, INP*).

1.6 Ciclo de vida

Giardia intestinalis presenta un ciclo de vida simple y está formado por dos estadios, la fase infectiva está representada por el quiste que es la forma de resistencia, relativamente inerte y resistente al medioambiente. Los quistes son ingeridos por el hospedero, expuesto al pH de los ácidos gástricos y también la quimotripsona y tripsina de enzimas pancreáticas, esto da comienzo al proceso de desenquistamiento en el duodeno. Entre el proceso de diferenciación existe un estadio de vida corta: el excyzoito, que es diferente al trofozoíto, ya que no presenta aún el disco adhesivo y contiene cuatro núcleos tetraploides. El excyzoíto se divide dos veces, pero no hay replicación de su DNA, dando lugar posteriormente a cuatro trofozoítos con dos núcleos diploides ([Ankarklev et al.2010](#); [Bernander et al. 2001](#)). **Figura. 5**

Los trofozoítos se replican en las criptas de duodeno y en la parte superior de yeyuno, adheridos por el disco ventral y reproduciéndose asexualmente por fisión binaria. Después algunos trofozoítos comienzan a enquistarse cuando migran al íleon, como resultado de las sales biliares y el escaso colesterol, para posteriormente ser expulsados en las heces. Los quistes tienen una baja tasa metabólica en comparación con los trofozoítos y son altamente resistentes a factores ambientales, siendo capaces de sobrevivir durante varias semanas fuera del huésped ([Ortega y Adam, 1997](#); [Paget et al., 1998](#)). **Figura 5.**

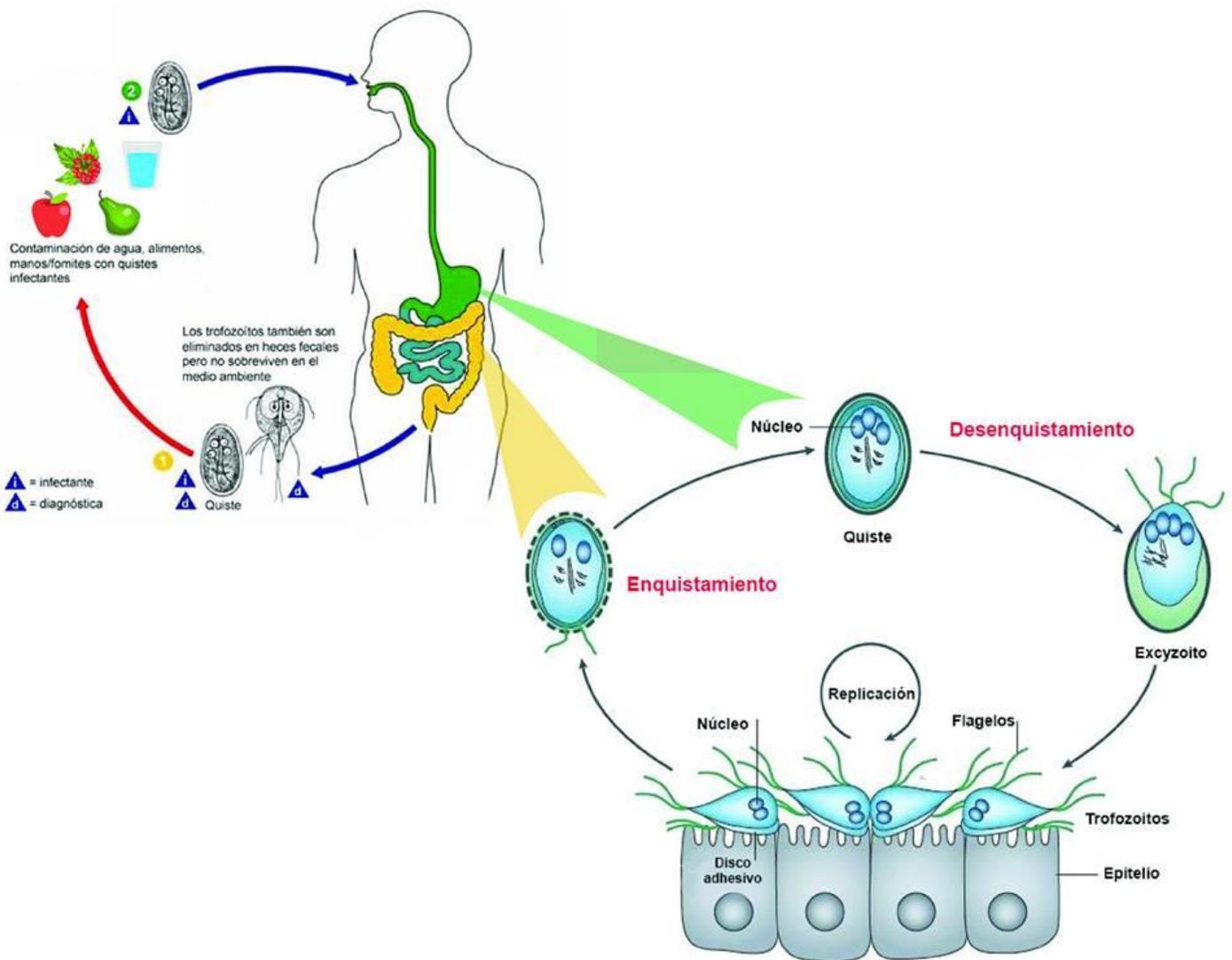


Figura 5. Esquema del ciclo de vida de *Giardia intestinalis*. (Modificado de: [Centers for Disease Control and Prevention: https://www.cdc.gov/parasites/giardia/pathogen.html](https://www.cdc.gov/parasites/giardia/pathogen.html), Anarklev et al., 2010).

1.6.1 Enquistamiento

El enquistamiento es un proceso adaptativo de *G. intestinalis* para enfrentar condiciones adversas dentro y fuera de su hospedero, como el decremento de nutrientes, específicamente de colesterol y la presencia de bilis en alta concentración en la parte baja del intestino delgado donde los trofozoítos generalmente colonizan el yeyuno de los mamíferos, medio rico en colesterol. Durante la digestión, las sales biliares se liberan en el duodeno proximal y se reabsorben más tarde por un sistema de transporte activo en el íleon distal. La absorción de colesterol se produce casi por completo en el yeyuno. Por lo tanto, los trofozoítos tienen que viajar por el intestino bajo donde se encuentra un entorno pobre en colesterol, lo que desencadena el estado de diferenciación del parásito ([Luján et al., 1998](#); [Ellis et al., 2003](#)).

Se han realizado diversos trabajos tratando de determinar los mecanismos por los cuales ocurre la diferenciación en *Giardia*, se han llevado a cabo diversas estrategias de enquistamiento *in vitro* que incluyen: (a) empleo de una atmósfera de N_2/CO_2 , (b) el uso de altas concentraciones de sales biliares en el medio de cultivo y (c) empleo de medios deficientes en colesterol. ([Arguello-García et al., 2009](#))

En base a los resultados obtenidos en estas estrategias se han propuesto y demostrado algunas de las vías que involucra la diferenciación de trofozoíto a quiste. En el proceso de enquistamiento de *Giardia* se distinguen tres fases: (I) Inducción del estímulo de enquistamiento y regulación de la expresión de genes específicos, (II) Síntesis y transporte de los componentes de la pared del quiste, y (III) Ensamblaje de la pared celular del quiste ([Luján et al., 1997](#); [Mowatt et al., 1995](#)). A continuación se detallan.

Fase I: Inducción del estímulo de enquistamiento y regulación de la expresión de genes específicos.

Estudios *in vitro* muestran que en presencia de una alta concentración de colesterol puede suprimir la transcripción de genes específicos del enquistamiento, por lo que en un ambiente extremadamente carente de colesterol pueden ser activados, esto llevó a identificar el receptor Citonin K (Ck) el cual participa en el control de homeostasis del colesterol, la inactivación de este receptor trae como consecuencia el incremento de Proteínas de la Pared del Quiste (CWP1). Las Proteínas de Unión a Elementos Reguladores de Esteroles (SREBPs; por sus siglas en inglés) son factores que regulan la transcripción de genes del metabolismo lipídico, que participan en el control de la homeostasis celular del colesterol ([Kaul et al., 2001](#); [Worgall et al., 2004](#)). **Figura 6**

También se han identificado la expresión tanto en el trofozoíto como en células de enquistamiento cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1 y ERK2). De éstas, se ha reportado principalmente que el aumento de la actividad de ERK1 es un requisito previo para iniciar el proceso de enquistamiento

([Ellis et al., 2003](#)). Adicionalmente en [2002, Bazar-Tejeda](#) y cols. a partir de identificar en *Giardia* proteoquinasas C (PKC) y sus isoformas: Beta (β); Delta (δ); Epsilon (ϵ); Theta (θ) y Zeta (ζ) presentaron diferentes patrones de expresión durante en enquistamiento. En especial PKC β presentó una actividad de enzima cuando se redistribuyo hacia la membrana plasmática tras la inducción del enquistamiento, indicando su posible activación en esta etapa.

Distintos factores de transcripción se sobre-expresan en la inducción del enquistamiento, entre ellas las CWPs (1, 2 y 3) al igual que otras proteínas como la Glucosamina-6-fosfato isomerasa (GLN6PI- b), la proteína BiP, Myb2, GLP1 y ENC6. **Figura 6:** cascada de señalización propuesta, detalle de su función. ([Sun et al., 2003](#); [Yang et al., 2003](#); [Argüello-García et al., 2009](#); [Aguilar-Díaz et al., 2011](#)).

Fase II: Síntesis y transporte de los componentes de la pared del quiste.

Durante el proceso de diferenciación de *G. intestinalis*, el parasito pierde su capacidad de adhesión y su transformación morfológica es evidente por la desaparición de los cuerpos medios, desorganización del disco adhesivo y flagelos, dando lugar a la formación de una pared redondeada, como ya se había mencionado la pared el quiste de *G. intestinalis* está compuesta por una red filamentosa. Las vacuolas que estas involucradas en la formación de esta estructura son llamadas Vesículas Especificas de Enquistamiento (ESV) que se encargan de transportar CWPs. **Figura. 7.** ([Reiner et al., 2001](#); [Hehl y Marti, 2004](#); [Gottig et al., 2006](#)) Se ha encontrado evidencias que proponen que las ESV tienen una función semejante al organelo Aparato de Golgi presenten en células eucariontes superiores, además de presentar propiedades funcionales, las ESVs muestran marcadores característicos del aparato de Golgi. **Figura. 6** ([Stefanic et al., 2009](#), [McCaffery y Gillin., 1994](#); [Lanfredi-Rangel et al., 2003](#)).

La Formación de la pared celular de *G. intestinalis* está mediada por múltiples reacciones enzimáticas-acopladas. La síntesis del glicopolimero (GalNAc) involucra dos procesos principales. El primero es el citosólico, regulado por vía enzimática en cinco pasos que convierte la fructosa-6-fosfato derivada de la glucólisis en UDP-GalNAc, el precursor del polímero de GalNAc, la cascada enzimática continúa con la actividad de cuatro enzimas más. El segundo proceso es la síntesis del polisacarido principal (β 1,3-GalNAc) de la Pared del Quiste (CW) dentro de las ESV por la actividad de una transferasa denominada CW sintasa ([Karr y Jaroll., 2004](#); [Sener et al., 2004](#)).

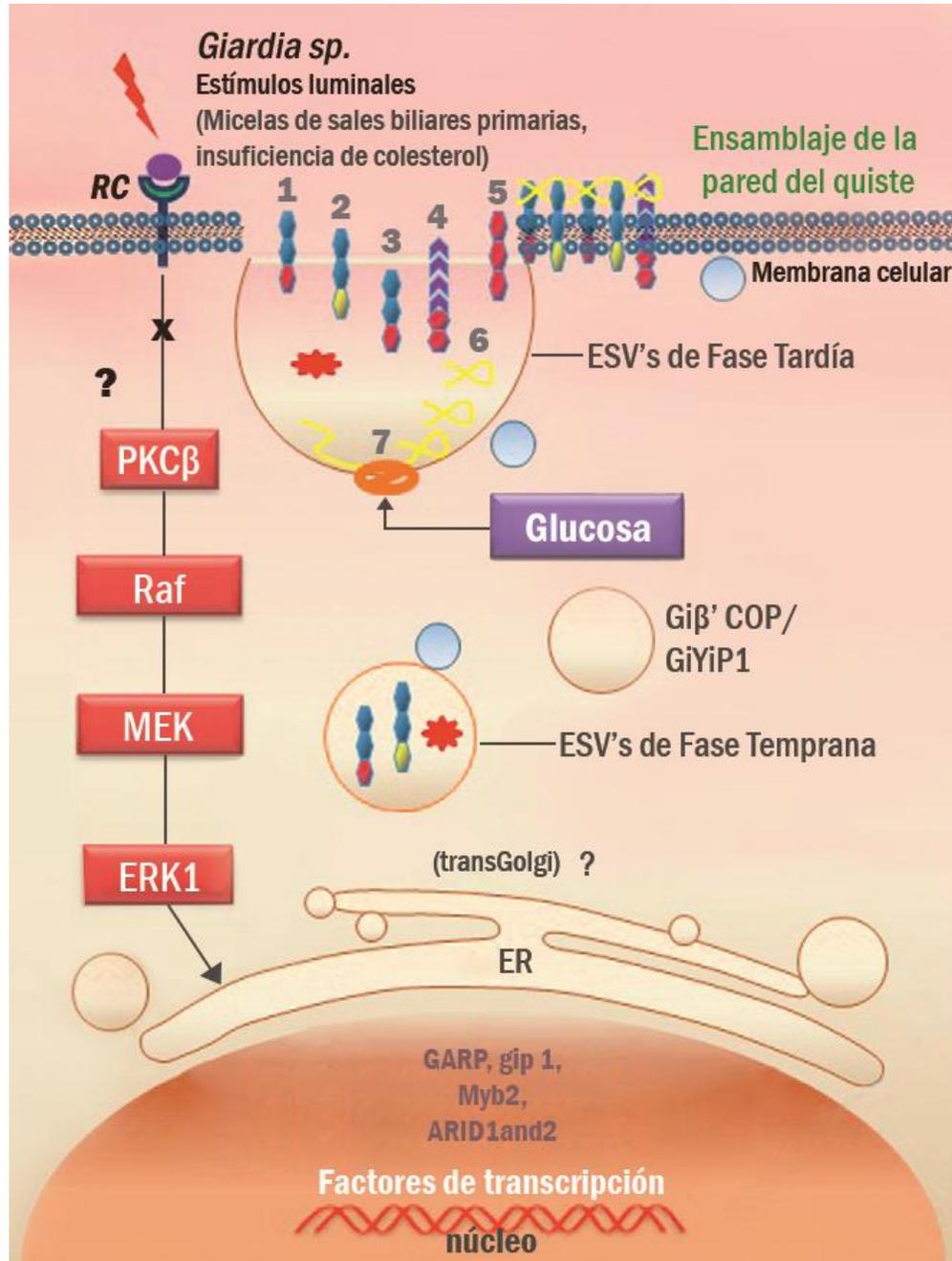


Figura 6. Cambios celulares asociados a la fase temprana de enquistamiento en *Giardia sp.* Los estímulos utilizados para la inducción del enquistamiento *in vitro* se encuentran fuera de la pared celular, a partir de los cuales se detalla la señalización a través del receptor (RC) por insuficiencia de colesterol y la trasnducción de señales para la síntesis de Gal-lectina (Gal). Los factores de transcripción conocidos para la inducción y asociados a la expresión de genes relacionados con el enquistamiento (se muestran el interior del núcleo). Posteriormente la síntesis temprana y tardía de vesículas específicas de enquistamiento (ESV's) en un nuevo sistema de secreción incluyendo moléculas del retículo endoplásmico (RE) y el Aparato de Golgi. Por último se muestra la incorporación de la ESV a la membrana celular y deposición del contenido a la superficie que formara la pared de quiste. ?) Vía desconocida en espera de demostración experimental. 1, 2 y 3: CWP 1, 2 y 3 respectivamente. 4: Proteína HCNC; 5: Proteína EFGC 1; 6: Fibras de N-Acetil Galactosamina; 7: β- 1, 3 GalNac- transferasa. (Modificado de Aguilar-Diaz *et al.*, 2011).

