



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ACTIVIDAD ANTIGIARDIÁSICA *IN VITRO* DE LOS  
EXTRACTOS ETANÓLICO Y ACUOSO DE *BROMELIA  
KARATAS L.***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**SANTIAGO ANTONIO MURILLO PÉREZ**



**ASESORA: M. EN C. YADIRA RUFINO GONZÁLEZ**

**CIUDAD DE MÉXICO, 2020**



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

Murillo

Pérez

Santiago Antonio

55 39 79 55 70

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

311096503

2. Datos del tutor(a)

M. en C.

Yadira

Rufino

González

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Martha

Ponce

Macotella

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Yolanda

Vera

Montenegro

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Rogelio

Aguilar

Aguilar

6. Datos del sinodal 4

M en C.

Isabel Cristina

Cañeda

Guzmán

7. Datos del trabajo escrito

Actividad anti-giardíasis *in vitro* de los extractos etanólico y acuoso de *Bromelia karatas* L.

77 p.

2020

## **Dedicatoria**

A mis padres Juan Carlos y Josefina, al igual que a mi tía abuela Concepción, los cuales han sido los pilares de mi formación, educación y principios. Al resto de mis familiares y amigos que confiaron en mi para terminar esta etapa tan importante de mi vida.

A Heiri y Dulce por la fidelidad, amistad y cariño que compartimos en el laboratorio y en la carrera. A Fernanda y José Luis por brindarme su amistad y por haber compartido buenos momentos durante nuestra estancia en la facultad.

A mis colegas y amigos veterinarios del Departamento de Parasitología con los que realicé mi servicio social, los cuales me apoyaron hasta el final y siempre me recibieron en el laboratorio con los brazos abiertos, sobre todo, la Dra. Irene Cruz Mendoza, Nelyda Saldaña Hernández y el Dr. Juan Antonio Figueroa Castillo.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por darme la oportunidad de formarme cómo profesional y darme todo lo que necesito para tener un futuro brillante y prometedor.

A mi asesora, la M en C. Yadira Rufino González y a mi sinodal la Dra. Martha Ponce Macotela, por el esfuerzo de terminar este trabajo juntos, por la gran paciencia que tuvieron conmigo, por el conocimiento tan extenso que recibí y sobre todo porque creyeron en mí en momentos difíciles. También al Instituto Nacional de Pediatría por haberme recibido y darme el material para trabajar en mi proyecto, a los miembros del Laboratorio de Parasitología Experimental por el apoyo, los consejos, y por compartir su conocimiento.

A la Dra. Yolanda Vera Montenegro, al Dr. Rogelio Aguilar Aguilar y a la M. en C. Isabel Cristina Cañeda Guzmán, por ser parte de mi jurado, por revisar mi trabajo y sus observaciones, las cuales fueron fundamentales para esta tesis.

A la Dra. Carolina Granados Mendoza, al Dr. Jerónimo Reyes Santiago y al Instituto de Biología en general, por asesorarme con la identificación de los frutos, por la atención brindada y por la amabilidad recibida.

## Índice:

### Contenido

1.0	Introducción .....	9
1.1	Generalidades .....	9
1.1.1	Historia .....	9
1.1.2	Clasificación .....	10
1.1.3	Especies del Género <i>Giardia</i> :.....	11
1.1.3.1	Ensamblés:.....	13
1.1.4	Morfología .....	14
1.1.5	Ciclo de vida (Mecanismo de infección): .....	15
1.1.6	Mecanismos de transmisión .....	17
1.1.7	Manifestaciones Clínicas.....	18
1.1.8	Epidemiología.....	19
1.1.8	Mecanismos Patogénicos.....	20
1.1.9	Mecanismos de defensa contra la respuesta inmune .....	22
1.1.9.1	Estructura química de las VSP .....	23
1.1.10	Diagnóstico.....	23
1.1.11	Tratamiento .....	24
1.2	Medicina tradicional mexicana .....	30
1.3	Familia Bromeliaceae .....	36
1.4	<i>Bromelia karatas</i> .....	37
1.4.1	Biología y Distribución de <i>B. karatas</i> .....	37
1.4.2	Características Morfológicas de <i>B. karatas</i> .....	37
1.4.3	Características químicas del fruto de <i>B. karatas</i> .....	40
1.4.4	Actividad Biológica de <i>Bromelia karatas</i> .....	42
1.4.5	Usos tradicionales de los frutos del género <i>Bromelia</i> y de <i>B. karatas</i> .....	43
2.0	Objetivo general .....	44
2.1	Objetivos particulares .....	44
3.0	Preguntas de Investigación .....	44
4.0	Hipótesis.....	44
5.0	Planteamiento del problema.....	44
6.0	Justificación.....	44

7.0 Material y Método.....	45
7.1 Obtención e Identificación de los frutos.....	45
7.2 Preparación de los extractos acuoso y etanólico .....	46
7.3 Cuantificación de Proteínas.....	46
7.4 Ensayos <i>in vitro</i> .....	47
7.5 Obtención del <i>IC50</i> .....	48
7.6 Morfología del trofozoíto de <i>G. intestinalis</i> .....	48
8.0 Resultados .....	49
8.1 Identificación de frutos.....	49
8.2 Obtención de los extractos .....	49
8.3 Cuantificación de proteínas .....	49
8.4 Ensayos <i>in vitro</i> .....	49
8.5 Obtención del <i>IC50</i> .....	53
8.6 Morfología de los trofozoítos después de aplicar el <i>IC50</i> .....	53
9.0 Discusión.....	62
10.0 Conclusiones y Perspectivas.....	62
11.0 Referencias .....	62



## Resumen

*Giardia intestinalis* es un protozooario endoparásito con dos fases en su ciclo de vida: el trofozoíto y el quiste. Tiene distribución cosmopolita, la prevalencia en países en vías de desarrollo llega hasta el 40.7%. En los países desarrollados varía entre el 0.4 -7.6 %. En México la prevalencia es variable, depende del lugar, tipo de estudio y población, se ha reportado hasta el 55 % de seropositividad.

Para el tratamiento de la giardiasis, se utilizan los siguientes fármacos: Nitroimidazoles (Metronidazol, Tinidazol, Ornidazol y Secnidazol), Benzimidazoles (Albendazol, Mebendazol), Nitrotiazoles (Nitazoxanida), Quinacrina y Furazolidona. Sin embargo, la eficacia y sus efectos secundarios son variables. Por lo que, es indispensable la búsqueda de tratamientos alternativos. Las plantas son una opción considerable por sus propiedades y efectos que pueden poseer actividad anti-giardiasis.

En el presente trabajo se evaluó la actividad anti-giardiasis de los extractos acuoso y etanólico del fruto de *Bromelia karatas* en dos aislados: HGINV y WB. Los ensayos *in vitro* se realizaron en placas de 96 pozos y la viabilidad se obtuvo con el Kit XTT. Las concentraciones evaluadas fueron: 0.075, 0.15, 0.3, 0.6 y 1.2 µg/ml para el extracto acuoso y 0.08, 0.16, 0.328, 0.66 y 1.31 µg/ml para el extracto etanólico. Los porcentajes de muerte de los trofozoítos fueron los siguientes para el aislado WB: 12.06, 30.03, 27.92, 32.16 y 55.38 % con el extracto acuoso. Para el etanólico fueron: 10.71, 11.25, 40.65, 55.01 y 95.32%. En HGINV obtuvimos: 8.87, 17.92, 18.89, 38.21 y 51.22% con el extracto acuoso. Para el extracto etanólico se obtuvieron: 5.69, 5.14, 17.04, 55.57 y 72.46%

El IC50 se obtuvo con el programa JMP, y solo se utilizó el extracto etanólico. Se expusieron los trofozoítos del aislado WB con el IC50 de dicho extracto, para observar posibles daños morfológicos con la tinción de Giemsa. Los trofozoítos se midieron con el programa Imagine pro Insight usando el microscopio óptico.

## 1.0 Introducción

### 1.1 Generalidades

La Giardiasis es una parasitosis que afecta al humano, su agente etiológico es el protozoo endoparásito *Giardia intestinalis* (*G. intestinalis*); en cuanto a sus molestias, puede pasar por desapercibido (asintomática) o presentar sintomatología, con molestias gastrointestinales como: diarrea, dolor abdominal, mareo y vómito. Este protozoo afecta más a los niños y a las personas inmunocomprometidas. *G. intestinalis* junto con *Cryptosporidium spp* son los protozoarios más frecuentes en muestras de agua, demostrado en diferentes países de América Latina durante 1979-2015 (Rosado et al., 2017).

#### 1.1.1 Historia

Es probable que el conocimiento de los protozoarios haya empezado por las observaciones de Anthon Van Leeuwenhoeck de Delphis; con la ayuda de los microscopios que el mismo fabricó. En las notas que él enviaba a la Royal Society of London, describió los síntomas que el mismo presentaba. Observó una muestra de sus evacuaciones diarreicas, justo después de haberse alimentado, y describió lo que observaba en sus propias heces (Tsuji, 2009).

Éstas notas sirvieron como testimonio de que probablemente se trataba de *Giardia intestinalis*, ya que describió morfológicamente a estos organismos, y los nombró “animáculos”.

Desafortunadamente para Leeuwenhoeck en ese tiempo, su aporte a la ciencia no obtuvo la relevancia que se merecía ante la Royal Society of London. Actualmente su logro es reconocido en todo el mundo, ya que fue capaz de descubrir y describir a un ser vivo más pequeño que las pulgas de agua, reportadas por Swammerdam en esa época (Tsuji, 2009).

Posteriormente en 1859 Lambl describió con mayor detalle a este organismo, inicialmente pensó que dicho organismo pertenecía al género *Cercomonas* y lo nombró *Cercomonas intestinalis* (Adam, 2001). Los datos históricos no se limitan sólo a la especie que parasita al humano, sino que también existen indicios de otras especies, que infectan a hospederos vertebrados. En 1879, Grassi nombró a un

organismo que encontró en roedores como *Dimorphus muris* (actualmente *Giardia muris*). Entre 1882 y 1883, Kunstler describió a un organismo que se encuentra en el interior de renacuajos, denominando al género *Giardia* por primera vez, al nombrar a esta especie como: *Giardia agilis*. En 1888, Blanchard sugirió el nombre de *Lambliia intestinalis*, que Stiles en 1902 cambió a *G. duodenalis*. Posteriormente, Kofoid y Christiansen propusieron las especies *G. lamblia* en 1915 y *G. enterica* en 1920 (Adam, 2001).

En los años posteriores inició una controversia respecto al criterio de como clasificar diferentes especies de *Giardia*, el cual, prácticamente se dividió en dos formas: algunos investigadores sugirieron nombres de especies en función del hospedero de origen y otros se centraron en la morfología.

El nombre de la especie *G. lamblia* fue ampliamente aceptado a lo largo de la década de 1970. Sin embargo, en la década de 1980, se utilizó como sinónimo: *G. duodenalis* (Adam, 2001). Después, en 1990, la OMS decidió llamarle a esta especie *Giardia intestinalis* (Ponce & Martínez, 2014)

### 1.1.2 Clasificación

En este trabajo se tomará en cuenta la Clasificación propuesta por (Adl et al., 2019).

*Dominio Eukarya*

*Reino Protista*

*Grupo Excavata*

*Phylum Metamonada*

*Clase Fornicata*

*Orden Diplomonada*

*Subfamilia Giardiinae*

*Género Giardia*

Los organismos del Phylum *Metamonada* (Grassé 1952; Cavalier Smith 1987) agrupa a organismos anaerobios o microaerófilos, ya sea que pueden carecer de mitocondrias o presentar mitocondrias modificadas que carecen de crestas y de un genoma (hidrogenosomas ó mitosomas) y son no respiratorias. Aunque en su mayoría son células ciliadas, ancestralmente, un cinétido consta de 4 cinetosomas, existe una gran variación, algunos de estos organismos son de vida libre, y otros endobióticos o parásitos (Adl et al., 2019; Cavalier, 1998).

La Clase *Fornicata* (Simpson 2003) agrupa a organismos que presentan un solo cinetido y núcleo, o un par de cinetidos y núcleos. Los cinétidos constan de 2-4 cinetosomas. Mitocondrias no respiratorias sin crestas (Adl et al., 2019). Apomorfía: “Fibra B”, que se origina contra la raíz microtubular R2 (secundariamente perdida en Diplomonadida y Caviomonadidae (Adl et al., 2019).







Los organismos del Orden *Diplomonada* (Wenyon 1926), presentan, un par de cinetidos y dos núcleos. Cada cinetido generalmente con cuatro cinetosomas ciliados. Pueden ser de vida libre o endobiótica, generalmente parasitaria. Apomorfia: organización celular diplomonada (Adl et al., 2019).

La Subfamilia *Giardiinae* (Kulda & Nohýnková 1978,) agrupa a organismos sin aparato de alimentación distinguible; de cada cinétido se dirige un flagelo hacia la región posterior, es intracitoplasmático, con código genético estándar y con una organización celular “diplomonada” (Adl et al., 2019).

### 1.1.3 Especies del Género *Giardia*:

El género *Giardia* está representado por 6 especies. Filice (1952) describió tres especies en base a la morfología del trofozoíto y del cuerpo medio: *G. duodenalis*, *G. muris* y *G. agilis* (Adam, 2001), posteriormente agregaron 3 especies más: *G. ardeae* y *G. psittaci* en aves y *G. microti* en ratones (Reboredo-Fernández et al., 2017). En la Tabla 1 se indican las características de las especies de *Giardia*.

Tabla 1.- Especies de *Giardia*

Especie	Hospedero	Características	Medidas (LXA) $\mu\text{m}$	Imágenes	Referencias
<i>Giardia intestinalis</i>	Mamíferos	Trofozoitos en forma de pera con uno o dos cuerpos medios transversales en forma de garra.	12-15 X 5-9		Adam RD, 2001 Rocha Gadelha et al., 2017
<i>Giardia agilis</i>	Anfibios	Los trofozoitos son largos y angostos con cuerpo medio en forma redonda .	19.7 X 3.9		Sogayar, & Gregório, 1998 Feely & Erlandsen 1985
<i>Giardia ardeae</i>	Aves (garzas)	Redondos con una muesca prominente en el disco ventral y un único flagelo caudal en el lado derecho, con el izquierdo vestigial, cuerpo medio ovalado redonda o en forma de clava .	10 X 6.5		Erlandsen et. al .1990 Thompson & Monis, 2011
<i>Giardia psittaci</i>	Aves (psitácidos)	Cuerpo medio en forma de clava	14 X 6		Erlandsen & Berrick, 1987
<i>Giardia muris</i>	Roedores	Trofozoito y cuerpos medios redondos .	7-13 X 5-10		Adam RD, 2001 Burr et. al. 2012
<i>Giardia microti</i>	Roedores	Trofozoitos piriformes. Los quistes presentan dos trofozoitos con los discos ventrales maduros.	12-15 X 6-8		Feely, 1988 Thompson & Monis, 2011

Los trofozoítos de *G. intestinalis* son morfológicamente indistinguibles y, parasitan a un gran número de hospederos mamíferos. Sin embargo, con la aplicación de técnicas moleculares se ha demostrado que dentro de esta especie se encuentran diferentes ensambles o grupos (Xiao & Fayer, 2008).

#### 1.1.3.1 Ensamblés:

Los análisis filogenéticos de *G. intestinalis* muestran ocho ensambles de la A a la H, de los cuáles el ensamble A y B se dividen en grupos. Estos ensambles presentan una gran diversidad de hospederos mamíferos, incluyendo a los humanos (Feng & Xiao, 2011; Zhong et al., 2017, Durigan et al., 2018). Los ensambles A y B son los que infectan a los humanos (Tabla 2).

Tabla 2. Ensamblés de *G. intestinalis*

Ensamble	Grupos	Hospederos
A	AI, AII, AIII	Humanos, animales de granja (bovinos, ovinos, caprinos, porcinos y equinos), animales de compañía (caninos y felinos) y animales silvestres (castores, cuyos, etc.)
B	BIII and BIV	Humanos, caninos, chinchilla, castores, ratas, etc.
C		Perros
D		Perros
E		Mamíferos con pezuña o de granja: ganado bovino, búfalos, ovejas, cabras y cerdos
F		Gatos
G		Ratas
H		Focas

Adam, 2001. Otero, Ibarra, Martínez, & Ponce, 2011. Lasek, Welch, & Sogin, 2010

Los ensamblajes A y B de *G.intestinalis* se consideran especies zoonóticas por la transmisión animal - hombre (Reboredo et al., 2017).

#### 1.1.4 Morfología

Este protozooario presenta dos formas, la vegetativa o trofozoíto y el quiste que soporta las condiciones ambientales adversas.

Trofozoíto: Es piriforme, tiene simetría bilateral, con un extremo anterior ancho y un extremo posterior delgado. Su longitud es de 12 a 15  $\mu\text{m}$  por 5 a 9  $\mu\text{m}$  de ancho y 1 o 2  $\mu\text{m}$  de espesor. El disco suctor se encuentra en la región antero ventral del trofozoíto; mide de 8 a 10  $\mu\text{m}$ , es cóncavo, ligeramente asimétrico y compuesto de tubulina, giardinas y otras proteínas contráctiles; la cresta lateral delimita la región periférica del disco (Tsuji, 2009, Ponce & Martínez, 2014). El axostilo es una estructura visible en la parte central del trofozoíto. En la región anterior se encuentran dos núcleos idénticos y ovalados, con una enorme masa de cromatina central. Sobre el axostilo se encuentran los cuerpos medios. Los trofozoítos presentan 4 pares de flagelos: el anterior, posterior, ventral y caudal (Fig. 1 y Fig. 2). En el citoplasma se encuentran ribosomas, microtúbulos, endomembranas y depósito de glucógeno. Carecen de mitocondrias y Aparato de Golgi (Romero, 2007).

Los trofozoítos se replican aproximadamente al mismo tiempo (Wieseahn et al., 1984, Narcisi et al., 1998). Además, durante la división celular, los núcleos se mueven lateralmente, seguidos por la replicación nuclear, lo que resulta en trofozoítos con cuatro núcleos, los cuales se dividen por el plano longitudinal, de tal manera que mantienen la asimetría izquierda-derecha (Kabnick & Peattie, 1990).

Las proteínas contráctiles del disco ventral (actina,  $\alpha$ -actina, miosina y tropomiosina), son la base bioquímica involucrada en la adherencia. La adhesión depende del metabolismo activo y es inhibido por temperaturas inferiores a 37 ° C, niveles elevados de oxígeno o concentraciones reducidas de cisteína (Adam, 2001).

