



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A. C.**

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DEL EXTRACTO DE
SAPONINAS DE *Yucca baccata* DEL DESIERTO
SONORENSE EMPLEANDO JERBOS (*Meriones
unguiculatus*) INFECTADOS CON *Giardia lamblia***

Por:

ROCÍO DEL CARMEN LEÓN TRUJILLO

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE


MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

SEPTIEMBRE 2012

APROBACIÓN

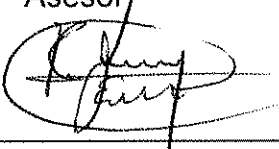
Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la Q.B. Rocío del Carmen León Trujillo, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



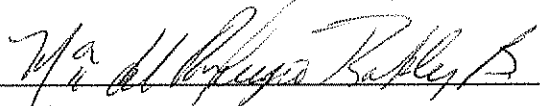
Dr. Luis Quihui Cota
Director de Tesis



Dr. Humberto Astiazarán García
Asesor



Dr. Julián Esparza Romero
Asesor



MC. María del Refugio Robles Burgueño
Asesor




Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda
Asesor externo

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and lines, positioned above a horizontal line.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado durante estos 2 años que me permitió continuar con mi formación profesional.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD) por la oportunidad que me dio una vez más, y por las facilidades otorgadas para poder realizar esta maestría.

De manera especial, agradezco enormemente al Dr. Luis Quihui Cota por aceptarme para realizar este trabajo, por su GRAN confianza brindada, por todo el apoyo, comprensión, por ser un guía. Gracias por compartir conmigo sus conocimientos, pero sobre todo gracias por demostrarme su cariño.

A mis asesores...Dr. Humberto Astiazarán: GRACIAS por estar ahí OTRA vez! Gracias por ese apoyo incondicional, por ser una parte tan importante en este trabajo, por su experiencia transmitida, por su amistad, por adoptarme!... M. C. María del Refugio Robles: Cuquis!! Muchísimas gracias por todo su tiempo, su PACIENCIA, por sus GRANDES enseñanzas, por ser más que una asesora para mí...Dr. Julián Esparza: Gracias por sus comentarios oportunos, por su aporte tan importante en este trabajo...Dr. Ramón Zepeda: Por su invaluable consejos, por sus conocimientos y por siempre mostrarse positivo ante las circunstancias, por ayudarme a ver las cosas desde otro punto de vista.

A la M. C. Lupita Morales, gracias por sus consejos, ánimos, por sus sonrisas y motivaciones...por ser esa parte alegre.

A la Q. B. Carmen Lugo, por toda la ayuda, por estar al pendiente, por todos los “mandados”, gracias!

Al Laboratorio de Patología Experimental, Gracias por todos los momentos compartidos, por ser otra familia, por el apoyo diario y sobre todo por la ayuda técnica a la Q. B. Berthita Pacheco, Q. B. Bianca Vargas, y al M. C. Orlando Tortoledo. Gracias también por el apoyo MORAL a la ahora Dra. Verónica López Jaja (tenía que decirlo DRA), a la M. C. Gemma Iñigo, y a la M. C. Karina Monroy...porque más que simples compañeros, me atrevo a decir que se formó una buena amistad, y eso no quiero dejarlo...

Al Laboratorio de Fisiología Vegetal, por ser esos SERES que día con día, shaker con shaker, iluminaban mis días con sonrisas, aperitivos, pláticas, chistes y demás. Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio, por el cariño...al M. C. Emmanuel Aispuro, M. C. Marisol Ochoa, Q. B. Panchito...pero sobre todo al Dr. Miguel Ángel, por aceptarme e interesarse por mi trabajo.

Al Laboratorio de Minerales, en especial a la M. C. María Isabel Grijalva y al Q. B. Javier Yáñez por su ayuda en la preparación de los extractos.

Al Laboratorio de Inmunología y Biología Celular de la Universidad de Sonora, a la M. C. Lucila Rascón y al Q. B. Samuel Alday por su preocupación, y ayuda, por esas *Giardias*...

Al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA), de la Universidad de Sonora, en especial al M.C. Rafael Canett y al M. C. Iván Rivero por el apoyo brindado, por facilitarme durante el inicio de este trabajo el área de bioterio.

A mis amigos de maestría, los que conocí al inicio y aquellos estudios sin fin y hasta el amanecer, y por los que conocí al final y que me permitieron descubrir que son unas locas personas que seguían el rollo siempre y hasta el final de los finales. Gracias por todos los momentos de estrés, alegría, tristeza,

des-estrés, enojos y demás. Gracias por dejarme entrar en sus vidas y descubrir que a estas alturas, aun se pueden encontrar por la vida buenos amigos. Creo que ustedes saben quienes son más que nadie, no ocupo ser tan precisa, y no quiero que nadie se me pase.

A mis otros amigos, los de tiempo atrás y que a pesar de las distancias, los años y los cambios...siguen ahí al pendiente de todo, tratando de que esa amistad no acabe a pesar de mis alejamientos, de mis “estoy haciendo la tesis”...Gracias por no dejarme, por hacer lo imposible porque esos lazos siguieran ahí.

A mi Familia, por estar SIEMPRE presente.

Y a todas aquellas personas que de alguna u otra manera estuvieron involucrados en este proyecto y que por mi FALTA de memoria olvido incluir, MUCHAS GRACIAS!

DEDICATORIA

A DIOS, por permitirme llegar hasta aquí. A veces uno piensa que no lo va a lograr y de repente saca fuerzas de no sé dónde y hace todos sus sueños posibles. Gracias por ser tú esa FUERZA, y esa luz. Gracias por dejarme vivir esta vida, y por dejarme tener a mi lado AUN a personas que tanto quiero y que de una u otra manera son mi OTRA fuerza para seguir adelante.

A mi MAMÁ, muchas gracias! Que haría sin ti? Gracias por ser la otra Mamá de Pablito, gracias por tu ayuda siempre, gracias por tus regaños, por tu sinceridad, gracias por querer hacer de mí una mejor mujer en todos los aspectos de mi vida. PAPÁ, gracias por ser el hombre de mi VIDA! Por ser ese ejemplo CONSTANTE de trabajo y dedicación, por tu apoyo, por tu amor. Gracias a AMBOS...deseo con todo mi corazón que Dios les de toda la salud y vida por mucho tiempo más, para así poder yo algún día darles un poquito de lo que USTEDES me han dado a mí.

A mi HERMANO, como ya te dije alguna vez y te lo seguiré diciendo, gracias por ser ese EJEMPLO a seguir, por todos los momentos que hemos pasado juntos, por tu ayuda enojona, pero ayuda al fin y al cabo...Le doy gracias a Dios por tenerte conmigo.

Gracias al AMOR de mi vida Eloy, gracias por los buenos y malos momentos, por ser mi esposo, mi amigo, mi compañero fiel, por todo lo que hemos vivido juntos, que ojalá sean muchos años mas multiplicados al por mayor. Quiero vivir contigo más tesis jaja. Te amo.

Y muy ESPECIALMENTE a mi hijo, Pablo Eliel...a ti y a USTEDES, les DEDICO todos mis esfuerzos, todas mis luchas, todas esas horas en las que no puedo estar ahí. Por ustedes quiero ser mejor, y seguir adelante...Gracias!

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XII
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XV
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
<i>Giardia lamblia</i>	3
Ciclo de vida	4
Transmisión.....	6
Epidemiología.....	6
Prevalencia global.....	6
Prevalencia en México y Sonora.....	7
Sintomatología clínica.....	7
Estado nutricional y parasitosis.....	9
Tratamientos.....	10
Efectos secundarios en el hombre.....	11
Plantas medicinales	13
<i>Yucca sp.</i>	14
Saponinas en plantas medicinales.....	15

ÍNDICE (continuación)

	Página
Evaluación de la actividad antiparasitaria de los extractos de <i>Yucca schidigera</i> sobre <i>Giardia lamblia</i>.....	17
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
Diseño experimental.....	21
Asignación de los jerbos a los grupos.....	21
Asignación de los tratamientos a los grupos.....	21
Bioensayo.....	22
Especímenes y obtención de los extractos.....	24
Colección de especímenes.....	24
Proceso de secado.....	24
Preparación de los extractos.....	24
Cuantificación de saponinas.....	25
Evaluación de la actividad anti$giardiasis$.....	26
Condiciones de bioterio.....	26
Modelo animal.....	26
Dieta de mantenimiento.....	27
Cultivo y preparación del inóculo de <i>G. lamblia</i>	28
Inóculo con <i>G. lamblia</i>	29

ÍNDICE (continuación)

	Página
Confirmación de la infección.....	30
Recuperación y conteo de trofozoítos.....	30
Administración de los extractos.....	31
Análisis Estadístico	31
RESULTADOS	32
Estandarización y cuantificación de saponinas	32
Curva estándar de glucosa.....	33
Saponinas en <i>Y. baccata</i>	36
Cuenta de trofozoítos en duodeno y proximal	37
Modelo Experimental	38
Efecto de los tratamientos a diferentes concentraciones sobre la infección de <i>Giardia lamblia</i> en jerbos	41
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXOS	59
Anexo 1. Preparación de medio TYI-S-33 y cultivo de <i>G. lamblia</i>	59
Anexo 2. Preparación del inóculo.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Etiología de la giardiasis: Trofozoíto y quiste.....	4
2	Ciclo de vida de <i>G. duodenalis</i>	5
3	Incidencia de giardiasis en México.....	8
4	<i>Y. baccata</i>	15
5	Seguimiento de jerbos en el bioensayo.....	23
6	Jerbos hembras (<i>Meriones unguiculatus</i>).....	27
7	Inoculación intragástrica.....	29
8a	Curva estándar de saponinas utilizando <i>Quillaja Saponaria</i> (Jerbos machos. Experimento 1).....	32
8b	Curva estándar de saponinas utilizando <i>Quillaja Saponaria</i> (Jerbos hembras. Experimento 2).....	33
9a	Curva estándar de glucosa (Jerbos machos. Experimento 1)..	34
9b	Curva estándar de glucosa (Jerbos hembras. Experimento 2).	34
10a	<i>Quillaja saponaria</i> vs contenido de azúcares (Jerbos machos. Experimento 1).....	35
10b	<i>Quillaja saponaria</i> vs contenido de azúcares (Jerbos hembras. Experimento 2).....	35
11a	Cuenta de trofozoítos en duodeno y en intestino proximal (Jerbos machos. Experimento 1).....	37
11b	Cuenta de trofozoítos en duodeno y en intestino proximal (Jerbos hembras. Experimento 2).....	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Requerimientos nutricionales diarios para roedores.....	28
2	Contenido de saponinas en tallo de <i>Y. baccata</i> (Jerbos machos. Experimento 1).....	36
3	Contenido de saponinas en tallo de <i>Y. baccata</i> (Jerbos hembras. Experimento 2).....	36
4	Peso de Jerbos macho (Experimento 1).....	39
5	Peso de Jerbos hembra (Experimento 2).....	40
6	Efectos del tratamiento del extracto butanólico con saponinas a diferentes concentraciones sobre <i>Giardia lamblia</i> en jerbos macho (Experimento 1).....	42
7	Efectos del tratamiento del extracto butanólico con saponinas a diferentes concentraciones sobre <i>Giardia lamblia</i> en jerbos hembra (Experimento 2).....	44

RESÚMEN

Introducción. La infección por *Giardia lamblia* es un problema de salud pública global y su prevalencia en nuestro país, particularmente en Sonora, es elevada. Los tratamientos quimioterapéuticos de elección son costosos y en ocasiones provocan efectos secundarios. La investigación en productos naturales, representa una excelente estrategia para el descubrimiento de compuestos con efectos antiparasitarios. **Objetivo.** Evaluar la actividad giardicida de saponinas presentes en los extractos butanólicos de *Yucca baccata* contra *G. lamblia* usando al jerbo como modelo experimental. **Materiales y Métodos.** En 2 experimentos independientes, 25 machos (n=5/grupo) y 35 hembras (n=7/grupo) fueron categorizados aleatoriamente en 5 grupos. Al inicio se inoculó a c/u con 5×10^6 trofozoítos/mL. El día 6 post-infección se eutanizó un par de jerbos para confirmar infección a través de la cuenta de trofozoítos en duodeno y proximal. Los próximos tres días recibieron tratamiento diariamente. Para los machos, las concentraciones del extracto para cada grupo fueron: 24.4mg/mL (1.68 mg de saponinas), 12.2 mg/mL (0.84 mg de saponinas) y 6.1 mg/mL (0.42 mg de saponinas). Y para las hembras, un grupo tratado a 24.4mg/mL (8.61 mg de saponinas), 12.2 mg/mL (4.30 mg de saponinas) y 6.1 mg/mL (2.15 mg de saponinas); además de un grupo tratado con el antiparasitario comercial Metronidazol (1mg/dosis) y un grupo no tratado. El día 10 post-infección, los jerbos fueron eutanizados y se realizó un conteo de trofozoítos en duodeno e intestino proximal. **Resultados.** En el experimento 1 realizado con jerbos machos, se presentó tendencia de disminución en cuentas de trofozoítos en duodeno y proximal en los grupos tratados en comparación con el no tratado, aunque no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$). En el experimento 2 realizado con jerbos hembras, se observó que los grupos

tratados con 12.2 mg/mL y 24.4 mg/mL, presentaron reducciones en cuenta de trofozoítos significativamente diferentes ($p < 0.05$) al grupo no tratado. En el grupo tratado con 6.1 mg/mL no se observan diferencias estadísticas al compararlo con cualquier otro. En intestino proximal también existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los grupos tratados con el extracto en comparación con el grupo no tratado. El Metronidazol como tratamiento control, eliminó 100% de los trofozoítos

Conclusión. Este estudio constituye un paso para evaluar la actividad giardicida de saponinas a partir de extractos de *Y. baccata*. Estos extractos pueden representar una alternativa terapéutica más efectiva, económica y con menos efectos secundarios en la salud del hombre y en animales de producción.