Fase III: Ensamblaje de la pared celular del quiste

Uno de los mecanismos propuestos implicados en la formación de la pared quística de *Giardia*, esta determinado para la acción de transporte de las Vesículas Específicas de Enquistamiento (ESV), que provoca la secreción de las CWP's a la periferia de la célula ([Reiner et al., 2001](#); [Luján et al., 1997](#)). Fig 8. En [2002 Argúello-García](#) y Col. Por medio de Microscopia Electrónica de Barrido y Trasmisión (SEM; TEM) y tinción Rojo de Rutenio (RR), analizaron el montaje de la pared del quiste, demostraron la progresiva aparición de parches fibrilares en las superficies ventrales y dorsales, de esta manera se ha propuesto que mientras los polipéptidos (CWP's) son transportados por las (ESV's) y depositados en la superficie del trofozoíto, los precursores de (β 1,3-GalNac) son integrados a la pared del quiste para copolimerizarse y formar la malla fibrilar. La bicapa lipídica de la pared del quiste y el espacio peritrópico se originan del crecimiento, elongación y fusión de grandes vacuolas citoplásmicas ([Chávez-Munguía et al., 2007](#)). **Figura 8**

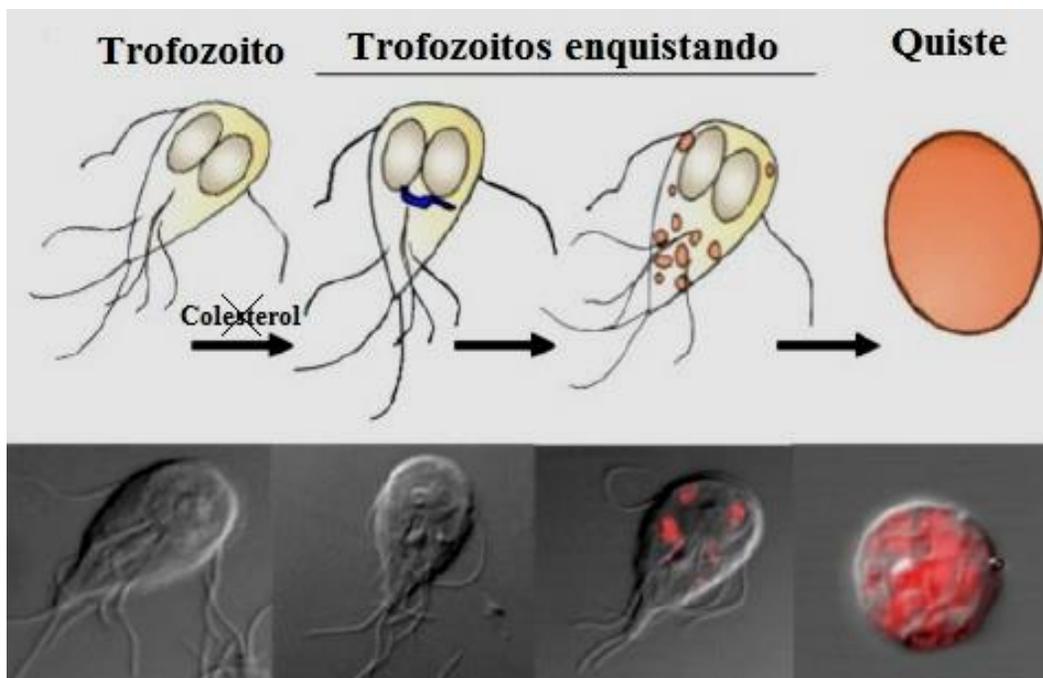


Figura 7. Diferenciación de trofozoítos de *Giardia* en quistes. Panel superior e inferior, representación esquemática y micrografías respectivamente, representando el proceso de enquistamiento. *Giardia* inicia la diferencia después de un período de cultivo en medio libre de enquistamiento llamado: Pre-enquistamiento, son privados de colesterol con un cambio de altas concentraciones de bilis. El cambio morfológico temprano de los trofozoítos en enquistamiento se determina por la aparición de grande gránulos de vesícula secretoras-específicas de enquistamiento, que transportan materiales a la pared del quiste (en naranja) para su montaje extracelular de la pared que es rígida y protege al parásito. (Modificada de [Gottig et al., 2006](#))

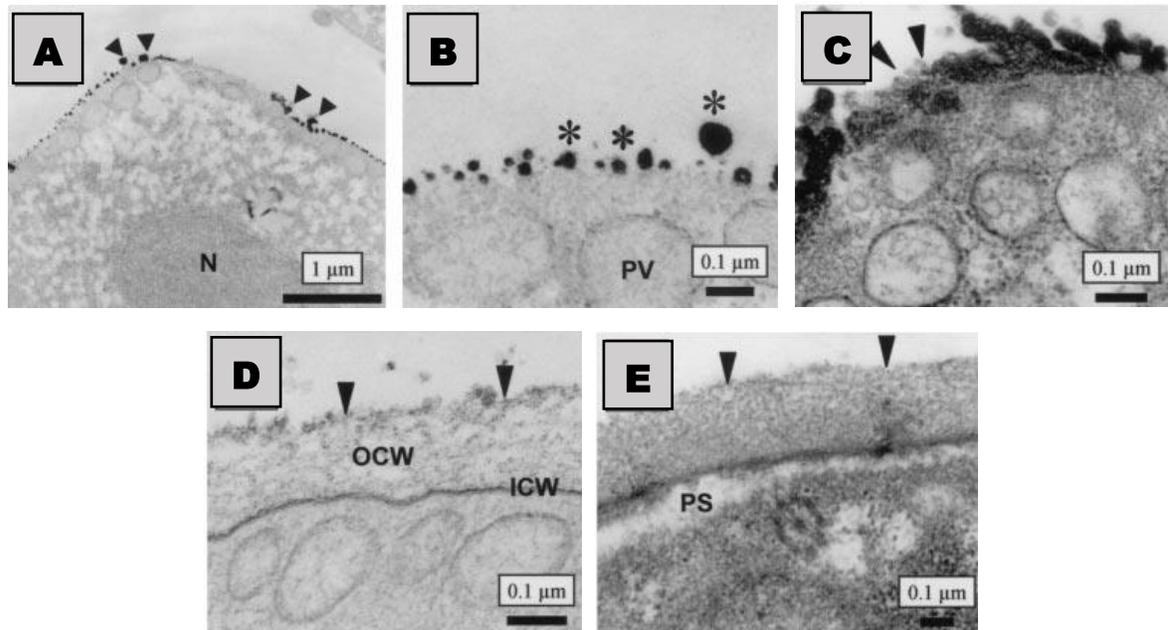


Figura 8. Ensamblaje de la Pared del Quiste de *Giardia intestinalis* mediante tinción de Rojo de Rutenio (RR). (A) Estructuras fibrilares (puntos) de diámetro variable, seccionado transversalmente y teñido con RR, detectados en la superficie dorsal de un trofozoíto (cabezas de flecha). (b) Puntos en capas establecidos en la superficie celular, algunos se observan fusionados (*). (C) Célula en enquistamiento con polimerización de la pared en una etapa tardía. Abundante solapamiento y superposición de puntos RR que se pierden progresivamente (cabezas de flecha). (D) Sección transversal de una pared del quiste que muestra la capa externa en fibrilación (OCW, cabezas de flecha) que se ensambla sobre la capa membranosa interna (ICW) y ya no se encuentra teñido por RR. (E) Se completa el ensamblaje de la pared, se forma el espacio peritropico (PS) y no se observa tinción RR. El tiempo de muestreo fue el siguiente: 15h en A y B, de 18h en C, 21 h en D y 24 h en E. N, Núcleo; PV, vacuola periférica. (Tomada y modificada de Argüello-García *et al.*, 2002)

1.6.2 Desenquistamiento

Durante la infección natural, después de la ingesta de quistes de *G. intestinalis* que pasan al estómago del hospedero, donde son expuestos a ácidos gástricos que activa el proceso de desenquistamiento, sin embargo en este ambiente no puede llevarse a cabo la apertura del quiste. Posteriormente, los quistes entran en el duodeno, en el que el quimo gástrico se neutraliza rápidamente por la afluencia de bicarbonato. El desenquistamiento es estimulado por el medio bicarbonato-fosfato acompañado por acidificación de las vacuolas periféricas y la liberación de su contenido en el espacio peritrofico. ([Boucher y Gillin, 1990](#); [Bingham y Meyer, 1979](#); [Feely *et al.*, 1991](#)).

El proceso inicia por la apertura de la pared del quiste en un polo, el citoplasma retraído de la pared y el espacio peritrofico se hacen cada vez más grande. El exterior citoplasmático es desprendido de la pared del quiste y numerosas vesículas pequeñas puede quedarse entre la pared y el organismo, mientras

disposición de las microfibrillas se va perdiendo ([Benchimol y De Souza, 2011](#)). Distintos autores han sugerido vías de señalización esenciales para el desenquistamiento, en su conjunto consideran que el desenquistamiento está regulado por PP2A (Protein Phosphatase 2) y PKA (Protein Kinase A), mientras que Ca²⁺ / calmodulina ayuda con el control de salida y la reanudación de la motilidad de los trofozoítos. ([Abel et al., 2001](#); [Lauwaet et al., 2007](#)).

1.7 Mecanismos de Transmisión

En países desarrollados, se considera que la giardiasis está relacionada por beber agua y consumir alimentos contaminados con quistes de *G. intestinalis*, además de la exposición en centro acuáticos de recreación y las infecciones en viajeros que visitaron países en vías de desarrollo, estas son las principales vías de infección. Sin embargo en países en subdesarrollo, los factores socioeconómicos juegan un papel muy importante en las infecciones por *G. intestinalis* ([Prado et al., 2003](#)). Del mismo modo las condiciones de salud, la educación y las costumbres relacionadas con las prácticas de la higiene, así como la presencia de animales domésticos en los hogares, la contaminación de agua y alimentos, han sido reportados como factores asociados a la presencia de esta parasitosis ([Thomson, 2008](#)).

La giardiasis se puede contraer por tres mecanismos: a través del agua, al consumo de alimentos contaminados con quistes, fómites y por medio de la transmisión fecal-oral directa. Se ha comprobado que solo es necesario la ingesta de 10 a 100 quistes para contraer infección por *G. intestinalis*, ([Rendtorff, 1954](#); [Ortega et al., 1997](#)).

La transmisión mediante alimentos se ha reportado en restaurantes, hospitales psiquiátricos, casas de reposo e iglesias. Éstos se han producido por la ingestión de alimentos crudos como ensaladas, pescado y carnes frías. La transmisión por vía fecal oral directa se puede presentar en instituciones que atienden pacientes psiquiátricos, pacientes con deficiencia mental y orfanatorios. Este tipo de transmisión también se presenta en parejas homosexuales o heterosexuales que practican contacto sexual oro-anal. Otro proceso involucrado en la transmisión es el consumo de alimentos mal lavados que han sido regados con aguas negras. La contaminación del agua potable por drenajes defectuosos o por fecalismo es también un mecanismo de gran importancia en la dinámica de transmisión. ([Vázquez-Tsuji et al., 2009](#); [Núñez-Fernández et al., 2003](#); [Escobedo, et al., 2010](#)).

1.7.1 Mecanismos patogénicos

Cuando los trofozoítos interactúan con los enterocitos activan los mecanismos patogénicos que involucran: (a) adhesión del parásito a las microvellosidades de la superficie de las células epiteliales, (b) interacción con factores microambientales que favorecen al parásito los requerimientos metabólicos para el crecimiento y la diferenciación, desequilibrando los niveles celulares y sistémicos del hospedero, y (c) la producción y secreción de moléculas que interactúan con las células epitelial del hospedero y activan la respuesta inmune tanto la innata como la específica. Los efectos combinados de estos tres niveles de interacción contribuyen de manera importante en la variabilidad del resultado de la enfermedad (sintomática, asintomática, aguda, crónica, etc.) ([Ortega-Pierres, et al., 2011](#)).

En [2011, Bénéré E.](#) y colaboradores encontraron en un estudio con gerbos infectados con los ensamblajes A subtipo A_I y B de *G. intestinalis*, los cuales presentaron mayor infección durante más tiempo, provocando relativamente mayor patogenicidad, caracterizado por una mayor inflamación intestinal, un mayor daño en la composición y función de la mucosa intestinal, lo que sugiere la asociación entre genotipos y virulencia.

Traumático

La adherencia de trofozoítos de *G. intestinalis* en los enterocitos es esencial y crucial en la patogénesis de la giardiasis, se considera la interacción más cercana, ya que implica el contacto físico entre las superficies celulares de trofozoítos y los enterocitos, esta estrecha unión provoca daño y pérdida de las células epitelial del hospedero ([Farthing et al., 1997](#); [Scott, et al., 2000](#)).

Los trofozoítos de *Giardia* se adhieren fuertemente a la superficie epitelial del intestino delgado a través del disco adhesivo ventral. Moléculas de la superficie del parásito se dedican a forzar esta interacción, como son las giardinas (alfa, beta, delta y gamma giardinas), así como una compleja red de proteínas contráctiles que desempeñan un papel importante en la unión de los trophozoítos ([Cotton, et al., 2011](#))

Barrera Mecánica

Después de adherirse e invadir el epitelio intestinal, los trofozoítos se multiplican rápidamente provocando eventualmente una barrera física entre los enterocitos y el lumen intestinal, interfiriendo además con la absorción de nutrientes. El proceso conduce a daños en los enterocitos, atrofiando las vellosidades y provocando hiperplasia de las criptas, la hiper-permeabilidad intestinal causa reducción en la secreción de enzimas disacaridas, provocando mala absorción ([Faubert, 2000](#); [Bured et al., 1992](#)).

Enzimático

El daño en la superficie de la mucosa epitelial, atrofia y afecta a la actividad de las enzimas digestivas tales como lipasas, proteasas y disacaridasas. La activación secuencial de las proteasas específicas (caspasas) es un componente regulador importante en la muerte apoptótica. La apoptosis de los enterocitos es dependiente de cepas de *Giardia* provocando pérdida de función en la barrera epitelial. Enzimas como sulfatasas, fosfatasas ácidas, hidrolasas y tiolproteinasas benefician la adhesión del parásito atrofiando la conformación de microvellosidades epiteliales. ([Cotton et al. 2011](#); [Scott et al., 2000](#); [Farthing et al., 1997](#)).

Competencia

La giardiasis está asociada con el decremento en la absorción de glucosa, electrolitos, micronutrientes, agua y reducción de actividad de los disacáridos, a través de una pérdida de superficie de área de absorción, debido a la colonización de trofozoítos de *G. intestinalis* en el epitelio intestinal. Diversos factores han sido reportados que contribuyen la mala absorción en el hospedero, estos incluyen un crecimiento en la población bacteriana, alteración de la secreción de enzimas pancreáticas y sales biliares y aumento de la motilidad intestinal ([Scott et al., 2002](#); [Astiazarán-García, et al. 2015](#)).

Tóxico

Se han descrito vacuolas lisosomales en la región ventral del trofozoíto, que no están totalmente definidas o caracterizadas, sin embargo contienen enzimas hidrolíticas que podrían ser consideradas como toxinas ([Olson et al., 2000](#)). Tras la clonación y secuenciación del gen de una proteína variable de superficie (CRP136) seleccionada de una cepa resistente a metronidazol, se identificó que comparte homología del 57% con un grupo de sarafotoxinas presentes en el veneno de serpientes, que provocan síntomas intestinales observados también en infecciones por *Giardia* ([Eckmann et al., 2001](#); [Chen and Upcroft, 1995](#)).

1.7.2 Mecanismos de defensa

La respuesta inmune del hospedero de *Giardia*, está determinada por el tipo de virulencia de la cepa, el estado de desarrollo nutricional, inmunológico y la naturaleza de la microfauna intestinal. El parásito al no invadir los tejidos en su hospedero provoca una respuesta inmune localizada, provocando la serie de eventos ya mencionados, induciendo anormalidades epiteliales y activando componentes del sistema inmune innato y adaptativo, principalmente las IgA y mastocitos ([Singer M., 2011](#); [Feng et al., 2011](#); [Béneré et al., 2011](#)).