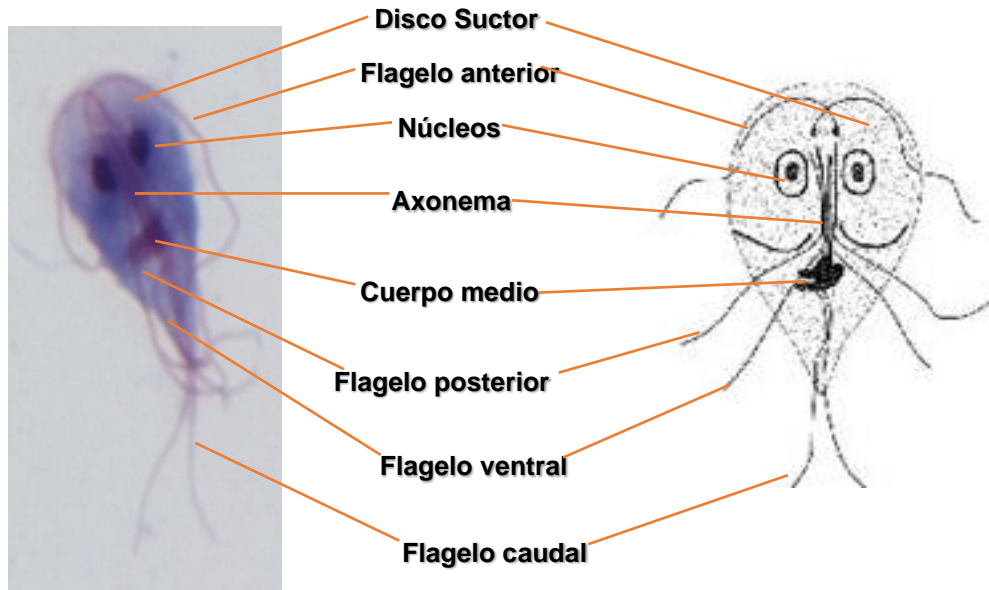


Figura 1.- Morfología del Trofozoíto, teñido con Giemsa 100X (Murillo, 2019)

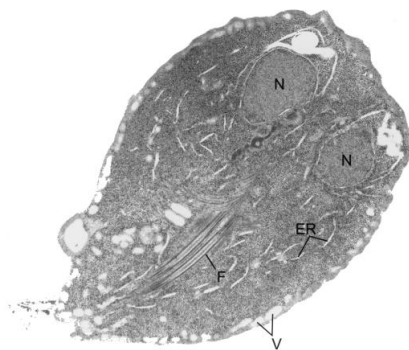


Figura 2.- Microfotografía de Transferencia del trofozoito de *G. intestinalis*, N: núcleos, F: flagelos, ER:retículo endoplásmico y V: vacuolas. Tomada de Adam, 2001

Quiste: Estructura ovalada que mide entre 8 hasta 11  $\mu\text{m}$  de largo por 7 a 11  $\mu\text{m}$  de ancho. La pared del quiste, mide de 0.3 a 0.5  $\mu\text{m}$ , está compuesta por una capa filamentosa externa y una membranosa interna. Internamente en el citoplasma se encuentran de 2 a 4 núcleos, tienen restos de flagelos y en ocasiones se observan los cuerpos medios, vacuolas y fragmentos del disco suctor (Fig. 3 y Fig. 4) (Romero, 2007). Al menos se han encontrado e identificado cuatro proteínas en la pared externa del quiste con los siguientes tamaños: 29, 75, 88 y 102 kDa (Erlandsen et al., 1990).



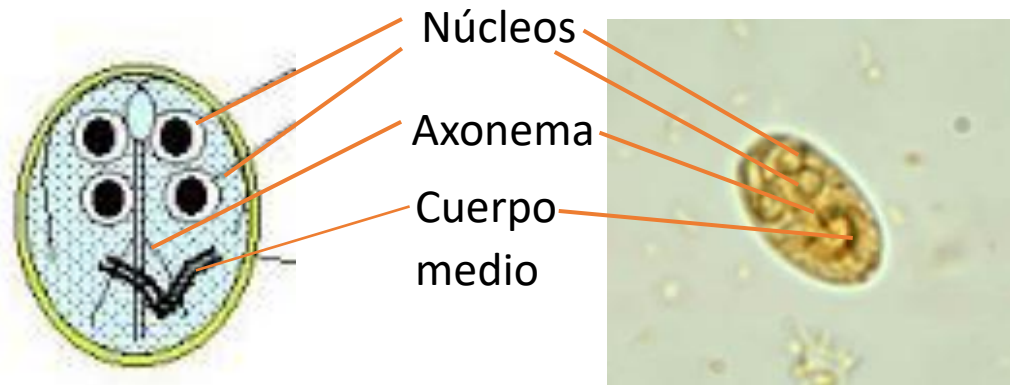


Figura 3.- Morfología del quiste de *G. intestinalis*. esquema tomado de Parasitología Química, 2013 y foto de Tapia et al., 2011.

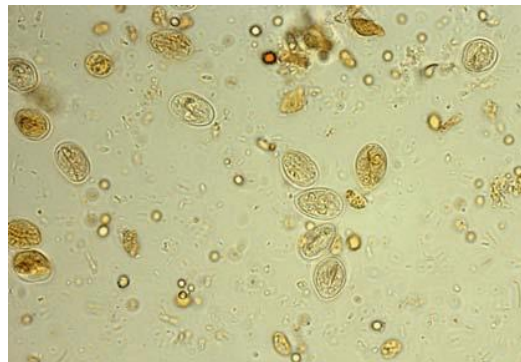


Figura 4.- Quistes de *G. intestinalis* obtenidos de un paciente de Sudán del Sur 100X. En: Bayoumi et al., 2016.

#### 1.1.5 Ciclo de vida (Mecanismo de infección):

El ciclo de vida de *G. intestinalis* es directo, solo se necesita un hospedero. Una persona infectada liberará a los quistes por medio de sus heces. De tal manera que una persona se puede infectar por ingerir quistes en agua, frutas o verduras contaminadas. Una vez que son ingeridos los quistes, inicia el desenquistamiento por el cambio del pH ácido en el estómago y pH alcalino en el duodeno, cambiando la morfología del parásito: de quiste a trofozoíto. Los trofozoítos empezarán a dividirse por fisión binaria longitudinal y se adhieren con su disco suctor en la superficie de las microvellosidades, generando una capa de trofozoítos (Adam, 1991), provocando la sintomatología de la giardiasis. A medida que los trofozoítos se replican y colonizan la superficie intestinal, algunos se enquistan en el yeyuno después de la exposición a las secreciones biliares (Fig. 5).

Se induce el enquistamiento de los trofozoítos principalmente por la presencia de un pH alcalino de 7.8, sales biliares conjugadas, más ácidos grasos (Adam, 2001). Es importante mencionar que, el colesterol es indispensable para un buen medio de crecimiento (Adam, 2001).

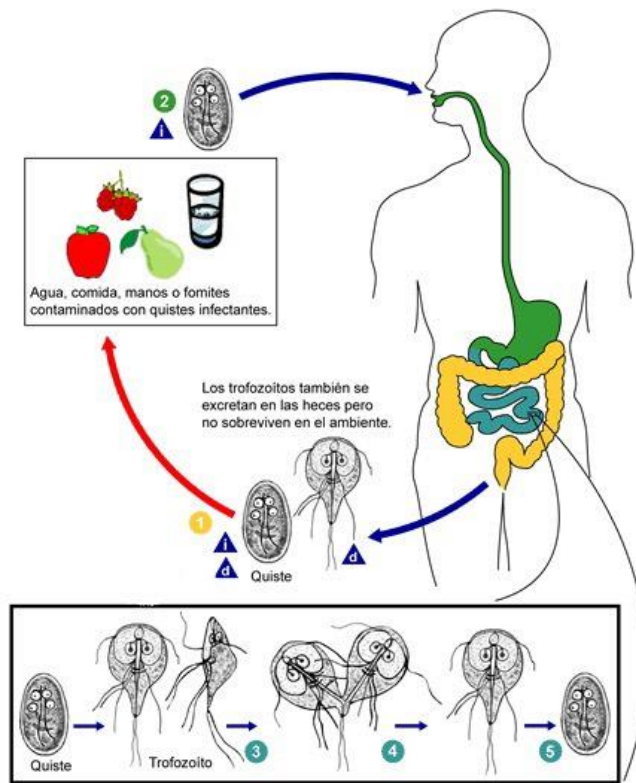


Figura 5.- Ciclo de vida de *G. intestinalis*, "i": Estado infeccioso, "d": Estado diagnóstico. Tomado de: Centers of Disease Control and Prevention, 2017.

### 1.1.6 Mecanismos de transmisión

El fecalismo es el mecanismo de infección más común, ya sea de manera directa (ano-mano-boca) o de manera indirecta (alimentos y agua, incluso en lugares acuáticos recreativos). Además, el hacinamiento, facilita la transmisión de persona a persona, entre miembros de la familia y en guarderías infantiles. Otra vía de transmisión es la sexual, especialmente en el sexo anal, en donde al menos una persona se encuentra infectada con *G. intestinalis*. Independientemente de la vía de transmisión, una infección por giardiasis puede iniciar cuando el hospedero ingiere mínimo 10 quistes (Muhsen & Levine, 2012).

Varios de los mecanismos de transmisión de *G. intestinalis* ocurren por factores sociales, por ejemplo: las costumbres, la educación y la posición económica de las personas.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso tres estrategias principales de control para prevenir las infecciones parasitarias intestinales a nivel escolar: tratamiento periódico de desparasitación; saneamiento mejorado y suministro de agua segura; y educación para la salud. Sin embargo, existe una evidencia muy limitada del efecto combinado de estas intervenciones en las tasas de reinfección por helmintos y protozoos entre los escolares indígenas, particularmente en áreas remotas (Monárrez et al., 2011). Es recomendable hacer campañas de prevención, sobre todo en las zonas rurales del país, donde la difusión de la información no puede llegar de una u otra forma.

#### 1.1.7 Manifestaciones Clínicas

La parasitosis puede cursar como asintomática o sintomática aguda ó crónica. El periodo de incubación es de 6 a 15 días. En la fase aguda, algunos individuos eliminan pronto la infección, otros cursan con síntomas como: diarrea grasosa y de mal olor (esteatorrea) (Bartelt & Sartor, 2015), dolor abdominal, náuseas, vómitos, flatulencia, anorexia y fiebre (Muhsen & Levine, 2012). En la fase crónica, donde la infección dura mucho más tiempo, la sintomatología se acentúa, hay malabsorción de vitaminas A y B12, d-xilosa, hierro y zinc, también puede haber una deficiencia de la lactasa desde un 20 hasta el 40% (Solomons, 1982). También puede presentarse el síndrome del intestino irritable (SII), alergias a los alimentos, o síndrome de fatiga crónica (Einarsson et. al., 2016).

Las observaciones experimentales y clínicas indican que la causa principal de la diarrea en la giardiasis es la malabsorción. Se ha propuesto que la malabsorción participa en el deterioro del crecimiento, pero no se ha relacionado causalmente con él (Oberhuber et al., 1997).

### 1.1.8 Epidemiología

Éste parásito es cosmopolita y se estima que su prevalencia en países en vías de desarrollo llega a ser hasta del 40.7%, mientras que, en los países desarrollados oscila entre el 0.4 -7.6 % (Feng & Xiao, 2011; Norhayati, 2003).

En Italia, su prevalencia es de 2.7% (Crotti et al., 2005), mientras que para el norte de Portugal es de 4% (Almeida et al., 2006). Sin embargo, para Majadahonda, Madrid, España, es de 15.6% y en niños oscila entre el 3% al 25% (Mateo et al., 2014).

En países en vías de desarrollo se presentan prevalencias variables en poblaciones pediátricas, por ejemplo, en Huánuco , Perú, fue de 15.1% (Choi & Kim, 2017). En otro estudio realizado en Antioquia, Colombia, registraron el 27.6% (Botero et al., 2009), y en 4 localidades de Argentina solo fue de 7.2% de prevalencia(Periago et al., 2018). En otro estudio que se realizó en Quetzaltenango, Guatemala; en niños entre 1.5 a 7 años, donde se analizaron 75 muestras durante 5 semanas por medio de ELISA. La prevalencia en la semana 0 fue del 43.7% y en la semana 4, 44.7% (Duffy et al., 2013). En otro estudio que se realizó en la Región Manisa, Turquía, analizaron muestras de heces obtenidas de 3216 pacientes de una población pediátrica (0 a los 15 años), registrando una prevalencia para *G. intestinalis* del 40.1% (Gündüz et al., 2005).

La frecuencia de giardiasis en nuestro país es variable, dependen del lugar, tipo de estudio y población. En un estudio realizado en Cananea, Sonora; en niños con edad promedio de 8 años se reportó una prevalencia del 23% (Quihui-Cota et al., 2017). En otro estudio se realizaron pruebas de seropositividad en diversas zonas de México, se reportó una prevalencia de giardiasis hasta del 55 % (Cedillo-Rivera et al., 2009). En la Ciudad de México se reportó una prevalencia del 50% en niños menores de un año (Sánchez et al., 2006).

Recientemente en las localidades de Paraíso y Xkalakdzonot, Yucatán, en una población conformada con menores de 17 años de ambos sexos se obtuvo una frecuencia de 26.5% (Panti et al., 2019).

### 1.1.8 Mecanismos Patogénicos

*G. intestinalis* causa daño en el hospedero por diferentes vías, pero principalmente empieza por la adherencia de los trofozoítos a la superficie del epitelio intestinal a través del disco adhesivo. En esta estrecha interacción, participan una serie de moléculas del parásito como las giardinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ) así como una red compleja de proteínas contráctiles (actina, alfa actina, miosina y tropomiosina) que son importantes en la unión del trofozoíto y desencadenan una serie de eventos que culminan en la producción de diarrea (Einarsson et al., 2016). Se consideraba que, los trofozoítos tanto en humanos como en modelos animales no invadían el tejido intestinal. Sin embargo, recientemente Reynoso et. al. 2015 demostró que los trofozoítos de un aislado (INP220806-HGINV (HGINV) que inicialmente se aisló *in vitro* y posteriormente se utilizó para instalar la infección en jerbos (*Meriones unguiculatus*), tienen capacidad invasora ya que se encontraron en la mucosa y submucosa de los jerbos infectados, para demostrarlo, los trofozoítos se inocularon en jerbos de 3 días de edad y posteriormente a los 21, 30 y 60 días, fueron sacrificados y al realizar el análisis histológico y ultraestructural se encontraron trofozoítos entre la células epiteliales, en la base de las células caliciformes vacías, en los vasos lactales y dentro de la submucosa, capacidad que no se presentó en los trofozoítos del aislado de referencia (WB), demostrándose otro mecanismo patogénico (Reynoso et al., 2015).

#### Traumático

La adhesión, ocasionada por ciertas proteínas contráctiles genera una interacción que, produce en el hospedero exfoliación, lisis celular, aumento del índice mitótico y aplanamiento de las microvellosidades (Ponce & Martínez, 2014).

Las uniones estrechas entre los enterocitos crean una barrera selectiva importante entre la luz intestinal y el tejido subyacente. *G. intestinalis* aumenta la permeabilidad al alterar las proteínas importantes que mantienen las uniones estrechas F-actina y zónula occludens-1 (ZO-1) (Einarsson et al., 2016). Se producen huecos tan grandes que, los trofozoítos podrían ingresar al epitelio intestinal. También aumentan las células caliciformes. Además, la discontinuidad epitelial, por si sola

produce despolarización de las membranas, desequilibrio electrolítico, hiperperistaltismo y diarrea (Ponce & Martínez, 2014).

#### Enzimático

Existen enzimas de *G. intestinalis* como: sulfatasas, fosfatasa ácida, hidrolasas, tiolproteinasas, etc. que favorecen la adherencia del parásito al epitelio intestinal, debido a que atacan a las glucoproteínas de los enterocitos y alteran la integridad de las microvellosidades (Ponce & Martínez, 2014).

#### Barrera Mecánica

Cuando las condiciones son óptimas, los trofozoítos crecen en forma vertiginosa y en algunas zonas se crearán barreras mecánicas, que influyen en la malabsorción del hospedero. En duodeno y yeyuno, la bilis favorece el crecimiento de este organismo (Ponce & Martínez, 2014).

#### Apoptosis

Se ha demostrado que, *Giardia* induce apoptosis en enterocitos y es dependiente de la caspasa-3. Se cree también que la apoptosis puede ser causa del aumento de la permeabilidad intestinal y también puede contribuir a la resolución de la inflamación (Ponce & Martínez, 2014).

#### Competencia con el hospedero

Los trofozoítos compiten con el hospedero por las sales biliares, colesterol y fosfolípidos. *Giardia* no puede sintetizar aminoácidos ni nucleótidos, pero cuando los necesita los adquiere del medio. Utiliza aspartato, alanina y arginina (Ponce & Martínez, 2014).

#### Autoinmune

Se ha informado que las células T CD8 + son responsables del acortamiento de microvellosidades difusas. La reducción de la longitud de las microvellosidades disminuye el área de absorción del intestino, lo que produce una malabsorción de agua, Na + y disacáridos, combinada con hipersecreción de Cl- (Einarsson et al.,

2016). Por lo tanto *G. intestinalis* posee también un mecanismo patogénico autoinmune (Cottonet al., 2011); ya que su infección desencadena a las células T CDB+, las cuales inducen apoptosis en células de las microvellosidades, provocando que haya una malabsorción aún más severa en el hospedero (Wissinger, 2014).

Todos los cambios, anteriormente mencionados, afectan el equilibrio electrolítico y causan un aumento de la permeabilidad intestinal, lo que lleva a la producción de diarrea. Los resultados patológicos, sin embargo, dependen de la virulencia del aislado y por lo tanto, las infecciones de *Giardia* podrían variar en cuestión del daño que provocan en el hospedero (Einarsson et al., 2016).

#### 1.1.9 Mecanismos de defensa contra la respuesta inmune

Para sobrevivir dentro del hospedero y evadir la respuesta inmune, *Giardia* muestra variación antigénica, y se ha demostrado que este fenómeno ocurre en diversos hospederos. Los trofozoítos se encuentran recubiertos de una determinada proteína de superficie que forma una verdadera interfaz entre el parásito y el medio, y que pertenece a una familia de proteínas denominadas proteínas variables de superficie (Variant-Specific Surface Protein, VSPs). *Giardia* cambia espontáneamente la expresión de sus VSPs, ya sea en cultivo o en respuesta al ataque inmunológico que estos antígenos inducen tanto en humanos como en animales de experimentación (Lujan, 2006). *Giardia* contiene en su genoma un repertorio de entre 150 a 200 genes que codifican estas proteínas, pero solamente una VSP se expresa en la superficie de los trofozoítos en un momento dado (Lujan, 2006). Las VSPs cambian espontáneamente cada 6 a 12 generaciones aproximadamente, cambio que también se ha observado durante el proceso de enquistamiento y desenquistamiento.

Se ha propuesto que la síntesis de las VSP se lleva a cabo en el retículo endoplásmico, y después se transportan a la membrana, donde la recubren de manera difusa. También las VSP se pueden detectar en cantidades menores en las vacuolas periféricas de tipo lisosoma, lo que sugiere la posibilidad de que estas vacuolas estén involucradas en el reciclaje de las VSP (McCaffery et al., 1994).

#### 1.1.9.1 Estructura química de las VSP

Estas proteínas tienen masas moleculares de 50 a 200 kDa, y, a pesar de ser antigénicamente diferentes entre sí y ser heterogéneas en lo que respecta a su tamaño molecular, poseen un dominio transmembrana altamente conservado y una porción carboxilo-terminal citosólica compuesta por sólo cinco aminoácidos (CRGKA). Su región N-terminal es altamente variable (dándole a cada una de estas proteínas la característica de ser antigénicamente diferentes), pero todas son ricas en cisteína (~12%), incluyendo una alta incidencia del tetrapéptido CXXC (donde X representa cualquier aminoácido) (Lujan, 2006).

*Giardia* evade la secreción de monóxido de nitrógeno (NO) del hospedero. En experimentos realizados *in vitro*, se comprobó que el monóxido de nitrógeno inhibe el crecimiento del parásito, el enquistamiento y el desenquistamiento. Sin embargo, este organismo compite con el hospedero por el aminoácido necesario para la fabricación de NO en células epiteliales: la Arginina. Al consumirse dicho aminoácido, la producción de NO disminuye y por lo tanto *G. intestinalis* evita ser atacada por ese compuesto (Eckmann et al., 2000).

#### 1.1.10 Diagnóstico

Los trofozoítos y/o quistes de *Giardia intestinalis* se diagnostican principalmente por examen microscópico, especialmente los métodos de concentración de heces (Autier et al., 2018). Se estima que, en un examen de una sola muestra de heces permitirá un diagnóstico del 60 al 80%, mientras que, en dos muestras de heces es del 80 al 90%, y será superior al 90% si se examinan tres muestras de heces (Hooshyar et al., 2019).