Palabras Clave: *G. lamblia*, *Y. baccata*, saponinas, jerbos.

ABSTRACT

Introduction. *Giardia lamblia* infection is a global public health problem including in our country, particularly in the Sonora State. At present, the chemotherapy of choice is expensive and accompanied with side effects and natural plant products represent an excellent strategy of treatment. **Objective.** To evaluate the anti-giardia activity of *Yucca baccata*, butanolic extracts using gerbil as an experimental model. **Materials and Methods.** Twenty-five males (n = 5/group) and 35 females (n = 7/group) were distributed randomly into 5 groups in 2 independent experiments. All gerbils were inoculated with 5×10^6 trophozoites per mL of PBS. On day 6 post-infection a couple of gerbils were euthanized to confirm trophozoites infection in duodenum and proximal ileum. Then, the assigned treatment was administered once a day for 3 days. In the males bioassay (1), the extract concentrations for experimental group were 24.4mg/mL extract (1.68 mg of saponins), 12.2 mg/mL (0.84 mg of saponins) and 6.1 mg/mL (0.42 mg of saponins). In the females bioassay (2), extract concentrations for experimental group were 24.4mg/mL treated group (8.61 mg of saponins), 12.2 mg/mL (4.30 mg of saponins) and 6.1 mg/mL (2.15 mg of saponins). In this study a group treated with Metronidazole (1mg per mL of PBS) and an untreated group was used per each bioassay. On day 10 post-infection, gerbils were euthanized and trophozoite count swas performed for duodenum and proximal intestine. **Results.** The bioassay 1 showed lower but no significant trophozoites counts in duodenum and proximal intestine among the treated groups ($p > 0.05$). In the bioassay 2 the treated groups with 12.2 mg / mL and 24.4 mg/mL, showed a significant reduction of trophozoite counts ($p < 0.05$) as compared with the untreated group. For gerbils receiving 6.1 mg/mL of the extract, no statistical difference was observed when compared to the rest of the

groups. Significant differences were also observed in the trophozoite counts in proximal intestine ($p < 0.05$) in the treated groups with the extract as compared with the untreated group. Metronidazole was 100% effective against trophozoites. **Conclusion.** This study assessed the anti-giardia activity of saponin extracts from the *Y. baccata* and at present they should be a more effective and alternative treatment to impact human health and animal production.

Keywords: *G. lamblia*, *Y. baccata*, saponins, gerbils.

INTRODUCCIÓN

Las parasitosis intestinales tienen una alta incidencia en el mundo, en especial en países emergentes como México. Esto es grave para nuestro país y se ha vuelto un fuerte problema de salud pública, ya que en su cuadro clínico, las parasitosis no solo ocasionan dolores de estómago, diarreas, vómito o malestar en general; sino que pueden inducir problemas nutricionales graves. Esto tiene como consecuencias pérdida de peso en adultos y talla baja en niños (Goto, 2002; Quihui et al., 2003).

Una de las parasitosis más importantes en el mundo es la giardiasis, causada por *Giardia lamblia*. Se estima una frecuencia anual de un billón de casos y una prevalencia global del 30% de esta parasitosis (Upctof, 2001; Gupta et al., 2004). *G. lamblia* se encuentra frecuentemente en perros, gatos, animales de crianza y en humanos. El quiste se transmite por ruta fecal-oral y la ingestión de comidas o agua contaminada, lo anterior se ve favorecido por su resistencia a la cloración y a que puede sobrevivir períodos largos en aguas frías (DeRegnier et al., 1989).

En algunas regiones de México, la prevalencia de giardiasis llega hasta un 68% (Ponce et al., 2002), y específicamente en Sonora, se tiene una alta incidencia llegando hasta un 40% de la población general. De esta forma se coloca dentro de los 10 estados con mayor incidencia a nivel nacional (SSA, 2010). Además, *Giardia* es el protozooario que más se asocia a tasas altas de morbilidad infantil, especialmente en niños de 1-4 años. Estos datos son muy preocupantes y nos motiva a realizar investigaciones que ayuden a combatir esta parasitosis.

Los fármacos convencionales contra las parasitosis funcionan, pero pueden producir una gran variedad de efectos secundarios en los seres

humanos, aunado a su limitada disponibilidad. Por esto se requieren alternativas para combatir parásitos, como la medicina tradicional alternativa. Se ha considerado que la alta variedad de compuestos en las plantas puede tener una mayor efectividad terapéutica que un producto sintético purificado (Clark, 1996). En el mundo se utilizan alrededor de 20,000 especies de plantas como remedios, y se reconoce que la medicina alópata moderna proviene de la naturaleza. Algunos productos naturales con potencial antiparasitario cumplen además con las demandas que exige la normatividad pública (Tagboto y Townson, 2001). El uso de plantas tradicionales aun no probadas promueve una urgente necesidad de estudiarlas y poder así comprobar qué productos son eficaces y seguros para el ser humano, además de poder determinar su acción tóxica para el organismo (Fernández-Calienes et al., 2009).

Por lo anterior, surge como interés explicar la posible actividad antiparasitaria de plantas medicinales, específicamente, la acción antiparasitaria que pudiera existir en *Yucca baccata* (una planta del desierto de Sonora) para combatir *G. lamblia*.

ANTECEDENTES

Giardia lamblia

El parásito *Giardia* consta de seis especies, siendo *Giardia lamblia* la más común en humanos, perros y otros mamíferos (Szénasi et al., 2007). Es un parásito unicelular, eucariótico que presenta dos morfologías, trofozoíto (forma vegetativa) y quiste (forma patógena). La primera se puede encontrar solamente en el intestino del hospedero, y el quiste en la materia fecal (Hausen et al., 2009). Este último es más pequeño y resistente que el trofozoíto, ya que puede permanecer en el ambiente en condiciones adversas y sobrevivir hasta 3 meses en agua a 4°C (Faubert, 2000). Mide de 6 a 12 micras, su forma es ovalada con una pared gruesa llamada pared quística, la cual le da resistencia. Los quistes inmaduros tienen dos núcleos, los maduros cuatro; en su citoplasma se pueden observar restos de flagelos y cuerpos parabasales (Romero, 2008).

El trofozoíto mide alrededor de 12 micras, tiene una simetría bilateral, es piriforme, con un extremo anterior ancho y otro posterior delgado. En la parte anterior tiene una estructura llamada disco ventral donde hay dos núcleos idénticos y ovalados. Es con esta parte con la que se adhiere al epitelio del intestino. Una parte central rígida llamada axolema le sirve de esqueleto. También tiene cuatro flagelos (anterior, posterior, caudal y ventral) (Figura 1) (Tay et al., 1994; Tay et al., 1996; Campaniti y Monteiro-Leal, 2002).



a)



b)

Figura 1. Agente etiológico de giardiasis. a) Trofozoíto, b) Quiste.
(http://futuramedica.org/galeria_principal.php?clave=43)

Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Giardia lamblia* empieza en el organismo del hospedero cuando se ingiere el quiste. Después de un par de horas, ya que ha pasado por al pH ácido del estómago y se expone al pH básico del intestino delgado proximal, eclosiona el quiste. El trofozoíto se une al epitelio intestinal y se multiplica asexualmente por fisión binaria en el revestimiento luminal (Faust y Rusell, 1961). Después, los trofozoítos pasan a la parte terminal del intestino delgado y forman nuevos quistes que se excretan en las heces. Los quistes sobreviven en el medio ambiente, para llegar a otros hospederos susceptibles y causar nuevas infecciones (Adam, 2001; Sulaiman et al., 2004;).

Giardiasis (*Giardia duodenalis*)

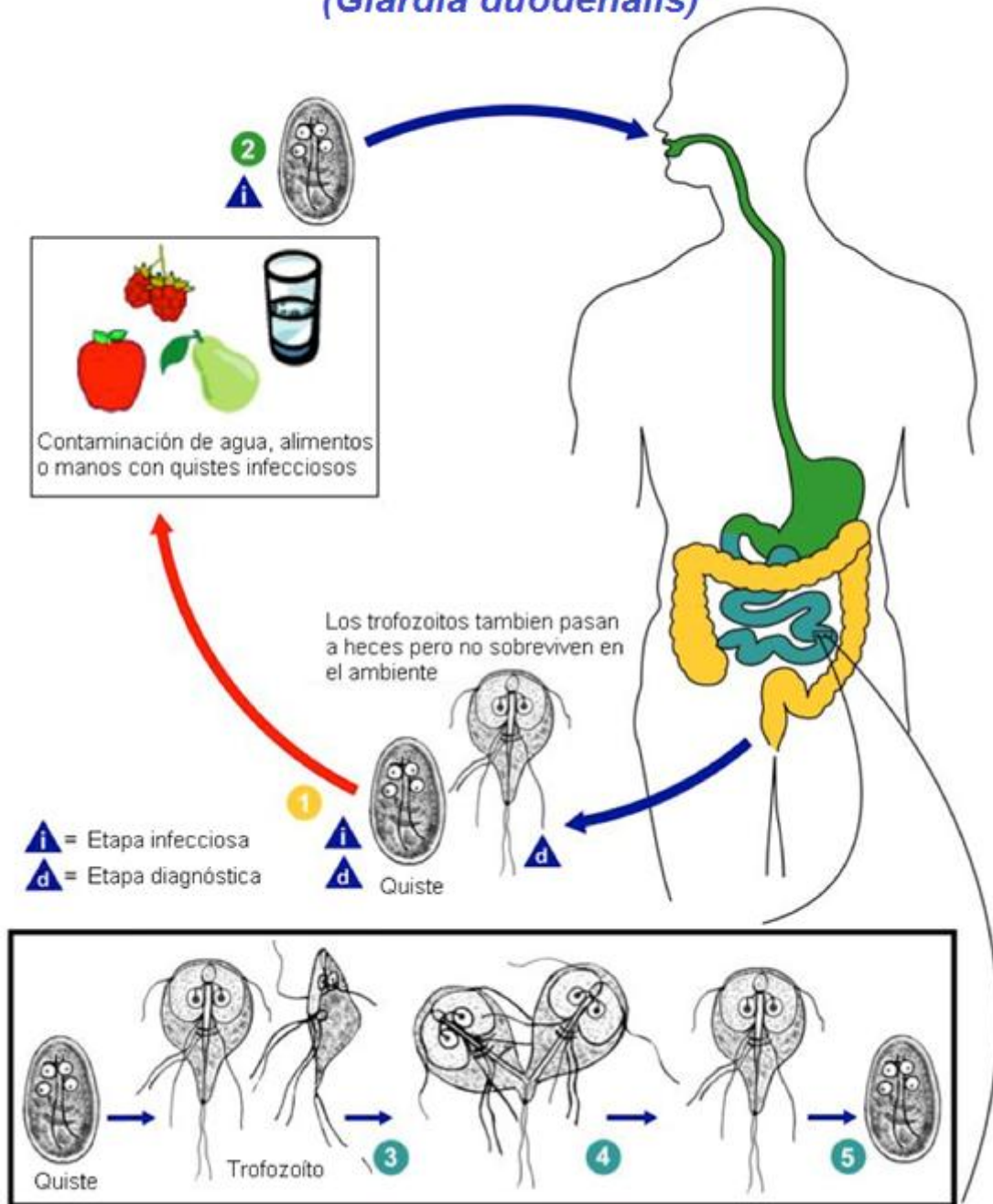


Figura 2. Ciclo de vida de *Giardia lamblia* (Fuente: librería pública de imágenes de CDC. <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/biology.html>).

Transmisión

Varias especies de *Giardia* colonizan el intestino de casi todos los grupos de vertebrados. *G. lamblia* es la especie que infecta a los seres humanos, animales domésticos, de granja y silvestres (Thompson, 2000; Sulaiman et al., 2003). *G. lamblia* puede transmitirse de persona a persona principalmente mediante el contacto de heces que contengan quistes de este protozoario. También puede transmitirse por el consumo de agua y alimentos contaminados (Nichols, 2000; Farthing, 1997). El mecanismo de infección suele ser variable y el número de quistes que puede haber en heces contaminadas es de aproximadamente 300 millones (Vázquez y Campos, 2009).