Giardia cuenta con una variación antigénica que le permite evadir la respuesta inmune de su hospedero, en este sentido los trofozoítos cuenta con proteínas de superficie denominada proteínas variables de superficie (VSPs), que se expresan en la superficie del trofozoíto, debido a que dentro de su genoma tiene alrededor de 150 a 200 genes que codifican cada momento una proteína de conformación diferente y eludiendo así la protección de su hospedero ([Nash T., 1997](#); [Faubert, 2000](#); [Prucca., et al, 2008](#)) .

Se ha reportado que el Óxido Nítrico (NO) afecta a los trofozoítos, sin embargo *Giardia* ha desarrollado una estrategia a base de metabolizar arginina y privando a los enterocitos de la producción de NO ([Eckmann, et al., 2000](#)).

1.8 Manifestaciones clínicas

La Giardiasis se manifiesta en tres formas clínicas: asintomática, sintomática aguda y sintomática crónica. Tras la infección por *Giardia* los síntomas aparecen de 6 a 15 días después ([Roxtröm-Lindquist, et al., 2006](#))

Los pacientes asintomáticos no presentan manifestaciones clínicas comunes de la giardiasis, en ocasiones suelen tener un período de diarrea que pasa desapercibido el cual no puede ser atribuible a la enfermedad, en algunos casos se plantea que en infecciones previas se puede generar algún tipo de inmunidad a los procesos que provocan los síntomas. Sin embargo hospederos asintomáticos pueden liberar quistes viables y actuar como un medio de transmisión de la enfermedad ([Farthing 1997](#); [Hanevik et al., 2007](#); [Nash 1987](#)). En una infección sintomática aguda es la manifestación clínica menos frecuente, y está asociada a todas las áreas geográficas y presente en personas de todas las edades, es característica de personas que viajan a lugares endémicos de la enfermedad. Los síntomas son una combinación entre diarreas, flatulencia, dolor y distensión abdominales, náuseas, vómitos, anorexia y fatiga ([Farthing, 1997](#); [Lebwohl, 2003](#)).

Los síntomas comunes de una infección sintomática crónica incluyen diarrea, flatulencia, fatiga excesiva, náuseas, heces malolientes, calambres e inflamación abdominal, anorexia y pérdida de peso, en población infantil se amplían los síntomas presentando adinamia, pérdida de peso, talla baja, déficit cognitivo y malabsorción de la vitamina A, B12, proteínas, D-xilosa, y el hierro ([Hill 1993](#); [Ponce-Macoleta et al., 2014](#); [Takahashi et al., 2001](#)).

1.9 Diagnóstico

En la actualidad se manejan distintos métodos de detección para el diagnóstico de la giardiasis, siendo la técnica de diagnóstico morfológico por microscopia la más empleada. Con los avances en la biomedicina se han desarrollado estudios no morfológicos, como son los inmunológicos para la detección de coproantígenos y secuenciación del DNA por medio de PCR.

Análisis Coproparasitoscópico (CPS): En la examinación de heces fecales ante la sospecha de infección podemos detectar la presencia de trofozoítos, quistes o ambos, se realiza por medio de métodos directos, flotación y sedimentación. Se recomienda realizar un estudio de dos muestras sucesivas para proporcionar un 86% de sensibilidad, y de tres muestras para un 97.6%. Las limitaciones en este diagnóstico es la discontinuidad en la eliminación quística, ya que puede ser intensa, baja o mixta y podría provocar un resultado erróneo al no encontrarse presencia del parásito. ([Robertson, et al., 2009](#); [Ponce-Macoleta et al., 2014](#); [Smith et al., 2011](#)).

Análisis Inmunológicos: El ensayo inmunológico (ELISA) usa anticuerpos que aumenta la sensibilidad de detección en heces de antígenos que se encuentran tanto en trofozoítos y quistes con una masa molecular relativa de 65 kDa (GSA 65), es mucho más confiable que los métodos coproparasitoscópicos, con una sensibilidad del 98% y una especificidad cercana al 100% ([Faubert, 2000](#); [Hill, 1993](#)).

Análisis Moleculares: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RPFL) son las técnicas moleculares utilizadas en la detección de DNA de *Giardia* en heces, utilizando principalmente los genes: ssu-rRNA, β -giardina (bg), glutamato deshidrogenasa (gdh), triosa fosfato isomerasa (tpi) y la región intergénica del gen rRNA (IGS). Cabe destacar que debido a la sensibilidad y rapidez de estas técnicas son de gran interés en el área de epidemiología, como la detección de quistes en el suministro de agua (Smith et al., 2011; Cacciò et al., 2008; Rochelle et al., 1997).

1.10 Tratamiento

Una vez diagnosticada la parasitosis, normalmente se administra un tratamiento a base de los siguientes fármacos: 5-Nitroimidazol (Metronidazol, Tinidazol, Ornidazol, y Secnidazol); Quinacinas; Furazolidonas; Paromocinas; Benzimidazoles (Albendazol, Mebendazol); Nitazoxamida. Las dosis esta determinadas e indicadas para niños y para adultos según el caso. (**Cuadro 2**). A pesar de ser fármacos de referencia hay diversos reportes acerca de la resistencia de cepas de *Giardia* al tratamiento, además de los efectos secundarios que se presentan en los pacientes. ([Upcrof and Upcroft, 2001](#)).

Tabla 2: Tratamiento contra *Giardia intestinalis*.

Fármaco	Mecanismo de Acción	Dosis	Efectos secundarios
5-Nitroimidazoles			
(Metronidazol	Activación reductiva del grupo nitro en el metabolismo energético del parásito.	Adultos: 250 mg/kg /3 x día/ 5-7 días.	Sabor metálico, dolor de cabeza, prurito, desordenes gastrointestinales, vértigo, insomnio, irritabilidad, neuropatía, convulsiones, orina rojiza-café, elevación transitoria de trasminasas y leucopatia.
Tinidazol			
Ornidazol	Síntesis de radicales tóxicos e inhibición de la respiración de los trofozoítos.	Niños: 20 mg/kg/3 x día/ 7 días.	Estudio en ratas reporta el metronidazol como mutagénico.
Secnidazol)			
Quinacrina	Posible inhibición de los mecanismos de la síntesis de ácidos nucleicos, y la interferencia con los componentes de flavina en NADH oxidasa.	Adultos: 100 mg/kg /3 x día/ 5 - 7 días. Niños: 2 mg/kg /3x día/ 7 días	Vómito, sabor amargo, nauseas, coloración amarillenta en piel y orina, urticaria, dermatitis exfoliativa, exacerbación de la psoriasis, hemolisis en la deficiencia de G6PH y psicosis.
Furazolidona	Posibles mecanismos en la activación reductiva a través de una NADH oxidasa. Daño del ADN del parásito por los productos tóxicos reducidos.	Adultos: 100 mg/kg/4 x día/ 7 a 10 días Niños: 2 mg/kg/4 x día/ 10 días.	Anemia hemolítica (no administrable a lactantes y embarazadas), nausea, vómito, diarrea, orina color marrón
Paramomicina	Inhibición de la síntesis de proteínas.	Adultos: (Embarazadas): 500 mg/kg/3 x día/5 a 10 días. Niños: 30 mg/kg/3 x día/ 10 días.	Algunas molestias gastrointestinales.

Benzimidazoles	Inhibición de la polimeración del citoesqueleto que perjudica la captación de glucosa mediante la unión a β -tubulina del citoesqueleto del parásito.	Adulto: 200-400 mg/kg/1-3 x día/ 1 a 5 días. Niños: 10-500 mg/kg/1-3 x día/ 3 a 7 días.	Nauseas, vómito, diarrea, dolor epigástrico.
Albendazol			
Mebendazol			
Nitazoxanida	Inhibición de una nitroreductasa llamada GNR-I. Activación reductora del grupo nitro.	Adulto: 500 g/kg/2 x día/3 días. Niños: 7.5 mg/kg/2 x día/ 3 días.	Dolor abdominal, diarrea, vómito, dolor de cabeza, orina color amarillo.

(Modificado de [Escobedo et al. 2010](#))

1.11 La Medicina Tradicional Mexicana

El uso de las plantas con fines curativos se remonta al principio de la historia de la humanidad. El hombre recurría a la naturaleza en busca de su alimento y cuidado de su salud. Por medio de aciertos y errores aprendió a conocer las plantas que lo curaban; este conocimiento se transmitió de generación en generación y fue incrementando con el tiempo. 3,000 A. C. en China, se escribió el libro más antiguo de plantas medicinales; los Sumerios, 2 500 años A.C usaban las plantas con fines curativos; y en el Suroeste Asiático los Asirios conocían poco más de 250 hierbas medicinales ([Hernández, 1981](#)). México tiene una herencia cultural en el uso de plantas medicinales para tratar diferentes padecimiento, las cuales datan de hace varios siglos antes de la conquista. Se ha identificado hasta 5,000 especies de plantas que tiene aplicaciones curativas, de las cuales son comúnmente utilizadas por más de 60 grupos étnicos en el país ([González-Stuart et al., 2009](#)).

En la literatura médica novohispana de México, escritas a mediados del siglo XVI, destacan estas obras: el *Códice De la Cruz Badiano* originalmente titulado: *Libellus de Medicinallibus Indorum Hebis*, escrito por Martín de la Cruz y traducido al latín por Juan Badiano, el *Codice Florentino* conocido también como *Historia General de las Cosas de la Nueva España* escrito por Fray Bernardino de Sahagún y la *Historia Natural de la Nueva España* de Francisco Hernández. Estas tres obras plasman el conocimiento de la medicina indígena en varios de sus aspectos, las cuales han sido pauta para vislumbrar los orígenes del vasto conocimiento que se tiene del uso de las plantas medicinales, y que aún en la actualidad siguen vigente ([Viesca-Treviño, 1991](#); [Zepeda et al., 2008](#)).

Las plantas de México son utilizadas para diversos fines, de entre los cuales destacan el uso alimenticio, como material de construcción, combustible, para la elaboración de artesanías y el uso medicinal, este último siendo el de uso mayoritario. En general, las familias de plantas con mayor número de especies utilizadas en el ámbito medicinal, son: Leguminosae, Arecaceae, Solenaceae, Euphorbiaceae, Cactaceae y Labiatae. ([Pennington \(1963\)](#), [Barrera et al. 1976](#); [Caballero y Mapes, 2000](#); [Casas et al. 1994](#)). La familia Asteraceae ha producido un numerosos medicamentos para las poblaciones nativas y mestizas de México, y se han realizado numerosos estudios sobre el uso de estas plantas en las diversas regiones de México. Sus principales características en su fitoquímica destaca la presencia de alcaloides de Senecioneae-pirrolizidina. ([Heinrich et al. 1998](#))

1.11.1 Plantas con actividad contra quistes de *Giardia*.

Se estima que la atención primaria de salud de hasta un 80% de la población de los países en desarrollo se basa en la medicina tradicional, por tradición cultural o porque no existen otras opciones. En estos países las personas recurren a diversos tipos de remedios naturales porque consideran que «natural» es sinónimo de inocuo ([OMS, 2002](#)).

Diversos estudios científicos han documentado el uso, efecto y propiedades de plantas con actividad antiparasitaria, como una alternativa al tratamiento con fármacos de referencia, en donde diferentes cepas de protozoarios han desarrollado resistencia al efecto de estos tratamientos, además de los efectos adversos que se presentan en los pacientes ([Upcroft et al., 2001](#)). De las plantas medicinales pertenecen a 26 familias botánicas diferentes, destacan las familias Asteraceae, Lamiaceae y Nyctaginaceae, dentro de éstas 18 especies son las más reportadas por su uso contra parásitos ([Osuna-Torres et al., 2005](#)).

En la actualidad son diversos los estudios que se han reportado sobre plantas con actividad anti*giardiásica* de los cuales en su mayoría están enfocados en la acción sobre la fase infectiva (Trofozoíto), mientras que sobre la fase de resistencia y propagación (quiste) hay pocos trabajos reportados, y aún más escasos los estudios con actividad anticisticidas durante el proceso de diferenciación de *Giardia* (trofozoíto a quiste).

En 2006 se reportó el efecto de zumo de uva y vinagre en quistes, se realizaron con 250 quistes durante 3 horas a 24°C, la eficacia cisticida fue de 28.3, 16.2, 40.6% respectivamente ([Sadjjadi S. H. et al. 2006](#))

Rahimi-Esboei y colaboradores en el 2013 reportan el efecto de los extractos del fruto de *Sambucus ebulus* contra quistes de *G. intestinalis*, a una concentración de 1 mg/ml, la eficiencia después de 60 min de incubación fue de un 39%, a 10mg/ml fué de 41% y a concentraciones mayores de 50 y 100 mg/ml de 64% a 78% ([Rahimi-Esboien et al., 2013](#)).

En 2014 se reporta la actividad de extractos clorofórmicos de *Artemisia annua* para la eliminación *in vitro* de quistes y trofozoítos de *G. intestinalis*, a diferentes concentraciones e intervalos de tiempo de incubación de 5 hasta 180 minutos, los resultados demostraron que *A. annua* tiene efecto en la inhibición de quistes que va de 67% en la concentración y tiempo más bajo (1 mg/ml a 5 min.) y de hasta un 99% en la concentración y tiempo más alto (100 mg/ml a 180 min.) ([Golami et al., 2014](#))

En Iran se realizó un estudio del efecto de extractos de hojas de olivo, *Satureja khuzestanica* y *Allium sativum* sobre quistes obtenidos de muestras de pacientes con giardiasis, los resultados demostraron una mortalidad de 37.90 % en los ensayos con hojas de Olivo y de un 32.52 % con los extractos de *Satureja khuzestanica*, en el caso del ajo se encontró un efecto menor de 22.65 %. Concluyendo que los extractos de hojas de olivo y de *Satureja khuzestanica* son más eficaces en comparación con su grupo control (metronidazol) quien presentó un efecto de 28.72% ([Fallahi et al., 2015](#)).

Recientemente Dyab y colaboradores realizaron un estudio *in vitro/in vivo* valorando el efecto letal en quistes de *Giardia* con extractos diclorometano de *Zingiber officinale* y *Curcuma longa* a diferentes concentraciones, en el estudio *in vitro* se encontró que los extractos en una concentración de 50 mg/mL de *Z. officinale* presentaron mayor efecto con un 97 % en comparación con el efecto de *C. longa* que fue de 85 %. En el estudio *in vivo*, se inocularon ratones con quistes de *Giardia* y se cuantificaron los quistes viables que fueron excretados por los ratones, teniendo una tasa reducción de 91.2% en el caso de *Z. officinale* y de 72.3% de *C. longa*. ([Dyab et al., 2016](#)).

1.12 *Piqueria trinervia* Cav.

1.12.1 Descripción botánica

Esta planta es una hierba perenne, que alcanza hasta los 70 cm de alto, su tallo es ramificado, cilíndrico, verde amarillento y con frecuencia rojizo, a veces con pelillos a lo largo de dos hileras longitudinales. Las hojas son opuestas, lanceoladas o angostamente ovadas, puntiagudas, margen aserrado, peciolo de hasta 3mm de largo. Envés lisa y frecuentemente brillante. Su inflorescencia se compone por pequeñas cabezuelas de hasta 4 mm de largo agrupadas a la misma altura. El fruto es un aquenio (o cypsela) con forma de prisma, de aproximadamente 1.5 mm de largo. Utilizada como planta ornamental, también en medicina tradicional ([Rzedowski y Rzedowski, 2001](#)).



Figura 9. A) Tallos, hojas e inflorescencias de *Piqueria trinervia* Cav; B) Ilustración de Inflorescencias, raíz y tallo completo de *P. trinervia* Cav. (Fotografía de Pedro Tenorio Lezama 2005, Fichas técnicas, CONABIO <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/piqueria-trinervia/fichas/paginal.htm>;

Ilustración Drawing L. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 20 Sep 2016 <http://www.tropicos.org/Image/100254065>.)