El Método de Flotación de Faust es recomendado para concentrar quistes de *Giardia*. En esta técnica se utiliza Sulfato de zinc al 2%, que permite, que las estructuras parasitarias con menor peso específico tiendan a flotar, manteniendo su estructura normal. El proceso se acelera al centrifugarse la muestra separando de una forma muy satisfactoria los elementos residuales en las heces (Figuroa et al., 2015).



Actualmente, las técnicas de biología molecular como PCR son auxiliares en el diagnóstico a partir de muestras provenientes de heces y utilizando genes específicos (Autier et al., 2018), cómo: *bg* (beta giardina), *gdh* (glutamato deshidrogenasa) (Rodríguez et al., 2014), SmB (Pequeña ribonucleoproteína nuclear B), SmD3 (Pequeña ribonucleoproteína nuclear D3) (Gómez & Wasserman, 2016), etc.

También se pueden utilizar técnicas inmunológicas como: El ensayo inmunofluorescente, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA,) (Hooshyar et al., 2019), la prueba de Inmunocromatografía con el Kit Crypto/Giardia KSeT® (Goudal et al., 2019), etc.

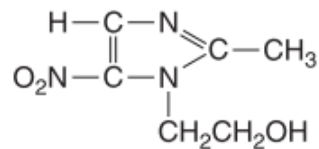
#### 1.1.11 Tratamiento

Para combatir la Giardiasis se utilizan los siguientes fármacos:

**Nitroimidazoles** (Metronidazol, Tinidazol, Ornidazol y Secnidazol)

Metronidazol

Originalmente llamado 1-(β -hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol, desde su descubrimiento y síntesis, se observó una actividad intensa, contra los protozoos anaerobios *T. vaginalis*, *E. histolytica*, tanto *in vitro* como *in vivo*. A partir de 1997 este fármaco se utilizó como anti-giardiasis (Busatti HG et al., 2012; Phillips & Stanley, 2011) (Fig. 6)



METRONIDAZOL

Figura 6.- Estructura química del Metronidazol, tomada de Phillips & Stanley 2011

## Mecanismo de acción

El metronidazol necesita de la activación reductiva del grupo nitro por parte de microorganismos susceptibles, los cuales contienen componentes de transporte de electrones como ferredoxinas, proteínas pequeñas con Fe-S con suficiente potencial redox negativo para donar electrones al metronidazol y la transferencia de un electrón forma un anión radical nitro muy reactivo que destruye microorganismos susceptibles por mecanismos mediados por radicales que actúan en DNA y quizá en otras biomoléculas vitales. El metronidazol reducido sirve como terminal aceptor de electrones que se une covalentemente a las macromoléculas de DNA, lo que resulta en daños en el DNA, pérdida de la forma de la estructura helicoidal y rotura de filamentos, con la posterior muerte del trofozoíto (Phillips Margaret A. & Stanley Samuel L., 2011).

## **Benzimidazoles:** Albendazol y Mebendazol

Son una buena opción durante el tratamiento, evitando así el aumento de resistencia a fármacos dentro de los aislados. El albendazol tiene el espectro de actividad más amplio de los benzimidazoles liberados hasta la fecha y ha sido ampliamente utilizado en la medicina clínica humana como un fármaco seguro. Este fármaco incluso puede ser utilizado para tratar casos de poliparasitismo (Gardner & Hill, 2001) (Fig. 7).

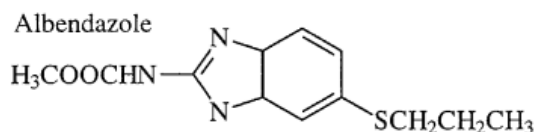


Figura 7.- Estructura química del Albendazol, tomada de Upcroft & Upcroft, 1998

## Mecanismo de Acción

Los benzimidazoles ejercen su efecto tóxico en *Giardia* al unirse al citoesqueleto de  $\beta$ -tubulina. Esta unión causa tanto la inhibición de la polimerización del citoesqueleto como la disminución de la captación de glucosa (Gardner & Hill, 2001).

## Nitrotiazoles (Nitazoxanida)

Es un antiparasitario sintético oral de amplio espectro, obtenido originalmente en 1980, con base en la estructura del antihelmíntico niclosamida. Las primeras pruebas de este fármaco, informaron que servía contra platelmintos, pero no tardaron en realizar más estudios *in vitro*, en donde se comprueba que también hay actividad contra helmintos y protozoarios intestinales. En el 2002 la FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos, aprobó este fármaco para tratar la criptosporidiosis y la giardiasis en niños (Phillips & Stanley, 2011).

En estudios *in vitro* se demostró que, la nitazoxanida y su metabolito activo, la tizoxanida (desacetil-nitazoxanida) inhiben la proliferación de *E. histolytica* y *T. vaginalis in vitro* (Fig 8). También posee actividad contra helmintos intestinales como: *Hymenolepis nana*, *Trichuris trichura*, *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Ancylostoma duodenale* y *Strongyloides stercoralis* (Phillips & Stanley, 2011).

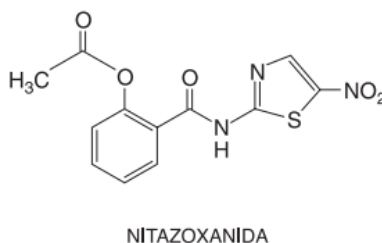


Figura 8.- Estructura química de la Nitazoxanida, tomada de Phillips & Stanley, 2011

Se desconocen los mecanismos exactos de acción, se ha propuesto que interfiere en la reacción de transferencia electrónica que depende de la enzima Piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR). Dicha reacción es esencial en el metabolismo anaerobio. La nitazoxanida al parecer no origina mutaciones de DNA, lo cual sugiere que su mecanismo de acción es diferente del de los nitroimidazoles (Phillips & Stanley, 2011).

## Quinacrina

Se introdujo por primera vez como un agente antimalárico en 1930, y más tarde se convirtió en el antimalárico de elección para las tropas aliadas en la Segunda Guerra Mundial por su mayor disponibilidad y mejor tolerancia en comparación con la quinina (Tracy & Webster, 1996). Después de la guerra, pronto se convirtió en un agente importante contra *G. intestinalis*, con una eficacia clínica del 90% o más. Sin embargo, cómo el mercado estadounidense estaba limitado al tratamiento de *Giardia* en ese entonces, el uso de quinacrina disminuyó y su producción en los Estados Unidos se suspendió en 1992, aunque aún puede obtenerse a través de una fuente alternativa (Gardner & Hill, 2001) (Fig. 9).

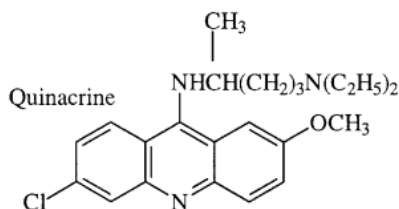


Figura 9.- Estructura química de la Quinacrina, obtenida de Upcroft & Upcroft, 1998.

El mecanismo de acción de la quinacrina no está completamente aclarado. El fármaco se intercala fácilmente con el DNA de *G. intestinalis*, y es esta interacción la que se cree que causa una inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (Tracy & Webster, 1996).

## Furazolidona

Es uno de los compuestos de nitrofuranos creados desde la década de 1940. Es eficaz contra muchas bacterias incluyendo *Klebsiella spp.*, *Clostridium spp.*, *Escherichia coli*, *Campylobacter spp.*, y *Staphylococcus aureus*. Ya en la década de 1950, la furazolidona estaba siendo utilizada en el tratamiento de la giardiasis. Este

fármaco está aprobado para su uso en los Estados Unidos y sigue siendo un importante agente terapéutico a nivel mundial (Gardner & Hill, 2001) (Fig. 10).

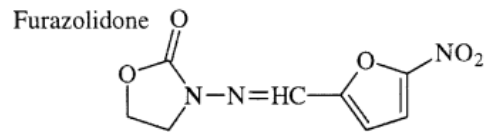


Figura 10.- Estructura química de la Furazolidona, obtenida de Upcroft & Upcroft, 1998.

El fármaco sufre una activación reductiva en el trofozoíto de *G. intestinalis*, pero, a diferencia del metronidazol, la reducción posiblemente se produzca a través de una NADH oxidasa (Upcroft & Upcroft, 1998). Este fármaco, tiene la capacidad de dañar componentes celulares importantes, entre ellos, el DNA (Gardner & Hill, 2001).

La dosis, efectos secundarios y eficacia de los fármacos con actividad anti-giardíasis se mencionan a continuación (Tabla 3).

Tabla 3.- Dosis para pacientes pediátricos y adultos.

Fármaco	Dosis pediátrica	Dosis en adultos	Eficacia (%)	Efectos Secundarios	Bibliografía
Metronidazol	125 mg por 5 ml para la edad de 2 ± 5 años o 250 mg por 5 ml para edades de 6 ± 11 años, diariamente durante 5 días.	2.4 g una sola dosis o la misma cantidad para dos días seguidos.	80 - 100	Náuseas, sabor metálico, mareos y dolor de cabeza.	Ortiz et al., 2001 Jokipii & Jokipii, 1979
Tinidazol	50 mg/kg en única dosis.	2 g en una sola dosis única.	90.5 – 100	Náuseas y fatiga, vomito, debilidad, mareo, o dolor de cabeza.	Escobedo et al. 2008 Jokipii & Jokipii, 1979
Nitazoxanida	7.5 mg/kg dos veces al día por 3 días 1,000 mg de Nitazoxanida en una dosis única.	500 mg 2 veces al día por 3 días consecutivos.	78.4 - 57.1 – 81	Efectos secundarios leves, transitorios, el síntoma más frecuente fue la diarrea	Escobedo et al. 2008 Speich et al., 2013 Rossignol et al., 2001
Albendazol	Única dosis diaria de 10 mg / kg durante 5 días.	Única Dosis diaria de 400 mg. por 5 días.	90.4 - 80+/-28	Anorexia, dolor abdominal, dolor de cabeza, náuseas, etc.	Yereli et al., 2004 Karabay et al. 2004
Mebendazol	200 mg tomados por día por 5 días.	200 mg 3 veces al día por 3 días	78.7 - 86	Dolor abdominal, vómito, náuseas y dolor de cabeza.	Canete et al, 2006 Almirall et al., 2011
Furazolidona	6 mg/kg, cuatro veces al día por 10 días.	100 mg 4 veces al día por 7-10 días	81.7 – 80 (a 85)	Orina oscura y mareos	Talari et al., 2006 Gardner & Hill, 2001
Quinacrina	8 mg / kg / día durante 5 días.	100 mg 3 veces al día durante 5 días	100% en giardiasis refractaria (n=13)	irritabilidad y somnolencia en un niño	Requena et al. 2017

Experimentalmente se han obtenido aislados de *Giardia* provenientes de pacientes que fueron resistentes al tratamiento con metronidazol. En el trabajo de Tejman-Yarden se indujo resistencia a 5 aislados de *G. intestinalis* con metronidazol y fueron inoculados a ratones de 3 a 7 días de nacidos. Solo dos aislados lograron infectar a los ratones (WB y aislado 106). También se realizó el ensayo con gerbos, en donde dos aislados consiguieron infectar, uno con mayor eficacia que el otro (WB-M2 y WB-M1 respectivamente). Mencionan que este caso de resistencia no está catalogado como un problema clínico para el tratamiento de la giardiasis, porque se comprobó que existe un costo de aptitud en aislados con resistencia adquirida; la cual se expresa como una infectividad atenuada. En donde, la capacidad de los trofozoítos para adherirse en superficies inertes o vivas se ve comprometida. Por lo tanto, los resultados de este trabajo y otros podrían explicar en parte la rareza de encontrar casos clínicos en donde el paciente esté infectado con aislados resistentes a metronidazol a pesar de ser una parasitosis cosmopolita (Tejman et al., 2011).

En un estudio que se realizó *in vivo* en un modelo de ratón, se logró obtener el IC50 de algunos fármacos conocidos. Con metronidazol fue de 40.8 mg/kg, para tinidazol 2.8 mg/kg, y para furazolidona 13.5 mg/kg, etc (Boreham et al., 1986).

Debido a las fallas en el tratamiento, y a los efectos secundarios que producen es necesario buscar alternativas para combatir la giardiasis

## 1.2 Medicina tradicional mexicana

La medicina tradicional es propia de un grupo y de una cultura, ya que los sistemas terapéuticos se construyen de acuerdo con las características culturales de los grupos. Si cambian, variarán también las maneras de entender la salud y la enfermedad, las formas de abordar los problemas y las propuestas de soluciones (Aparicio, 2005).

Las medicinas tradicionales incluyen a veces aspectos de índole espiritual, vivencial y anímica (Aparicio, 2005). Estos tratamientos son ancestrales, no solo en México, sino en el mundo. Actualmente, las instituciones científicas de países en desarrollo, y desarrollados están interesados en este campo (Ekor, 2014).

México es un país privilegiado por su biodiversidad; es el cuarto país megadiverso, después de Brasil, Colombia e Indonesia. Se estima que alberga entre el 10-12% de todas las especies del planeta, con un registro aproximado de 25 mil especies de plantas vasculares aproximadamente, y casi la mitad de las especies son endémicas del país (Sierra et al., 2014). De las especies de plantas con flores son aproximadamente 7,000 las que tienen una actividad medicinal (Martínez et al., 2006).

Ancestralmente, el humano utilizó a las plantas para su beneficio, siendo el uso medicinal, uno de los más importantes. Por ejemplo: La planta, *Aloe vera*, se ha aplicado a las heridas durante más de 5000 años por egipcios, romanos, pueblos indígenas de África, Asia y América; y sigue siendo un tratamiento de primera línea para quemaduras, úlceras y heridas quirúrgicas.

En Veracruz, México, la raíz de *Heliotropium indicum* (alacrancillo), se ha utilizado para el asma y complicaciones de la próstata. En la India utilizan el jugo como analgésico y en piquetes de insectos. En Nigeria la utilizan como antipirético y en úlceras. En Cuba machacan o maceran las hojas y la aplican en la piel, para las mialgias.

En Veracruz, las flores de *Bougainvillea glabra* con o sin canela, orégano y tomillo es usada para tratar la tos (Escamilla Pérez B. E. & Moreno Casasola P., 2015). El tomillo (*Thymus vulgaris*) de igual manera posee propiedades medicinales, como: antibiótico y antiséptico (Botanical-online, 2019).

Por otro lado, las hojas de *Elytraria imbricata* (Canastilla) se utilizan como antidiarreico, en picaduras de alacranes, y en algunas zonas de México las usan como analgésico en problemas renales. La raíz de *Acacia cornígera* (Cornizuelo) se ocupa como analgésico. Las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Epazote) se utilizan en enfermedades parasitarias, sobre todo de helmintos, pero también como analgésico, etc (Escamilla & Moreno, 2015).



Actualmente, a nivel mundial existen varios grupos de trabajo que se han enfocado en valorar *in vitro* compuestos provenientes de plantas para encontrar una actividad anti-giardíasis (Tabla 5 y Tabla 6)

Tabla 5.- Especies de plantas que se ocupan en la medicina tradicional mundial como anti-giardíacos, en estudio *in vitro*.

Especie	Usos en la medicina tradicional	Tipo de extracto ó compuesto	Actividad anti-giardíaca ( $IC_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ )	Referencias
<i>Solanum lycocarpum</i> (Lobeira)	Hipoglucemia, Antiparasitario: <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Leishmania infantum</i> , <i>Leishmania amazonensis</i> , <i>Strongyloides stercoralis</i> y <i>Schistosoma mansoni</i> .	Mezcla de glicoalcaloides (solasonina y solamargina).	13.23	Martins et al., 2015
<i>Mentha x piperita</i> (menta)	Se utiliza para tratar: náuseas, flatulencia, vómitos, indigestión, calambres estomacales, menstrual calambres y parasitosis	Metanólico Fracción de Diclorometano	0.8 0.75	Vidal et al. 2007
<i>Cymbopogon citratus</i> (pasto limón)	Bactericida, fungicida, antidiarreica, antiinflamatoria y antipirética	Acuoso de hojas secas	93.8/24 horas y 60.4 /48 horas.	Eman et al., 2018.
<i>Coptosapelta flavescens</i>	Se utiliza para expulsar helmintos y contra protozoarios	CFQ (1-hidroxi-2 hidroximetilanttraquinona)	0.42	Houkngong et al., 2015
<i>Dalbergia frutescens</i>	Antiasmático, antiinflamatorio, y anticonvulsivo.	Formononetin y pseudobaptigenin	30 ng/ml y .56	Khan et al., 2000
<i>Adansonia digitata</i>	Antipirético, antidiarreico, antimalárico, deficiencia de vitamina C y antidisentérico.	Etanólico de las hojas	25.74 para después de 4 días	Kabbashi & Abdrabo, 2015

Tabla 6.- Especies de plantas con actividad anti-giardiasica en la medicina tradicional mexicana

Especie	Usos en la medicina tradicional	Tipo de extracto o compuesto	Actividad anti-giardiasica ( $IC_{50}$ $\mu$ g/mL)	Referencias
<i>Elaeodendron trichotomum</i> (cheechem blanco)	Antiinfeccioso, antipirético y como agente antitumoral	Acuoso de raíz	.44	Roca et al. 2016.
<i>Piqueria trinervia</i> (Hierba de San Nicolás o 'hierba de tabardillo)	Se ha utilizado desde el siglo XVI como antipirético y antipalúdico,	Tinervinol Piquerol Fracciones 1 y 2 y el aceite rojo	2.02 2.42 5.03, 3.38 y 5.66	Rufino et al. 2017
<i>Salvia polystachya</i> (Chía)	Trata la disentería, servir como purgante, antipirético y problemas gástricos.	Polistaquina A: Polistaquina B: Polistaquina D: Linearolactona:	134.7 107.8 107.5 28.2	Calzada et al., 2010
<i>Dorstenia contrajerva</i>	Desordenes gastrointestinales	Metanólico	23.3	Calzada et al., 2006
<i>Senna racemosa</i> (K'aanlool)	Las infusiones de hoja, raíz y corteza son recomendadas para el tratamiento de diarrea, infecciones oculares, diabetes, dolor de oído, dolor de cabeza, molar, abdominal y epigástrico.	Metanólico de corteza Cassin	2.10 3.28	Moo et al., 2007
<i>Persea americana</i> (Aguacate)	La semilla del aguacate se ocupa en la medicina tradicional para tratar erupciones en la piel, diarrea, disentería, procesos infecciosos causados por hongos y bacterias, asma, hipertensión arterial y el reumatismo.	A partir de la semilla: Cloroformo Etanólico.	0.634 0.486	Jiménez et al., 2013

<i>Marrubium vulgare</i> . (llamado marrubio, hierba del sapo)	trata la bronquitis, la tos y los resfriados.	Acetónicos y metanólicos de <i>M. vulgare</i> de hoja/tallo.	90 34	Ramos et al., 2007
<i>Geranium mexicanum</i> (pata de leon)	Utilizada como purgante, y como remedio contra la amigdalitis, la tos, la tos ferina, la urticaria, la disentería y diarrea.	Epicatequina	1.6	Calzada et al, 2005
<i>Tridax procumbens</i> (manzanilla)	Enfermedades diarreicas.	Extracto metanólico de toda la planta	6.34	Peraza et al., 2005

### 1.3 Familia Bromeliaceae

Agrupada a tres subfamilias: Pitcairnioideae, Bromelioideae y Tillandsioideae, 58 géneros, con aproximadamente 3172 especies. Dichas plantas se distribuyen en México, Belice, Guatemala, Panamá, las Antillas, norte de Sudamérica y una sola especie se ubica en el oeste de África. En México se han registrado 18 géneros y 342 especies de la subfamilia Bromelioideae; las cuales habitan en clima cálido desde el nivel del mar y hasta los 200 m de altitud, asociadas a dunas costeras y bosque tropical caducifolio (Meza et al., 2017).