Epidemiología

Prevalencia global. Las parasitosis son de las enfermedades más comunes y con mayor prevalencia a nivel mundial. Alrededor de 3,500 millones de personas son infectadas por distintos parásitos. Aproximadamente 450 millones presentan la sintomatología, siendo la población infantil la más afectada (Zonta et al., 2007).

Se creía que *G. lamblia* era un parásito comensal, pero actualmente es reconocido como el agente causal más frecuente de infecciones intestinales causadas por protozoarios (Thompson, 2008; Vázquez y Campos, 2009). En el mundo hay aproximadamente 270 millones de infecciones anuales por *G. lamblia*. En Asia, África y América Latina, alrededor de 200 millones de personas desarrollan manifestaciones clínicas a causa de la giardiasis y 500 mil nuevos casos son reportados anualmente. En países en vías de desarrollo la prevalencia puede llegar hasta un 60% y en países desarrollados a un 5%. En Estados Unidos se estima una incidencia de 2.5 millones de casos por año (Furness et al., 2000) y en México, afecta aproximadamente a 9 millones de personas (Overtruf, 1994).

Prevalencia en México y Sonora. La giardiasis en México es una de las principales causas de parasitosis intestinales, afectando a la población en general, principalmente a los niños. Se ha reportado una prevalencia de giardiasis en niños de 3% a 50% (Cifuentes et al., 2004; Sánchez, et al., 2006). Los niños de 1 a 5 años presentan la prevalencia más alta, que van desde 4% al 42% (Nygard, et al., 2006).

Sonora es de los estados con mayor prevalencia e incidencia de giardiasis en nuestro país (Jiménez y Córtes, 2002). Se ha encontrado una prevalencia de *Giardia* que puede variar de un 14% a 49% en la población general (Secretaría de Salud, 2009) y una incidencia en niños de 1 a 4 años que puede llegar hasta 88.97 por cada 100,000 habitantes (Figura 3) (Secretaría de Salud, 2010).

Sintomatología clínica

Los síntomas por la infección con *Giardia* varían de persona a persona. Esto debido a la intensidad de la infección, la cantidad de quistes ingeridos, la cepa del parásito y el estado inmunológico del paciente. El período de incubación de *Giardia* varía de 1 a 3 semanas y la duración de éste depende del tamaño del inóculo.

Una de las características de la giardiasis es que la persona puede estar infectada con el parásito y no presentar ningún síntoma. En cambio en las personas que sí los presentan éstos pueden variar y pueden ser malestar en general, debilidad, dolor abdominal, anorexia, diarreas severas. Las heces pueden ser mucosas, pastosas o líquidas, fétidas y espumosas, la diarrea es constante en algunos casos, mientras en otros no (Sing, et al., 2000). La fase

Estado	Grupos de edad											Incidencia
	< 1	1 - 4	5 - 9	10 - 14	15 - 19	20 - 24	25 - 44	45 - 49	50 - 59	60 - 64	65 y +	
Aguascalientes	36.05	70.48	34.81	20.72	14.50	22.58	13.07	19.01	9.19	3.60	3.58	21.39
Baja California	10.73	32.54	19.12	13.79	3.95	3.61	2.34	5.26	6.05	9.27	2.12	8.02
Baja California Sur	41.37	215.63	147.24	76.85	27.00	30.38	31.02	37.37	34.39	50.20	67.29	60.60
Campeche	91.47	152.72	112.31	45.32	38.33	32.68	25.04	26.74	42.42	43.65	26.42	49.18
Coahuila	4.34	26.09	10.24	5.27	1.20	4.76	2.42	5.77	3.61	5.46	6.17	5.84
Colima	9.95	79.77	37.23	26.41	8.82	17.99	5.74	5.39	3.74	11.57	0.00	16.43
Chiapas	128.73	131.63	53.75	29.74	15.05	18.08	16.77	24.88	26.44	47.28	32.94	36.28
Chihuahua	13.75	29.04	14.91	8.96	5.03	3.02	4.01	3.87	5.35	1.08	3.98	7.45
Distrito Federal	15.76	53.36	34.90	26.85	12.72	9.45	10.74	12.77	12.29	16.26	11.97	16.75
Durango	24.93	37.08	25.13	17.40	11.44	10.69	6.99	10.41	6.40	2.32	5.18	13.11
Guanajuato	9.41	16.25	9.69	2.53	2.13	3.03	2.25	1.48	3.12	6.20	3.40	4.48
Guerrero	62.74	85.73	27.10	18.68	21.84	17.34	9.43	18.21	59.58	12.85	13.63	26.03
Hidalgo	20.72	21.35	14.93	4.37	4.58	7.45	2.12	4.28	4.87	1.41	3.93	6.45
Jalisco	21.64	62.78	16.75	6.67	2.65	5.57	3.04	4.80	3.59	5.48	3.03	9.66
México	21.58	36.52	22.80	17.72	11.93	11.31	6.22	5.41	7.22	12.15	8.82	12.57
Michoacán	1.42	14.68	8.41	5.46	2.48	1.11	1.45	1.84	3.67	1.74	1.09	3.75
Morelos	39.37	76.32	54.10	33.63	65.50	10.73	9.95	8.83	13.06	17.36	13.80	27.08
Nayarit	24.41	33.37	14.31	11.20	3.21	4.68	5.32	8.93	3.51	3.30	8.86	8.95
Nuevo León	8.03	35.17	27.05	15.63	6.10	5.39	3.90	2.18	4.44	4.78	1.96	9.40
Oaxaca	64.64	90.30	42.19	20.40	17.81	13.22	10.18	14.99	17.04	15.22	7.52	23.11
Puebla	17.49	22.83	14.83	10.00	5.48	6.38	3.79	7.78	6.23	4.01	4.68	8.15
Querétaro	6.26	16.66	12.62	7.79	2.83	5.40	4.37	2.05	6.07	4.89	2.39	6.28
Quintana Roo	79.74	139.57	75.28	44.44	18.90	13.46	10.01	9.97	12.86	24.60	17.67	32.68
San Luis Potosí	30.43	109.60	57.01	38.74	33.32	34.41	31.24	41.92	38.22	23.03	28.39	41.63
Sinaloa	143.69	293.65	150.00	92.23	52.61	43.21	37.53	37.67	38.48	61.69	27.17	74.06
Sonora	27.96	88.97	78.15	49.06	28.21	17.89	10.36	8.47	12.66	16.77	14.24	29.14
Tabasco	45.53	66.72	46.66	31.63	15.95	13.28	10.68	18.99	9.36	12.02	14.93	22.32
Tamaulipas	32.83	82.35	57.15	40.14	38.06	34.86	6.06	46.94	39.02	109.82	36.60	34.83
Tlaxcala	13.86	28.83	13.86	7.53	4.38	5.60	2.29	1.64	2.38	3.65	1.57	6.70
Veracruz	38.41	47.61	33.73	27.56	25.97	24.67	13.75	43.91	23.66	36.03	14.29	25.35
Yucatán	127.04	212.46	108.95	83.10	57.04	89.55	50.26	33.01	24.55	22.56	27.34	69.79
Zacatecas	64.45	94.61	32.30	12.26	7.22	7.28	6.49	2.64	7.38	2.58	5.98	16.91
TOTAL GLOBAL	35.08	63.03	34.35	22.03	15.07	14.05	9.22	13.91	13.74	17.83	11.02	19.08

Figura 3. Incidencia de Giardiasis en México de la población general por grupos de edad. Casos probables registrados en el Sistema de Notificación Semanal, 2010.

Incidencia por 100 000 habitantes

A/N= Ausencia de notificación

N.A.= No aplica para este grupo de edad

aguda de la giardiasis dura 3 ó 4 días y en raras ocasiones existen otras complicaciones en los afectados como urticaria, rinitis e insomnio (Heuman y Scott, 1997).

La mayoría de las personas se recupera totalmente después del tratamiento, pero algunos sufren de malestares estomacales o diarreas que pueden durar dos años o más. En casos muy graves existe una mal absorción de nutrientes y la consecuente desnutrición (Adam, 1991). Esto puede ser debido a que *Giardia* origina alteraciones en el duodeno, causando una obstrucción mecánica de la superficie de absorción del intestino. En el hospedero con giardiasis hay un recambio celular acelerado en el intestino asociado con la atrofia de las vellosidades. Este es el posible mecanismo patogénico, que tiene una relación sinérgica con el desbalance de la flora intestinal (Farthing, 1997). Algunos autores opinan que la pérdida epitelial y el desprendimiento de enterocitos son las causas de las diarreas (Burret et al., 1990). Pero otros como Astiazarán y colaboradores en el 2000, observaron *in vivo* que *G. lamblia* no se distribuye uniformemente en el intestino, si no que forma nichos. También se ha observado que los niveles de hemoglobina, vitaminas y parámetros antropométricos son afectados (Barreras y Ontiveros, 2002).

Estado nutricional y parasitosis

En general las infecciones intestinales pueden afectar el estado nutricional de la persona. Los niños y las personas desnutridas son las más vulnerables, la infección puede volverse crónica y provocar diarreas graves, pérdida de peso y talla en los niños y una mal absorción de nutrientes. Esta mal absorción puede ser en general, o específicamente de algún grupo de nutrimentos, ya sea vitaminas (como B9 y B12), lactosa, almidón, entre otros (Ortega y Adam, 1997). En un estudio en zonas rurales en el noroeste de Tailandia, se estudió el efecto de la giardiasis sobre el estado nutricional de niños escolares. Al comparar

niños sanos con infectados, los últimos presentaban menores ingestiones de hierro, riboflavina y proteínas (Egger et al., 1990). Algunos estudios como estos respaldan la evidencia que *G. lamblia* tiene un impacto negativo en el estado nutricional, especialmente en niños (Thompson y Walters, 2002).

Tratamientos

Es difícil encontrar estudios que evalúen de una misma manera la eficacia de los medicamentos usados en el tratamiento contra la giardiasis. Hasta hace algunos años no existía un fármaco ideal con el que se lograra un porcentaje alto de curación con pocos efectos secundarios (Gardner, 2001). Anteriormente esta infección era tratada con productos con arsénico, mercurio y bismuto. Gracias al descubrimiento de la quinacrina en los años treinta, este medicamento fue usado como anti-giardiasis, con una eficacia del 90% (Tracy y Webster, 1996). Sin embargo, tiene efectos secundarios que incluyen; vómitos, náuseas, coloración amarilla de la piel, cefalea y malestar general. Esto ha traído como consecuencia una disminución drástica de su empleo y su producción. Hay distintos tratamientos que tratan de brindar los mejores resultados en el paciente, pero todos en mayor o menor proporción pueden causar efectos secundarios indeseables.

La furazolidona, ha sido otro producto efectivo contra la giardiasis. Estudios realizados en la década de los ochenta demostraron que las tasas de curación alcanzadas con este compuesto oscilaban entre 80% y 90%. Además se sugirió su uso en la población infantil, por sus mínimos efectos indeseables y por su fácil disponibilidad en suspensión (Murphy y Nelson, 1983; Cañete et al., 2004).

Los nitroimidazoles son de las drogas más usadas, con tasas elevadas de curación en el tratamiento para la infección con *Giardia*. Dentro de ellos el metronidazol ha sido el más estudiado y sus tasas de curación oscilan entre 60% y 100%. Sin embargo, hay evidencia de efectos adversos al usar este

fármaco, entre ellos; sabor metálico, dolor de cabeza, náuseas y toxicidad del sistema nervioso central. Secnidazol y tinidazol son otros nitroimidazoles muy utilizados. El poder emplearlos en una sola dosis y la poca aparición de efectos secundarios han determinado un incremento gradual en su uso (Gardener y Hill, 2001). Los bencimidazoles se han usado con relativa frecuencia (Al-Waili y Hasan, 1992). De ellos, el albendazol, es el que mejores resultados ha brindado tanto en estudios “*in vitro*”, como clínicos (Hill, 1993).

Por otro lado, se ha probado la eficacia de los tratamientos de nitromidazoles, furazolidona y bencimidazoles; sin mostrar diferencias significativas al comparar un tratamiento con otro. En un estudio reciente se evaluó la eficacia de albendazol, tinidazol y cloroquina en 165 niños con giardiasis, donde el porcentaje de curación de la cloroquina fue de 86% y del tinidazol del 91% (Escobedo et al., 2003; Escobedo et al., 2008). Ambos superan la efectividad de albendazol.

Otro estudio realizado en Cuba en niños de 5 a 15 años comparó el efecto de mebendazol contra secnidazol y no encontró diferencias entre los tratamientos (Sadjjadi et al., 2001).

Debido a lo anterior, actualmente se buscan alternativas terapéuticas antiparasitarias en los extractos de plantas de uso en la medicina tradicional (Satalaya et al., 2009). Éstas deben competir con los actuales esquemas de tratamiento que incluyen medicamento alopático, en base a costos, efectividad y ausencia de efectos indeseables.