Los nombres comunes de *Piqueria trinervia* son: Hierba de San Nicolás, hierba del tabardillo, alta reina, cuapopolchi, hierba del perro, hierba del zopilote, gusanillo. Dentro de los idiomas indígenas de México es conocida con los siguientes nombres Cuimic (lengua tarasca), empueshte (lengua otomí), tzontzoniztale, xexenitzal, xoxonitzal, xoxonitztac, yoloxiltic ([Martínez, 1979](#); [Rzedowski y Rzedowski, 2001](#)).

1.12.2 Clasificación taxonómica

Reino Plantae

Phylum Magnoliophyta

Clase Magnoliopsida

Orden Asterales

Familia Asteraceae

Genero *Piqueria* Cav.

Especie *Piqueria trinervia* Cav.

1.12.3 Distribución geográfica

Se ha colectado desde los estados al norte de país como Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Aguascalientes, Durango, Zacatecas, Nayarit, San Luís Potosí, Jalisco en el centro, Ciudad de México, Michoacán, Querétaro, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Tlaxcala, Morelos, y sur- sureste como Guerrero, Oaxaca, Puebla, , Veracruz y Chiapas, entre 2300 y 3000 m de altitud, principalmente en sitios con matorral y pastizal, aunque se extiende al bosque de pino y encino y ocasionalmente al de oyamel. Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en México, Centroamérica y las Antillas. ([Rzedowski y Rzedowski, 2001](#); [Villaseñor y Espinosa, 1998](#)). **Figura. 10**



Figura 10. Distribución en México de *Piqueria trinervia* Cav. The Global Biodiversity Information Facility: GBIF Backbone Taxonomy, 2013-07 01. Acceso via <http://www.gbif.org/species/3122010> en 2016-04-29 (GBIF, 2016).

1.12.4 Usos en la medicina tradicional

Unos de los primeros registros que se tienen corresponden al siglo XVI en el Códice Florentino con el nombre de “Cuapupoltzi” utilizado para la fiebre. *P. trinervia* Cav. se caracteriza por su uso para diferentes afecciones en los cuales se encuentran los desordenes digestivos como: infecciones intestinales, diarreas, dolor de estómago y empacho. Registros indican su empleo para controlar otros padecimientos como los resfríos, catarro, tifo, calentura, para acelerar el parto, reumas, lavar heridas, sarampión, dolor de oídos, así como “para el espanto” y “mal aire” ([Soto-Núñez 1995](#); [Béjar et al., 2000](#)).

1.12.5 Actividad biológica de extractos y compuestos

Extractos y compuestos de *Piqueria trinervia* Cav. han sido valorados en diferentes estudios en los que se reporta actividad biológica contra bacterias, hongos, parásitos, moluscos, etc (**Tabla 3**).

Los principales compuestos identificados de *P. trinervia* Cav. son: Monoterpenos: dihidro-etoxi-trimetil benzaldehído, acetato de carquejol, piquerol A y B, diacetato; iso-propenil-metil anisol, un derivado del acetato del carquejol, y los derivados acetoxi-e hidroxilados del senecioato del iso-ferulol en la raíz. Sesquiterpeno: alfa-santalol y de la planta completa se aislaron cristina y carmelina así como el trinervinol de hojas con flores. De la hoja se ha obtenido el heterociclo de oxígeno, metil-ripariocromeno. Las hojas contienen un aceite esencial, el alcaloide piquerina de estructura desconocida, una resina y ácido tánico.

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Piqueria%20trinervia&id=7679>, [Romo et al., 1979](#); [Rubluo et al., 1995](#); [Jiménez et al., 1995](#)).

Tabla 3. Antecedentes de estudios con actividad biológica de *Piqueria trinervia* Cav.

Agentes susceptibles	Parte de la planta empleada	Extractos y/o Compuestos (Concentración)	Eficacia	Referencia
Germinación y crecimiento de plantas ruderales.	Hojas	Acuoso Piquerol A (Desde 50 ppm)	Potencial Alelopático Hasta el 50 a 90 % de inhibición de germinación y crecimiento de plántula.	González de la Parra et al., 1981
Ocho especies de moluscos (vectores de <i>Fasciola hepática</i> y <i>Schistosoma mansoni</i>).	Hojas	Piquerol A (5, 25, 50 ppm)	Potencial Molusquicida Mortalidad (60 a 100%) en concentraciones a partir de 5 ppm después de 24 hrs.	Cruz-Reyes et al., 1989
Hembras grávidas y larvas de garrapata <i>Boophilus microplus</i> .	Hojas	Piquerol A y B (300 µg/mL en 3 días.)	Potencial Acaricida Mortalidad significativa de 98 y 100% en hembras grávidas por Piquerol A y B.	González de la Parra et al., 1991.
<i>Tripanosoma cruzi</i> (Epimastigotes)	Hojas	Piquerol A (200 µg/mL)	Potencial inhibitorio de la reproducción de epimastigotes <i>T. cruzi</i>	Castro et al., 1992
<i>Pisum sativum L</i>	Hojas	Piquerol A Diacetyl piquerol (180 µm)	Potencial Alelopático Inhibidores de la fosforilación en cloroplasto de <i>P sativum L</i> .	Mendoza et al., 1994
Hongos	Cultivo Celular	Piquerol, sustancias no identificadas.	Potencial antifúngico Modelo para estudio del metabolismo de monoterpenos	Saad et al., 2000
Bacterias Gram (-)	Raíz, hoja, tallo, inflorescencia	Hexánico (2 mg x sensidisco)	Potencial antibacteriano Todas las partes utilizadas presentaron actividad, destacando el extracto de tallo.	Goldhaber-Pasillas et al., 2004
Once Cepas Bacterianas	Raíz	Hexánico Etil-acetato (2 mg x disco)	Potencial antimicrobiano Extracto hexánico de raíz presentó mayor actividad en las cepas empleadas.	Ruiz de Esparza et al., 2007

Agentes susceptibles	Parte de la planta empleada	Extractos y/o Compuestos (Concentración)	Eficacia	Referencia
Cepas Bacterianas. Cepas Fúngicas <i>Taenia crassiceps</i> (Ciscercos)	Tallo Hojas	Diclorometánico Piquerol Trinervinol Aceite Rojo (4.0 y 8.0 mg/mL)	Potencias antibacteriano Diclorometámico (Actividad en todas las cepas) Potencias Fungicida Diclorometánico (Inhibición 100%)	Sansón-Romero 2012
<i>Giardia intestinalis</i> (trofozoitos) <i>Trichomonas vaginalis</i>	Tallos Hojas	F1 y F2 (200 ppm) Etanólico 400 µg/mL Piquerol Trinervinol (6.2 µg/mL) Aceite Rojo y F1 (100 µg/mL) F2 (25 µg/mL)	Potencial cisticida F2 (100%) Potencial Antiparasitario Mejor actividad antrigiardiasica F2 Mortalidad de <i>G. intestinalis</i> (87. 4 ± 4.5 %) Se reportó poco efecto tricomonocida	Jiménez-Fragoso 2014

2.0 JUSTIFICACIÓN

La giardiasis es una enfermedad cosmopolita, donde los niños son los más propensos a este padecimiento. Los fármacos utilizados en el tratamiento, tiene diversos efectos secundarios en los pacientes que van de leves a graves. Además que se ha reportado resistencia a los fármacos prescritos en el tratamiento de infecciones para algunas cepas de *G. intestinalis*. Por lo anterior es indispensable buscar nuevas alternativas para el tratamiento de la giardiasis. Siendo además, que en la actualidad existen escasos trabajos que valoren actividad de extractos en quistes y mucho menos en el proceso de enquistamiento, esto ayudaría a evitar la dispersión y propagación de la fase infectiva del parásito.

3.0 OBJETIVOS

- Valorar actividad *in vitro* de extractos metanólicos, etanólicos y acuoso de *Piqueria trinervia* durante el proceso de formación de quiste *in vitro* de *Giardia intestinalis*.

Objetivos secundarios.

- Establecer las condiciones de enquistamiento *in vitro* de aislados de *Giardia intestinalis*.
- Obtener imágenes que evidencien el daño de los extractos de *Piqueria trinervia* por medio de microscopía de Microscopia de Interferencia Diferencial (DIC Nomarsky).

4.0 HIPÓTESIS

Los extractos de *Piqueria trinervia* inhibirán el proceso de formación de quistes de *Giardia intestinalis* de una manera dosis-dependiente.

5.0 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Obtención de extractos naturales

Los experimentales se realizaron con extractos Acuoso, Etanólico y Metanólico de la planta *Piquería trinervia*, obtenidos por la Biol. Candy Naftaly Jiménez Fragoso.

Brevemente se realizó lo siguiente: “La planta se colectó en el Cerro del Ajusco, Delegación Tlalpan en Noviembre del 2010. El material se secó a temperatura ambiente, tallos y hojas se fragmentaron y se obtuvo un total de 700 g, para cada uno de los tres extracto se utilizó 233 g.

Para cada extrato (acuoso, etanólico y metanólico) se utilizó 100 mL de solvente por cada 15.5 g de muestra macerada (peso seco) durante 24 hrs. Los extractos se filtraron y se evaporaron, el extracto acuoso se secó a temperatura ambiente, el etanólico y metanólico por rotavapor. Se almacenaron en frascos ambar hasta su uso” ([Jimenez-Fragoso, 2014](#)).

5.2 Aislado de *Giardia intestinalis*

Para establecer las condiciones de enquistamiento, inicialmente se utilizaron los aislados de *G. intestinalis* HGINV (INP220806-HGINV) y WB (ATTC309557) que crecieron en medio TYI-S-33 (Diamond, 1978; Modificado por Keister, 1983), solo se utilizó trofozoítos adheridos a las paredes de los tubos de cultivo en fase exponencial de crecimiento (monocapa).

5.3 Experimentos *in vitro*

5.3.1 Ensayos de Enquistamiento

Inicialmente aplicamos el protocolo de enquistamiento tradicional que se sigue en el Laboratorio de Parasitología Experimental, se utilizaron tubos de borosilicato de 4 ml con diferentes poblaciones iniciales: 2, 4 y 8 millones de trofozoítos de *G. intestinalis* en un medio de enquistamiento con un pH de 7.8, suplementado con Suero Fetal Bovino 10% (v/v) y 10 mg/ml de bilis bovina en un tiempo de incubación de 24 hrs.

Para establecer las concentraciones de bilis bovina que se utilizaron en los experimentos de valoración *in vitro* de los extractos, se valoraron concentraciones 5, 7 y 10 mg/mL, en medio TYI-S-33 pH 7.8 y suplementado con el Suero Fetal Bovino al 10% a y las poblaciones 1 y 2 millones de trofozoitos; se incubaron por 24 hrs. a 37 °C, posteriormente se enfriaron y se centrifugaron a

3500/ 5 min, el botón del tubo se recuperó en tubos eppendorf, se llevó a un volumen final de un 1 ml de agua estéril a 4°C, se realizaron dos lavados y finalmente permanecieron 24 hrs. a 4°C para eliminar restos de trofozoítos, posteriormente se realizaron tres lavados más con agua estéril, y se conservó en un volumen de 500 µl, se cuantificaron en cámara de Neubauer solo los quistes refringentes y ovalados. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Finalmente se optó por implementar un medio de pre-enquistamiento que consistió en sustituir el medio de crecimiento TYI-S-33 de un tubo en donde los trofozoítos se encontraban en monocapa, por medio de crecimiento TYI-S-33 en ausencia de bilis por un periodo de incubación de 24 hrs., para posteriormente inducir el enquistamiento.

5.3.2 Ensayos de enquistamiento para la valoración de extractos de *Piqueria trinervia* Cav

Los ensayos de valoración de extractos, se realizaron a partir de tubos que se encontraban en fase de crecimiento exponencial (monocapa), se cambió el medio de crecimiento normal (TYI-S-33) por medio de pre-enquistamiento (TYI-S-33 sin bilis) durante 24 horas, posteriormente los tubos se enfriaron 15 min, se centrifugaron durante 5 min a 3500 rpm, se cuantificaron en cámara de Neubauer, los ensayos se realizaron con 500 000 trofozoítos/ml en medio de enquistamiento (TYI-S-33, pH 7.8 con 5 mg/mL de bilis bovina), más las diferentes concentraciones para cada uno de los extractos (25, 50, 100, 200, 400 µg/ml), se incubaron durante 24 horas a 37°C. Como controles se utilizaron: medio de enquistamiento sin extracto, DMSO al 0.4%, metronidazol 2.5 µg/mL, transcurrido el tiempo se enfriaron, se centrifugaron a 3500 rpm/ 5 min, se decantaron y se realizaron dos lavados con agua estéril para la eliminación del resto de los trofozoítos, finalmente los quistes se cuantificaron en una cámara de Neubauer, tomando como criterio de viabilidad: forma del quiste ovalado y la refringencia. Finalmente los quistes se mantuvieron en refrigeración para su maduración

5.4 Microscopia de Interferencia Diferencial de Contraste (DIC Nomarsky)

De los quistes obtenidos y que se mantuvieron a 4 °C, se tomó una alícuota por extracto (acuoso, etanólico y metanólico) en la concentración de 400 µg/ml y fueron analizados por microscopia (DIC Nomarsky), para identificar su maduración y el posible daño en quistes por *P. trinervia*. Por cada extracto se tomo una muestra en un portaobjetos y fijado con barniz para su observación bajo el microscopio confocal (FluoView™ FV1000: OLYMPUS).

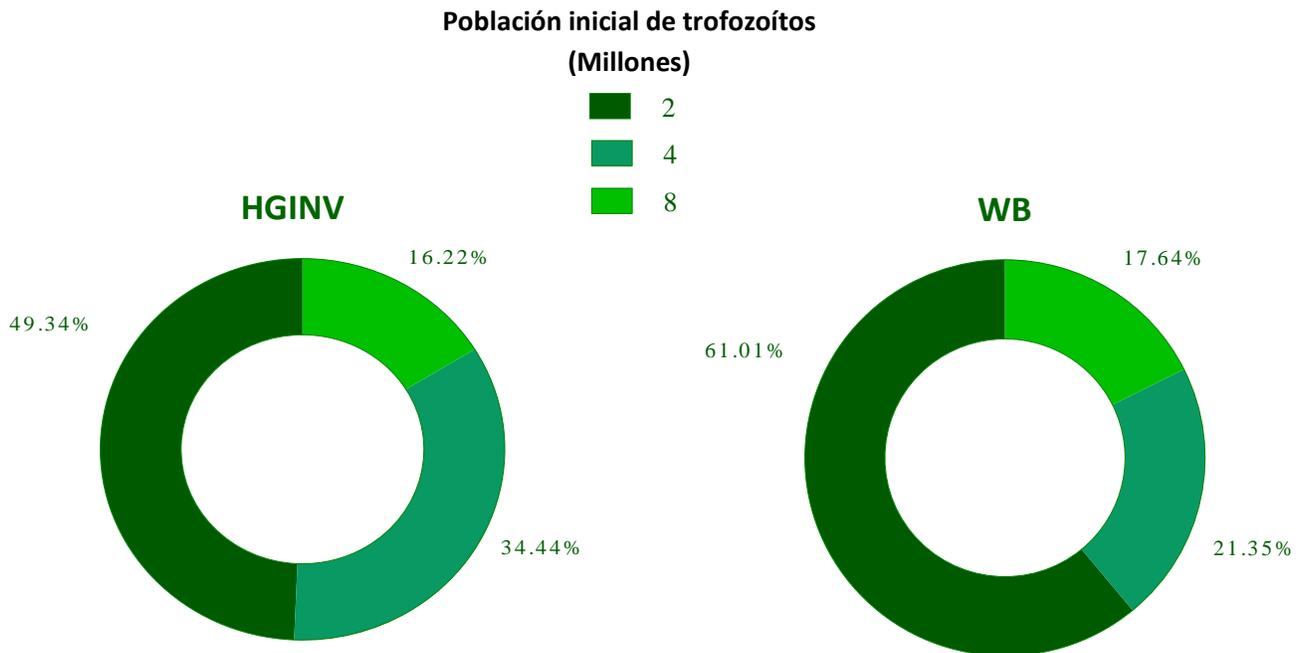
5.5 Análisis Estadístico

Para determinar el efecto de los extractos metanólico, etanólico y acuosos de *P. trinervia* durante el enquistamiento de *G. intestinalis* se realizó un (ANOVA de una vía) entre las medias de la inhibición de enquistamiento en comparación con los grupos control de los ensayos. Se realizó una prueba de Dunnett para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los controles y tratamientos. En análisis se realizó con GraphPad Prims Version 6.01. los datos se consideran estadísticamente significativos a partir de $P = 0.05$.