Los organismos de esta familia, tienen hábitos de hierbas, epífitas o terrestres. Los tallos generalmente son obsoletos, cortos y gruesos sin ramificaciones, rara vez colgantes; la ligula está entera, con color diferenciado respecto a la lámina, a veces con pelos absorbentes para retener agua y nutrientes. Sus hojas son alternas, a menudo espiraladas en rosetas, lineares a ensiformes o triangulares, rígidas, venación paralela, indumento de pelos simples, peltados o estrellados, margen entero a espinoso o espinuloso. Entre los géneros representativos se encuentran: *Aechmea*, *Bromelia* (Fig. 11) y *Pitcairnia* (Castro, 2013).



Figura 11.- *Bromelia karatas*. Hojas y frutas. (<https://www.backyardnature.net/chiapas/pinuela.htm>.)

Conrad, 2017

Las inflorescencias son variables, terminales, espigadas, racemosas, etc. Generalmente poseen brácteas coloridas, dispuestas en espiral o dísticas, cubriendo cada flor. Flores actinomorfas o zigomorfas, bisexuales a veces unisexuales; 3 sépalos, libres o connados; 3 pétalos, libres o soldados, llamativamente coloreados; 6 estambres, en dos series; ovario superior (Tillandsioideae) o ínfero (Bromelioideae), con 3 carpelos y 3 lóculos, 3 estigmas; placentación axial, óvulos numerosos. Los frutos son cápsulas septicidas o loculicidas, bayas o múltiples (*Ananas*). Semillas: Desde 1 a muchas por lóculo, con o sin apéndices, aladas, caudadas o plumosas (Castro, 2013).

En Latinoamérica esta planta se utiliza en diversas áreas, las cuales incluye: ornamental, medicinal, fines alimenticios, decorativos para festividades y ceremonias, además de otros usos como: obtención de bebidas y fibras, sustituto del café, relleno de cojines, instrumento musical, decoración de piñatas, fibra para lavar trastes, etc (Hornung, 2011).

#### 1.4 *Bromelia karatas*

##### 1.4.1 Biología y Distribución de *B. karatas*

Es una planta terrestre de bosques y matorrales, se ubica entre 50–1500 msnm, florece en los meses de junio a julio y es propia de bosques secos, estacionalmente seco a bosques húmedos (más raro). *Bromelia karatas* crece en suelos pobres y se encuentra en estado silvestre o cultivado como cercas vivas (Rojas et al., 2014).

Se distribuye desde México hasta Ecuador y Brasil (Rojas et al., 2014), en la Península de Yucatán se encuentra en selva seca. Su ciclo de vida es sencillo; florece, fructifica y muere, dejando un hijuelo en su reemplazo. Se caracteriza por la presencia de tomento (“pelo” corto que cubre órganos de algunas plantas) suave de color café en cada una de sus partes (Salvatierra et al., 2013).

##### 1.4.2 Características Morfológicas de *B. karatas*

Son plantas acaules. Las raíces son delgadas y fibrosas, son escasas, y no crecen tanto, y se encuentran de manera superficial. Es una raíz homorricia, debido a que no tiene un centro de origen, sino que se origina de cualquier lugar de la cabezuela.

El tallo es indefinido; debido a que la planta es acaule, no se distingue el tallo, solo se observa la prolongación de una porción de falso tallo (pseudo tallo) durante la etapa de floración (Rojas et al., 2014).

Sus hojas son lanceoladas y alargadas con una longitud entre 1.2 y 1.5 m, grosor de 2.8 cm (Fig. 12); escapo ausente o muy corto, de color verde brillante por el haz y verde grisáceo por el envés; un poco cóncavas hacia el haz, en los márgenes presenta numerosas espinas de color café oscuro, agudas, pungentes, erectas y curvas en el ápice, de 7.9 mm de largo, separadas por 3 a 6.4 cm. El número de hojas por planta varía entre 15 y 30 en etapa de crecimiento y desarrollo, pero en la etapa de senescencia (fructificación) tiene de 13 a 23. Cuando la planta inicia la floración, presentan dos colores de hojas: las más cercanas a la inflorescencia, aproximadamente 10 son rojas. Mientras que las ubicadas hacia los lados conservan el verde brillante, aproximadamente 15 hojas (Rojas et al., 2014).



Figura 12.- Hojas de *Bromelia karatas* tomada de Rojas et al., 2014.

La Inflorescencia es sésil; en forma de nido como una cabezuela sentada en el centro de la roseta foliar con muchas flores dispuestas en un denso capitulo, aplanada en el ápice, de 15 a 35 cm de diámetro y rodeada por las hojas internas de color rojo brillante y/o verde pálido, dependiendo del morfotipo (Rojas et al., 2014) (Fig. 13).

Flores: Son erectas, de 5 a 12 por espiga, sésiles o cortamente pediceladas, el pedicelo de hasta 1 cm de largo, densamente ferrugíneo-lepidoto; sépalos verdes,

largamente triangulares, de 1.5 a 3 cm de largo, de 5 a 7 mm de ancho, connados en la base, densamente ferrugíneo-lepidotos por fuera, especialmente hacia la parte apical, redondeados en el ápice; pétalos rosados con blanco, de 4.8 a 5 cm de largo, connados en la base por 2.7 a 3 cm (Espejo et al., 2010) (Fig. 13).



Figura 13.- Inflorescencia de *Bromelia karatas*,

(<http://loscharcosdeosa.blogspot.com/2008/09/flowers-of-bromelia-plumeri.html>) (Aguilar R., 2008)

Fruto: Es una baya agridulce y jugosa de cáscara hebrosa de color blanco amarillento o café oscuro, dependiendo del morfotipo; completamente ferrugíneo tomentoso, fusiforme, estrecho hacia la parte basal y apical, pero más redondo en su parte central, de 9 a 12 cm de longitud. Pulpa de color blanco dividida en tres lóculos (tricarpelar y/o trilocular) con dos series de semillas de placentación parietal, ubicadas alternamente hacia el centro, de color café a negro, subglobosas, de 3 a 4 mm de diámetro (Rojas et al., 2014) (Fig. 14 y 15).



Figura 14.- A: Frutos de *Bromelia karatas* en racimo. B: Semillas de *B. karatas* Aguilera et. al. 2019



#### 1.4.3 Características químicas del fruto de *B. karatas*

Los frutos del género *Bromelia* son ricos en proteasas, las cuales tienen un papel fisiológico relevante para el desarrollo y movilización de proteínas germinales en respuesta a varios tipos de estrés medioambiental, o bien en la defensa contra plagas y patógenos, así como en la apoptosis y senescencia de los mismos (Meza et al., 2017). Se han identificado como cisteín-proteasas (Meza et al., 2017), cuya actividad catalítica depende de la reactividad del grupo tiol del residuo de cisteína del centro activo, el cual rompe enlaces peptídicos de otras proteínas. Las cisteín-proteasas se absorben bien en el intestino delgado después de ser administradas por vía oral y no tienen efectos secundarios importantes (ardor en la boca por consumo en fresco), incluso después de uso prolongado; por tanto, se sugiere que las cisteína proteasas pueden ser utilizadas como un eficaz suplemento alimenticio para prevenir enfermedades (Meza et al., 2017).

*Bromelia karatas* contiene minerales (calcio, fósforo y potasio), vitamina C, y alto contenido de proteasas (karatasina) (Meza et al., 2018). Además, también se ha reportado la presencia de flavonoides, terpenos y cumarinas en frutos maduros. Los frutos verdes tienen mayor cantidad de proteínas en comparación con las que se encuentran en frutos maduros ( $13.3 \pm 0.2$ ,  $3.13 \pm 0.2$  % de proteína respectivamente). Sin embargo; los frutos maduros tienen un mayor efecto antioxidante, en parte, por los metabolitos secundarios; los cuales no poseen los frutos verdes, cómo: taninos (cloruro férrico, gelatina sal) y abundancia de fenilpropanoides (Moyano et al., 2012).

Se ha mencionado que, el grado de madurez del fruto no está relacionado con la cantidad de proteínas que presenta (Villanueva et al., 2019). En un estudio se colectaron frutos de tres localidades, y con diferentes estados de maduración. Los resultados evidenciaron que la cantidad de proteína no tuvo diferencias significativas entre las 3 localidades, sin embargo, los frutos de la segunda localidad tuvieron la mayor actividad proteolítica; quizás se debe, a que fue una mezcla de proteasas con pesos moleculares variables. Las proteasas de *B. karatas* son

estables durante tres horas de 30 - 50 °C. El pH óptimo es de 6 a 10; y la actividad enzimática se mantiene alta (80 %) en concentración de 10 % de NaCl. Debido a estas características, *B. karatas* puede considerarse como fuente alternativa de proteasas para la industria alimentaria (Villanueva et al., 2019).

Por otro lado, el jugo de los frutos de *Bromelia karatas* contiene una proteinasa sulfhidrilo denominada: Karatasina. Esta proteasa es de 24858 kDa que, puede fragmentarse en enzimas activas de pequeño tamaño con una masa molecular muy por debajo de 13 kDa, que están presentes en el jugo en pequeñas cantidades (Meza et al., 2017).

La karatasina tiene una composición de amino ácidos similar a la de la papaína y quimopapaína, especialmente la baja cantidad, tanto de ácido aspártico y glutámico, y similares proporciones de alanina, glicina, leucina e isoleucina. La secuencia inicial de aminoácidos es la misma para la karatasina pequeña y para la que tiene una masa molecular alta (Val-Pro-Glu-Thr) (Fig. 16) (Montes et al., 1990).

Tabla 7.- Secuencia de un fragmento de la karatasina, Montes et al., 1990

**Table IV.** COMPARISON OF N-TERMINAL AMINO ACID SEQUENCE OF KARATASIN, PAPAIN, AND STEM BROMELAIN

Karatasin <sup>a</sup>	Val-Pro-Glu-Thr-Trp-Asp-X-X-Asp	5	Tyr-Gly-Ala-Gln Thr-X-	10	Thr-X-	15
Papain <sup>b</sup>	Ile-Pro-Glu-Tyr-Val-Asp-Trp-Arg-Gln-Lys-Gly-Ala-Val-Thr-Pro-					
Stem bromelain <sup>b</sup>	Val-Pro-Gln-Ser-Ile-Asp-Trp-Arg-Asp-Tyr-Gly-Ala-Val-Thr-Ser-					

<sup>a</sup> This paper.

<sup>b</sup> From ref. 21.

Se ha comparado la actividad enzimática y la caracterización parcial de las proteasas de *B. karatas* y *B. pinguin*. Los frutos de ambas plantas, originalmente se obtuvieron de Nayarit, México. Posteriormente se obtuvieron otros frutos de *B. karatas* que provenían de Culiacán, Sinaloa, México. Se realizaron extractos crudos en donde les agregaron agua, buffer de cisteína fosfato y buffer de Sulfuro de sodio. Se comparó la cantidad de proteínas de los extractos y se reveló que, en el único

donde sobresalió *B. karatas* fue el que tenía el Buffer de Cisteína fosfato, con 8.79 mg/g. Después se comparó la actividad enzimática y de acuerdo con los autores, fue superior en *B. pinguin*. Sin embargo, al comparar estos resultados con los que obtuvieron con *B. karatas* de Sinaloa, se descubrió que, ahora el valor para *B. pinguin* era menor. Este fenómeno ocurre por la síntesis de proteínas, que, depende de condiciones de crecimiento. Por lo tanto, la actividad enzimática de proteasas obtenidas de *B. karatas* y *B. pinguin* depende de la ubicación. Eso quiere decir que, dentro del mismo género existe una variabilidad que debe tomarse en cuenta (Meza et al., 2018).

#### 1.4.4 Actividad Biológica de *Bromelia karatas*

El extracto acuoso y metanólico de hojas obtenidas de *B. karatas*, se evaluaron en ratas diabéticas, después de 120 minutos que se les administraron se reportó que presentaron actividad hipoglucemiante. Estos extractos tienen como constituyentes metabolitos secundarios, a los cuales, se les atribuye actividad: flavonas y flavonoles (Meza et al., 2017).

La actividad biológica en otras especies, cómo *Bromelia pinguin* es la siguiente. El extracto metanólico proveniente de los frutos presentó actividad fungicida. Se evaluó el extracto en varias cepas, de las cuales, la más sensible fue *Trichophyton mentagraphytes* FM 583, con una concentración mínima inhibitoria de 1 mg/ml (Camacho et al., 2002).

*Bromelia pinguin* presentó actividad antihelmíntica contra *Toxocara canis*. En el ensayo, a los nemátodos adultos se les agregó extracto puro y diluciones (1:1, 1:2, 1:3, 1:4) con PBS con diferentes pH (5-7.2). Se encontró que, el extracto puro destruyó la cutícula de los helmintos, con eficacia del 100%. Al observarlos bajo el microscopio, se encontró un 80% de daño en la cutícula de dichos organismos, con 3 ml del extracto que presentaron 59 µg de proteína (Acevedo, 2003).

#### 1.4.5 Usos tradicionales de los frutos del género *Bromelia* y de *B. karatas*

El uso de estos frutos tiene origen en las culturas prehispánicas desde hace miles de años; los Aztecas, Mayas, Incas, Quechuas, los Yanomami y otros pueblos las utilizaban en ceremonias religiosas, como alimento, fibra, medicina y como plantas ornamentales. En México se acostumbra a comer estos frutos frescos o cocinados porque tienden a ser ácidos y provocan ardor en la boca después de consumirlos, debido a la presencia de las cisteína proteasas (Meza et al., 2017).

En otras regiones de América Central y Sudamérica hierven los frutos, o hacen infusiones, los cuales son remedios para la tos y otros padecimientos del sistema respiratorio, el jugo de los frutos ha sido utilizado como bebida refrescante, así como agente antihelmíntico (Meza et al., 2017). Las frutas hervidas en agua se utilizan también para el escorbuto, diabetes y enfermedades renales. Los extractos acuosos de hojas o de tallos han mostrado actividades espasmódicas, antiparasitarias y citotóxicas (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

En Venezuela los frutos se ocupan para hacer refrescos. En nuestro país, específicamente en Chiapas e Hidalgo la fruta es conocida como "timbiriche", la cual, se encuentra en mercados populares en forma de "agua de sabor", que es un jugo azucarado y diluido, hecho de *Bromelia karatas*. En Jalisco, el fruto de *B. karatas* se le conoce como: "piñuelas", "cocuixtle" o "jocuixtle", y se come directamente o se usa para preparar una salsa para tacos; También se consume en Zacatecas, donde se transporta desde el estado de Jalisco (Leoni, 2011).

El jugo, se vende localmente como una bebida, siendo un buen sustituto del jugo de piña. Probablemente, las proteinasas purificadas de *B. karatas*, reemplacen a la papaína en la industria alimentaria, aprovechando la estabilidad relativa a alta temperatura y la actividad aceptable en diversos pH mostrados por estas enzimas (Leoni, 2011).

## 2.0 Objetivo general

Evaluar *in vitro* la actividad anti giardiasica de los extractos etanólico y acuoso del fruto de *B. karatas*.

## 2.1 Objetivos particulares

- Valorar *in vitro* la actividad de estos extractos en dos aislados (WB y HGINV)
- Determinar la cantidad de proteína presente en los extractos etanólicos y acuosos de *Bromelia karatas*
- Obtener la Concentración Inhibitoria 50% (IC<sub>50</sub>)
- Demostrar por microscopía de luz los posibles daños morfológicos en los trofozoítos, causados por el extracto que presente la mejor actividad anti giardiásica.

## 3.0 Preguntas de Investigación

¿Los extractos, acuoso y etanólico, obtenidos de los frutos de *B. karatas* tendrán actividad anti giardiásica?

## 4.0 Hipótesis

Los extractos etanólico y acuoso obtenido de *B. karatas* presentarán igual o mejor actividad que el metronidazol.

## 5.0 Planteamiento del problema

Existen pocos estudios sobre de la actividad biológica de los frutos de *Bromelia karatas* y no hay registros de actividad anti giardiásica. Se sabe que los frutos tienen un sabor ácido, debido quizás a la presencia de proteasas que, posiblemente puedan ser las causantes de su actividad. Este trabajo podría abrir un nuevo campo en la investigación sobre la evaluación de los extractos de esta planta en protozarios de importancia médica.

## 6.0 Justificación

La giardiasis es una parasitosis que en nuestro país alcanza una seropositividad de hasta el 55%, siendo la población infantil la más afectada, para su tratamiento se utilizan fármacos que producen efectos secundarios, además se ha reportado que hay trofozoítos resistentes al tratamiento. Por lo tanto, es necesaria una búsqueda

de tratamientos alternativos para la giardiasis, que sea fácil de obtener y que sea accesible a la población.

## 7.0 Material y Método

### 7.1 Obtención e Identificación de los frutos

Los racimos de frutos se adquirieron en abril del 2018, en el mercado de San Juan (Fig. 17), de Ciudad de México. Los frutos se lavaron, y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Los frutos en malas condiciones se eliminaron (Fig. 18 y Fig. 19).

Un racimo de frutos se llevó al Instituto de Biología de la UNAM para su identificación taxonómica.



Figura 15.- Racimos de frutos de *B. karatas* adquiridos en el mercado de San Juan



Figura 16.- Selección de los frutos de *B. karatas*.

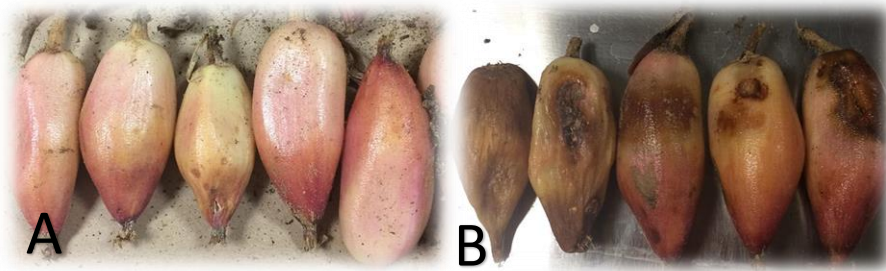


Figura 17.- Frutos de *B. karatas*, A) candidatos para la extracción B) Frutos eliminados para la extracción

### 7.2 Preparación de los extractos acuoso y etanólico

Extracto Acuoso: Los frutos se descongelaron, se obtuvieron 20 g de la pulpa, se les agregó 50 ml de la solución TRIS-HCl (0.02M) (Moreno-Hernández et al., 2017).

Se homogenizó dos minutos con ayuda de un mezclador (Oster, 2609), posteriormente se separó la parte gruesa con un cedazo y el líquido recuperado se dividió en tubos Corning de 50 ml y se centrifugó a 4000 rpm por 20 minutos (Equipo Heraeus instruments. Biofuge primo). El sobrenadante recuperado se pre filtró y esterilizó por filtración con una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ . Se congeló hasta su uso.

Extracto etanólico: Se realizó el mismo procedimiento, descrito en el párrafo anterior; con la diferencia de que a la pulpa (20g) se le agregó 25 ml de TRIS-HCl (0.02M) y 25 ml de etanol absoluto anhidro (J.T. Baker). Se incubó a 4°C durante 1 hora en agitación constante, y se centrifugó a 4000 rpm por 20 minutos. Se recuperó el sobrenadante, se pre filtró y posteriormente se esterilizó, con una membrana de .22  $\mu\text{m}$ . Se congeló hasta su uso.

### 7.3 Cuantificación de Proteínas

Se realizó por el micrométodo en placa de 96 pozos. Se siguió la técnica propuesta por el proveedor Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate. Se utilizó el kit Bio-Rad (Cat. #500-0006). Se realizó la curva estándar a partir del stock de albúmina sérica bovina (2 mg/ml), y se ajustaron las concentraciones (50-500  $\mu\text{g/ml}$ ), con las siguientes diluciones: 0, 25, 50, 100, 200 y 250  $\mu\text{l}$  a partir del stock.