Efectos secundarios en el hombre

Los efectos nocivos de los fármacos en contra de las parasitosis son un problema a nivel mundial, tanto económica, sanitaria y socialmente. Teniendo, muchas veces, efectos nocivos en el desarrollo físico y mental, especialmente en el niño. Los antiparasitarios de mayor consumo en el ser humano aparentemente inocuos han mostrado un efecto tóxico tanto “*in vivo*” como “*in*

vitro" en modelos animales experimentales. No solo se presentan efectos secundarios a nivel clínico como náuseas, diarreas, entre otros; si no que también los puede haber a nivel genético (Mudry, et al., 1994).

Es necesario el uso de fármacos que no produzcan efectos adversos para prevenir y tratar infecciones parasitarias. Desafortunadamente los fármacos están perdiendo utilidad, debido a la presencia de tolerancia y resistencia que están desarrollando los parásitos. El caso de los antiparasitarios es muy importante, ya que a nivel mundial el número de personas expuestas aumenta. No existen medicamentos realmente inocuos y que puedan ser consumidos sin secuelas. Esto ha exigido la investigación y control clínico que permitan la disponibilidad de antiparasitarios útiles e identificar agentes tóxicos en vigencia en algunas regiones del mundo.

El Mebendazol, es un antihelmíntico efectivo, pero se ha demostrado su mutagenicidad en ensayos a corto plazo (Mudry et al., 1990). Tiene una capacidad de inducir micronúcleos "*in vivo*" en eritrocitos policromáticos de médula ósea de ratones en tres días de prueba. Otros ensayos "*in vitro*" en líneas celulares derivadas de cultivos de células de ovario de hámster chino, evidenciaron un aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas. Por otra parte, la bibliografía ha referido efectos tóxicos de mebendazol en humanos al ser administrado durante el primer trimestre de embarazo (Zutel, 1978; Al-Waili, 1990).

Los efectos genotóxicos de las drogas nitromidazólicas revelan una aparente contradicción en la bibliografía. Por una parte, son potentes mutágenos en sistemas microbianos "*in vitro*" (Connor et al., 1977), mientras que en células de mamíferos, son muy poco o nada activas. Esto pone en evidencia la alta eficiencia de los mecanismos de reparación del DNA en las células eucariotas (Matula, 1990). Sin embargo, su genotoxicidad ha sido determinada "*in vitro*", encontrándose aberraciones cromosómicas y micronúcleos en cultivo de linfocitos humanos e "*in vivo*" utilizando médula ósea de ratón. De igual manera, ensayos de carcinogenicidad realizados en ratones

demonstraron susceptibilidad al desarrollo de cáncer de pulmón, encontrándose también un incremento de linfomas malignos (Rustia y Shubik, 1972).

Hasta el momento no se cuenta con un fármaco ideal con el que se logre un porcentaje alto de curación con pocos o ningún efecto indeseable.

Plantas Medicinales

Las plantas medicinales han sido utilizadas por la humanidad desde tiempos muy remotos debido a sus componentes terapéuticos. El hombre poco a poco ha aprendido a usarlas y conocer sus propiedades benéficas, aprendizaje sin el cual tal vez no hubiera sobrevivido. El ser humano, al dominar la naturaleza, ha creado las medicinas sintéticas, benéficas para la salud, pero debido a su mal uso han perdido eficacia y provocado efectos secundarios. Aún con los avances en la medicina moderna, se sabe que en algunas regiones del mundo el 80% de la población sigue utilizando medicina tradicional para curar enfermedades (OMS, 2002; Annan y Houghton, 2007).

El uso de las plantas medicinales va en aumento, aunque no son inocuas y hay que estudiarlas para saber sus propiedades farmacológicas, clínicas y tóxicas, para obtener como resultado una alternativa útil en el desarrollo de fármacos que resuelvan problemas de salud. El propósito de algunos tratamientos alternativos es fortalecer el organismo y controlar los efectos secundarios de los tratamientos convencionales. La mayoría de las veces son más seguros y tienen menos efectos secundarios que los medicamentos ya existentes (Pressman, 2001; Barbosa et al., 2006). Su uso, en países desarrollados ha aumentado considerablemente, y más en países emergentes como México, tanto en la medicina homeopática como en productos naturales purificados (OMS, 2002).

Por falta de recursos económicos o de acceso a la medicina alópata, algunos sectores de la población mexicana usa solo remedios elaborados con plantas medicinales. En México existen alrededor de 5,000 especies utilizadas

para curar diversas enfermedades. Solo una pequeña parte ha sido estudiada desde el punto de vista biológico (CONABIO, 2010).

Además de producir metabolitos primarios, como aminoácidos, carbohidratos, ácidos grasos, las plantas producen metabolitos secundarios. Son sustancias que no parecen participar directamente en el desarrollo, simplemente aportan a la planta que las produce una ventaja para responder a estímulos del entorno (Quiroga et al., 2001; Quiroga et al., 2004). A esos metabolitos, se les atribuyen las propiedades de las plantas, que están ganando interés para aplicaciones terapéuticas (Sing et al., 2000). Los metabolitos secundarios de las plantas pueden poseer propiedades biológicas, tales como anticancerígenos, antimicrobianos, antiinflamatorios, y antiparasitarios. Además, tienen potencialidad para utilizarse en la prevención de enfermedades (Ferguson, 2001).

Se han realizado estudios sobre la actividad de las plantas medicinales. En México el estudio químico de las plantas se ha realizado desde hace mucho tiempo. En los últimos años este enfoque ha cambiado considerablemente. Ahora se busca extraer sus compuestos tratando de demostrar diversas actividades biológicas, identificando específicamente el metabolito secundario activo.

Yucca sp.

La yuca es una planta mexicana con propiedades curativas. Tiene unas 50 especies pertenecientes a la familia *Agavaceae*; todas ellas fácilmente diferenciadas de los agaves, aun sin floración. Presentan hojas rectas y flores blancas, en forma de campana. Estas últimas, además de los frutos de la yuca, son comestibles. La mayoría de las especies de yuca se producen en regiones semiáridas o en el desierto. Su hábitat va desde el norte de las grandes llanuras a través de los bosques y el trópico seco de México, hasta el suroeste de Estados Unidos. Cerca de 10 especies se encuentran en la región del Desierto

de Sonora, siendo una de ellas *Yucca baccata* (Figura 4) (Mielke, 1993; Dimmitt, 2000). De las raíces de algunas especies de *Yucca* se obtienen productos químicos que se utilizan para hacer jabón, proporcionar el agente espumante en bebidas, entre otros. También se logran beneficios terapéuticos gracias a las saponinas; metabolitos secundarios que producen algunas plantas desérticas (Piacente et al., 2005).



Figura 4. *Yucca baccata*
http://en.wikipedia.org/wiki/Yucca_baccata

Saponinas en plantas medicinales

Las saponinas son detergentes naturales encontrados en muchas plantas que contienen compuestos solubles en agua y en grasa. Las dos principales fuentes comerciales son *Yucca schidigera* que crece en el desierto del norte de México

y *Quillaja saponaria*, un árbol que crece en las zonas desérticas de Chile (Cheeke, 2000).

La mayor producción de yuca se lleva a cabo en nuestro país. El tronco de la planta es la parte más utilizada. Se tritura y seca para obtener polvo de yuca. Después se somete a un macerado mecánico para producir jugo de yuca, el cual se concentra por evaporación, quedando el concentrado denominado extracto de yuca. Finalmente quedan los componentes activos, con propiedades detergentes; las saponinas son excelentes agentes espumantes. Los extractos de yuca se utilizan en bebidas, lápiz labial y champú. Sus propiedades antifúngicas y antibacterianas son muy importantes en las aplicaciones cosméticas. También se ha reportado una reducción de amoníaco ruminal en el ganado “*in vitro*” e “*in vivo*”, cuando se administran concentraciones de extractos de yuca (Santoso et al., 2004; Pen et al., 2006).

En Estados Unidos se ha utilizado *Y. schidigera* para aliviar los síntomas de artritis en caballos. Además las saponinas también sirven de protección contra la leishmaniasis, una enfermedad humana (McClure y Nolan, 1996), que es la segunda protozoosis más importante, después de la malaria.

Uno de los efectos más importantes que tienen las saponinas de *Y. schidigera* es su actividad antiprotozoaria al formar complejos irreversibles con el colesterol. Éste y otros esteroides son componentes de las membranas celulares, excepto de las bacterias, entonces las saponinas causan ruptura de la membrana, lisis celular y muerte (Cheeke, 2000). Su actividad en contra de protozoos ruminales ha planteado la cuestión de que si estas mismas saponinas pueden ser eficaces contra las enfermedades por protozoos que afectan a los seres humanos. Por ejemplo, en la giardiasis, enfermedad causada por *G. lamblia*, se ha observado que las saponinas de *Y. schidigera* son efectivas para matar a los trofozoítos en el intestino (McAllister et al., 1998).

Además, las saponinas son particularmente eficaces como adyuvantes en las vacunas contra protozoarios (Bomford, 1989). La eficacia de las vacunas orales aumenta porque se altera la permeabilidad de las células de la mucosa intestinal. Esto facilita la absorción de sustancias que normalmente el intestino

no absorbe (Johnson et al., 1986). Por lo tanto las saponinas podrían ser utilizadas en un ataque de dos frentes sobre protozoarios patógenos. Esto es un área muy prometedora para futuras investigaciones.

Evaluación de la actividad antiparasitaria de los extractos de *Yucca schidigera* sobre *Giardia lamblia*

Los extractos de la especie de *Y. schidigera* han sido estudiados ampliamente. Uno de los casos es en la producción porcina y de aves de corral para reducir el olor y las emisiones de amoníaco (McAllister et al., 1998). Además, se ha demostrado “*in vitro*” e “*in vivo*” que reducen protozoos del rumen en el ganado (Wang et al., 1998; Hristoy et al., 1999). Igualmente se ha estudiado el efecto que tienen las saponinas de extractos de *Y. schidigera* para combatir la giardiasis, utilizando como modelos experimentales jerbos y corderos (McAllister et al., 2001).

Se han hecho estudios para analizar la actividad de extractos y polvo de *Y. schidigera*, y probar la inhibición de la adhesión de trofozoítos en jerbos infectados con *Giardia*. Estos fueron tratados administrándoles oralmente extracto de butanol o incluyendo polvo de yuca en su dieta. Al final del ensayo se evaluó la excreción fecal de quistes y se observó que el extracto de butanol tuvo mayor actividad que el polvo de *Yucca*. Se realizó un ensayo “*in vitro*” utilizando extracto de butanol a 1500µg/mL y como control un antiparasitario comercial (metronidazol) a 40µg/mL. Se pudo observar que ambos tuvieron la misma eficacia al reducir hasta en un 50% la población de trofozoítos en la placa. En los jerbos tratados los trofozoítos no fueron eliminados totalmente del duodeno y yeyuno, esto por la dificultad de eliminar *Giardia* de estas regiones. Sin embargo fueron eliminados por completo del íleon (McAllister et al., 2001).

También fueron infectados veinte corderos con *Giardia* y después de la infección se les administro de forma oral polvo de yuca. Se observó que la excreción de quistes fue menor ($P < 0.05$) para los corderos que recibieron el

polvo en comparación con los no tratados. Aún así no se observaron disminuciones significativas de la incidencia. El polvo de yuca administrado en la dieta de corderos redujo quistes en la materia fecal. Pero, después de 26 días de tratamiento, el 90% de los corderos seguían excretándolos. Por lo tanto, se demostró que *Y. schidigera* no elimina en su totalidad la giardiasis en corderos, pero si reduce la excreción de quistes (McAllister et al., 2001).

Por otra parte, las saponinas son conocidas por formar complejos con las sales biliares y colesterol (Gee y Johnson, 1988). Es posible que la liberación de estos compuestos en el duodeno reduzca la actividad anti-giardial de saponinas en las regiones superiores del intestino delgado (Wang et al., 1999). La inactivación resultante de las saponinas puede reducir la eficacia del extracto como tratamiento para la giardiasis.

Con estos resultados no se puede confirmar claramente que tan efectivos son los extractos de saponinas obtenidas de *Y. schidigera*. Hay evidencia un poco más confiable sobre la efectividad de los extractos de saponinas en estudios “*in vitro*”, pero “*in vivo*” la información que se tiene es muy poca. No hay conclusiones sobre la eficiencia de este tratamiento y mucho menos información sobre concentraciones utilizadas para obtener resultados favorables.

Una de las especies de *Yucca* con mayor distribución en Sonora, es *Y. baccata*. De esta especie no se tienen estudios que evalúen su actividad anti-giardiasis “*in vitro*” e “*in vivo*”. Se recomienda seguir con este tipo de estudios en las plantas de este género, y comprobar si especies diferentes pueden tener actividad anti protozoaria. Las concentraciones de las dosis sin producir efectos tóxicos, su aceptación y costos razonables en su fabricación y administración, serán las áreas de impacto. Estos factores deben ser considerados en el desarrollo de recomendaciones para el extracto de yuca como alternativa terapéutica para la giardiasis, asociada a tasas altas de morbilidad en la población.