6.0 RESULTADOS

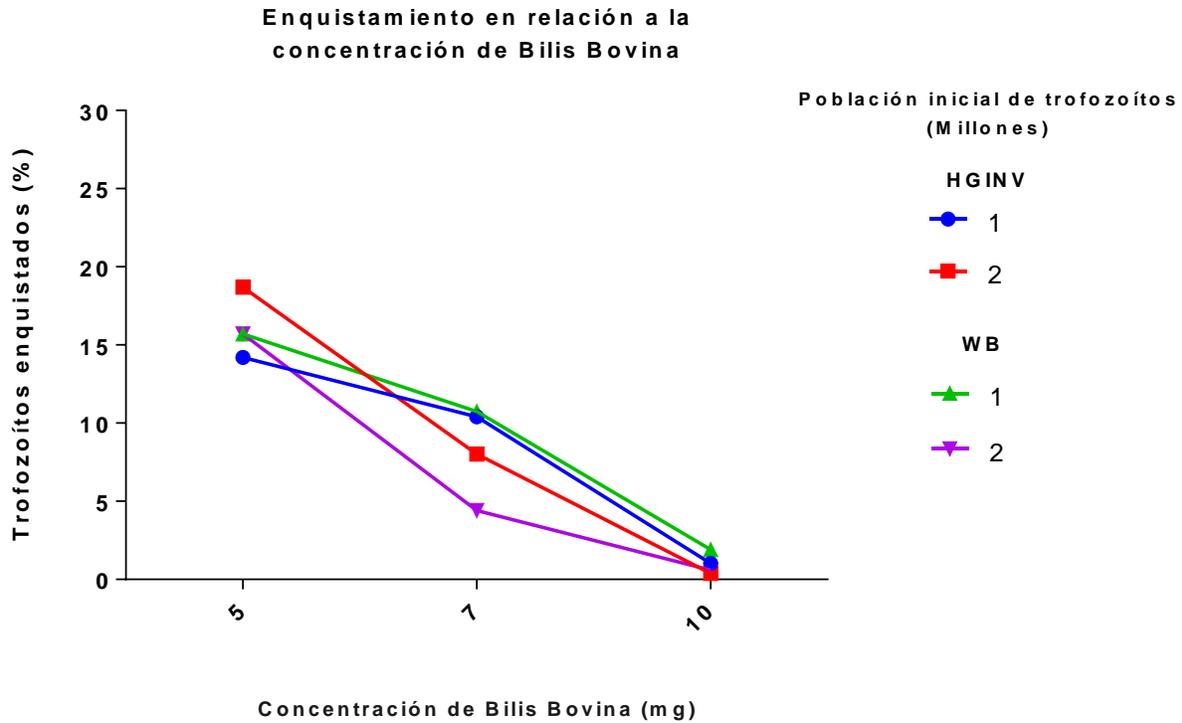
6.1 Ensayos de enquistamiento

En los primeros ensayos de rendimiento de enquistamiento se observó la relación con la cantidad inicial de trofozoítos, se encontró un mayor porcentaje de enquistamiento en los experimentales con una población inicial de 2 millones, como se muestra en la **Gráfica 1**, el aislado HGINV y WB presentaron un porcentaje de enquistamiento de 49.34 % y 61.01% respectivamente.



Gráfica 1. Porcentaje de enquistamiento de *G. intestinalis*, aislado HGINV y WB con diferentes poblaciones iniciales de trofozoítos. Condiciones de enquistamiento: pH 7.8, Suero Fetal Bovino, 10 mg/ml de Bilis Bovina, a 24 hrs en tubos de borosilicaro de 4ml, cálculo de tres serie de experimentales de manera independiente. n = 3.

La exposición a diferentes concentraciones de bilis, mostró que el aislado HGINV con una población inicial de 2 millones de trofozoítos y una concentración de bilis bovina de 5 mg/ml el mejor rendimiento (18.75%), el rendimiento de enquistamiento se obtuvo considerando como 100 % los trofozoítos iniciales de cada experimento (1 y 2 millones) de cada aislado (HGINV y WB) **Gráfica 2.**

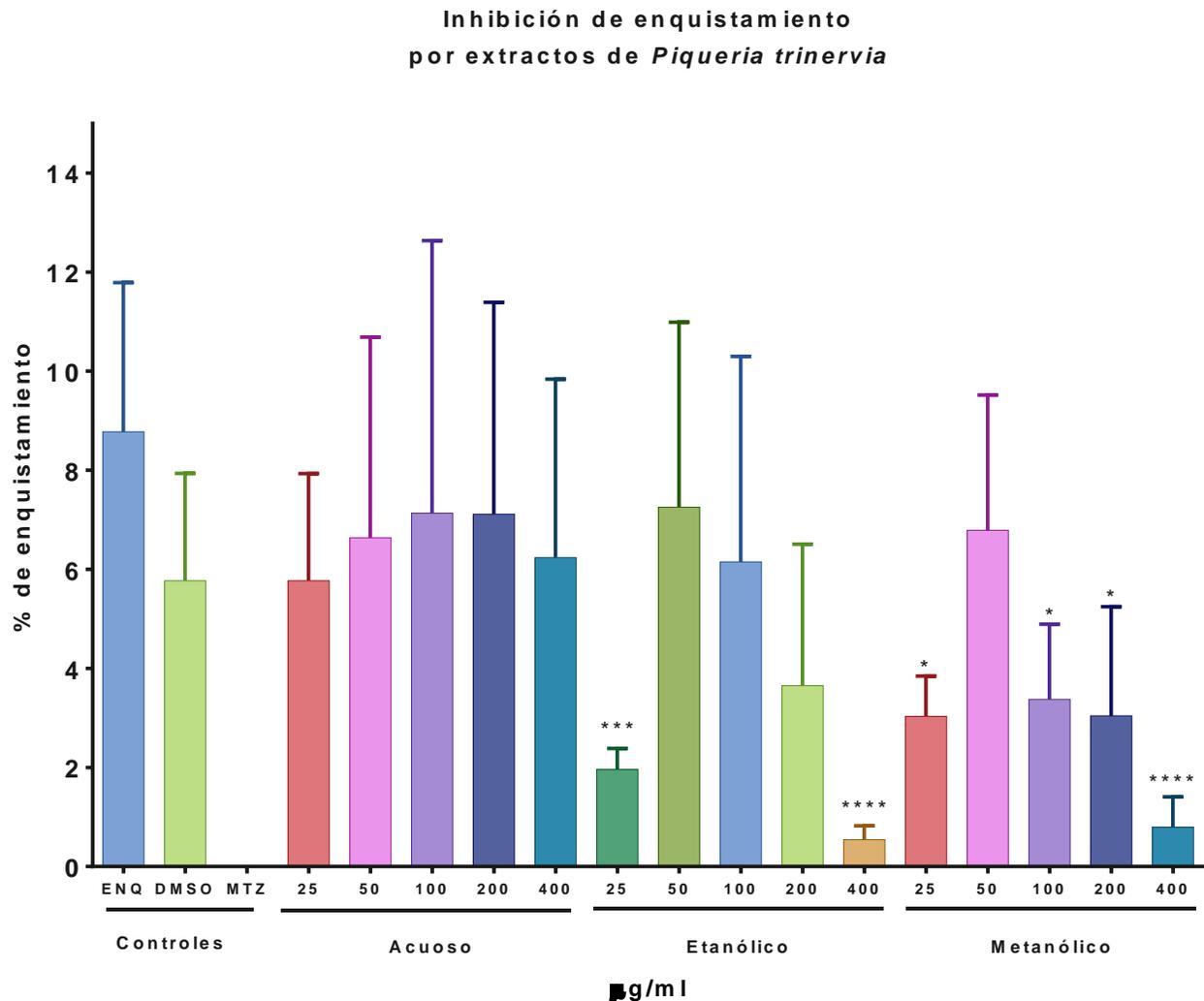


Gráfica 2. Porcentaje de enquistamiento de *G. intestinalis* aislados HGINV y WB, poblaciones iniciales de 1 millón y 2 millones de trofozoítos en diferentes concentraciones de Bilis Bovina: 5, 7 y 10 mg/mL, suplementado con 10% Suero Fetal Bovino y (v/v), pH 7.8, con un tiempo de incubación de 24 hrs. En tubos de borosilicado de 4 mL. n = 3

6.2 Inhibición de enquistamiento *in vitro* con extractos de *Piqueria trinervia* Cav

El extracto etanólico y metanólico presentaron mayor inhibición de enquistamiento de *G. intestinalis*. El extracto etanólico tuvo un efecto cisticida en las concentraciones de 25 y 400 $\mu\text{g/mL}$ ya que presentaron un porcentaje de enquistamiento de 1.9% y 0.5% respectivamente. El extracto metanólico presentó un efecto cisticida en las concentraciones de 25 $\mu\text{g/mL}$ (3.03%), 100 $\mu\text{g/mL}$ (3.3%), 200 $\mu\text{g/mL}$ (3.04%), 400 $\mu\text{g/mL}$ (0.7). El efecto no se pudo considerar dosis dependiente. **Gráfica 3**

Se presentó una diferencia estadísticamente significativa comparando la media del porcentaje de enquistamiento con los extractos etanólico y metanólico comparando la media de porcentaje de enquistamiento del control Enquistamiento (8.7%), $P < 0.0001$. **Gráfica 3**



Gráfica 3. Inhibición de enquistamiento de los extractos (acuosos, etanólico, metanólico) de *P. trinervia* durante el enquistamiento de *G. intestinalis* (HGINV). Controles: trofozoítos en medio de enquistamiento sin tratamiento (ENQ), Dimetil sulfóxido (DMSO 0.4%), Metronidazol, fármaco de referencia (MTZ 2.5 $\mu\text{g/mL}$). **** $P < .0001$; *** $P < .001$; * $P < 0.5$. n = 8.

6.3 Microscopia de Contraste de Interferencia Diferencial (DIC Nomarsky)

6.3.1 Inhibición de enquistamiento de *G. intestinalis* por extractos de *P. trinervia*

De las series experimentales se tomaron alícuotas de controles y de los tratamientos con extractos de *P. trinervia* (400 µg/ml), para determinar el posible daño ocasionado en los trofozoítos que se lograron enquistar.

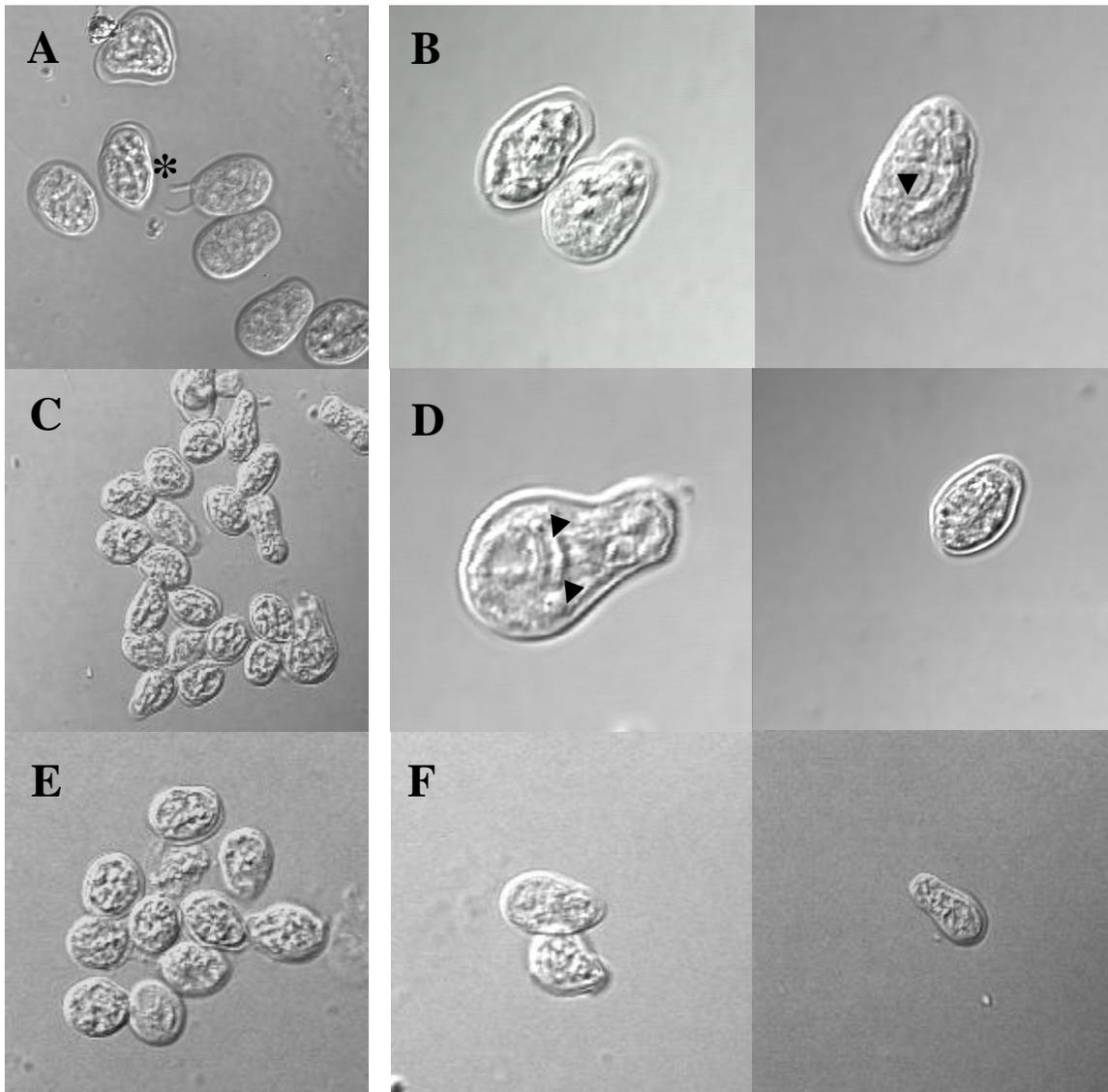


Figura 11. Imágenes tomadas de microscopia de Contrastes de interferencia diferencial (DIC Nomarsky) de los efectos de los extractos de *Piqueira trinervia* sobre quiste de *Giardia intestinalis*. (A, C, E) Grupos Control de tratamiento, Extracto Acuoso (EA), Metanólico (EM) y Etanólico (EE). Se observan quistes ovalados con una pared lisa y en algunos con una pared rugosa, restos de posibles de posibles estructuras (flagelos *). (B, D, F) Quistes incubados en medio con EA, EM y EE, a una concentración de 400µg/ml., se observa una pared más gruesa en los quistes y posibles estructuras internas (puntas de flechas). Además se observa una disminución de quistes dentro del campo visual, con forme aumentaba la concentración de los extractos. (100x).

6.3.2 Maduración de quistes de *Giardia intestinalis*

De los controles negativos (incubado solo con medio de enquistamiento) y después de que permanecieron en refrigeración por (1, 2 y 4 semanas), se prepararon y observaron en DIC-Nomarsky.