Las diluciones de los extractos de *B. karatas* (50 y 100  $\mu$ l), se ajustaron con PBS 1X, a un volumen final de 1 ml.

Al final de cada dilución se tomaron 10  $\mu$ l y se colocaron en cada pozo de una placa de 96 pozos y se le agregó a cada uno 200  $\mu$ l del reactivo de proteínas, se homogenizaron los pozos, se incubó 20 minutos y se leyó la placa en el equipo Thermo Scientific Multikan GO a 520 nm. Se realizó tres veces por triplicado.

#### 7.4 Ensayos *in vitro*

Para los experimentos, se utilizaron los trofozoítos de los aislados de *Giardia intestinalis*: INP220806-HGINV y WB. Los cultivos se mantuvieron en tubos de cultivo de 13 ml con tapa de rosca. Para los ensayos se necesitaron cultivos de trofozoítos en fase log de crecimiento (Monocapa), se les cambió el medio por Solución salina de fosfatos (PBS 1X). Los tubos se mantuvieron a 4°C por 15 minutos, posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm por 5 minutos. El precipitado celular se recuperó y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se realizaron diluciones (1:100) y se contaron con la cámara de Neubauer.

Los bioensayos se realizaron en tubos eppendorf de 1.5 ml. Por cada mililitro se colocó medio TYI-S33 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 50  $\mu$ l con  $1 \times 10^6$  de trofozoítos y diferentes concentraciones de los extractos acuoso (0.075, 0.15, 0.3, 0.6 y 1.2  $\mu$ g/ml) y etanólico (0.08, 0.16, 0.328, 0.66 y 1.31  $\mu$ g/ml). El volumen final de los ensayos fue de 1.5 ml. Los controles fueron trofozoítos sin tratamiento y trofozoítos expuestos a metronidazol (20  $\mu$ g/ml). Se incubaron a -37°C por 24 horas.

Recultivo. Después de las 24 horas de incubación, los tubos se colocaron en un baño de hielo durante 15 min. Se homogenizaron y se tomó una alícuota de 75  $\mu$ l de cada tubo y se depositó en otros tubos eppendorf que contenían 1425  $\mu$ l de medio TYI-S33, complementado con 10% de Suero Fetal Bovino sin extracto, esto se realizó con cada una de las concentraciones y sus controles. Nuevamente se incubaron durante 24 horas a 37 °C. La viabilidad se midió con el Kit II de proliferación celular XTT (Roche Diagnostics). Los tubos se incubaron en un baño con hielo por 15 min. Se centrifugaron por 5 minutos a 3500 rpm, el sobrenadante



se desechó y se lavaron dos veces con 1 ml de Solución salina de fosfatos (PBS 1X). En una placa de 96 pozos se colocaron 250  $\mu$ l de cada una de las muestras más 50  $\mu$ l de XTT ((2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2Htetrazolio5-carboxianilida) y 1  $\mu$ l de PMS (N-Metil dibenzopyrazina metil sulfato). La placa se incubó por 4 horas a 37°C y finalmente se leyó a 490 nm en un equipo Thermo Scientific Multiskan GO. Se realizaron 6 experimentos con el aislado WB y 5 experimentos con HGINV, ambos por triplicado. Con las densidades ópticas obtenidas se aplicó la fórmula: [(D.O. Control negativo – D.O. experimentales)/(D.O. Control negativo – D.O. Medio TYI-S33)] X 100 para obtener el porcentaje de muerte celular de los extractos y controles. Con estos resultados se realizó una ANOVA de una sola cola, una prueba de Tukey-Kramer y una prueba de Dunnett, con el programa JMP trial versión 14.3.0.

#### 7.5 Obtención del $IC_{50}$

Se obtuvo la concentración inhibitoria al 50 % ( $IC_{50}$ ) con los resultados de los ensayos *in vitro*, con ayuda del paquete JMP.

#### 7.6 Morfología del trofozoíto de *G. intestinalis*

Para el análisis morfológico de los trofozoítos (WB), se expusieron  $1 \times 10^6$  a la  $IC_{50}$  (.5596  $\mu$ g/ml) del extracto etanólico durante 24 horas. Posteriormente, la muestra se colocó en un baño con hielo durante 15 minutos, se centrifugaron a 3500 rpm y se lavaron con PBS 1 X. Se tomó una alícuota (de 10  $\mu$ l) se colocó en un portaobjetos, se dejó secar a temperatura ambiente, se fijó con metanol y se tiñó con Giemsa. Finalmente, el montaje de la preparación se realizó con resina Entellan y se midió el largo y ancho de los trofozoítos. Se eligió una población de 25 trofozoítos (WB) y se compararon las medidas del largo y ancho con los controles: metronidazol ( $IC_{50}$ : 350 ng/ml) y sin tratamiento). Se tomaron fotografías con ayuda del programa Imagine pro Insight en el equipo OLYMPUS BX50.

Los datos obtenidos fueron analizados con las pruebas de HSD de Tukey-Kramer y Dunnett y el análisis de varianza (ANOVA) de una sola cola en el programa JMP trial versión 14.3.0.

## 8.0 Resultados

### 8.1 Identificación de frutos

La identificación de los frutos la realizó la Dra. Carolina Granados Mendoza. El número de folio que se le asignó al racimo de *Bromelia karatas* fue FS9866 y forma parte de la colección de frutos y semillas en el Herbario del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

### 8.2 Obtención de los extractos

De cada extracto se obtuvieron 11 alícuotas de 1 ml. El pH de los extractos acuoso y etanólico fue de 4.0

### 8.3 Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteína en los extractos acuosos y etanólicos fue de 12 y 13.1  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

### 8.4 Ensayos *in vitro*

Resultados para el Aislado WB

Con el extracto acuoso y la concentración más alta (1.2  $\mu\text{g/ml}$ ) se obtuvo un porcentaje de muerte del  $55.38 \pm 32.77\%$  y con 20  $\mu\text{g/ml}$  del metronidazol, la respuesta fue del  $100 \pm 2.16\%$  (Figura 18).

Con el extracto etanólico y la concentración 1.31  $\mu\text{g/ml}$ , la actividad anti-giardiasica fue del  $95.32 \pm 6.24\%$ , muy similar a la del Metronidazol (20  $\mu\text{g/ml}$ ) que fue del  $97.82 \pm 1.89\%$  (Figura 19).

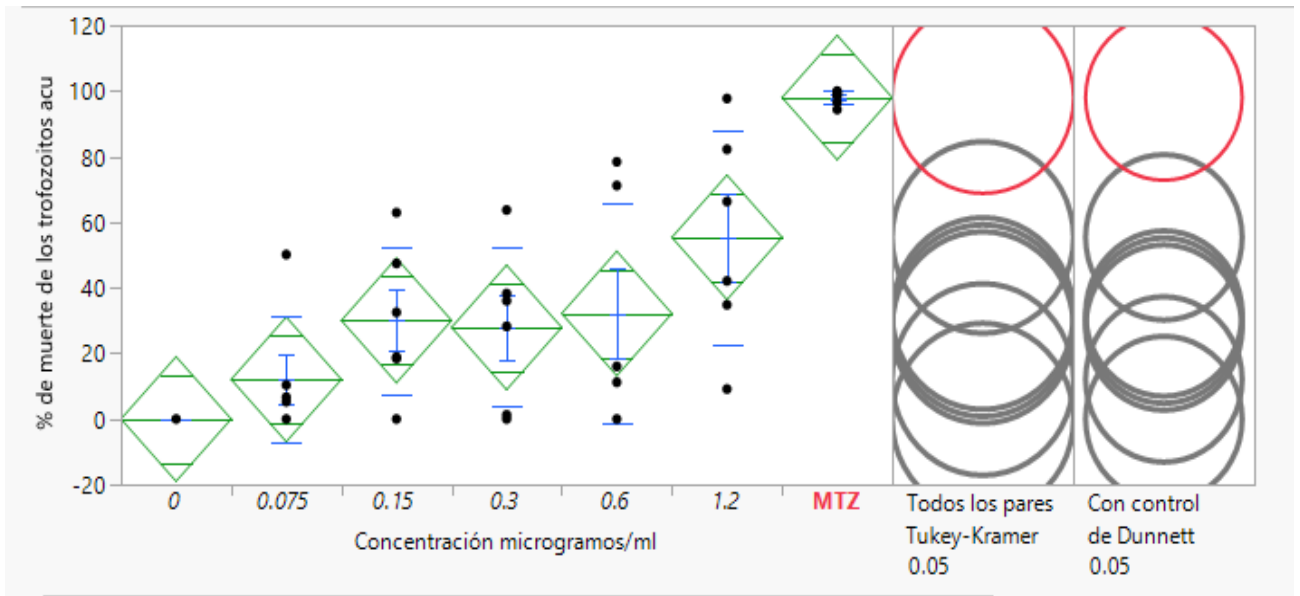


Figura 18.- Relación entre las diferentes concentraciones del extracto acuoso con el aislado WB de *G. intestinalis*. Se utilizó la prueba de Tukey y Dunnett para el análisis. En la mitad de cada rombo se encuentra la media de cada concentración y las líneas azules representan las barras de error.

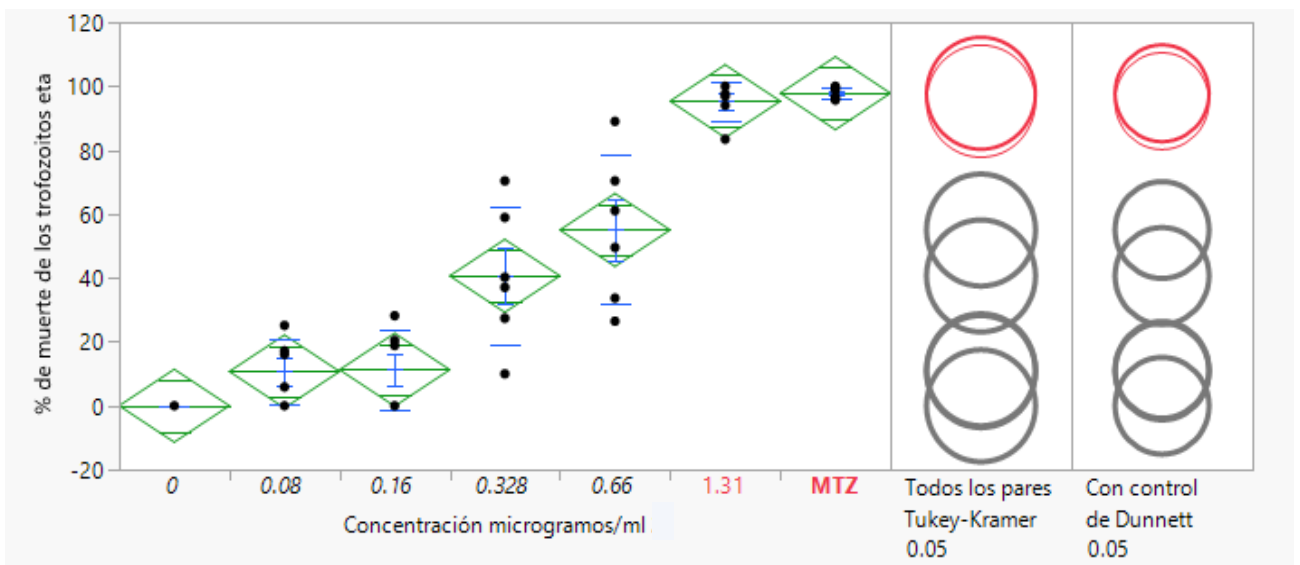


Figura 19.- Relación entre las diferentes concentraciones del extracto etanólico con el aislado WB de *G. intestinalis*. Se utilizó la prueba de Tukey y Dunnett para el análisis.

### Resultados para el aislado HGINV

Extracto acuoso. Las concentraciones 0.075, 0.15 y 0.3  $\mu\text{g/ml}$  presentaron baja actividad. Con 1.2  $\mu\text{g/ml}$  la muerte de los trofozoítos fue del  $51.22 \pm 25.88\%$ . La actividad del metronidazol (20  $\mu\text{g/ml}$ ) fue del  $98.32 \pm 2.3\%$  (Figura 20).

Extracto etanólico. Con 1.31  $\mu\text{g/ml}$  la actividad anti giardiásica fue del  $72.46 \pm 22.54\%$  y la del metronidazol (20  $\mu\text{g/ml}$ ) fue del  $97.96 \pm 3.39\%$  (Figura 21).

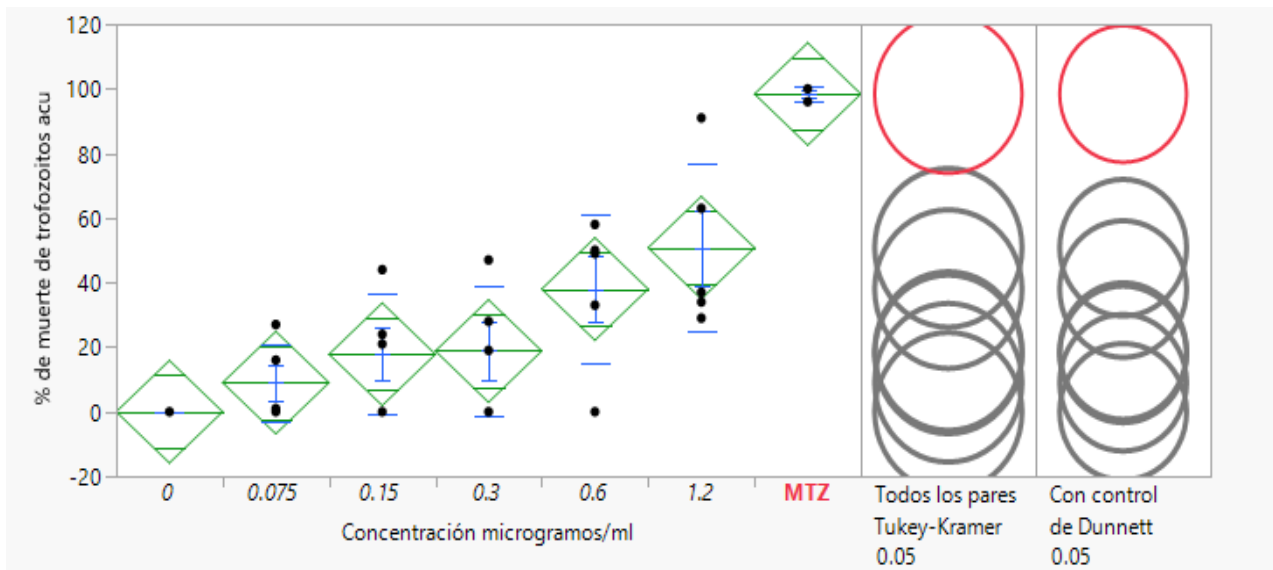


Figura 20.- Relación entre las diferentes concentraciones del extracto acuoso con el aislado HGINV de *G. intestinalis*. Se utilizó la prueba de Tukey y Dunnett para el análisis.

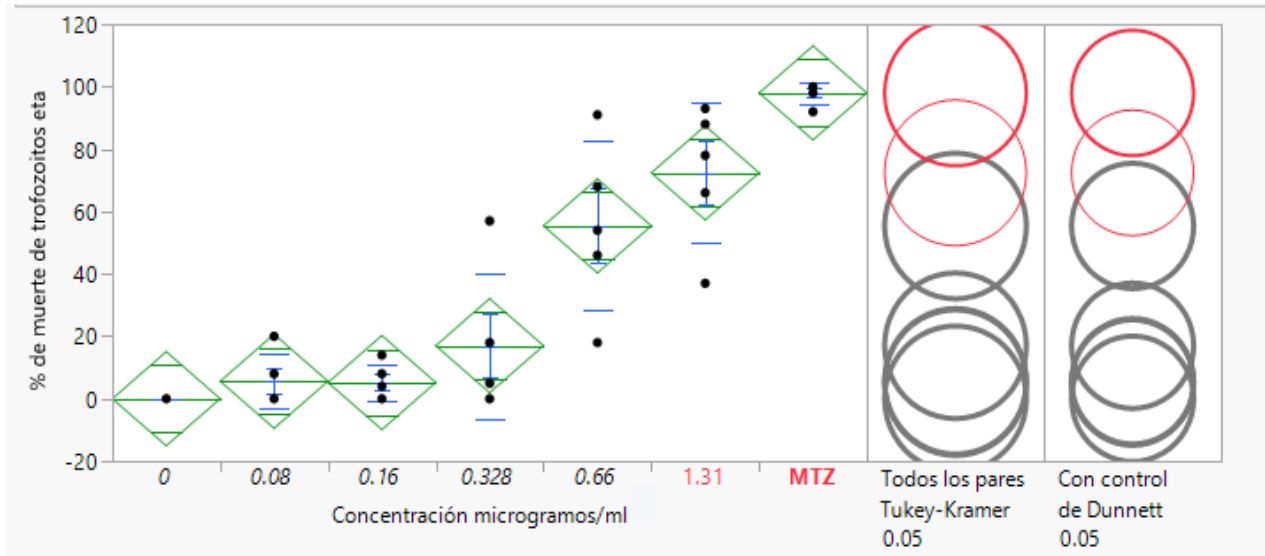


Figura 21.- Relación entre las diferentes concentraciones del extracto etanólico con el aislado HGINV de *G. intestinalis*. Se utilizó la prueba de Tukey y Dunnett para el análisis.

### Efecto del extracto acuoso en ambos aislados de *G. intestinalis*

En el aislado de referencia (WB) se encontró el  $55.38 \pm 32.77\%$  de actividad anti-giardíasis con  $1.2 \mu\text{g/ml}$  del extracto acuoso. Con el aislado nacional HGINV (INP220806-HGINV) la respuesta fue del  $51.22 \pm 25.88\%$  con la misma concentración del extracto (Figura 18 y Figura 20). Se realizó una prueba t de Student entre las respuestas que se encontraron en ambos aislados con las concentraciones más altas, para identificar una diferencia significativa.

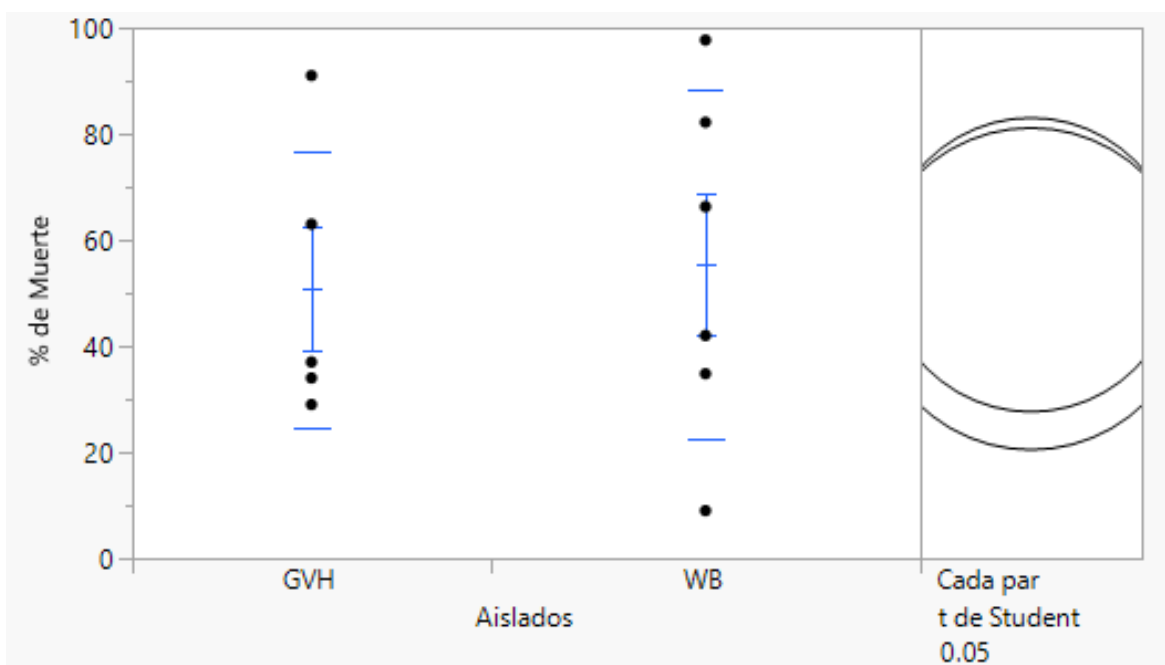


Figura 22.- Prueba t de Student. Para comparar los resultados de los trofozoítos expuestos a una concentración  $1.2 \mu\text{g/ml}$  del extracto acuoso. Líneas azules horizontales en los polos: Desviación estándar. Línea media: Promedio. No hay diferencias significativas entre las respuestas.