HIPÓTESIS

Las saponinas de los extractos de *Yucca baccata* del desierto sonoreño tienen actividad antiparasitaria “*in vivo*” sobre *G. lamblia* en jerbos (*Meriones unguiculatus*).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antiparasitaria de las saponinas presentes en los extractos de *Yucca baccata*, contra *Giardia lamblia* usando al jerbo (*Meriones unguiculatus*) como modelo experimental.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar el método de Dinitrosalicílico (DNS) para la cuantificación de saponinas usando como estándar *Quillaja saponaria*.
2. Obtener extractos butanólicos de hoja, tallo y raíz de *Yucca baccata* y cuantificar el contenido de saponinas en las mismas para seleccionar aquella con la mayor concentración.
3. Evaluar la actividad anti-giardiasis de saponinas usando tres concentraciones (24.4 mg/mL, 12.2 mg/mL y 6.1 mg/mL) del extracto butanólico de *Yucca baccata* usando jerbos como modelo experimental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño Experimental

El presente trabajo fue un diseño completamente al azar. El trabajo se dividió en dos experimentos independientes. Cada experimento incluyó 5 tratamientos (tres a base de saponinas: concentración baja, media y alta; uno más utilizando antiparasitario comercial y un grupo no tratado) y 5 grupos de comparación. La asignación de los tratamientos a los grupos de comparación y de los jerbos previamente infectados a cada uno de los grupos, se hizo de manera aleatoria. El proceso de aleatorización se hizo con el apoyo de un programa estadístico, y consistió en:

Asignación de los jerbos a los grupos

Se realizó mediante un programa de computo (STATA versión 11) partiendo de una población de 25 jerbos (Experimento 1, machos) y de 35 (Experimento 2, hembras), suponiendo 5 grupos de comparación con igual número de jerbos.

Asignación de los tratamientos a los grupos

Se tuvieron 2 urnas, en una de ellas se colocaron 5 papeles etiquetados con números del 1 al 5, que definían a los grupos. En la otra se colocaron 5

papeles etiquetados con letras de la A, a la E, que definían cada tratamiento como sigue:

- Tratamiento A: 24.4 mg/mL del extracto, concentración alta de saponinas, (Experimento 1: 1.65 mg/mL de saponinas y Experimento 2: 8.61 mg/mL de saponinas).
- Tratamiento B: 12.2 mg/mL del extracto, concentración media de saponinas (Experimento 1: 0.82 mg/mL de saponinas y Experimento 2: 4.30 mg/mL de saponinas).
- Tratamiento C: 6.1 mg/mL del extracto, concentración baja de saponinas (Experimento 1: 0.41 mg/mL de saponinas y Experimento 2: 2.15 mg/mL de saponinas).
- Tratamiento D: Antiparasitario comercial Metronidazol.
- Tratamiento E: Buffer de fosfatos (PBS).

Bioensayo

Antes de iniciar con el experimento se realizó un inóculo gástrico a cada uno de los jerbos con *G. lamblia*. Se consideró a un par de jerbos en cada experimento, seleccionados aleatoriamente, los cuales también fueron inoculados con trofozoítos de *G. lamblia*, para confirmar la infección, haciendo cuenta de trofozoítos en el duodeno e intestino proximal seis días post-infección.

Después de asignar aleatoriamente a los jerbos en cada grupo de tratamiento, y a siete días post-infección, se procedió a la administración del tratamiento correspondiente una vez diariamente por tres días consecutivos. El décimo día se realizó el sacrificio de los jerbos y se extrajo el duodeno e intestino proximal, para realizar la cuenta de trofozoítos. Además se registró el peso de cada jerbo al inicio y al final del bioensayo (Figura 5).

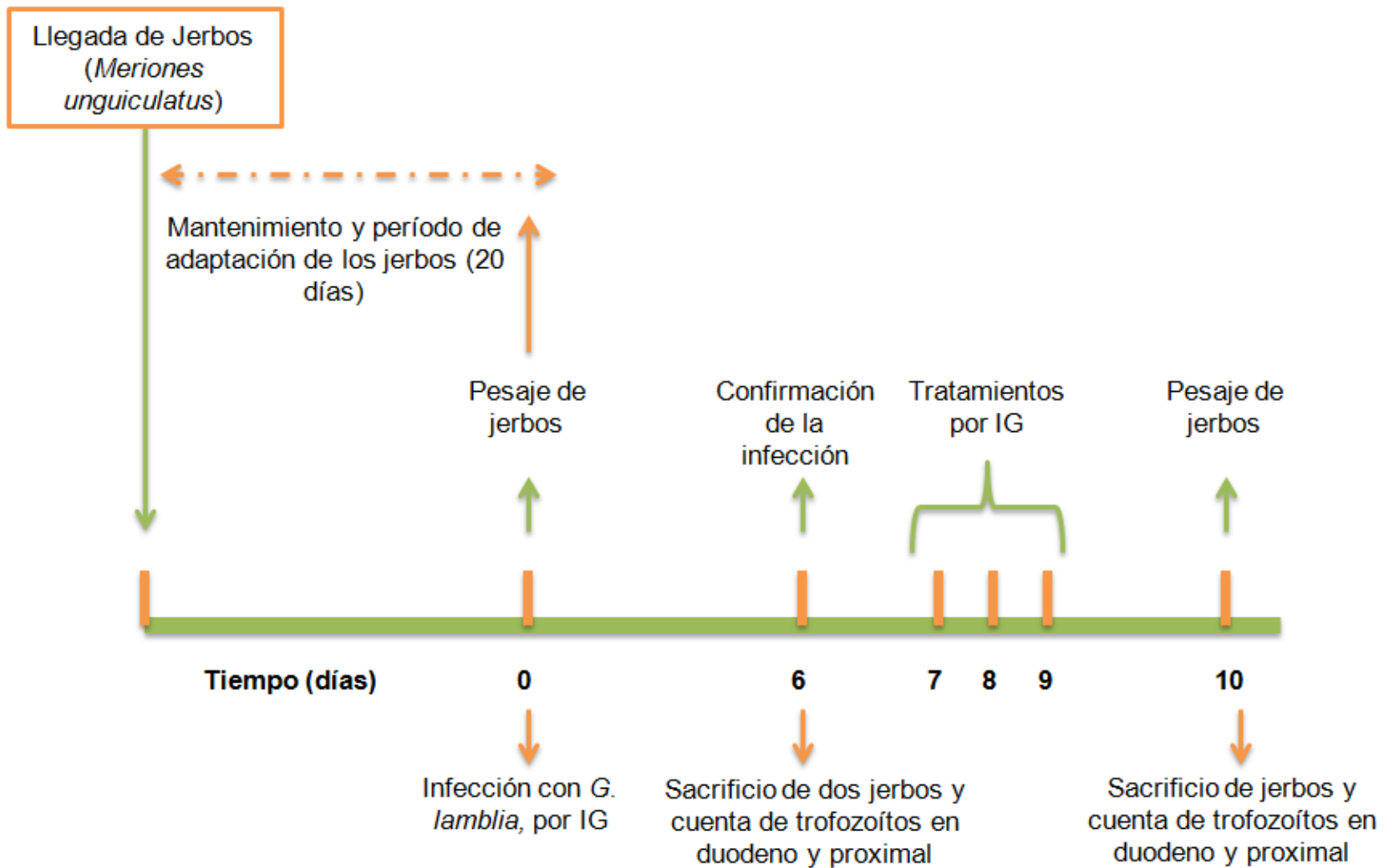


Figura 5. Seguimiento de jerbos en el bioensayo.
 IG: inoculación intragástrica con *G. lamblia*.

Colección de los especímenes y obtención de extractos

Colección de especímenes

La planta *Y. baccata* se colectó en el Rancho El Aribabi ubicado a 20 minutos al este del poblado de Imúris, Sonora. Las plantas se extrajeron del suelo y se colocaron en cajas rotuladas. Los especímenes fueron transportados hacia el herbario de la Universidad de Sonora para realizar su autenticación taxonómica por el Ing. Jesús Sánchez Escalante responsable del Herbario.

Proceso de secado

El material recolectado fue secado extendiéndolo sobre láminas, a la sombra, a temperatura ambiente, y removido diariamente durante 20 días. Después fue cortado por partes (hoja, tallo y raíz) y empacado en diferentes bolsas. El material seco fue pulverizado en un molino Whiley (Molino Thoma-Whiley Model 4, Laboratory Mill USA) hasta obtener un polvo grueso (2 mm de tamaño de partícula), para la elaboración de los extractos. Posteriormente se obtuvo el peso del material seco.

Preparación de los extractos

La preparación de los extractos se realizó basándose en el método descrito por Newbold en 1997, el cual consistió en realizar una suspensión acuosa de hoja, tallo y raíz de *Y. baccata* (33g/L), por toda una noche a temperatura ambiente (25-30°C). Posteriormente cada suspensión fue filtrada y agitada en un volumen igual de n-butanol durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se repitió la extracción con n-butanol y las capas orgánicas de cada extracto, fueron agrupadas y secadas en un rotavapor acoplado a una bomba de vacío (Vacum

Bland) a 40°C. Finalmente el sólido extraído fue pesado y resuspendido en PBS en una relación 1:15 del volumen original de agua.

Cuantificación de saponinas

La estandarización para la cuantificación de saponinas se realizó a través de una curva de calibración en un rango de 1 mg/mL hasta 5 mg/mL de estas. Se relacionó la cantidad de azúcares generados por la hidrólisis de las saponinas con la concentración inicial de estas; usando como estándar las saponinas de *Quillaja saponaria*, a través de la metodología del DNS (dinitrosalícilico). Este consiste en agregar 0.1 mL de la muestra y 0.1 mL del reactivo a un tubo de ensayo. Seguidamente se hidrolizó la reacción por 5 minutos en baño de agua hirviendo, para después interrumpir la reacción en un baño con hielo. Después se agregó 1 mL de agua a cada tubo, se dejó en reposo por 15 min y se cuantifican los azúcares reductores por el método espectrofotométrico del 3, 5-dinitrosalícilico a 540 nm. La curva de calibración se realizó con la saponina terpénica de *Quillaja saponaria* (Sigma) (Newbold, 1997; Hernández et al., 2005). Finalmente se seleccionó la estructura de la planta que contenía la mayor concentración de saponinas, la cual fue administrada como tratamiento antiparasitario durante el curso de la parte experimental del proyecto.

Evaluación de la actividad anti-giardiasis

Condiciones de bioterio

El área de bioterio de CIAD fue sanitizada con solución de hipoclorito de sodio al 10%. La temperatura se reguló entre 20°C y 26°C con una óptima de 22°C \pm 1°C y una humedad relativa del 40%-70%. La ventilación fue mantenida con 10 a 14 recambios de aire por hora y con un ciclo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Se colocó a cada jerbo en una jaula y se les proporcionó agua esterilizada por filtración y alimento *ad libitum*. Cada jaula fue sanitizada cada 3 días. Los desechos se depositaron en bolsas rojas de material peligroso biológico infeccioso (RPBI) (Villar y Mendocilla, 2007).

Modelo animal

Para este ensayo se utilizaron 60 Jerbos Mongólicos *Meriones unguiculatus*, que se pueden observar en la Figura 6; de ambos sexos, con variación de pesos que fueron desde 36g a 66g y de 6 a 12 semanas de edad; provenientes de las facilidades de experimentación animal de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).



Figura 6. Jerbos (*Meriones unguiculatus*)

Dieta de mantenimiento

Los jerbos recibieron por un período de 20 días, una dieta comercial en base a sus requerimientos nutricionales diarios, como se observa en la Tabla 1. Esta consistió en caseína, aceite de maíz, fibra, mezcla de minerales, gluconato de zinc mezcla de vitaminas, colina, almidón de maíz y sucrosa (Alimento Teklad Global para roedores Proteína, esterilizable).

Tabla 1. Requerimientos nutricionales diarios para roedores (National Research Council, 4ª edición revisada en 1995 y modificada en el 2009).

COMPONENTE	CANTIDAD	COMPOSICION
Caseína	200	20
Aceite de maíz	50	5
Fibra	50	5
Mezcla de minerales⁽¹⁾	35	3.5
Gluconato de zinc⁽³⁾	0.03	0.003
Mezcla de vitaminas⁽²⁾	10	1
Colina	2	0.2
Almidón de maíz	653	65.3
Sucrosa	Suficiente en la mezcla de minerales	
TOTAL	1000 g dieta	100%

Cultivo y preparación del inóculo de *G. lamblia*

Se colocaron 7mL de medio TYI-S-33 suplementado al 10% con suero bovino (Bovine adult serum, SIGMA) en un tubo de ensayo de 13 x 100 mm. Se adicionaron 250 µL de cultivo de *G. lamblia* GSH7 (1x10⁶ trofozoítos/mL). Ya sembrada la cepa, se incubó en condiciones semi-anaeróbicas (Figuroa y Granados, 2003)(Anexo 1). Se utilizó la cepa de la clona GS/M83-H7.