Figura 12. Quistes con una semana de maduración, hay un leve engrosamiento en la pared y se distinguen algunas posibles estructuras internas. (100x)

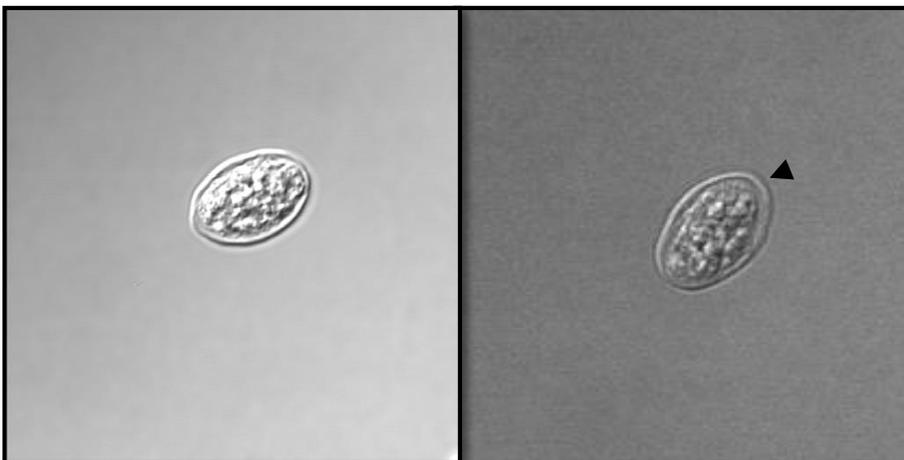


Figura 13. Quistes con dos semanas de maduración: Se observa una pared más engrosada, por lo tanto más definida con un espacio mayor grande entre la superficie de la pared y las posibles estructuras internas. (100x)

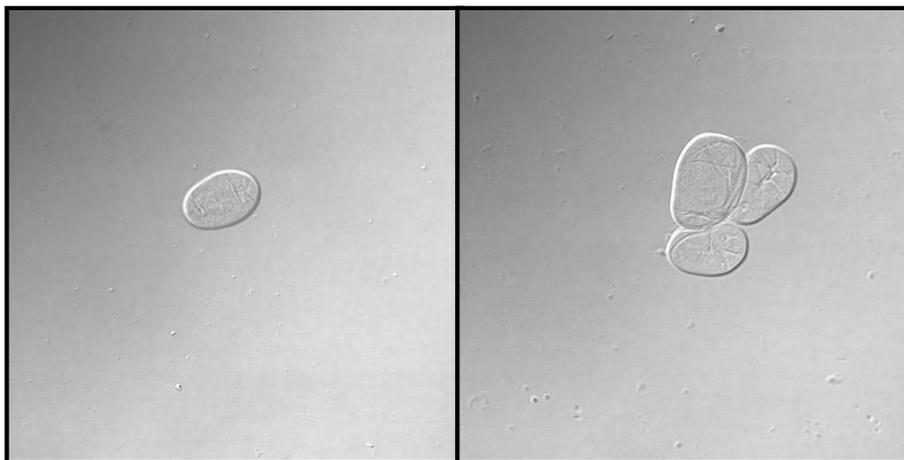


Figura 14. Quiste con cuatro semanas de maduración. Como puede observar los quistes ya no presentan posibles extracuras visibles (100x).

7.0 DISCUSIÓN

Giardia sp. se encuentra distribuida en todo el mundo, pero es más común en áreas donde las medidas sanitarias públicas y personales son inadecuadas. En estas áreas, la principal población afectada por una infección de *Giardia intestinalis* son niños. Se ha reportado resistencia a los fármacos que se utilizan, como el metronidazol ([Upcroft and Upcroft, 2001](#)), además de presentar efectos secundarios, por lo que es necesario encontrar alternativas al tratamiento de esta parasitosis. ([Escobedo and Cimerman, 2007](#))

En este trabajo se valoró el efecto de extractos naturales de la planta *Piqueria trinervia* durante el proceso de la formación de quiste de *G. intestinalis*, el proceso *in vitro* es importante para el diseño de nuevas alternativas en el bloqueo del ciclo de vida del parásito evitando su transmisión.

El método de enquistamiento utilizado en este trabajo, busco eficacia y buen rendimiento en el proceso de enquistamiento *in vitro* de *G. intestinalis* con los elementos disponibles en laboratorio. El enquistamiento de *G. intestinalis* se considera un proceso multifactorial que requiere elementos definidos en el medio extracelular, como la privación de nutrientes específicos como colesterol, tipo de aislado y condiciones de incubación ([Luján et al., 1997](#); [Kaul et al., 2001](#); [Arguello-Garcia et al., 2009](#)). Inicialmente valoramos dos aislados WB y HGINV, es importante aclarar que el aislado WB es una cepa de referencia internacional, mientras que el aislado HGINV es un aislado que se obtuvo del desenquistamiento de quistes de muestras de un paciente con un cuadro de dolor crónico abdominal, el cual demostró que es invasivo en tejido duodenal de gerbos ([Reynoso-Robles et al., 2015](#)). A partir de esta valoración se decidió trabajar con el aislado HGINV, donde se encontró un rendimiento de 49.34% de una población inicial de 2 millones de trofozoítos **Gráfica 1**. Un segundo protocolo se evaluó en poblaciones iniciales de 1 y 2 millones de cada aislado (HGINV y WB), donde se obtuvo un rendimiento de 18.7 % en el aislado HGINV con una población inicial de 2 millones de trofozoítos y una concentración de bilis bovina de 5 mg/ml a pH 7.8, finalmente este protocolo fue el empleado en los subsecuentes experimentales **Gráfica 2**.

La inhibición de enquistamiento fue estadísticamente significativo, entre el extracto etanólico y metanólico. Con el extracto etanólico en una concentración de 25 µg/mL en promedio se enquistaron un 1.9% de trofozoitos, mientras que en la concentración de 400 µg/mL se enquistaron 0.5%. Con el extracto metanólico la mayor inhibición se encontró en los 400 µg/mL donde solo se enquistó un 0.7% de la población inicial de trofozoitos **Gráfica 3**. Resulta evidente en este ensayo, que las mayores concentraciones empleadas fueron tóxicas para los parásitos, sin embargo en concentraciones de 50, 100

mg/ml resultaron favorables para la obtención de una tasa alta de enquistamiento. También se podría atribuir que a estas concentraciones, los trofozoitos se enquistaron de forma más acelerada por lo que la pared quística no permite la penetración de los extractos empleados. Los protocolos de enquistamiento *in vitro* publicados en diversos trabajos muestran tasas de rendimiento variables, donde se han obtenido quistes viables (infecciosos), pero también se obtienen quistes con anomalías en comparación con el enquistamiento *in vivo* ([Middlej and Benchimol, 2009](#)), debido a estas variaciones es necesario considerar el enquistamiento *in vitro* de *G. intestinalis* un proceso complejo.

En 2014 Jimenez-Fragoso reportó la actividad anti-giardiasis de diferentes extractos de *Piqueria trinervia*, concordamos con este estudio en que los extractos orgánicos también se presentará efecto en este caso durante el enquistamiento, ella encontró que a 100 µg/mL la mortalidad de los trofozoitos para el extracto acuoso fue de (52.4%), etanólico (56.4%) y metanólico (56.9), siendo el extracto etanólico el que presentó mayor actividad, a una concentración de 200 µg/mL donde se obtuvo un 94.3% de muerte de trofozoitos. Este extracto también presentó el mejor efecto cisticida, ya que con la concentración mínima (25 µg/mL), se presentó solo un porcentaje de enquistamiento de 1.9%.

Son escasos los reportes que hasta el momento muestra el efecto de algún compuesto natural sobre la fase infectiva y de resistencia de Giardia (quiste), en 2014 Golami y cols, reportan efecto en quistes y trofozoitos de extractos cloroformicos de *Artemisia annua* en dilución variante de (1 a 100 mg / ml) y tiempo (de 1 a 180 min), una tasa de mortalidad de quistes y trofozoitos de (67% y 99%), (65% y 100%), respectivamente ([Golami et. al., 2014](#)). Lo que sugiere que el trofozito es mas susceptible al extracto de *A. annua* en comparación con el quiste. La mayoría de los estudios utilizan técnicas enfocadas para experimentar en quistes ya formados, evaluando extractos y compuesto de plantas: En 2006 [Sadjjadi et al.](#), reportó el efecto de zumo de uva y vinagre sobre quistes obtenidos de muestras infectadas por *G. intestinalis*, durante tres horas obteniendo un efecto de hasta 40.6%. Por otro lado [Rahimi-Esboei et. al., 2013](#), reportó el efecto de los extractos del fruto de *Sambucus ebulus* contra quistes de *G. intestinalis* aislados de pacientes con giardiasis de diferentes hospitales, obteniendo un eficacia hasta del 78% en concentraciones de 100 mg/ml. Por ultimo [Fallahi y cols.](#) en 2015 reportaron el efecto de hojas de Olivo (37.90%) de muerte y de (32.52 %) con los extractos de *Satureja khuzestanica*, sobre quistes aislados de pacientes diagnosticados con giardiasis, con una concentración mínima de 2 mg/ml. Es importante resaltar nuestros resultados obtenidos con el extracto etanólico donde solo se enquistó 1.9% con una concentración de 25 µg/mL, encontrando una actividad mayor con una concentración mucho menor a las reportadas en los trabajos anteriores.

En 2016 un grupo de investigación reportó el efecto *in vitro* de extractos obtenidos con diclorometano de *Zingiber officinale* y *Curcuma longa* a diferentes concentraciones, y los valoraron sobre quistes aislados de niños que presentaban infección por *Giardia*, encontrando un efecto de 97% y 85% respectivamente, en la evaluación *in vivo*, realizada en ratones se encontró una reducción de quistes viables de hasta 91.2% con *Z. officinale* ([Dyab et. al 2016](#)).

Morfológicamente en la microscopia de Contraste de Interferencia Diferencial (DIC) **Figura 11**, se observó quistes con diferentes características en las concentraciones de los extractos, metanólico, etanólico y acuoso (400 µg/mL) en comparación con los controles (A, C y E) evidenciando en los quistes una pared más gruesa y rugosa, además de presencia de algunos posibles organelos. En 2009 Midlej y Benchimol, describen por medio de microscopia electrónica de barrido, transmisión y videomicroscopia los cambios morfológicos que se presentan durante la diferenciación de *G. intestinalis*, las modificaciones que sufre el trofozoíto hasta su enquistamiento, se dieron de forma gradual, los trofozoítos fueron perdiendo su forma dorso-ventral aplanada a una forma más redondeada, los flagelos fueron internalizados y el material fibrilar se depositó gradualmente en la superficie, nosotros observamos que a las 24 horas en los controles negativos un engrosamiento de la pared y evidencia de posibles estructuras internalizadas en los quistes **Figura 12 y 13**.

[Hausen y Cols., 2009](#), reportaron la efectividad de algunos derivados de benzimidazoles durante el proceso de diferenciación de *G. intestinalis*, se encontró alteraciones en los quistes sometidos a las diferentes concentraciones, así como en engrosamiento de la pared quística. Por otra parte se proponen que el efecto del fármaco se debe a la unión de los heterodímeros con los microtúbulos de montaje, deteniendo la polimerización de la pared del quiste. Para definir el posible mecanismo de acción de los extractos de *P. trinervia*, es necesario la implementación de microscopia electrónica de barrido y transmisión para localizar específicamente las estructuras afectadas y reordenadas durante el enquistamiento *in vitro* de *G. intestinalis*. Además de que estos ensayos se valoren en diferentes tiempos (4, 8, 12 y 16 horas). Los resultados obtenidos en la gráfica 3, sugiere que las concentraciones de 25µg/mL y 400µg/mL de los diferentes extractos aplicados, muestran un efecto sobre trofozoítos en un periodo inicial al enquistamiento, sin embargo los quistes que logran enquistarse se definirían resistentes al efecto de los extractos, pero no siempre se podrían considerar viables. La comprensión de estos mecanismos puede proporcionar información importante para el desarrollar quimioterapia dirigida a esta vía metabólica específica del parásito, evitando la distribución de esta parasitosis, obteniendo un ambiente libre de quistes infecciosos de *G. intestinalis*.

8.0 CONCLUSIONES

- Se estableció condiciones optimas para el enquistamiento de *Giardia intestinalis* aislado (HGINV, WB), modificando la concentración de bilis bovina 5 mg/mL a pH 7.8 y utilizando un medio de pre-enquistamiento.
- Es el primer trabajo donde se evalua el efecto de extractos totales de *Piqueria trinervia* durante la formación *in vitro* de quistes de *G. intestinalis*.
- En extracto etanólico de *P. trinervia* presento un efecto mayor a menor concentración durante el enquistamiento de *G. intestinalis*. (25 µg/mL 1.6% de enquistamiento).
- A concentraciones de 50 y 100 µg/mL de extracto etanólico y acuoso hubo una aumento en la tasa de enquistamiento.

9.0 PERSPECTIVAS

- ❖ Valorar el proceso de enquistamiento a tiempos más cortos 2, 4, 8, 10, 12 y 16 hrs.
- ❖ Caracterizar el daño morfológico a nivel ultraestructural provocado por los extractos de *Piqueria trinervia*.
- ❖ Valorar estos extractos en quistes obtenidos de pacientes ó animales, modelo *in vivo*.
- ❖ Desenquistar aquellos quistes que lograron sobrevivir a las concentraciones más altas.
- ❖ Obtener los compuestos mayoritarios de el extracto etanólico para posteriormente valorarlos durante el proceso de enquistamiento.

10.0 REFERENCIAS

- Abel ES, Davids BJ, Robles LD, Lofl in CE, Gillin FD, and Chakrabarti R. (2001). Possible roles of protein kinase A in cell motility and excystation of the early diverging eukaryote *Giardia lamblia*. *J Biol Chem*, 276: 10320–10329.
- Adam, R.D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14. 447–475.
- Aguilar-Díaz, H., Carrero, J. C., Argüello-García, R., Lacleste, J. P., & Morales-Montor, J. (2011). Cyst and encystment in protozoan parasites: Optimal targets for new life-cycle interrupting strategies? *Trends in Parasitology*, 27(10), 450–458.
- Ankarklev J., Jerlstrom-Hultqvist J., Ringqvist E., Troell K., Svärd S. (2010). Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species, *Nat. Rev.*, 8: 413-422.
- Argüello-García R., Bazán-Tejeda M. L. (2009). Encystation commitment in *Giardia duodenalis*: A long and winding road. *Parasite*, 16: 247-258.
- Argüello-García, R., Argüello-Lopez, C., Gonzales-Robles, A., Castillo-Figueroa, A. M., & Ortega-Pierres, G. (2002). Sequential exposure and assembly of cyst wall filaments on the surface of encysting *Giardia duodenalis*. *Parasitology*, 125, 209–219.
- Arieta-Baez D., Ruiz de Esparza R., Jiménez-Estrada M. (2012). Mexican Plants Used in the Salmonellosis Treatment, A Diversified Superbug, Mr. Yashwant Kumar (Ed.), ISBN: 978-953-307-781-9, InTech, Consultado de: <http://www.intechopen.com/books/salmonella-a-diversifiedsuperbug/mexican-plants-used-in-the-salmonellosis-treatment>.
- Astiazarán-García, H., Iñigo-Figueroa, G., Quihui-Cota, L., & Anduro-Corona, I. (2015). Crosstalk between Zinc Status and *Giardia* Infection: A New Approach. *Nutrients*, 7(6), 4438–4452.
- Avila-Rodríguez A., Avila-Rodríguez EH., Avila-Perez M., Araujo-Contreras J., Rivas Avila E. (2010). Parasitosis intestinal y factores asociados en niños menores de 5 años en cuatro asentamientos humanos irregulares de la ciudad de Durango, México. *Enlaces académicos*, 3(1): 15-27
- Barrera, A., A. Barrera-Vázquez y R. M. López-Franco. (1976). Nomenclatura etnobotánica Maya. Instituto Nacional de Antropología e Historia – Secretaría de Educación Pública, México.
- Bazán-Tejeda, M. L., Argüello-García, R., Bermúdez-Cruz, R. M., Robles-Flores, M., & Ortega-Pierres, G. (2002). Protein kinase C isoforms from *Giardia duodenalis*: identification and functional characterization of a B-like molecule during encystment. *Archives of Microbiology*, 187(3-4), 55–66.
- Béjar, E., Reyes-Chilpa, R., & Jiménez-Estrada, M. (2000). Bioactive Natural Products (Part E). *Studies in Natural Products Chemistry*, 24, 799–844.
- Benchimol M., De Souza W. (2011). The ultrastructure of *Giardia* during growth and differentiation, En: Edit. Luján H., Svärd S., *Giardia: A model Organism*, Springer Wien New York, 142-160.