### Efecto del extracto etanólico en ambos aislados de *G. intestinalis*

En el aislado de referencia (WB) se encontró el  $95.32 \pm 6.24\%$  de actividad anti-giardíasis con  $1.31 \mu\text{g/ml}$  del extracto etanólico. Con el aislado nacional HGINV (INP220806-HGINV) la actividad anti-giardíasis fue del  $72 \pm 22.54\%$  con la misma concentración del extracto (Figura 19 y Figura 21).

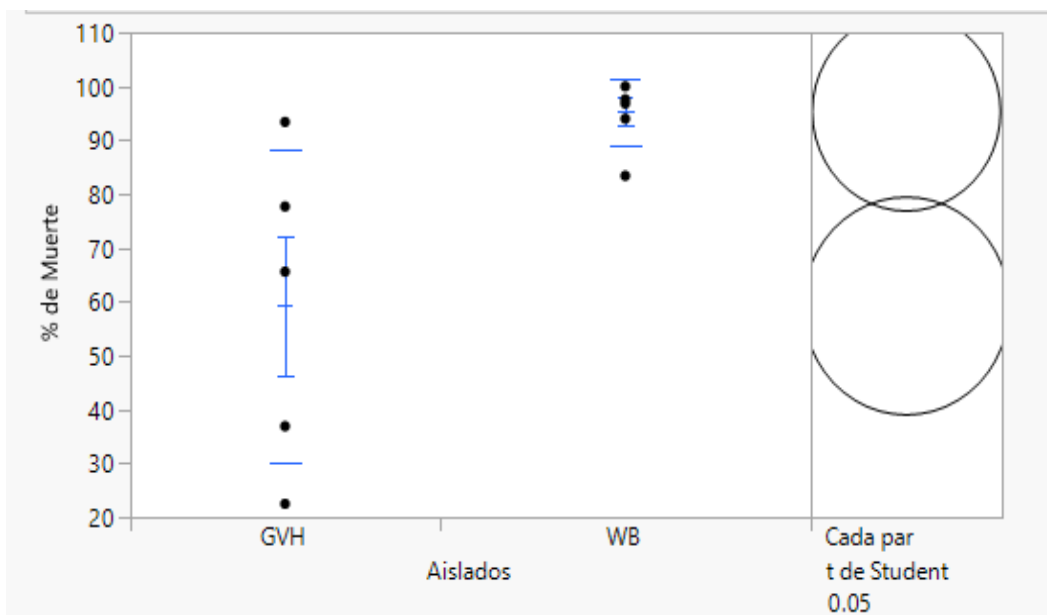


Figura 23.- Prueba t de Student. Para comparar los resultados de los trofozoítos expuestos a una concentración 1.31  $\mu\text{g/ml}$  del extracto etanólico.

Observamos que, no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos para ambos aislados expuestos al extracto acuoso. Con el extracto etanólico si encontramos una diferencia significativa entre ambos aislados (Figuras 22 y 23).

Se encontró mayor actividad anti-giardiasica con el extracto etanólico (Figura 19 y Figura 21). También se observó un mayor efecto anti-giardiasico del extracto etanólico sobre el aislado WB, en comparación con el HGINV.

### 8.5 Obtención del IC50

Tabla 8.- Resultados de IC50% de los extractos acuoso y etanólico

	Ext. Acuoso ( $\mu\text{g/ml}$ )	Ext. Etanólico ( $\mu\text{g/ml}$ )
WB	1.035	.5596
HGINV	1.070	.822

### 8.6 Morfología de los trofozoítos después de aplicar el $IC_{50}$

Se determinaron las dimensiones de los trofozoítos (WB) expuestos a la  $IC_{50}$  del extracto etanólico, el metronidazol (350  $\text{ng/ml}$ ) y de trofozoítos sin tratamiento. No

se encontraron diferencias en la longitud de los trofozoítos de los tres grupos. (Figura 24). Con respecto al ancho de los trofozoítos, se demostró que el metronidazol aumenta el volumen de los trofozoítos (Figura 25).

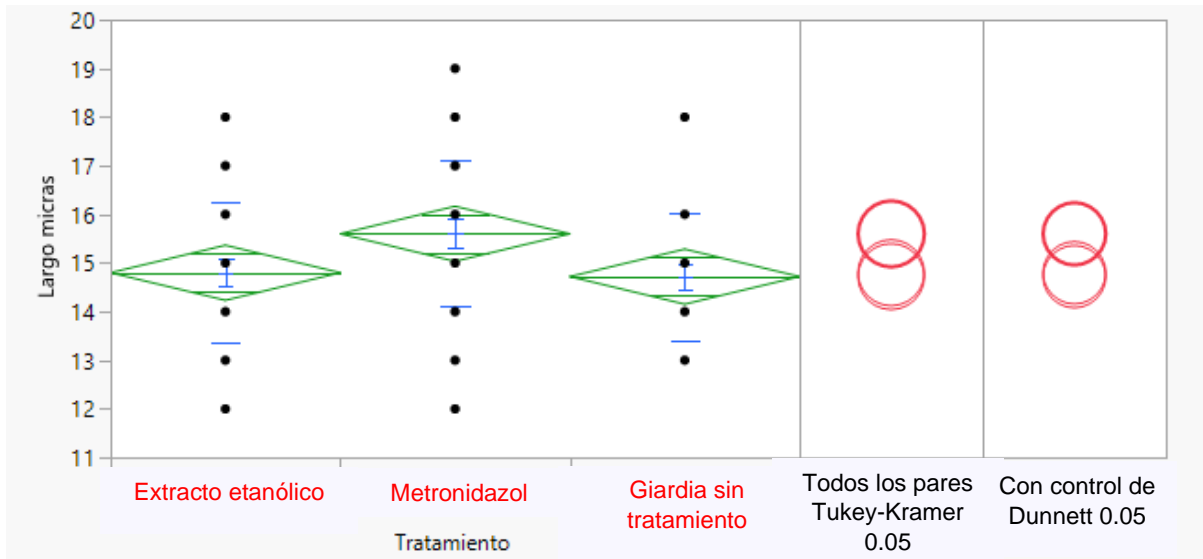


Figura 24.- Comparación de la longitud de los trofozoítos del aislado WB expuestos al IC50 del extracto etanólico, del metronidazol y sin tratamiento.

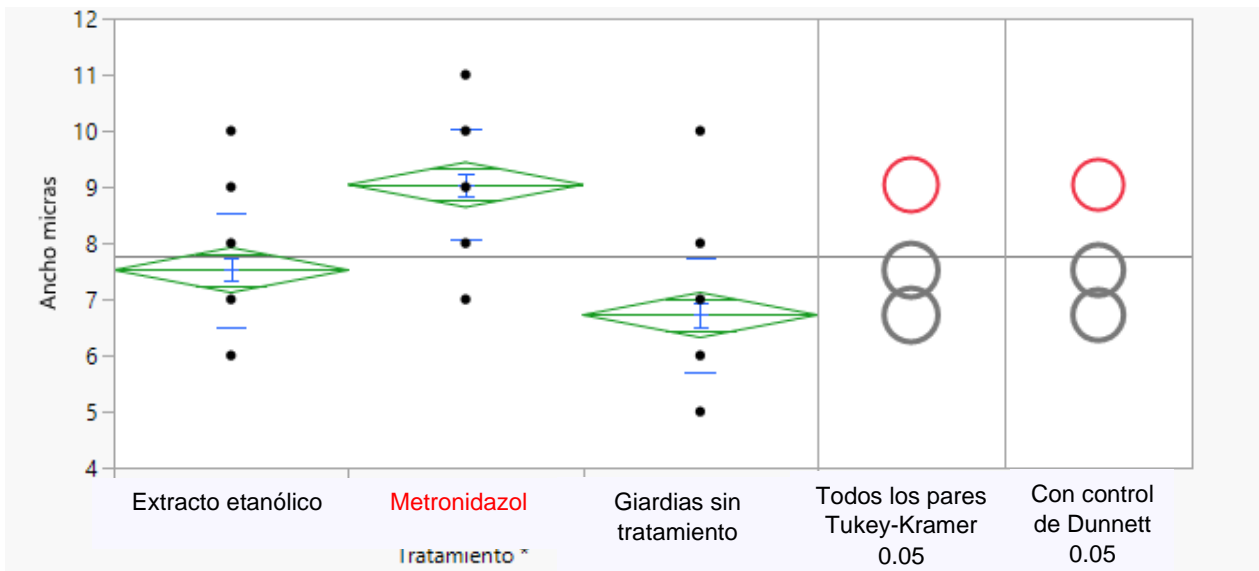


Figura 25.- Comparación del ancho de los trofozoítos del aislado WB expuestos al IC50 del extracto etanólico, del metronidazol y sin tratamiento.

Morfológicamente, los trofozoítos sin tratamiento, conservan su estructura piriforme, los 2 núcleos, cuerpo medio y los 4 pares de flagelos, etc (Fig. 24).

Los trofozoítos expuestos al extracto etanólico y al metronidazol se ven morfológicamente diferentes. Con el extracto etanólico se observan más redondos, los núcleos grandes y amorfos, y el citoplasma granular. En algunas fotografías no se distinguen los flagelos. (Fig. 25 y Fig. 26).

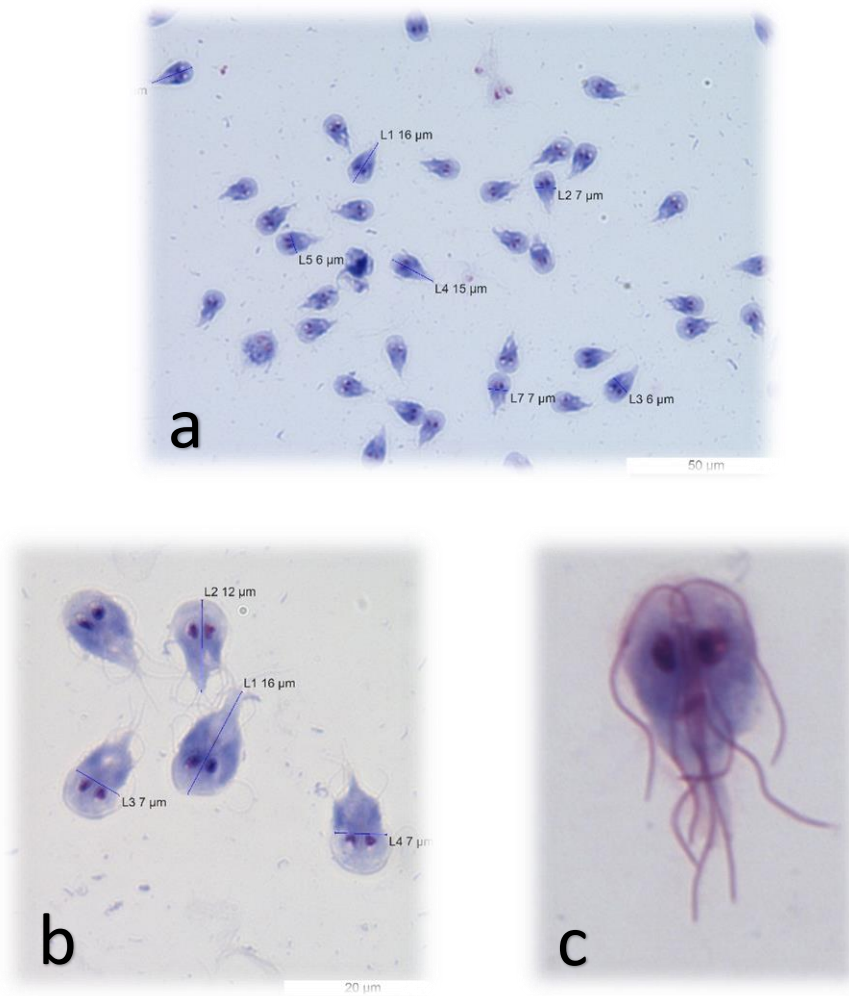


Figura 26.- Trofozoíto de *G. intestinalis* (WB) sin tratamiento. a): 10X b): 40X c): 100X



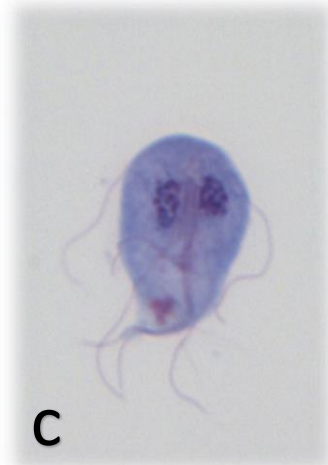
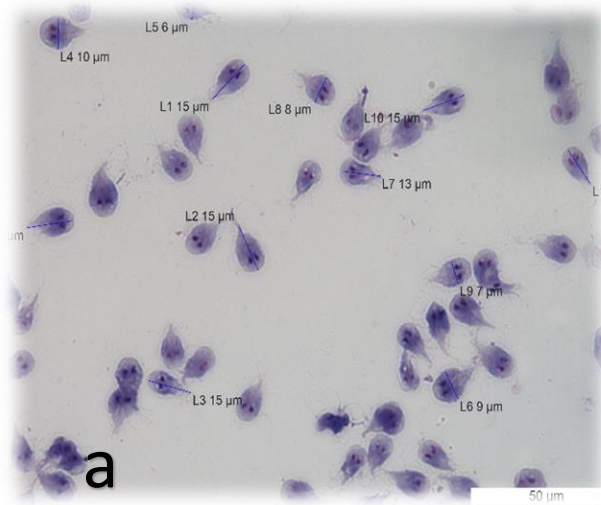


Figura 27.- Trofozoítos con la concentración  $IC_{50}$  (.5596  $\mu\text{g/ml}$ ) del extracto etanólico. a): 10X b): 100X c): 100X

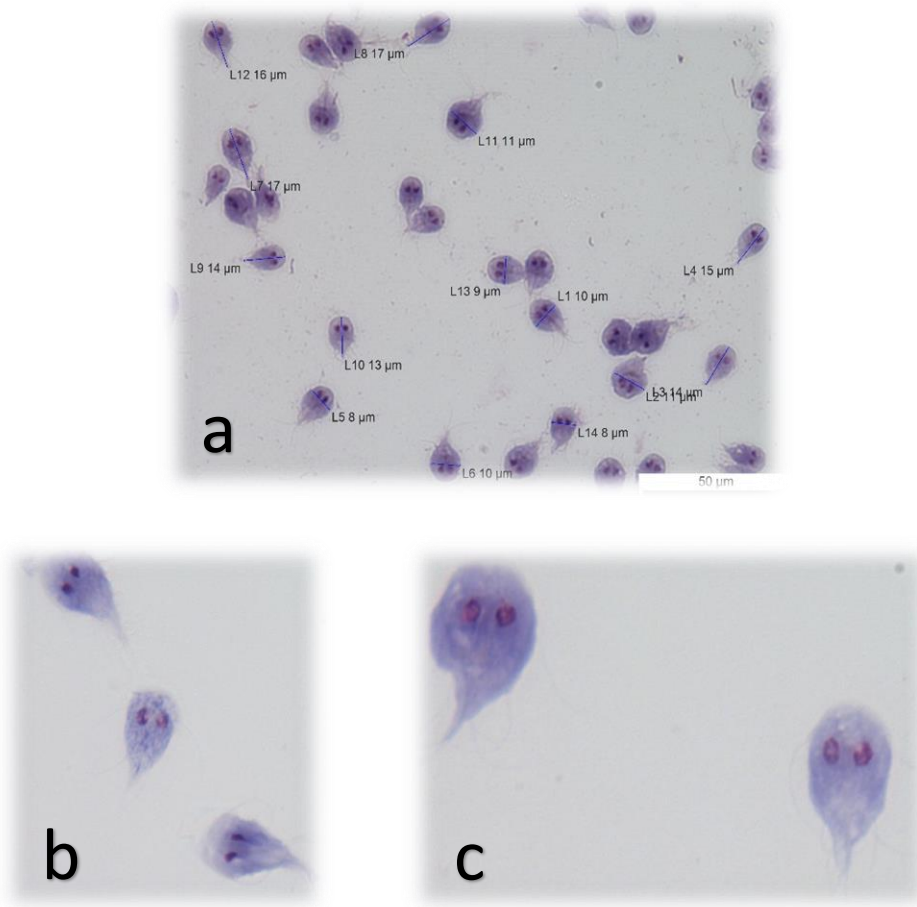


Figura 28.- Trofozoítos con la concentración  $IC_{50}$  del metronidazol. a): 10X b): 40X c): 100X

## 9.0 Discusión

De acuerdo con Ekor 2014, la aceptación y el uso de hierbas medicinales ha aumentado en los últimos años, en parte, debido a la creencia de que estos productos son "seguros" porque se originan de fuentes naturales. Sin embargo, muchas de estas plantas medicinales de uso empírico no se les ha determinado su efectividad, mecanismo de acción, efectos adversos y contraindicaciones, lo que compromete su uso seguro.

Con esta tesis se demostró que el extracto etanólico de *Bromelia karatas* presentó actividad anti-giardiasis, con una efectividad mayor al 70%.

Meza et. al. (2017), mencionó que los frutos de *B. karatas* tienen entre sus compuestos proteasas y metabolitos secundarios (flavonoides, terpenos y cumarinas) que pueden poseer actividad contra organismos patógenos. Este fue uno de los motivos que nos llevó a elegir los frutos de *B. karatas* para evaluar su actividad antiangiogénica. Nuestro trabajo es el primero en reportar la actividad antiangiogénica de un extracto etanólico de los frutos de *B. karatas*.

Por otro lado, se ha reportado que hay una enzima denominada karatasina, la cual, posiblemente sea la que produce el efecto antiangiogénico. Meza et. al. 2018, lograron caracterizar esta proteína de manera parcial; sin embargo, no evaluó su actividad contra patógenos. Lo que se encontró, es que la actividad enzimática varía, dependiendo de la ubicación de la planta. Por lo tanto, sería de interés identificar a la karatisina. Posteriormente, coleccionar frutos de diferentes localidades y analizar *in vitro* para comparar la actividad antiangiogénica que poseen sus extractos y si dicha actividad es producto de esta enzima.