La transferencia de *Giardia* se realizó en condiciones estériles con ayuda de una campana de flujo laminar vertical (Purifier Class II Biosafety Cabinet, Delta Series, LABCONCO). Se mantuvo el cultivo de trofozoítos de *Giardia* por 20 minutos en baño de agua-hielo para liberar los trofozoítos adheridos a la pared del tubo. Los trofozoítos se lavaron tres veces en solución reguladora de fosfatos PBS con un pH de 7.2 (GIBCO) utilizando una centrifuga a 800g por 10 minutos a 4°C. Después del tercer lavado la pastilla de trofozoítos resultantes se re-suspendió en 500µL de PBS para su cuantificación en cámara de

Neubauer en dilución 1:15 con PBS y posterior dilución 1:2 con azul de tripano (Trypan Blue, solución 0.4% SIGMA, cat T8154). Después del último lavado la pastilla se re-suspendió en PBS y se ajustó a 5×10^6 de trofozoítos en 200 μ L de solución.

Inóculo con *G. lamblia*

Después de la semana de dieta de mantenimiento y para iniciar el bioensayo, todos los jerbos fueron inoculados con 5×10^6 trofozoítos de *G. lamblia* clona GS/M-83-H7. El inóculo suspendido en PBS fue proporcionado por medio de una sonda de alimentación forzada directamente en el tracto digestivo de cada roedor (Figura 7). La infección se estableció en los siguientes 7 días.



Figura 7. Inoculación intragástrica

Confirmación de la infección

De cada experimento, se seleccionaron dos jerbos aleatoriamente, el sexto día fueron sacrificados para confirmar giardiasis a través de la presencia microscópica de trofozoítos en el tejido duodenal (Astiazarán et al., 2000). Seguido, se estimó el promedio de trofozoítos observados, antes de iniciar con la evaluación de los tratamientos. Los jerbos fueron anestesiados y colocados en cama de inmovilización. Se realizó una asepsia y con material quirúrgico estéril se hizo un corte en la región abdominal diseccionando 5.0 cm de duodeno y 3 cm de la región proximal a éste. Éstos se humedecieron con PBS para mantener vivos a los trofozoítos. Se realizaron lavados de los tejidos diseccionados duodenal y proximal, los cuales fueron transferidos a viales que contenían 4 mL de solución PBS estéril y se mantuvieron a 4°C.

Recuperación y conteo de trofozoítos

Los viales con tejido duodenal fueron agitados en un rotor mecánico SOL-bat (Aparatos científicos, Serie 1-86) a 35g por 60 minutos a 4°C, para liberar los trofozoítos adheridos al tejido. El sobrenadante donde se encontraban suspendidos los trofozoítos fueron transferidos a tubos cónicos, los cuales se centrifugaron a 800g, a 4°C por 10 min. El sobrenadante fue descartado, y una vez que el sedimento fue agitado para su homogenización, se tomó una muestra (0.5 µL) y se llevo a una dilución 1:20 con solución PBS. Se contabilizó la cantidad de trofozoítos localizados en cada uno de los cuatro cuadrados grandes de las esquinas (1 mm² cada uno) de la cámara de Neubauer. La observación se llevó a cabo en un microscopio invertido (Olympus, equipado con contraste de fases, modelo CKX41) con el objetivo 40X.

Administración de los extractos

Después de confirmar la infección, los jerbos restantes recibieron en forma oral los extractos acuosos de *Y. baccata* en las concentraciones seleccionadas (24.4 mg/mL, 12.2 mg/mL y 6.1 mg/mL) una vez al día por 3 días. Después de este período, los jerbos fueron sacrificados para contabilizar los trofozoítos en el tejido duodenal y proximal.

Determinación de la efectividad

El efecto de cada tratamiento fue determinado por la proporción de trofozoítos contabilizados microscópicamente en la cámara de Neubauer. Se definió como dosis terapéutica efectiva a aquella que tuvo un efecto letal sobre el 50% de los trofozoítos en comparación con aquellos en el grupo control sin tratar (Villar y Mendocilla, 2007).

Análisis Estadístico

La variable tratamiento consistió en el extracto de saponinas en sus tres diferentes concentraciones evaluadas, el antiparasitario comercial para el tratamiento de giardiasis, y buffer de fosfatos (PBS). El efecto de cada uno de los tratamientos en la reducción de las cuentas de trofozoítos se comparó mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la diferenciación de medianas mediante la prueba de Dunn. La significancia estadística se consideró a una $p \leq 0.05$. El paquete estadístico utilizado fue NCSS 2007.

RESULTADOS

Estandarización y cuantificación de saponinas

Durante el experimento 1 (machos) se obtuvo un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.9945$, lo cual se muestra en la Figura 8a; y para el experimento 2 (hembras) se obtuvo un coeficiente de $R^2 = 0.9813$ como se puede ver en la Figura 8b.

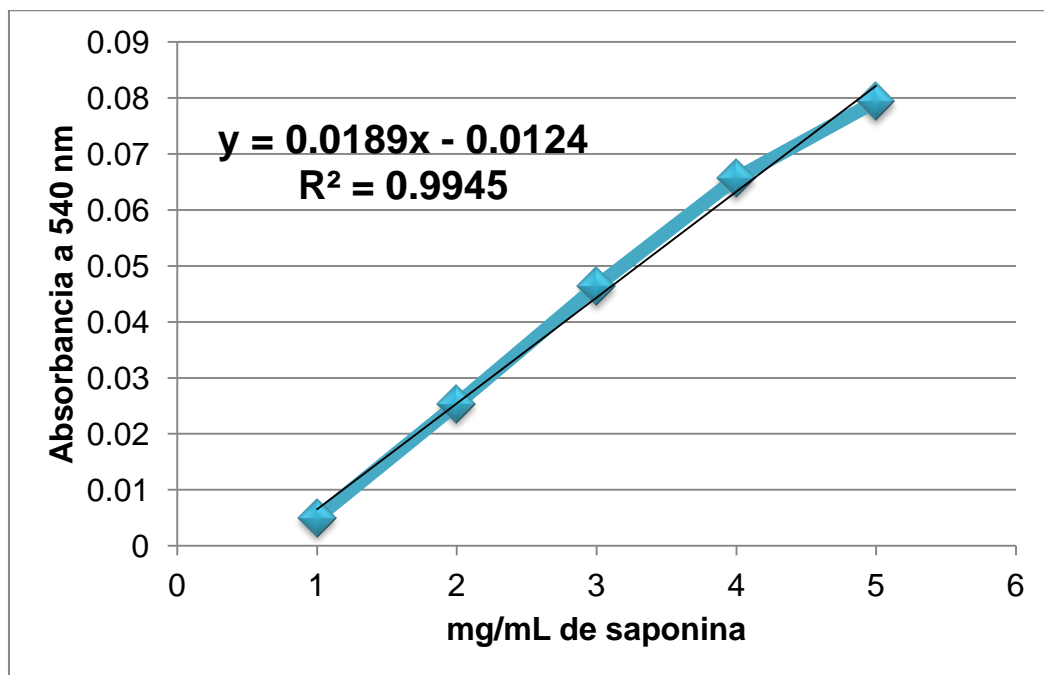


Figura 8a. Curva estándar de saponinas utilizando *Quillaja Saponaria* (Experimento 1).

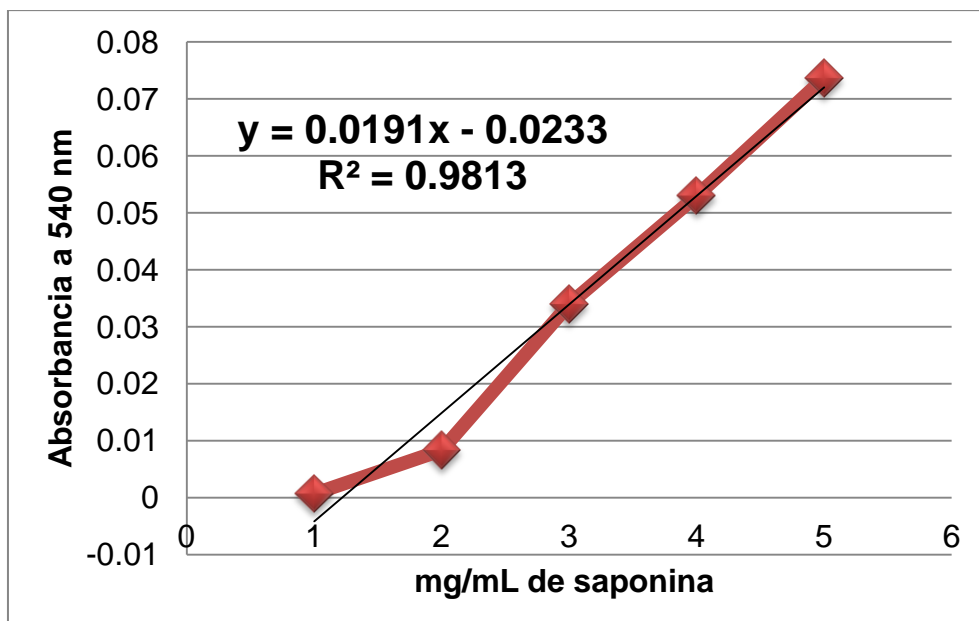


Figura 8b. Curva estándar de saponinas utilizando *Quillaja Saponaria* (Experimento 2).

Curva estándar de glucosa

Después de la estandarización y cuantificación de saponinas, se preparó una curva estándar de glucosa usando de 0.0 a 0.8 mg/ml, para conocer la cantidad de azúcar contenida en el estándar de saponinas de *Quillaja saponaria*. Para el experimento 1 se obtuvo un coeficiente de determinación de $R^2= 0.9955$ y para el experimento 2 de $R^2= 0.9922$ lo cual se muestra en la Figura 9a y 9b respectivamente.

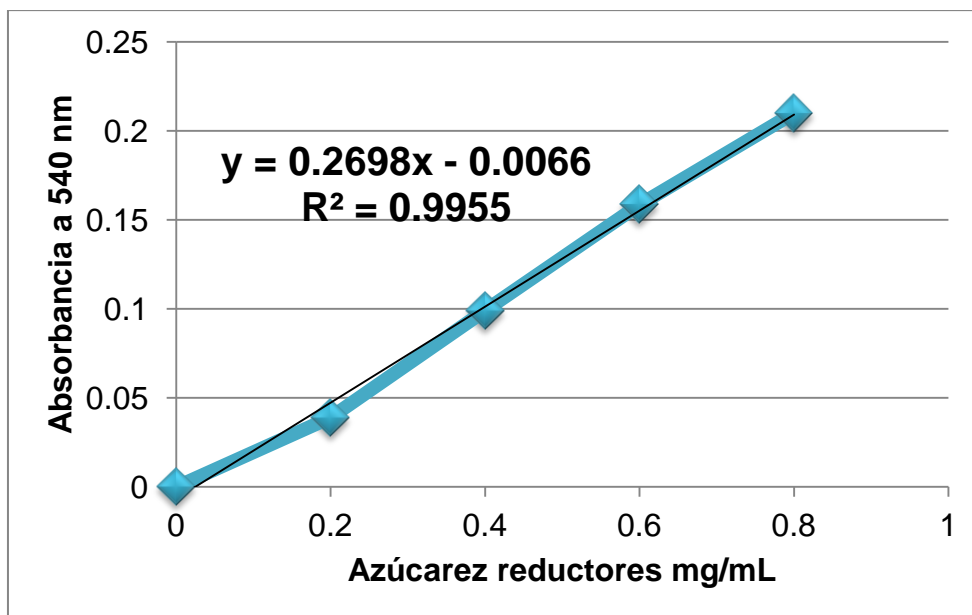


Figura 9a. Curva estándar de glucosa (Experimento 1).

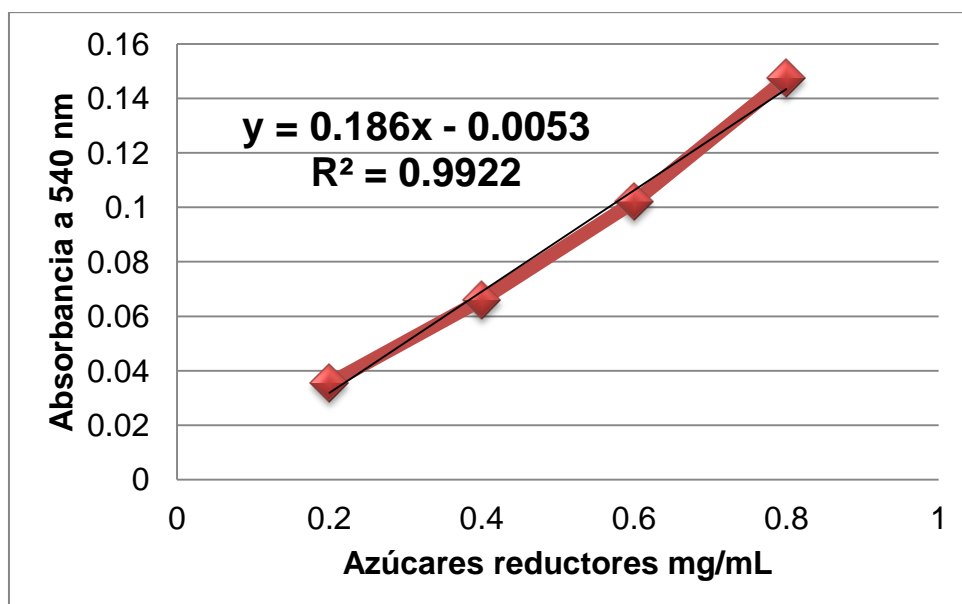


Figura 9b. Curva estándar de glucosa (Experimento 2).