- Benchimol M., Piva B., Campanati L., De Souza W. (2004). Visualization of the funis of *Giardia lamblia* by high-resolution field emission scanning electron microscopy—new insights, *J Struct Biol.*, 147(2), 102–115.
- Bénére, E., Van Assche, T., Van Ginneken, C., Peulen, O., Cos, P., & Maes, L. (2011). Intestinal growth and pathology of *Giardia duodenalis* assemblage subtype AI, AII, B and E in the gerbil model. *Parasitology*, 1–10.
- Bernander R., Palm J., Svädr S. G. (2001). Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle, *Cellular Microbiology*, 3(1), 55-62.
- Bingham AK and Meyer EA. (1979). *Giardia* excystation can be induced in vitro in acidic solutions. *Nature* 277: 301–302
- Boucher, S. E. M., & Gillin, F. D. (1990). Excystation of in vitro-derived *Giardia lamblia* cysts. *Infection and Immunity*, 58(11), 3516–3522.
- Buret A, Hardin JA, Olson ME, Gall DG. (1992). Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. *Gastroenterology*; 103:506-513.
- Caballero J., Casas A., Cortés L., Mapes C. (2000). Patrones en el conocimiento, uso y manejo de plantas en pueblos de México. *Estudios Atacameños*, 16: 1-15.
- Cacciò, S. M., & Ryan, U. (2008). Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol.*, 160(2), 75–80.
- Cárcamo C., Hooton T., Wener M., Weiss N., Gilman R., Arevalo J., Carrasco J., Seas C., Caballero M., Holmes K. (2005). Etiologies and Manifestations of Persistent Diarrhea in Adults with HIV-1 Infection: A Case-Control Study in Lima, Peru, *J Infect Dis*; 191:11–19.
- Casas, A., J. L. Viveros y J. Caballero. (1994). *Etnobotánica Mixteca: sociedad, cultura y recursos naturales en la Montaña de Guerrero*. Consejo Nacional de la Cultura y las Artes e Instituto Nacional Indigenista, México.
- Castro, C., Jimenez, M., & González de la Parra, M. (1991). Inhibitory Effect of Piquerol A on the Growth of Epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*, *Planta Med.*, 58(7992): 281-282.
- Cavalier Smith T. (1993). Kingdom Protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev.* 57: 953–994.
- Cavalier-Smith T. (2002). The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 297–354.
- Cavalier-Smith T. (2003a). The excavate protozoan phyla Metamonada Grassé emend. (Anaeromonadea, Parabasalialia, Carpediemonas, Eopharyngia) and Loukozoa emend. (Jakobea, Malawimonas): their evolutionary affinities and new higher taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1741–1758.
- Cavalier-Smith T. (2003). Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *Europ. J. Protistol.* 39, 338–348.

- Cavalier-Smith, T. & Chao, E. E. (1996). Molecular phylogeny of the free-living archezoan *Trepomonasagilis* and the nature of the first eukaryote. *J Mol Evol.* 43, 551–562.
- Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 73, 203–266.
- Cedillo-Rivera, R., Leal, Y. A., Yépez-Mulia, L., Gómez-Delgado, A., Ortega-Pierres, G., Tapia-Conyer, R., & Muñoz, O. (2009). Seroepidemiology of giardiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*, 80(1), 6–10.
- Chávez M. del P., Fernández J., Ospina I., López M., Moncada L., Reyes P. (2007). Tendencia de la prevalencia y factores asociados a la infección por *Giardia duodenalis* en escolares y preescolares de una zona rural de Cundinamarca, *Biomédica*; 27:345-51.
- Chávez-Munguía, B., Omaña-Molina, M., González-Lázaro, M., González-Robles, A., Cedillo-Rivera, R., Bonilla, P., & Martínez-Palomo, A. (2007). Ultrastructure of cyst differentiation in parasitic protozoa. *Parasitology Research*, 100(6), 1169–1175.
- Chen, N., Upcroft, J.A. (1995). A *Giardia duodenalis* gene encoding a protein with multiple repeats of a toxin homologue, *Parasitology*, 111 (4); 423-431.
- Cotton, J. A., Beatty, J. K., & Buret, A. G. (2011). Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *Int J Parasitol.*; 925-033
- Cruz A., Sousa M. I., Azeredo Z, Leite E., Figueiredo De Sousa F.C., Cabral M. (2003). Isolation, excystation and axenization of *Giardia lamblia* isolates: in vitro susceptibility to metronidazole and albendazole, *J Antimicrob Chemother*, 51, 1017–1020.
- Cruz-Reyes, A., Chavarin, C., Campos Arias, M. P., Taboada, J., & Jimenez. (1989). Actividad molusquicida del piquerol A aislado de *Piqueria trinervia* (Compositae) sobre ocho especies de caracoles pulmonados. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*.
- Dawson S., House S. (2010). Life with eight flagella: flagellar assembly and division in *Giardia*, *Current Opinion in Microbiology*, 13:480–490.
- Dyab, A. K., Yones, D. A., Ibraheim, Z. Z., & Hassan, T. M. (2016). Anti-giardial therapeutic potential of dichloromethane extracts of *Zingiber officinale* and *Curcuma longa* in vitro and in vivo. *Parasitology Research*, 2016, 71526.
- Eckmann, L., & Gillin, F. D. (2001). 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*, 280(1).
- Eckmann, L., Laurent, F., Langford, T. D., Hetsko, M. L., Smith, J. R., Kagnoff, M. F., & Gillin, F. D. (2000). 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*. *Journal of Immunology*, 164(3), 1478–1487.

- Ellis J. G., Davila M., Chakrabarti R. (2003). Potential Involvement of Extracellular Signal-regulated Kinase 1 and 2 in Encystation of a primitive Eucaryote, *Giardia lamblia*: Stage- Specific Activation and Intracellular localization. *J. Biol. Chem.*, 278: 1936-1945.
- Elmendorf, G.H. Dawson, S.C. McCaffery, J.M. (2003). The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *Int. J. Parasitol.* 33, 3–28.
- Erlandsen SL, Bemrick WJ, Wells CL, Feely DE, Knudson L, Campbell SR, Van Keulen H, and Jarroll EL. (1990). Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardeaherodias*). *J Parasitol.* 76: 717–724.
- Escobedo A. A, Almirall P, Robertson LJ, Franco RMB, Hanevik K, Morch K, and Cimerman S. (2010). Giardiasis: the ever present threat of a neglected disease. *Infect Disord Drug Targets*, Vol. 10.
- Escobedo, A. A., & Cimerman, S. (2007). Giardiasis: a pharmacotherapy review. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 8(12), 1885–902.
- Fallahi, S., Rostami, A., Delfan, B., Pournia, Y., & Rashidipour, M. (2015). Effect of olive leaf, *Satureja khuzestanica*, and *Allium sativum* extracts on *Giardia lamblia* cysts compared with metronidazole in vitro. *Journal of Parasitic Disease*, 1-6.
- Farthing M. J. Cap. 10. Giardiasis. En Gillis H. M. (1994). Protozoon Diseases, Ed. Arnold. United State of America, 562-584.
- Farthing M. J. The molecular pathogenesis of giardiasis. (1997). *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 24:79–88.
- Faubert G. (2000). Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev*; 13:35-54
- Feely D. E. (1988). Morphology of the cyst of *Giardia microtiby* light and electron microscopy. *J Protozool.* 35: 52–54
- Feely DE, Gardner MD, Hardin EL. (1991). Excystation of *Giardia muris* induced Prevention by phosphate-bicarbonate medium: localization of acid phosphatase. *J. Parasitol*, 77:441–8.
- Feng Y., Xiao L., Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2011, 24(1):110-131.
- Filice, F.P. (1952). Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. Univ. Calif. *Publ. Zool.* 57, 53–146.
- Golami, S., Rahimi-Esboei, B, Mousavi, P., Marhaba, Z., Youssefi, M. R., & Rahimi, M. T. (2014). Survey on efficacy of chloroformic extract of *Artemisia annua* against *Giardia lamblia* trophozoite and cyst in vitro. *Journal of Parasitic Diseases*, 40(1), 88–92.
- Goldhaber-Pasillas D., Ruiz de Esparza Villarreal R., Avila-Acevedo JG., Jiménez-Estrada M. (2007). Antibacterial activity of *Piqueria trinervia* Cav. Against several enteropathogenic bacteria, *Planta Med*; p. 073-093.

- González de la Parra, M., Anaya A. L., Espinosa F., Jiménez, M., Castillo R. (1981). Allelopathic potential of *Piqueria Trinervia* (Compositae) and Piquerols A and B. *Journal of Chemilcal Ecology*, 7(3).
- González-López M. E., Escobedo-Carbonell A., Ruiz-Pérez A. (2007). Diarreas crónicas asociadas a *giardia lamblia*, coccidias, y adenovirus en pacientes viviendo con VIH/SIDA, *Bioquimia*, 32(SuA) p. 107.
- González-Stuart A, Rivera JO. (2009). Comparison of herbal products use in two largest border communitites between the US and México. *Herbalgram*; 81: 58-66.
- Gottig N., Elias E., Quiroga R., Nores M. J., Solari A. J., Touz M. C., Luján H.D. (2006). Active and Passive Mechanisms Drive Secretory Granule Biogenesis during Differentiation of the Intestinal Parasite *Giardia lamblia*, *J. Biol. Chem.*, 281(26):18156-18166.
- Hanevik, K., Hausken, T., Morken, M. H., Strand, E. A., Mørch, K., Coll, P. Langeland N. (2007). Persisting symptoms and duodenal inflammation related to *Giardia duodenalis* infection. *Journal of Infection*, 55(6), 524–530.
- Hawrelak J. A. (2003). Giardiasis: Pathophysiology and Management, *Altern Med Rev.* 8(2):129-142.
- Hehl, A. B., & Marti, M. (2004). Secretory protein trafficking in *Giardia intestinalis*. *Molecular Microbiology*, 53(1), 19–28.
- Heinrich, M., West, J. E., & Montellano, B. R. O. De. (1998). Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae). 38:539–65.
- Hernández R., Gally-Jorda M. (1989). Plantas medicinales, Editorial Pax México,,: 7-10.
- Hill, D. R. (1993). Giardiasis. Issues in diagnosis and management. *Infectious Disease Clinics of North America*, 7(3), 503–525.
- Huang, D. B., and A. C. (1996). White. An updated review on Cryptosporidium and Giardia. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 35:291–314.
- Hausen, M. A., De Oliveira, R. P., Gadelha, A. P. R., Campanati, L., De Carvalho, J. J., De Carvalho, L., & Barbosa, H. S. (2009). Giardia lamblia: A report of drug effects under cell differentiation. *Parasitology Research*, 105(3), 789–796.
- Instituto de Biología. "*Piqueria trinervia* Cav. - IBUNAM:MEXU:PVsn44527". UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2010-05-27. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2015-6-25. Disponible en:
<<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PVsn44527>>
- Jacobsen K. H., Ribeiro S., Quist B., Rydbeck B. (2007) Prevalence of Intestinal Parasites in Young Quichua Children in the Highlands of Rural Ecuador, *Health Popul Nutr, USA*, 25(4): 399-405.

- Jarrol E.L, Macechko P.T., Steimle P.A., Bulik D., Karr C.D., van Keulen H., Paget T.A., Gerwig G., Kamerling J., Vliegenthart J., Erlandsen S. (2001). Regulation of carbohydrate metabolism during *Giardia* encystment. *J.Eukaryot Microbiol.* 48: 22-26.
- Jiménez M., González de la Parra M., Melendez E., Campos M. P., Soriano-García M. (1995). Trinervinol. *Acta Cryst.* 52: 1458-1460.
- Jiménez-Fragoso C. (2014). Actividad in vitro de *Piqueria trinervia* Cav. En Trofozoítos de *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*. Tesis de Licenciatura, Biología, UNAM.
- Jimenez-Garcia LF, Zavala G, Chavez-Munguia, B, Ramos-GodinezMdel P, Lopez-Velazquez G, Segura-Valdez M de L, Montanez C, Hehl AB, Arguello-Garcia R, and Ortega-Pierres G. (2008). Identification of nucleoli in the early branching protist *Giardia duodenalis*. *Int J Parasitol.* 38: 1297–1304.
- Júlio C., Vilares A., Oleastro M., Ferreira I., Gomes S., Monteiro L., Nunes B., Tenreiro R., Angelo H. (2012). Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: A case study in Portugal. *Parasites & Vectors*, 5:22.
- Karr, C. D., & Jarroll, E. L. (2004). Cyst wall synthase: N-acetylgalactosaminyltransferase activity is induced to form the novel N-acetylgalactosamine polysaccharide in the *Giardia* cyst wall. *Microbiology*, 150(5), 1237–1243.
- Kaul D., Rani, Sehgal R. (2001). Receptor-Ck regulates *Giardia* Encystation process. *Mol. Cell. Biochem*, 225: 167-169.
- Kofoid C., Christiansen E. (1915). On the Life-History of *Giardia*, *Proc Natl AcadSci U S A*. November; 1(11): 547–552.
- Kohli A., Bushena O., Pinkertona R., Houpta E., Newmanc R., Searsd C., Limae A., Guerranta R. (2008). *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children, *Trans R Soc Trop Med Hyg.*; 102(7): 718–725.
- Lanfredi-Rangel, A., Attias, M., Reiner, D. S., Gillin, F. D., & De Souza, W. (2003). Fine structure of the biogenesis of *Giardia lamblia* encystation secretory vesicles. *Journal of Structural Biology*, 143(2), 153–163.
- Larrosa-Haro A., Ruiz-Perez M., Aguilar-Benavides S. (2002). Utilidad del estudio de las heces para el diagnóstico y tratamiento de lactantes y prescolares con diarrea aguda. *Salud Publica Mex.*; 44:328-334.
- Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin ML. (2010). The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *Int J Parasitol.*, 40 (9): 1063–1074.
- Lauwaet T., Davids BJ, Torres-Escobar A, Birkeland SR, Cipriano MJ, Preheim SP, Palm D, Svård SG, McArthur AG, Gillin FD. (2007). Protein phosphatase 2A plays a crucial role in *Giardia lamblia* differentiation. *Mol Biochem Parasitol* 152: 80–89.

- Lebwohl, B., Deckelbaum, R. J., & Green, P. H. R. (2003). Giardiasis. *Gastrointestinal Endoscopy*, 57(7), 906–913.
- Luján H.D., Mowatt M.R., Nash T.E. (1997). Mechanisms of *Giardia lamblia* Differentiation into Cysts, *Microbiol, Mol Biol Rev.*; 61(3):294-304.
- Luján H.D., Mowatt M.R., Nash T.E. (1998). The Molecular Mechanisms of *Giardia* Encystation, *Parasitology Today*, 14(11): 446-450.
- Martínez, M. (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México.
- McCaffery, J. M., & Gillin, F. D. (1994). *Giardia Lamblia*: Ultrastructural Basis of Protein Transport during Growth and Encystation. *Experimental Parasitology*, 79, 220–235.
- Mendoza, J. L., Jiménez, M., & Lotina-henmen, B. (1994). Piquerol A and Diacetyl Piquerol Act as Energy Transfer Inhibitors of Photosynthesis, *Pestic. Sci.* 40, 37–40.
- Midlej V., Benchimol M. (2009). *Giardia lamblia* behavior during encystation: How morphological changes in shape occur, *Parasitol Inter.*, (58): 72–80.
- Mohammed Mahdy, A.K.; Lim, Y.A.L.; Surin, J.; Wan, K.L.; Al-Mekhlafi, M.S.H. (2008). Risk factors for endemic giardiasis: highlighting the possible association of contaminated water and food. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 102:5, 465-470.
- Monis, P.T., Andrews R. H., Mayrhofer G., Ey P. (2003). Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect. Genet. Evol.* 3, 29–38.
- Morales-Espinosa E.M., Sánchez-Pérez H.J., García-Gil M., Vargas-Morales G., Méndez-Sánchez J. D., Pérez-Ramírez M. (2003). Intestinal parasites in children, in highly deprived areas in the border region of Chiapas, Mexico, *Salud Pública de México*, 45(5): 378-388.
- Mowatt, M., Lujan D., Cotten D., Bower B., Yee J., Nash T., Stibbs H. (1995). Developmentally regulated expression of a *Giardia lamblia* cyst wall protein gene. *Mol. Microbiol.*, 15:955–963.
- Nash, T. E. (1997). Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 352 (1359), 1369–75.
- Nash, T. E., Herrington, D. A., Losonsky, G. A., & Levine, M. M. (1987). Experimental Human Infections with *Giardia lamblia*. *Journal of Infectious Diseases*, 156 (6), 974–984.
- Núñez FA, López JL, De la Cruz AM & Finlay CM. (2003a). Factores de riesgo de la infección por *Giardia lamblia* en niños de guarderías infantiles de Ciudad de La Habana, Cuba. *Cadernos de Saude Publica* 19, 677–682.
- Olson, M. E., Ceri, H., & Morck, D. W. (2000). *Giardia* vaccination. *Parasitology Today*, 16(5), 213–217.