Nosotros utilizamos frutos maduros y obtuvimos 12 y 13.1  $\mu\text{g/ml}$  para los extractos acuoso y etanólico respectivamente. Nuestros resultados no concuerdan con los reportados para frutos maduros por Villanueva et. al. 2019. Coleccionaron en 3 localidades de Yucatán, México, obtuvieron un promedio de 1.48  $\text{mg/ml}$  de proteína. Cabe mencionar que, los frutos estaban en diferentes estados de maduración, pero no había frutos verdes. Se necesitan aproximadamente 100 veces nuestros valores para obtener valores similares a los obtenidos en el estudio de Villanueva et al. 2019 (1.48  $\mu\text{g/ml}$ ). Una explicación a estas diferencias de concentración es que, las condiciones bióticas y abióticas (temperatura, altitud, tipo de suelo, etc.) de las localidades en las que se puede conseguir el fruto de *Bromelia karatas* provocan una variabilidad en los frutos tanto de su concentración de proteína como de la actividad enzimática, cómo lo mencionan Villanueva et al. 2019

Entre los extractos acuoso y etanólico, la cantidad de proteínas es similar, sin embargo, si hay diferencias en su actividad antiangiogénica. En los experimentos *in vitro* los resultados presentan una tendencia a una relación dosis-respuesta, (Figuras 18-21); ya que, a medida que va en aumento la concentración, la respuesta

en los organismos también aumenta. En este trabajo reportamos que, el aislado WB presenta un mayor porcentaje de muerte con ambos extractos que el aislado HGINV. Sin embargo, entre dichos aislados hay una diferencia significativa entre las respuestas que se obtuvieron con el extracto etanólico. Por lo tanto, la mejor actividad es la del extracto etanólico expuesto ante el aislado WB. La diferencia en el porcentaje de muerte de los aislados puede que radique en la capacidad invasiva de HGINV, que puede ser la clave de haber tenido mayor resistencia que WB, porque, Reynoso et. al. 2015 menciona, que estos trofozoítos pueden tener la capacidad de secretar sustancias para invadir las microvellosidades del hospedero. También puede que cambien más rápido sus VSPs en comparación de WB, y así logren protegerse con mayor efectividad. Las condiciones en el laboratorio también pudieron haber influido. Si un aislado se mantiene en condiciones óptimas, puede presentar dificultades al exponerse ante algún ambiente que presenta factores estresantes, cómo el cuerpo del hospedero o, medio de cultivo adicionado con algún fármaco, compuesto, extracto, etc.

La respuesta del extracto etanólico con el aislado WB es igual que con el metronidazol ( $97.82 \pm 1.89\%$ ), sin embargo, la concentración del fármaco es muy diferente, ya que se utilizaron 20  $\mu\text{g/ml}$  de metronidazol y solo utilizamos 1.31  $\mu\text{g/ml}$  del extracto etanólico. Esto quiere decir que, para tener la misma respuesta, teóricamente son necesarias 15 veces más del extracto etanólico. Por lo tanto, el extracto etanólico posee una actividad superior a la del metronidazol, por lo que lo hace un extracto interesante que puede tomarse en cuenta como un buen candidato para seguir ensayando en un modelo *in vivo*. La respuesta con el aislado HGINV no es significativamente diferente a la que obtuvo el metronidazol ( $97.96 \pm 3.39\%$ ). Por lo tanto, podemos afirmar que el extracto etanólico de los frutos de *B. karatas* presenta actividad anti-giardiasica contra ambos aislados, por lo que, esto lo hace interesante para continuar investigando con este extracto la respuesta con otros aislados, durante el proceso de enquistamiento en *Giardia*, y quizás con otros protozoarios de importancia médica, cómo: *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, *Leishmania*, etc.

La explicación sobre la mejor actividad del extracto etanólico puede deberse al utilizar el etanol y la solución TRIS-HCl (0.02M) como disolventes, (cómo lo realizó Moreno-Hernández et al., 2017), que contribuyeron a que se disolvieran en ellos el o los compuestos que tienen actividad anti-giardíasis. Sin embargo, es necesario caracterizar los compuestos principales del extracto etanólico, con técnicas químicas como la cromatografía en columna para lograr separar y analizar los compuestos.

Cuando se obtuvieron las concentraciones inhibitorias al 50 % (IC<sub>50</sub>) y comparamos, se comprobó que, la mejor actividad está en el extracto etanólico con el aislado WB (.5596 µg/ml) de *G. intestinalis*. Los resultados del extracto etanólico con el aislado HGINV (.822 µg/ml) son ligeramente diferentes a los mencionados anteriormente.

El resultado del IC 50 para el extracto etanólico de la pulpa del fruto con el aislado WB fue de .5596 µg/ml. Camacho et. al. 2002 reportó actividad fungicida en el extracto metanólico de pulpa de frutos de *Bromelia pinguin*. Se evaluó el extracto con varias cepas, pero la más sensible de todas fue *Trichophyton mentagraphytes* FM 583, con la concentración mínima inhibitoria de 1 mg/ml. Con respecto a la concentración de cada uno de estos extractos, podemos apreciar que, la diferencia es bastante considerable. Una explicación, es que quizás, la membrana de *G. intestinalis* es sumamente delgada, comparada con la pared celular del hongo (además de que presenta quitina).

Con el extracto puro de *Bromelia pinguin* se evaluó su actividad contra *Toxocara canis*. Acevedo, 2003, reportó una efectividad del 100% en la actividad antihelmíntica con un 80% de daño en la cutícula de los nemátodos adultos, la concentración de proteína que se reportó fue de 19.6 µg/ml, y en estos ensayos se colocaron 3 ml del extracto puro, que presentaron 60 µg/3 ml de proteínas. Estas cantidades son sumamente grandes en comparación con las que tenemos en este trabajo, sin embargo, con estos datos podemos confirmar que, los frutos de plantas del Género *Bromelia* tienen proteínas y/o compuestos con actividad antihelmíntica, anti-giardíasis y antifúngica.

Cuando teñimos los trofozoítos que sirvieron como control negativo, se observó una forma típica, piriforme, se logró observar ambos núcleos, bien teñidos de tonalidad morada y el cuerpo medio, además se observaron los cuatro pares de flagelos: anteriores, posteriores, ventrales y caudales. Los trofozoítos midieron 14.72 x 6.72  $\mu\text{m}$ . Este tamaño promedio concuerda con lo registrado por Ponce & Martínez (2014), un promedio de 12 a 15 x 5 a 9  $\mu\text{m}$ .

Los trofozoítos que fueron expuestos a la concentración de .5596  $\mu\text{g/ml}$  (IC50) mostraron cierto daño, ya que, cuando se midió el ancho de los trofozoítos (14.8 x 7.52) si fueron ligeramente diferentes de los trofozoítos que no se expusieron al extracto (14.72 x 6.72  $\mu\text{m}$ ). Tal vez el extracto afecta a la membrana; la cual, se vuelve permeable y entra más extracto y modifica la organización interna de la célula, causando también malformaciones en la estructura general del organismo. Sin embargo, es de interés que se evalué el efecto del extracto etanólico ultraestructuralmente para conocer el mecanismo de acción sobre los trofozoítos de *G. intestinalis* y poder afirmar donde ocurre el daño con exactitud.

El aporte de este trabajo radica en que es la primera vez que se reporta actividad anti-giardiasica en los frutos de *B. karatas*, abriendo un camino a una nueva línea de investigación, ya que faltan bastantes pruebas para que el extracto etanólico de los frutos de *B. karatas* sea considerado un tratamiento alternativo.

También se deberían realizar los mismos ensayos, pero, con frutos pertenecientes de otras localidades cómo en el trabajo de Villanueva, et al. 2019 para comprobar si existe una variabilidad en la actividad anti-giardiasica del extracto etanólico y también trabajar con frutos verdes, ya que cómo mencionan Moyano et, al. 2012, estos frutos presentan más proteína, y si la actividad anti-giardiasica proviene de estas biomoléculas, tal vez presenten un porcentaje de muerte aun mayor que el obtenido en este trabajo.

## 10.0 Conclusiones

- Es el primer trabajo en donde se reporta actividad anti*giardiásica* de los frutos de *Bromelia karatas* en dos aislados: WB y HGINV de *Giardia intestinalis*.
- El extracto etanólico es un buen candidato para proseguir con estudios y valorar si presenta los requisitos necesarios para llegar a ser parte de un tratamiento alternativo, ya que presenta una buena actividad anti*giardiásica* con una baja concentración y gracias a la tinción de Giemsa observamos un posible daño en la membrana y un cambio en la morfología interna de los trofozoítos desde la IC50 (.5596 µg/ml).
- Se encontraron diferencias en la respuesta de las dos cepas de *Giardia* en los extractos. En el cual el extracto etanólico tuvo mayor actividad que el acuoso. Además, hubo diferencias entre el tamaño (ancho) de los parásitos expuestos con los diferentes tratamientos, siendo el de metronidazol el que más diferencias tuvo con el resto.

## Perspectivas

- Analizar el daño provocado con el IC50 del extracto etanólico en el aislado WB por medio de Citometría de Flujo, para analizar el proceso de daño provocado por apoptosis y/o necrosis.
- Es necesario evaluar el daño a nivel ultra-estructural por medio de Microscopía Electrónica de Barrido de Transmisión.
- Realizar ensayo *in vivo* en jerbos *Meriones unguiculatus* para confirmar o descartar si el extracto etanólico mantiene su actividad anti*giardiásica*.
- Es necesario caracterizar los compuestos principales del extracto etanólico con la cromatografía en columna y también deben de utilizarse técnicas moleculares para identificar proteínas.

## 12.0 Referencias:

Acevedo Ramírez Perla María del Carmen. (2003). Efecto del extracto del fruto de *Bromelia pinguin* sobre la cutícula de *Toxocara canis*, estudio *in vitro* (tesis

- de licenciatura). Universidad Nacional Autonoma de México. Ciudad de México. México
- Adam, R. D. (1991). The biology of *Giardia spp.* *Microbiological Reviews*, 55(4), 706-732.
- Adam, R. D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 447-475. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.447-475.2001>
- Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E., Lukeš, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., Agatha, S., Berney, C., Brown, M. W., Burki, F., Cárdenas, P., Čepička, I., Chistyakova, L., Del Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Hampl, V., ... Zhang, Q. (2019). Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(1), 4-119. <https://doi.org/10.1111/jeu.12691>
- Aguilar R. (2008). Los Charcos de Osa: *Flowers of Bromelia plumieri*. <http://loscharcosdeosa.blogspot.com/2008/09/flowers-of-bromelia-plumeri.html>
- Aguilera et. al. (2019). Biodiversidad en Campeche. <https://docplayer.es/42055024-Biodiversidad-en-campeche.html>
- Almeida, A. A., Delgado, M. L., Soares, S. C., Castro, A. O., Moreira, M. J., Mendonça, C. M., Canada, N. B., & Correia Da Costa, J. M. (2006). Genotype Analysis of *Giardia* Isolated from Asymptomatic Children in Northern Portugal. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53(s1), S177-S178. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2006.00222.x>
- Almirall, P., Escobedo, A. A., Ayala, I., Alfonso, M., Salazar, Y., Cañete, R., Cimerman, S., Galloso, M., Olivero, I., Robaina, M., & Tornés, K. (2011). Mebendazole Compared with Secnidazole in the Treatment of Adult Giardiasis: A Randomised, No-Inferiority, Open Clinical Trial. *Journal of Parasitology Research*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/636857>
- Aparicio Mena Alfonso Julio. (2005). La medicina tradicional como medicina ecocultural. 21, 1-9.
- Autier, B., Belaz, S., Razakandrainibe, R., Gangneux, J.-P., & Robert-Gangneux, F. (2018). Comparison of three commercial multiplex PCR assays for the



- diagnosis of intestinal protozoa. *Parasite (Paris, France)*, 25, 48. <https://doi.org/10.1051/parasite/2018049>
- Bartelt, L. A., & Sartor, R. B. (2015). Advances in understanding *Giardia*: Determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000prime Reports*, 7, 62. <https://doi.org/10.12703/P7-62>
- Bayoumi, M., Nykwac, O., Kardaman, M., Ullberg, M., Alshammari, E., Sandström, G., Saeed, A., & Abd, H. (2016). Intestinal Parasitic Infections in School Students in Malakal City, Upper Nile State, South Sudan. *SOJ Microbiology & Infectious Diseases*, 4, 1-5. <https://doi.org/10.15226/sojmid/4/1/00142>
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana*. (2009). Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=C ontrayerba&id=7352>
- Boreham P. F.L., Phillips R.E., & Shepherd R.W. (1986). The activity of drugs against *Giardia intestinalis* in neonatal mice. 18, 393-398.
- Botanical-online. (2019, enero 19). Propiedades medicinales del tomillo. Botanical-online. <https://www.botanical-online.com/plantas-medicinales/tomillo-propiedades>
- Botero-Garcés, J. H., García-Montoya, G. M., Grisales-Patiño, D., Aguirre-Acevedo, D. C., & Alvarez-Urbe, M. C. (2009). *Giardia intestinalis* and nutritional status in children participating in the complementary nutrition program, Antioquia, Colombia, May to October 2006. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo*, 51(3), 155-162.
- Busatti HG, Alves RJ, Santana KG, Gil FF, Cury MC, Vannier MA, & Gomes MA. (2012). Effects of metronidazole analogues on *Giardia lamblia*: Experimental infection and cell organization. 75, 160-164. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.001>
- Calzada, F., Cervantes-Martínez, J. A., & Yépez-Mulia, L. (2005). *In vitro* antiprotozoal activity from the roots of *Geranium mexicanum* and its constituents on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *Journal of*

- Ethnopharmacology*, 98(1-2), 191-193.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.019>
- Calzada, F., Yépez-Mulia, L., & Aguilar, A. (2006). *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(3), 367-370.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.05.025>
- Calzada, F., Yépez-Mulia, L., Tapia-Contreras, A., Bautista, E., Maldonado, E., & Ortega, A. (2010). Evaluation of the antiprotozoal activity of neo-clerodane type diterpenes from *Salvia polystachya* against *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *Phytotherapy Research: PTR*, 24(5), 662-665.  
<https://doi.org/10.1002/ptr.2938>
- Camacho-Hernandez I.L., Chavez-Velazquez J.A., Uribe-Beltran M.J., Rios-Morgan A., & Delgado-Vargas F. (2002, mayo 12). Antifungal activity of fruit pulp extract from *Bromelia pinguin*—*ScienceDirect*.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X02001284?via%3Dihub>
- Canete, R., Escobedo, A. A., Gonzalez, M. E., & Almirall, P. (2006). Randomized clinical study of five days apostrophe therapy with mebendazole compared to quinacrine in the treatment of symptomatic giardiasis in children. *World Journal of Gastroenterology*, 12(39), 6366-6370.
- Castro E. (2013). Florula Digital de La Selva.  
[https://sura.ots.ac.cr/local/florula4/family.php?key\\_family=Bromeliaceae](https://sura.ots.ac.cr/local/florula4/family.php?key_family=Bromeliaceae)
- Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 73(3), 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. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(1), 6-10.
- Centers of Disease Control and Prevention. (2017). *Pathogen & Environment Giardia Parasites CDC*. <https://www.cdc.gov/parasites/giardia/pathogen.html>

- Choi, B., & Kim, B. (2017). Prevalence and Risk Factors of Intestinal Parasite Infection among Schoolchildren in the Peripheral Highland Regions of Huanuco, Peru. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 8(5), 302-307. <https://doi.org/10.24171/j.phrp.2017.8.5.03>
- Conrad Jim. (2017). Piñuela, *Bromelia karatas*. <https://www.backyardnature.net/chiapas/pinuela.htm>
- Cotton, J. A., Beatty, J. K., & Buret, A. G. (2011). Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *International Journal for Parasitology*, 41(9), 925-933. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.05.002>
- Crotti, D., D'Annibale, M. L., Fonzo, G., Lalle, M., Cacciò, S. M., & Pozio, E. (2005). *Dientamoeba fragilis* is more prevalent than *Giardia duodenalis* in children and adults attending a day care centre in Central Italy. *Parasite*, 12(2), 165-170. <https://doi.org/10.1051/parasite/2005122165>
- Duffy, T.-L., Montenegro-Bethancourt, G., Solomons, N. W., Belosevic, M., & Clandinin, M. T. (2013). Prevalence of giardiasis in children attending semi-urban daycare centres in Guatemala and comparison of 3 giardia detection tests. *Journal of Health, Population, and Nutrition*, 31(2), 290-293. <https://doi.org/10.3329/jhpn.v31i2.16394>
- Durigan, M., Cardoso-Silva, C. B., Ciampi-Guillard, M., Toledo-Silva, G., Mori, G. M., Franco, R. M. B., & Souza, A. P. (2018). Molecular genotyping, diversity studies and high-resolution molecular markers unveiled by microsatellites in *Giardia duodenalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006928>
- 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 (Baltimore, Md.: 1950)*, 164(3), 1478-1487.
- Einarsson, E., Ma'ayeh, S., & Svärd, S. G. (2016). An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.019>

- Ekor, M. (2014). The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Pharmacology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00177>
- Eman M. H. Méabed, Alaa I. B. Abou-Sreea, & Mohamed H. H. Roby. (2018). Chemical analysis and giardicidal effectiveness of the aqueous extract of *Cymbopogon citratus Stapf* | *SpringerLink*. 1745–1755. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s00436-018-5855-1>
- Erlandsen, S. L., Bemrick, W. J., Schupp, D. E., Shields, J. M., Jarroll, E. L., Sauch, J. F., & Pawley, J. B. (1990). High-resolution immunogold localization of *Giardia* cyst wall antigens using field emission SEM with secondary and backscatter electron imaging. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 38(5), 625-632. <https://doi.org/10.1177/38.5.2332623>
- Escamilla Pérez Blanca E., & Moreno Casasola Patricia. (2015). Plantas medicinales de La Matamba y El Piñonal, municipio de Jamapa, Veracruz (1°).
- Escobedo, A. A., Alvarez, G., González, M. E., Almirall, P., Cañete, R., Cimerman, S., Ruiz, A., & Pérez, R. (2008). The treatment of giardiasis in children: Single-dose tinidazole compared with 3 days of nitazoxanide. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 102(3), 199-207. <https://doi.org/10.1179/136485908X267894>
- Espejo Serna Adolfo, López Ferrari Ana R., & Ramírez Morillo Ivón. (2010). *Bromeliaceae*. En *Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes* (pp. 1-145).
- Feng, Y., & Xiao, L. (2011). Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 110-140. <https://doi.org/10.1128/CMR.00033-10>
- Figuroa-Castillo, J.A, Jasso-Villazul, C, Liébano-Hernández, Martínez-Labat, P., Rodríguez-Vivas, R.I., & Zárata-Ramos, J.J. (2015). Capítulo 3: Examen coproparasitoscópico. En R. I. Rodríguez Vivas (Ed.), *Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia en salud pública y veterinaria* (pp. 78-128). México AMPAVE-CONASA.