Finalmente se relacionó la cantidad de saponinas en *Quillaja saponaria* con el contenido de azúcares obtenidos en la curva estándar de glucosa. Se obtuvo un

coeficiente de determinación de $R^2= 0.9945$ para el experimento 1 (Figura 10a) y de $R^2= 0.9813$ para el experimento 2 (Figura 10b).

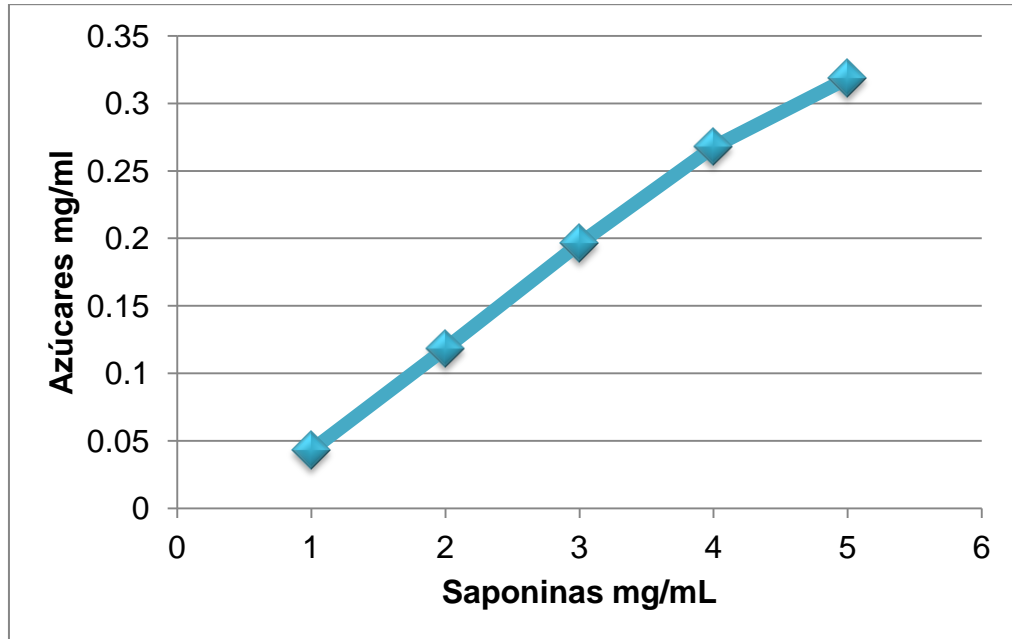


Figura 10a. *Quillaja saponaria* vs contenido de azúcares (Experimento 1).

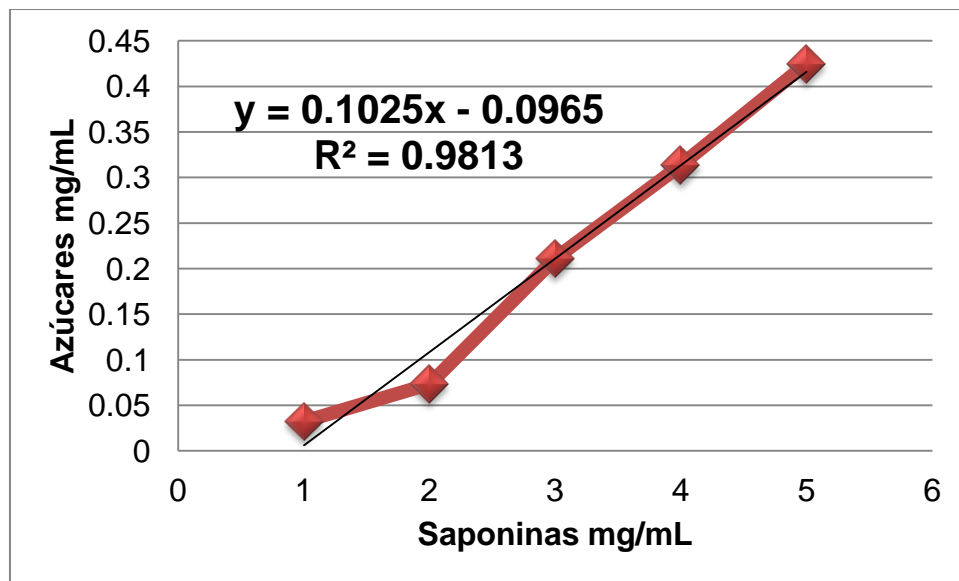


Figura 10b. *Quillaja saponaria* vs contenido de azúcares (Experimento 2).

Saponinas en *Y. baccata*

Después de la estandarización de la cuantificación de saponinas de *Quillaja*, se procedió a cuantificar las saponinas de *Y. baccata*.

La cuantificación se hizo específicamente para tallo, hoja y raíz (Experimento 1, Tabla 2) y solamente para tallo (Experimento 2, Tabla 3). Según la ecuación de la recta de la curva estándar los resultados fueron los siguientes:

Tabla 2. Contenido de saponinas en tallo de *Yucca baccata* empleada para la preparación de las concentraciones del tratamiento en el Experimento 1 (Jerbos machos).

Extracto butanólico	Concentración saponinas (mg/mL)	Extracto butanólico peso en seco (%)
Hoja	1.99	8.30
Raíz	0.41	1.2
Tallo	3.37	13.82

Tabla 3. Contenido de saponinas en tallo de *Yucca baccata baccata* empleada para la preparación de las concentraciones del tratamiento en el Experimento 2 (Jerbos hembras).

Extracto butanólico	Concentración saponinas (mg/mL)	Extracto butanólico peso en seco (%)
Tallo	17.22	70.6%

Cuenta de trofozoítos en duodeno y proximal

Con la finalidad de corroborar el establecimiento de la infección, dos jerbos machos del experimento 1 y un jerbo hembra del experimento 2 fueron infectados con 5×10^6 trofozoítos de *G. lamblia* diluidos en 200 μ l de PBS. Después de seis días de infección y al realizar el sacrificio se obtuvo para el experimento 1, una media en la sección del duodeno de 120,000 trofozoítos/mL, y en la sección del proximal de 85,000 trofozoítos/mL. Para el experimento 2, se obtuvo una cuenta de 200,000 trofozoítos/mL para duodeno y 130,000 trofozoítos/mL para el intestino proximal.

En la Figuras 11a y 11b se pueden observar trofozoítos tanto de duodeno como en intestino proximal específicamente. Estas imágenes corresponden a un campo del microscopio de contraste, observado a una resolución de 40X.

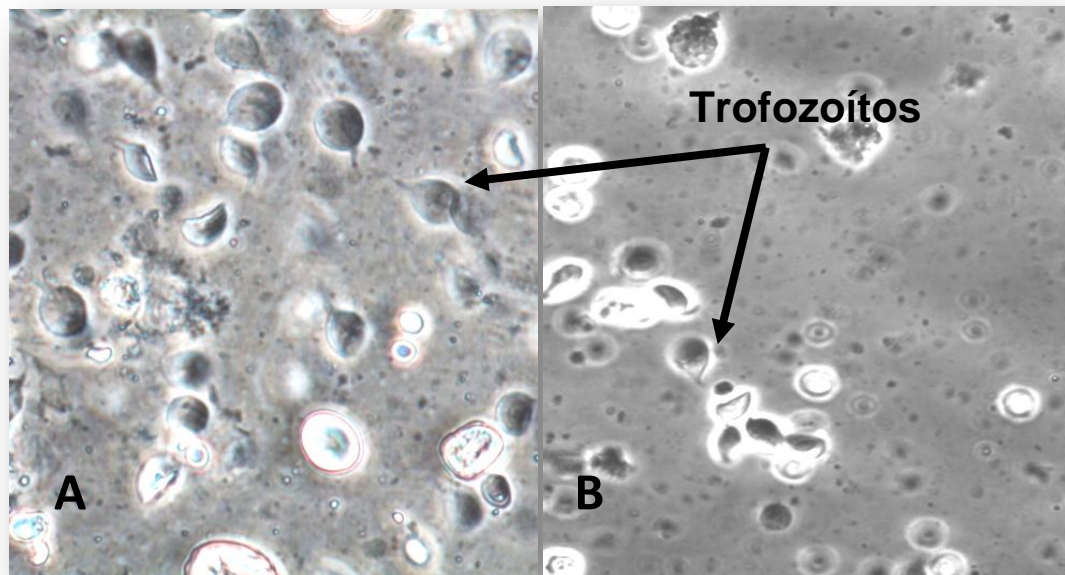


Figura 11a. A: Trofozoítos en duodeno. B: Trofozoítos en intestino proximal (Experimento 1: Jerbos machos).

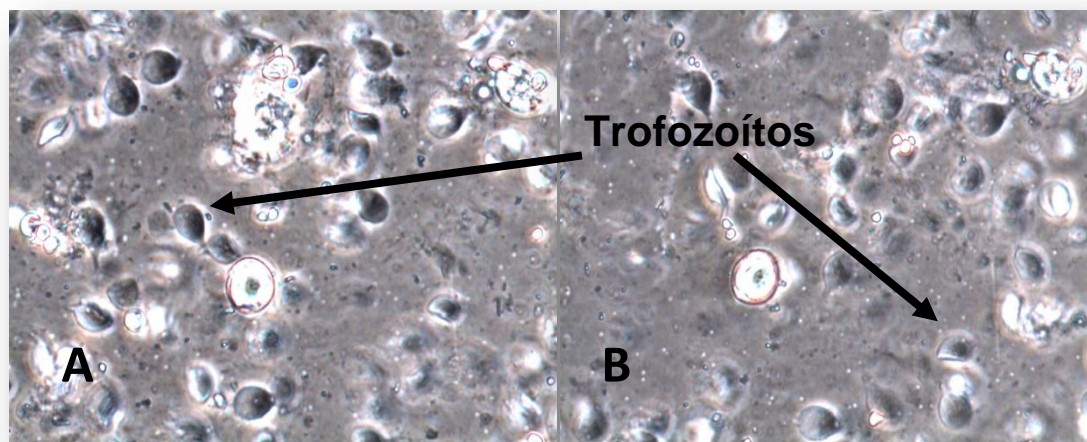


Figura 11b. A: Trofozoítos en duodeno. B: Trofozoítos en intestino proximal (Experimento 2: Jerbos hembra).

Modelo experimental

Se utilizarón 25 jerbos machos para el experimento 1 y 35 jerbos hembras para el experimento 2 (*Meriones unguiculatus*), divididos en 5 grupos los cuales se pesaron al inicio del estudio. A continuación se muestran los resultados de los pesos al inicio del estudio (Tabla 4 y 5).

En la tabla 4 y 5 se puede observar la pérdida de peso en jerbos del primer al décimo días del bioensayo. Para el primer experimento, no se observan diferencias significativas en los pesos de los jerbos entre los grupos tratados con los extractos de *Y. baccata* comparados con el grupo no tratado ($p > 0.05$). En cambio en el experimento 2, realizado con hembras se puede ver diferencias en la pérdida de peso ($p < 0.05$) entre los grupos tratados con el extracto butanólico de *Y. baccata* y el control negativo (PBS) comparado con el grupo tratado con metronidazol.

Tabla 4. Medianas de los pesos de los grupos de Jerbos macho durante el ensayo experimental (Experimento 1).

Extracto butanólico	Peso corporal inicial (g)	Peso corporal final (g)	Pérdida de peso (g)
24.4 mg/mL del extracto (1.65 mg saponinas/dosis)	57.9±1.85 ^a	45±1.3	7.2±1.51 ^a
12.2 mg/mL del extracto (0.82 mg saponinas/dosis)	54.3±2.83 ^a	43.2±4.09	6.1±1.89 ^a
6.1 mg/mL del extracto (0.41 mg saponinas/dosis)	53.4±2.05 ^a	46.6	7.6 ^a
No tratado	56.3±3.18 ^a	50.1±2.25	3.4±1.23 ^a
Metronidazol (1mg/dosis)	57.1±1.12 ^a	56.5±2.9	1.2±0.76 ^a

Pérdida de peso en jerbos macho al día 10 post-tratamiento. Datos se muestran como mediana ± EES. Diferente literal indica diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$, diferenciación de medianas por la prueba de Dunn).