- Organización Mundial de la Salud. (2002). Medicina Tradicional-Necesidades Crecientes y Potencial, Perspectivas Políticas Sobre Medicamentos de la OMS. WHO. EDM.
- Ortega Y., (1997). Adam R. D., Giardia: Overview and Update, *Clin. Infec. Dis.* . 25:545–50.
- Ortega-Pierres G., Bazán-Tejeda M. L., Fonseca-Liñán R., Bermúdez-Cruz R. M., Argüello-García R. (2011). Interaction of Giardia with Host Cells (Eds). Giardia, A Model Organism. *Springer-Verlag/Wien.* 261-174.
- Osuna-Torres L., Tapia-Perez M. E., Aguilar-Contreras A. (2005) Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Publicaciones y Ediciones de la Universidad de Barcelona, España, 173 p.
- Paget, T. A., Macechko, P. T. & Jarroll, E. L. (1998). Metabolic changes in *Giardia intestinalis* during differentiation. *J. Parasitol.*; 84: 222–226.
- Paniagua L., Monroy E. García-González O, Alonso J., Negrete E., Vaca S. (2007). Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* ; 6: 17.
- Parra, M. G., Chávez-Peña, D., Jiménez-Estrada, M., & Ramos-Mundo, C. (1991). Acaricidal Potential of Piquerols A and B against *Boophilus microplus*, *Pestic. Sci.* 33, 81-86.
- Pennington, C. W. (1963). The tarahumara of Mexico. Univ. of Utah Press. Salt Lake City, Utah.
- Piva B and Benchimol M. (2004). The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. *Biol Cell.* 96: 735–746.
- Ponce-Macotela M. y Martínez-Gordillo M. Cap. 7, Giardiasis. (2014). En Becerril M. A. Parasitología Médica, Mc Graw Hill Education, 63-74.
- Prado, M.S., Strina, A., Barreto, M.L., Oliveira-Assis, A.M., Paz, L.M., Cairncross, S. (2003). Risk factors for infection with *Giardia duodenalis* in pre-school children in the city of Salvador, *Brazil. Epidemiol. Infect.* 131, 899—906.
- Prucca, C. G., Slavin, I., Quiroga, R., Elías, E. V, Rivero, F. D., Saura, A., Luján, H. D. (2008). Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature*, 456(7223), 750–4.
- Prucca, C. G., Slavin, I., Quiroga, R., Elías, E. V, Rivero, F. D., Saura, A., Luján. (2008). Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature*, 456 (7223), 750–4.
- Puw Davies A., Campbell B., Rhys M., Bone A., Roche A., Chalmers R. (2009). Asymptomatic carriage of protozoan parasites in children in day care centers in the United Kingdom. *The Pediatric Infectious Disease Journal.* 28 (9): 838-40.
- Quihui L, Valencia ME, Crompton DW, Phillips S, Hagan P, Morales G, Diaz-Camacho SP. (2006). Role of the employment status and education of mothers in the prevalence of intestinal parasitic infections in Mexican rural schoolchildren. *BMC Public Health.* 6: 225–232.

- Rahimi-Esboei B., Ebrahimzadeh M.A., Gholami Sh., Falah-Omrani V. (2013). Anti-giardial activity of *Sambucus ebulus* Eur. Rev. Med. *Pharmacol. Sc*, 17: 2047-2050.
- Read, C. M., Monis, P. T., & Thompson, R. C. A. (2004). Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infection, Genetics and Evolution*, 4, 125–130.
- Reiner, D. S., McCaffery, J. M., & Gillin, F. D. (2001). Reversible interruption of *Giardia lamblia* cyst wall protein transport in a novel regulated secretory pathway. *Cellular Microbiology*, 3(7), 459–472.
- Rendtorff, RC. (1954). The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II: *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Am. J. Hyg.* 60:327–38.
- Reynoso-Robles, R., Ponce-Macotela, M., Rosas-López, L. E., Ramos-Morales, A., Martínez-Gordillo, M. N., & González-Maciel, A. (2015). The invasive potential of *Giardia intestinalis* in an in vivo model. *Scientific Reports*, 5(3700), 15168.
- Rivas-García C. (2000). Frecuencia de parasitosis intestinales en asentamientos humanos irregulares. *Rev. Fac. Med. UNAM*, 43(3)
- Robertson, L. J., Hanevik, K., Escobedo, A. A., Morch, K., & Langeland, N. (2009). Giardiasis - Why do the symptoms sometimes never stop? *Trends in Parasitology*, 26(2), 75–82.
- Rochelle, P. A., De Leon, R., Stewart, M. H., & Wolfe, R. L. (1997). Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), 106–114.
- Rodríguez-Guzmán L., Hernández-Jerónimo E., Rodríguez-García R. (2000). Parasitosis intestinal en niños seleccionados en una consulta ambulatoria de un hospital, *Rev. Mex. De Ped.*, 67(3): 117-122.
- Romo J., Romo de Vivar A., Quijano L., Rios., Diaz E. (1979) Los componentes terpenoides de la *Piqueria trinervia* Cav., *Rev. Latinoam. Quim.*, 1:72-81.
- Roxström-Lindquist, K., Palm, D., Reiner, D., Ringqvist, E., & Svärd, S. G. (2006). *Giardia* immunity - An update. *Trends in Parasitology*, 22(1), 26–31.
- Rubluo A., Flores A., Jimenez M., Brunner I. (1995). *Piqueria trinervia* Cav. (St. Nicholas Herb): In Vitro Culture and the Production of Piquerol. En “The series Biotechnology in Agriculture and Forestry. 33:377-387.
- Ruiz de Esparza, R., Bye, R., Meckes, M., Torres-Lopez, J., & Jimenez-Estrada, M. (2007). Antibacterial activity of *Piqueria trinervia*, a Mexican medicinal plant used to treat diarrhea. *Pharmaceutical Biology*, 45(6), 446–452.
- Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski. (2001). Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.: 802-803.

- Saad, E., Chávez, I., Reyes-Chilpa, R., Rubluo, A., & Jiménez-Estrada, M. (2000). Antifungal monoterpene production in elicited cell suspension cultures of *Piqueria trinervia*. *Phytochemistry*, 55(1), 51–57.
- Sadjjadi S. H., Rostami J., Azadbakht M. (2006). Giardiacidal Activity of Lemon Juice, Vinifer and Vinegar on *Giardia intestinalis* Cysts, South Asia J Trop Med Public Health., 37. Suppl. 3: 24-27.
- Sagolla MS, Dawson SC, Mancuso JJ, and Cande WZ. (2006). Three-dimensional analysis of mitosis and cytokinesis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis*. *J Cell Sci*.119:4889–4900.
- Sánchez de la Barquera-Ramos M. A., Miramontes-Zapata M., (2011). Parasitosis intestinales en 14 comunidades rurales del altiplano de México, *Rev. Mex. Patol Clin*, 58(1): 16-25.
- Sanchez-Vega, J. T., J. Tay-Zavala, A. Aguilar-Chiu, D. Ruiz-Sanchez, F. Malagon, J. A. Rodriguez-Covarrubias, J. Ordonez-Martinez, and L. Cal-deron-Romero. 2006. Cryptosporidiosis and other intestinal protozoan infections in children less than one year of age in Mexico City. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75:1095–1098.
- Sansón-Romero G. (2012). Estudio de la actividad antibacteriana y antifúngica de la planta *Piqueria trinervia Cav.* Tesis de Licenciatura. FEZ Zaragoza, UNAM.
- Savioli L., Smith H., Thompson A. (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the ‘Neglected Diseases Initiative’ *Trends Parasitol.* 22 (5): 203-208.
- Scott, K. G. E., Logan, M. R., Klammer, G. M., Teoh, D. A., & Buret, A. G. (2000). Jejunal brush border microvillous alterations in *Giardia muris*-infected mice: Role of T lymphocytes and interleukin-6. *Infection and Immunity*, 68(6), 3412–3418.
- Scott, K. G. E., Meddings, J. B., Kirk, D. R., LeesMiller, S. P., & Buret, A. G. (2002). Intestinal infection with *Giardia spp.* reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. *Gastroenterology*, 123(4), 1179–1190.
- Sener, K., Shen, Z., Newburg, D. S., & Jarroll, E. L. (2004). Amino sugar phosphate levels in *Giardia* change during cyst wall formation. *Microbiology*, 150(5), 1225–1230.
- Singer M. S., Immunology of Giardiasis. En: Edit. Luján H., Avärd S. (2011). *Giardia: A model Organism*, Springer Wien New York, 319-331.
- Smith, H. V., & Mank, T. G. (2011). Diagnosis of Human Giardiasis. *Giardia: A model Organism*, Springer Wien New York, 2011, 353 – 377.
- Soto-Núñez J.C. (1995). Plantas medicinales de la Cuenca del Río Balsas Universidad Nacional Autónoma de México., Cuadernos del Instituto de Biología. UNAM, México, Núm. 25, Pág. 7-198.
- Stefanic, S., Morf, L., Kulangara, C., Regös, A., Sonda, S., Schraner, E., Hehl, A. B. (2009). Neogenesis and maturation of transient Golgi-like cisternae in a simple eukaryote. *Journal of Cell Science*, 122(16), 2846–2856.

- Sulaiman I. and Cama V., Chapter 2: (2006). The Biology of Giardia Parasites. In Ortega Y. Editor. Foodborne parasites. Food microbiology and food safety series. New York, Springer: 15-32.
- Sun, C. H., McCaffery, J. M., Reiner, D. S., & Gillin, F. D. (2003). Mining the Giardia lamblia genome for new cyst wall proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 278(24), 21701–21708.
- Takahashi M, Katayama Y., Takada H., Hirakawa J., Kuwayama H., Yamaji H., Ogura K., Meda S., Omata M.(2001). Silent infection of Giardia lamblia causing bleeding through Vitamin K Malabsorption, *J Gastro. Hepato*, 16 (10) 1171-1172.
- Thompson RCA. (2004). The zoonotic significance and molecular epidemiology of Giardia and giardiasis, *Vet. Parasitol.* 26 15–35.
- Thompson RCA, Monis P. T. (2004). Variation in Giardia: Implications for Taxonomy and Epidemiology, *Adv Parasitol*; 58: 69–137.
- Thompson RCA, Monis P. T., Cap. 1. (2011). Taxonomy of Giardia Species. En Luján H. D, Svärd S. (Eds). *Giardia, A Model Organism*. Springer-Verlag/Wien,: 3-15.
- Thompson RCA. (2000). Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol*; 30:1259-1267.
- Thompson RCA. (2008). Giardiasis: Modern concepts in control and management, *Ann Néstle [Engl]*, 66: 23-29.
- Upcroft P., Upcroft A. J. (2001). Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa, *Clinical Microbiology Reviews*, 14(1):150–164.
- Vázquez-Tsuji O., Rivera-Campos T. (2009). Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial, *Revista del Centro de Investigación. Universidad La Salle*, 8, (31): 75-90.
- Viesca-Treviño C. (1991). Primer Libro Médico Mexicano, *Revista Ciencias, UNAM*,; 21: 38-40.
- Villaseñor, R., J.L. y F.J. Espinosa. (1998). Catálogo de malezas de México. UNAM. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México.
- Worgall, T. S., Davis-Hayman, S. R., Magana, M. M., Oelkers, P. M., Zapata, F., Juliano, R. A., Osborne T., Nash T., Deckelbaum, R. J. (2004). Sterol and fatty acid regulatory pathways in a *Giardia lamblia* -derived promoter : evidence for SREBP as an ancient transcription factor, *J. of Lipid Research*. 45, 981–988.
- World Health Organization: The World Health Report. (1996). Fighting Disease Fostering Development. Geneva. WHO.
- Yang, H., Chung, H. J., Yong, T., Lee, B. H., & Park, S. (2003). Identification of an encystation-specific transcription factor, Myb protein in *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 128(2), 167–174.

Yoder J S., Gargano J., Wallace R., Beach M. (2012). Giardiasis Surveillance — United States, 2009–2010. *MMWR.*, 61(5).

Zamora-Espinosa I. A. (2010). *Giardia lamblia*, en el Hospital infantil de Morelia: Frecuencia, distribución, sintomatología y factores de riesgo. Tesis, Facultad de químico farmacobiología. Univer. Mich. De San Nicolas Hidalgo: 46.

Zepeta C., White L. (2008). Herbolaria y Pintura Mural: Plantas Medicinales en los Murales del Convento Divino Salvador de Malinalco, Estado de México. *Polibotanica*, México, 25: 173-199.

ANEXO

Obtención de Extractos Totales (Acuoso, Etanólico y Metanólico)

-
- Planta colectada en Cerro del Ajusco, Ciudad de México, 2010.
 - Una vez seca, la planta se fragmento y se pesó (tallos y hojas): **700 g**. Se utilizaron **233 g** para cada extracto.
 - Las extracciones se realizaron a temperatura ambiente, se utilizaron **100 mL** del solvente para **15.5 g** correspondiente para cada muestra macerada **X 24 h**.
 - El extracto acuoso se evaporo a temperatura ambiente. Mientras que el Etanólico y Metanólico mediante rotavapor.
 - Se almacenaron en frasco ámbar hasta su uso.
-

(Jiménez-Fragoso, 2014)

PBS 1X (Buffer Fosfato Salino)

Reactivos	Cantidad (g)
NaCl	8
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄	0.610
KH ₂ PO ₄	0.190

Las sales se disolvieron en 900 mL de agua destilada y afora a 1 L, se esterilizó por medio de autoclave a 121°C durante 15 min.

Medio de Cultivo TYI-S-33

Reactivos	Cantidad (g)
Citrato Férrico de Amonio (C ₆ H ₁₁ FENO ₇)	0.015
Fosfato de Potasio Dibásico (K ₂ HPO ₄)	0.5
Fosfato de Potasio Monobásico (KH ₂ PO ₄)	0.3
Ácido Ascorbico (C ₆ H ₈ O ₆)	0.1
Cloruro de Sodio (NaCl)	1.0
Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	5.0
L-cisteína (C ₃ H ₇ NO ₂ S)	0.5
Bilis Bovina	0.25
Extracto de Levadura	5.0
Triptona	10.0

Todos los reactivos se disolvieron en 500 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 7.0 y se pre-filtro con una membrana de 0.45 µm, la filtración final se realizó bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar con membrana de 0.22 µm. Se rotuló y se conservo a 4 °C. Se agregaron antibióticos y se suplemento con 10% de suero fetal bovino.

Medio de Enquistamiento

Reactivos	Cantidad (mg)
Citrato Férrico de Amonio (C ₆ H ₁₁ FENO ₇)	2.28
Fosfato de Potasio Dibásico (K ₂ HPO ₄)	100
Fosfato de Potasio Monobásico (KH ₂ PO ₄)	60
Ácido Ascorbico (C ₆ H ₈ O ₆)	20
Cloruro de Sodio (NaCl)	200
Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	1 g
L-cisteína (C ₃ H ₇ NO ₂ S)	100
Bilis Bovina	25
Extracto de Levadura	1 g
Triptona	2

Todos los reactivos se disolvieron en 100 mL de agua destilada, se ajusto el pH a 7.8 y se pre-filtro con una membrana de 0.45 µm, la filtración final se realizo bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar con membrama de 0.22 µm. Se rotulo y se conservo a 4 °C. Se agregaron antibióticos y se suplemento con 10% de suero fetal bovino.