- [https://www.researchgate.net/publication/279530633\\_Figueroa-Castillo\\_JA\\_Jasso-Villazul\\_C\\_Liebano-Hernandez\\_E\\_Martinez-Labat\\_P\\_Rodriguez-Vivas\\_RI\\_Zarate-Ramos\\_JJ\\_2015\\_Capitulo\\_3\\_Examen\\_coproparasitoscopico\\_En\\_Tecnicas\\_para\\_el\\_diagnostico\\_de\\_parasitos\\_c](https://www.researchgate.net/publication/279530633_Figueroa-Castillo_JA_Jasso-Villazul_C_Liebano-Hernandez_E_Martinez-Labat_P_Rodriguez-Vivas_RI_Zarate-Ramos_JJ_2015_Capitulo_3_Examen_coproparasitoscopico_En_Tecnicas_para_el_diagnostico_de_parasitos_c)
- Gardner, T. B., & Hill, D. R. (2001). Treatment of Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(1), 114-128. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.1.114-128.2001>
- Gómez, V., & Wasserman, M. (2016). Inhibición parcial de dos genes que codifican para proteínas spliceosomales en *Giardia intestinalis*. *Biomédica*, 36. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.3068>
- Goudal, A., Laude, A., Valot, S., Desoubeaux, G., Argy, N., Nourrisson, C., Pomares, C., Machouart, M., Le Govic, Y., Dalle, F., Botterel, F., Bourgeois, N., Cateau, E., Leterrier, M., Lavergne, R.-A., Beser, J., Le Pape, P., & Morio, F. (2019). Rapid diagnostic tests relying on antigen detection from stool as an efficient point of care testing strategy for giardiasis and cryptosporidiosis? Evaluation of a new immunochromatographic duplex assay. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 93(1), 33-36. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.07.012>
- Gündüz, T., Demirel, M. M., Inceboz, T., Tosun, S., & Yereli, K. (2005). Prevalence of intestinal parasitosis in children with gastrointestinal symptoms associated with socio-economic conditions in Manisa region. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, 29(4), 264-267.
- Hooshyar, H., Rostamkhani, P., Arbabi, M., & Delavari, M. (2019). *Giardia lamblia* infection: Review of current diagnostic strategies. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 12(1), 3-12.
- Hornung-Leoni, C. T. (2011). Avances sobre Usos Etnobotánicos de las Bromeliaceae en Latinoamérica. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(4). <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=85619300003>
- Houkang, K., Sawangjaroen, N., Kongyen, W., Rukachaisirikul, V., & Wootipoom, N. (2015). Mechanisms of 1-hydroxy-2-hydroxymethylanthraquinone from

- Coptosapelta flavescens as an anti-giardial activity. *Acta Tropica*, 146, 11-16.  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.02.013>
- Jiménez-Arellanes, A., Luna-Herrera, J., Ruiz-Nicolás, R., Cornejo-Garrido, J., Tapia, A., & Yépez-Mulia, L. (2013). Antiprotozoal and antimycobacterial activities of *Persea americana* seeds. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-109>
- Jokipii, L., & Jokipii, A. M. (1979). Single-dose metronidazole and tinidazole as therapy for giardiasis: Success rates, side effects, and drug absorption and elimination. *The Journal of Infectious Diseases*, 140(6), 984-988.
- Kabbashi, A. S., & Abdrabo, A. M. (2015). Antigiardial Activity and Cytotoxicity of *Adansonia digitata*. 4, 462-470.
- Kabnick, K. S., & Peattie, D. A. (1990). In situ analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. *Journal of Cell Science*, 95 ( Pt 3), 353-360.
- Karabay, O., Tamer, A., Gunduz, H., Kayas, D., Arinc, H., & Celebi, H. (2004). Albendazole versus metronidazole treatment of adult giardiasis: An open randomized clinical study. *World Journal of Gastroenterology*, 10(8), 1215-1217.
- Khan, I. A., Avery, M. A., Burandt, C. L., Goins, D. K., Mikell, J. R., Nash, T. E., Azadegan, A., & Walker, L. A. (2000). Antigiardial Activity of Isoflavones from *Dalbergia frutescens* Bark. *Journal of Natural Products*, 63(10), 1414-1416.  
<https://doi.org/10.1021/np000010d>
- Lasek-Nesselquist, E., Welch, D. M., & Sogin, M. L. (2010). The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *International Journal for Parasitology*, 40(9), 1063-1074.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.02.015>
- Leoni, C. T. H. (2011). Bromeliads: Traditional plant food in Latin America since prehispanic times. *Polibotánica*, 32, 219-229.
- Lujan, H. D. (2006). *Giardia* and giardiasis. *Medicina*, 66(1), 70-74.
- Martínez Moreno, D., Alvarado Flores, R., Mendoza Cruz, M., & Basurto Peña, F. (2006). Plantas medicinales de cuatro mercados del estado de Puebla,

- México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 79.  
<http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=57707908>
- Martins, G. Z., Moreira, R. R. D., Planeta, C. S., Almeida, A. E., Bastos, J. K., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., & do Céu Sousa, M. (2015). Effects of the extract and glycoalkaloids of *Solanum lycocarpum* St. Hill on *Giardia lamblia* trophozoites. *Pharmacognosy Magazine*, 11(Suppl 1), S161-165.  
<https://doi.org/10.4103/0973-1296.157721>
- Mateo, M., Mateo, M., Montoya, A., Bailo, B., Saugar, J. M., Aguilera, M., Fuentes, I., & Carmena, D. (2014). Detection and Molecular Characterization of *Giardia duodenalis* in Children Attending Day Care Centers in Majadahonda, Madrid, Central Spain. *Medicine*, 93(15).  
<https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000075>
- McCaffery, J. M., Faubert, G. M., & Gillin, F. D. (1994). *Giardia lamblia*: Traffic of a trophozoite variant surface protein and a major cyst wall epitope during growth, encystation, and antigenic switching. *Experimental Parasitology*, 79(3), 236-249. <https://doi.org/10.1006/expr.1994.1087>
- Meza-Espinoza, L., de Los Ángeles Vivar-Vera, M., de Lourdes García-Magaña, M., Sáyago-Ayerdi, S. G., Chacón-López, A., Becerra-Verdín, E. M., & Montalvo-González, E. (2018). Enzyme activity and partial characterization of proteases obtained from *Bromelia karatas* fruit and compared with *Bromelia pinguin* proteases. *Food Science and Biotechnology*, 27(2), 509-517.  
<https://doi.org/10.1007/s10068-017-0244-6>
- Meza-Espinoza Libier, García-Magaña Ma. de Lourdes, Vivar-Vera Ma. de los Ángeles, Sáyago-Ayerdi Sonia G., Chacón-López Alejandra, Becerra-Verdín Eduardo M., Muy-Rangel Ma. Dolores, & Montalvo-González Efigenia. (2017). Aspectos Etnobotánicos, Nutricionales y Actividad Biológica de Extractos de Frutos del Género *Bromelia*. *Rev. Fitotec.* 40, 425-437.
- Monárrez-Espino, J., Pérez-Espejo, C. R., Vázquez-Mendoza, G., Balleza-Carreón, A., & Caballero-Hoyos, R. (2011). Intervention to prevent intestinal parasitic reinfections among Tarahumara indigenous schoolchildren in northern

- Mexico. *Revista Panamericana De Salud Publica = Pan American Journal of Public Health*, 30(3), 196-203.
- Montes, C., Amador, M., Cuevas, D., & Cordoba, F. (1990). Subunit structure of karatasin, the proteinase isolated from *Bromelia plumieri* (karatas). *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(1), 17-24.
- Moo-Puc, R. E., Mena-Rejon, G. J., Quijano, L., & Cedillo-Rivera, R. (2007). Antiprotozoal activity of *Senna racemosa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(2), 415-416. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.03.028>
- Moreno-Hernández, J. M., Hernández-Mancillas, X. D., Navarrete, E. L. C., Mazorra-Manzano, M. Á., Osuna-Ruiz, I., Rodríguez-Tirado, V. A., & Salazar-Leyva, J. A. (2017). Partial Characterization of the Proteolytic Properties of an Enzymatic Extract From «Aguama» *Bromelia pinguin* L. Fruit Grown in Mexico. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(1), 181-196. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2319-x>
- Moyano D. Diego, Osorio R. Marìa, Murillo P. Elizabeth, Murillo A Walter, Solanilla D. José, Méndez A. John, & Aristizabal S. Juan. (2012). Evaluación de Parámetros Bromatológicos, Fitoquímicos Y Funcionalidad Antioxidante de Frutos de *Bromelia karatas* (*Bromeliaceae*). *Vitae*, 19, S439-S441.
- Muhsen, K., & Levine, M. M. (2012). A systematic review and meta-analysis of the association between *Giardia lamblia* and endemic pediatric diarrhea in developing countries. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 55 Suppl 4, S271-293. <https://doi.org/10.1093/cid/cis762>
- Narcisi, E. M., Glover, C. V., & Fechheimer, M. (1998). Fibrillarin, a conserved pre-ribosomal RNA processing protein of *Giardia*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45(1), 105-111.
- Norhayati, M. (2003). *Intestinal Parasitic Infections in Man: A Review*. 58(2), 11.
- Oberhuber, G., Kastner, N., & Stolte, M. (1997). Giardiasis: A histologic analysis of 567 cases. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 32(1), 48-51.
- Ortiz, J. J., Ayoub, A., Gargala, G., Chegne, N. L., & Favennec, L. (2001). Randomized clinical study of nitazoxanide compared to metronidazole in the



- treatment of symptomatic giardiasis in children from Northern Peru. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 15(9), 1409-1415.
- Otero-Negrete, J. J., Ibarra-Velarde, F., Martínez-Gordillo, M. N., & Ponce-Macotela, M. (2011). Prevalencia de *Giardia intestinalis* y predominio de genotipos zoonóticos en ovinos y bovinos de traspatio de cinco estados de la República Mexicana. *Veterinaria México*, 42(3), 219-226.
- Panti-May, J. A., Zonta, M. L., Cociancic, P., Barrientos-Medina, R. C., Machain-Williams, C., Robles, M. R., & Hernández-Betancourt, S. F. (2019). Occurrence of intestinal parasites in Mayan children from Yucatán, Mexico. *Acta Tropica*, 195, 58-61. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.04.023>
- Parasitología Química. (2013, agosto 31). Parasitología Química: Giardiasis: GIARDIASIS. *Parasitología Química*. <http://giardiasis-lq-uacj.blogspot.com/2013/08/giardiasis.html>
- Peraza-Sánchez, S. R., Poot-Kantún, S., Toores-Tapia, L. W., May-Pat, F., Simá-Polanco, P., & Cedillo-Rivera, R. (2005). Screening of Native Plants from Yucatan for Anti-*Giardia lamblia*. Activity. *Pharmaceutical Biology*, 43(7), 594-598. <https://doi.org/10.1080/13880200500301720>
- Periago, M. V., García, R., Astudillo, O. G., Cabrera, M., & Abril, M. C. (2018). Prevalence of intestinal parasites and the absence of soil-transmitted helminths in Añatuya, Santiago del Estero, Argentina. *Parasites & Vectors*, 11. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3232-7>
- Phillips Margaret A., & Stanley Samuel L. (2011). Chapter 50: Chemotherapy of Protozoal Infections: Amebiasis, Giardiasis, Trichomoniasis, Trypanosomiasis, Leishmaniasis, and Other Protozoal Infections. En R. H. Dandan & L. L. Brunton. *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (13<sup>o</sup>). España. McGraw-Hill.
- Ponce-Macotela M, & Martínez-Gordillo MN. (2014). Capítulo 7: Giardiasis. En M. A. Becerril. *Parasitología Médica* (4<sup>o</sup>, p. 437). México Mc Graw Hill.
- Quihui-Cota, L., Morales-Figueroa, G. G., Javalera-Duarte, A., Ponce-Martínez, J. A., Valbuena-Gregorio, E., & López-Mata, M. A. (2017). Prevalence and associated risk factors for *Giardia* and *Cryptosporidium* infections among

- children of northwest Mexico: A cross-sectional study. *BMC Public Health*, 17. <https://doi.org/10.1186/s12889-017-4822-6>
- Ramos-Guerra, M. C., Mata-Cárdenas, B., Vargas-Villareal, J., Sampayo, A., Gonzalez-Salazar, F., Morales-Vallarta, M., & Said-Fernández, S. (2007). *In vitro* activity of organic leaf/stem extracts from *Marrubium vulgare* and *Mentha spicata* against *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *Pharmacologyonline*, 1, 108-112.
- Reboredo-Fernández, A., Ares-Mazás, E., Galán, P., Cacciò, S. M., Gómez-Couso, H., Reboredo-Fernández, A., Ares-Mazás, E., Galán, P., Cacciò, S. M., & Gómez-Couso, H. (2017). Detection of zoonotic and livestock-specific assemblages of *Giardia duodenalis* in free-living wild lizards. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 26(3), 395-399. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612017034>
- Requena-Méndez, A., Goñi, P., Rubio, E., Pou, D., Fumadó, V., Lóbez, S., Aldasoro, E., Cabezos, J., Valls, M. E., Treviño, B., Martínez Montseny, A. F., Clavel, A., Gascon, J., & Muñoz, J. (2017). The Use of Quinacrine in Nitroimidazole-resistant *Giardia duodenalis*: An Old Drug for an Emerging Problem. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(6), 946-953. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix066>
- 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. <https://doi.org/10.1038/srep15168>
- Roca-Mézquita, C., Graniel-Sabido, M., Moo-Puc, R. E., Leon-Déniz, L. V., Gamboa-León, R., Arjona-Ruiz, C., Tun-Garrido, J., Mirón-López, G., & Mena-Rejón, G. J. (2016). Antiprotozoal Activity of Extracts of *Eleaodendron trichotomum* (Celastraceae). *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines: AJTCAM*, 13(4), 162-165. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v13i4.21>
- Rodríguez, V., Espinosa, O., Carranza, J. C., Duque, S., Arévalo, A., Clavijo, J. A., Urrea, D. A., & Vallejo, G. A. (2014). *Giardia duodenalis* genotypes found in

- the Instituto Colombiano de Bienestar Familiar day care centers and dogs in Ibagué, Colombia. *Biomédica*, 34(2), 271-281. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.1713>
- Rojas, C. M., Teran, V. F., Zuñiga, R. A., & Caldon, Y. E. (2014). Descripción morfológica de *Bromelia karatas* recurso genético promisorio para Patía, Cauca, Colombia. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(1), 62-70.
- Romero Cabello, Raúl (2007). *Giardia lamblia*. En C. R. Romero *Microbiología y parasitología humana* (3°, pp. 770-775). México. Editorial Médica Panamericana.
- Rosado-García, F. M., Guerrero-Flórez, M., Karanis, G., Hinojosa, M. D. C., & Karanis, P. (2017). Water-borne protozoa parasites: The Latin American perspective. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 220(5), 783-798. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.03.008>
- Rossignol, J., Ayoub, A., & Ayers, M. S. (2001). Treatment of Diarrhea Caused by *Giardia intestinalis* and *Entamoeba histolytica* or *E. dispar*: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Nitazoxanide. *The Journal of Infectious Diseases*, 184(3), 381-384. <https://doi.org/10.1086/322038>
- Rufino-González, Y., Ponce-Macotela, M., Jiménez-Estrada, M., Jiménez-Fragoso, C. N., Palencia, G., Sansón-Romero, G., Anzo-Osorio, A., & Martínez-Gordillo, M. N. (2017). *Piqueria trinervia* as a source of metabolites against *Giardia intestinalis*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1787-1791. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1325912>
- Salvatierra, C. G., Rodríguez, L. M. P., & García, C. R. (2013). Microambiente lumínico y morfología y fisiología foliar de *Bromelia karatas* (*Bromeliaceae*) en una selva baja caducifolia de Yucatán, México. *Bot. Sci.* 91, 75-84.
- Sánchez-Vega JT, Tay-Zavala J, Aguilar-Chiu A, Ruiz-Sánchez D, Malagón F, Rodríguez-Covarrubias JA, Ordóñez-Martínez J, & Calderón-Romero L. (2006). Cryptosporidiosis and other intestinal protozoan infections in children

- less than one year of age in Mexico City. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 75(6)1095–1098.
- Sierra, C. L. J., Ramírez, J. S., Cortés-Calva, P., Cámara, A. B. S., Dávalos, L. I. Í., & Ortega-Rubio, A. (2014). México país megadiverso y la relevancia de las áreas naturales protegidas. *Investigación y ciencia* 60, 16-22.
- Solomons, N. W. (1982). Giardiasis: Nutritional implications. *Reviews of Infectious Diseases*, 4(4), 859-869.
- Speich, B., Marti, H., Ame, S. M., Ali, S. M., Bogoch, I. I., Utzinger, J., Albonico, M., & Keiser, J. (2013). Prevalence of intestinal protozoa infection among school-aged children on Pemba Island, Tanzania, and effect of single-dose albendazole, nitazoxanide and albendazole-nitazoxanide. *Parasites & Vectors*, 6(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-3>
- Talari S. A., Momtazmanesh N., Talebian A., Khorshidi A., Taghavi A., Fakharian E., Talari M.R., & Mokhtari Z. (2006). *Comparison of Metronidazole and Furazolidone Against Giardia lamblia in Children*. 6, 378-381.
- Tapia Alejandra, Aranda Erika, Yanci Ana, & Makino. (2011). *Protozoos Giardia lamblia*. <http://protozoos1104le.blogspot.com/p/giardia-lamblia.html>
- Tejman-Yarden, N., Millman, M., Lauwaet, T., Davids, B. J., Gillin, F. D., Dunn, L., Upcroft, J. A., Miyamoto, Y., & Eckmann, L. (2011). Impaired parasite attachment as fitness cost of metronidazole resistance in *Giardia lamblia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(10), 4643-4651. <https://doi.org/10.1128/AAC.00384-11>
- Tracy J. W., & Webster L. T. (1996). Drugs Used in the Chemotherapy of Protozoal Infections: Amebiasis, Giardiasis, Trichomoniasis, Trypanosomiasis, Leishmaniasis, and Other Protozoal Infections. In Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. En *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (9°, pp. 987–1008). McGraw-Hill. [https://www.researchgate.net/publication/285343656\\_Drugs\\_Used\\_in\\_the\\_Chemotherapy\\_of\\_Protozoal\\_Infections\\_Amebiasis\\_Giardiasis\\_Trichomoniasis\\_Trypanosomiasis\\_Leishmaniasis\\_and\\_Other\\_Protozoal\\_Infections\\_In\\_Goodman\\_and\\_Gilman's\\_The\\_Pharmacological\\_Basi](https://www.researchgate.net/publication/285343656_Drugs_Used_in_the_Chemotherapy_of_Protozoal_Infections_Amebiasis_Giardiasis_Trichomoniasis_Trypanosomiasis_Leishmaniasis_and_Other_Protozoal_Infections_In_Goodman_and_Gilman's_The_Pharmacological_Basi)

- Tsuji, D. O. V. (2009). Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial. *Revista del Centro de Investigación de la Universidad de la Salle*, 8(31), 75-90.
- Upcroft, J., & Upcroft, P. (1998). My favorite cell: *Giardia*. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 20(3), 256-263. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199803\)20:3<256::AID-BIES9>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199803)20:3<256::AID-BIES9>3.0.CO;2-P)
- Vidal, F., Vidal, J. C., Gadelha, A. P. R., Lopes, C. S., Coelho, M. G. P., & Monteiro-Leal, L. H. (2007). *Giardia lamblia*: The effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin. (Lamiaceae) on trophozoites. *Experimental Parasitology*, 115(1), 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.05.001>
- Villanueva-Alonzo H. J., Polanco-Hernández G. M., Lizama-Uc G., Acosta-Viana K. Y., & Alvarado-Segura A. A. (2019). Proteolytic activity of wild fruits of *Bromelia karatas* L. of Yucatán, Mexico. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 25(2), 157-168. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2018.08.062>
- Wiesehahn, G. P., Jarroll, E. L., Lindmark, D. G., Meyer, E. A., & Hallick, L. M. (1984). *Giardia lamblia*: Autoradiographic analysis of nuclear replication. *Experimental Parasitology*, 58(1), 94-100.
- Wissinger Erika. (2014). Células T CD8+. *Inmunología En Un Mordisco*. Recuperado 22 de febrero de 2019, de <http://inmunologia.eu/celulas-inmunologia-en-un-mordisco/celulas-t-cd8>
- Xiao, L., & Fayer, R. (2008). Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology*, 38(11), 1239-1255. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.006>
- Yereli, K., Balcioglu, İ. C., Ertan, P., Limoncu, E., & Onağ, A. (2004). Albendazole as an alternative therapeutic agent for childhood giardiasis in Turkey. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(6), 527-529. <https://doi.org/10.1111/j.1198-743X.2004.00829.x>

Zhong, Z., Tian, Y., Li, W., Huang, X., Deng, L., Cao, S., Geng, Y., Fu, H., Shen, L., Liu, H., & Peng, G. (2017). Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in captive non-human primates in Sichuan and Guizhou provinces, Southwestern China. *PLoS ONE*, 12(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184913>