Tabla 5. Medianas de los pesos de los grupos de Jerbos hembra durante el ensayo experimental (Experimento 2).

Extracto butanólico	Peso corporal inicial (g)	Peso corporal final (g)	Pérdida de peso (g)
24.4 mg/mL del extracto (8.61 mg saponinas/dosis)	52.5±1.48 ^a	53.6±5.9	4.35±4.05 ^a
12.2 mg/mL del extracto (4.30 mg saponinas/dosis)	52.4±3.03 ^a	49.8±2.6	6.4±1.55 ^a
6.1 mg/mL del extracto (2.15 mg saponinas/dosis)	57.1±0.99 ^a	46.6	7.6±0.53 ^a
No tratado	56.8±3.13 ^a	52.5±0.85	4.6±0.33 ^a
Metronidazol (1mg/dosis)	52.8±3.95 ^a	52.6±2.85	3.7±0.69 ^b

Pérdida de peso en jerbos macho al día 10 post-tratamiento. Datos se muestran como mediana ± EES. Diferente literal indica diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$, diferenciación de medianas por la prueba de Dunn).

Efecto de los tratamientos a diferentes concentraciones sobre la infección de
Giardia lamblia en jerbos

En la Tabla 6 se muestran los efectos de las dosis orales en el duodeno e intestino proximal de PBS (control negativo), extracto butanólico de tallo de *Y. baccata* 24.4 mg/mL (1.65 mg de saponinas por dosis), 12.2 mg/mL (0.82 mg de saponinas por dosis), 6.1 mg/mL (0.41 mg de saponinas por dosis) y Metronidazol (1 mg por dosis) dado a jerbos macho infectados con *Giardia lamblia*, una vez al día durante 3 días.

En la parte del duodeno y proximal respectivamente, se ve que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) en las cuentas de trofozoítos entre los jerbos macho tratados con una dosis alta de extracto, con aquellos con una dosis baja, y con el grupo control. Pero se observó una clara tendencia en ambos casos en la disminución de trofozoítos en los grupos tratados con el extracto a diferentes concentraciones en comparación con el grupo no tratado.

El grupo tratado con metronidazol fue muy efectivo, eliminando al 100% de los trofozoítos en duodeno e intestino proximal.

Tabla 6. Efectos del tratamiento del extracto butanólico con saponinas a diferentes concentraciones sobre las cuentas de trofozoítos de *G. lamblia* en jerbos macho al día 10 post-infección.

Extracto butanólico de <i>Y. baccata</i>	Duodeno (trofozoítos /mL)	Proximal (trofozoítos/mL)
24.4 mg/mL del extracto (1.65 mg saponinas/dosis)	440,000 ^a	90,000 ^a
12.2 mg/mL del extracto (0.82 mg saponinas/dosis)	200,000 ^a	130,000 ^a
6.1 mg/mL del extracto (0.41 mg saponinas/dosis)	480,000 ^a	120,000 ^a
No tratado	1,112,000 ^a	430,000 ^a
Metronidazol (1mg/dosis)	0.0	0.0

Efectos en el duodeno e intestino proximal de los tratamientos contra *Giardia lamblia* en jerbos machos. Valores expresados como medianas. Diferente literal indica diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$, diferenciación de medianas por la prueba de Dunn).

En la Tabla 7 (Experimento 2), se muestran los efectos de las cuentas de trofozoítos en el duodeno e intestino proximal de las dosis orales de PBS (control negativo), extracto butanólico de tallo de *Y. baccata* 24.4 mg/mL (8.61 mg de saponinas por dosis), 12.2 mg/mL (4.30 mg de saponinas por dosis), 6.1 mg/mL (2.15 mg de saponinas por dosis) y Metronidazol (1 mg por dosis) dado a jerbos hembra infectados con *Giardia lamblia*, una vez al día durante 3 días.

En la parte del duodeno existieron cuentas significativas bajas de trofozoítos ($p < 0.05$) en los grupos tratados con el extracto de *Yucca baccata* en comparación con el grupo control negativo (PBS).

En intestino proximal se puede ver que los grupos tratados con 12.2 mg/mL y 24.4 mg/mL son iguales estadísticamente, pero diferentes ($p < 0.05$) al grupo no tratado. En el grupo tratado con 6.1 mg/mL no se observan diferencias estadísticas al compararlo con cualquier otro.

El grupo tratado con metronidazol fue muy efectivo, eliminando al 100% de los trofozoítos en duodeno e intestino proximal

Tabla 7. Efectos del tratamiento del extracto butanólico con saponinas a diferentes concentraciones sobre las cuentas de trofozoítos de *G. lamblia* en jerbos hembra al día 10 post-infección.

Extracto butanólico	Duodeno (trofozoítos/mL)	Proximal (trofozoítos/mL)
24.4 mg/mL del extracto (8.61 mg saponinas/dosis)	30,000 ^b	15,000 ^b
12.2 mg/mL del extracto (4.30 mg saponinas/dosis)	65,000 ^b	20,000 ^b
6.1 mg/mL del extracto (2.15 mg saponinas/dosis)	210,000 ^{ab}	50,000 ^{ab}
No tratado	3,120,000 ^a	1,210,000 ^a
Metronidazol (1mg/dosis)	0.0	0.0

Efectos en el duodeno e intestino proximal de los tratamientos contra *Giardia lamblia* en jerbos hembras. Valores expresados como medianas. Diferente literal indica diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$, diferenciación de medianas por la prueba de Dunn).

DISCUSIÓN

Este es uno de los primeros experimentos en donde se utilizan extractos de *Y. baccata* para combatir parasitosis intestinales particularmente giardiasis en jerbos. En 2001, ya se había realizado un ensayo utilizando jerbos macho infectados con *G.lambli*a y tratados con extractos butanólicos de *Y. schidigera* (McAllister et al., 2001). En este estudio no se mencionó que parte de la planta fue utilizada para realizar los tratamientos, ni concentraciones de saponinas que se administraron.

En las últimas décadas se han estudiado las infecciones por *Giardia* en diferentes modelos animales como perros, ratas, ratones, gatos y jerbos, observando que estos últimos son el modelo más adecuado para estudiar la infección con *G. lambli*a. Por ejemplo se ha observado infecciones exitosas en ratones lactantes y jóvenes (ya que su sistema inmune es inmaduro). Por lo tanto, los resultados obtenidos son difíciles de interpretar y su utilidad como modelos animales para estudios de giardiasis podría ser cuestionada (Faubert y Belosevic, 1990).

Los pesos de los jerbos utilizados en este experimento (machos y hembras) oscilan entre 52-58 gramos, lo cual es considerado como apropiado para su edad de 6-12 semanas. A través de diversos estudios se ha observado que este peso y edad son los adecuados para realizar experimentos de *G. lambli*a en jerbos, ya que son más susceptibles a la infección. Durante el estudio por McAllister et al., 2001 (mencionado anteriormente) se realizaron bioensayos con jerbos de edad y peso similares a los observados en el presente estudio (McAllister et al., 2001).

Actualmente la medicina tradicional y popular ha retomado importancia en las investigaciones científicas, gracias a la falta de fármacos y la urgente necesidad de nuevos medicamentos que sean efectivos y no ocasionen efectos secundarios en las personas (Echeverría y Torres, 2001).

Los efectos antibacteriales, hemolíticos y antiparasitarios de estas plantas, se atribuyen a uno de sus metabolitos secundarios: las saponinas, las cuales son extraíbles con butanol (Wang et al., 1999).

Durante la estandarización del método para la cuantificación de saponinas, usando como estándar *Quillaja saponaria*. Se obtuvieron altos coeficientes de determinación $R^2=0.9945$ y $R^2=0.9813$ para el primer y segundo experimentos respectivamente. Anteriormente, se reportaron resultados similares a los de este estudio al estandarizar saponinas utilizando igualmente como estándar *Quillaja Saponaria*. Hernández y colaboradores en el 2005, reportaron un coeficiente de determinación de $R^2= 0.9827$, lo que nos ha demostrado que el método de cuantificación de saponinas por determinación de azúcares es muy confiable, ya que se muestra un alto índice de correlación entre la cantidad de saponinas presentes y la cantidad de azúcares hidrolizados.

Quillaja saponaria tiene una estructura compleja donde se observan diversas fracciones. Posee una aglicona sustituida con un limitado número de diferentes sacáridos (entre ellos glucosa, xilosa, fructosa), además de ácido quillaíco y ácido glucorónico, de igual forma las sapogeninas esteroidales se encuentran sustituidas por un limitado número de monosacáridos unidos entre sí por enlaces glicosídicos en cadenas lineales o ramificadas. En ambos casos la hidrólisis provocada supone un rompimiento total de los enlaces glicosídicos, de forma tal que todos los azúcares que conforman a las saponina queden expuestos como monosacáridos, los cuales son los únicos detectados por el método de Miller (Hernández et al., 2005).

Seguidamente se procedió a la cuantificación de saponinas en el extracto de tallo de *Y. baccata*, que fue la parte con la mayor concentración (3.37 mg/mL) de saponinas lo que correspondió a 13.82% del extracto butanólico seco, para el experimento 1, realizado con machos. Para el experimento 2, realizado con hembras se obtuvo una concentración de saponinas en tallo de 17.22 mg/mL, lo que correspondió al 70.6% del extracto butanólico seco obtenido para ese experimento. Existe información sobre la cantidad de

saponinas presentes en otras plantas pertenecientes a la familia *Agavaceae*, como lo es *Y. baccata*, pero no se tiene información sobre el tipo de saponinas presentes en la misma. Los datos obtenidos en la primera extracción concuerdan con lo publicado por Wang y Kim en el 2011, donde cuantificaron saponinas en *Y. schidigera* obteniendo un 12.5%, mientras que Oleszek y colaboradores en el 2001 ya habían publicado que *Y. schidigera* contenía un 10% de saponinas en su tallo. Los datos obtenidos en la segunda extracción fueron muy altos en comparación de los primeros. Esto puede deberse a la manera en la que se hizo la extracción, y aunque el método empleado para ambos casos era el mismo, cualquier mínima diferencia puede hacer que haya variación en los resultados obtenidos (Guerra et al., 2008).

Al administrar los tratamientos en el primer experimento realizado con jerbos machos no se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en las cuentas de trofozoítos en el duodeno entre los grupos tratados con 24.4 mg/mL (1.65 mg de saponinas/dosis; 440,000 trofozoítos/mL), 12.2 mg/mL (0.82 mg de saponinas/dosis; 200,000 trofozoítos/mL) y 6.1 mg/mL (0.41 mg de saponinas/dosis; 480,000 trofozoítos/mL) ni en intestino proximal con 24.4 mg/mL (1.65 mg de saponinas/dosis; 90,000 trofozoítos/mL), 12.2 mg/mL (0.82 mg de saponinas/dosis; 130,000 trofozoítos/mL) y 6.1 mg/mL (0.41 mg de saponinas/dosis; 120,000 trofozoítos/mL) del extracto butanólico de tallo de *Y. baccata*. Aunque hay evidencia de que la administración oral de la fracción soluble de los extractos butanólicos de *Y. baccata* redujo en gran manera el número de trofozoítos en el intestino delgado (duodeno e intestino proximal) de los jerbos, estos no fueron eliminados completamente.

Una de las posibles causas por las que en este experimento no se observaron diferencias estadísticas entre las cuentas de trofozoítos por efecto de las diferentes concentraciones de saponinas administradas, fue posiblemente por el tamaño de jerbos por grupo ($n=5$), lo que hizo que no se alcanzará una significancia.

Los trofozoítos presentes en duodeno fueron más que los contabilizados en intestino proximal, lo cual podría deberse a que las saponinas forman

complejos con las sales biliares y colesterol (Sidhu y Oakenfull, 1986; Gee y Johnson, 1988) cuya liberación en el duodeno reduce la actividad anti-giardia de saponinas en las regiones superiores del intestino delgado, por lo que su actividad podría ser mayor en el intestino delgado distal, donde las concentraciones de nutrientes son menores.

En el experimento 2, realizado con hembras, se pueden observar cuentas de trofozoítos significativamente bajas ($p < 0.05$) entre los grupos tratados con 24.4 mg/mL (8.61 mg de saponinas/dosis), 12.2 mg/mL (4.30 mg de saponinas/dosis) y 6.1 mg/mL (2.15 mg de saponinas/dosis) del extracto butanólico de tallo de *Y. baccata*, con respecto al grupo no tratado.

En la región del duodeno se observaron cuentas de trofozoítos más bajas en el grupo tratado con 24.4 mg/mL del extracto (30,000 trofozoítos/mL) con todos los demás grupos, incluido el grupo no tratado (3, 120,000 trofozoítos/mL).

En intestino proximal el grupo tratado con 24.4 mg/mL (15,000 trofozoítos/mL) es igual estadísticamente al grupo tratado con 12.2 mg/mL (20,000 trofozoítos/mL), pero diferente al grupo no tratado (1, 210,000 trofozoítos/mL). El grupo tratado con 6.1 mg/mL al realizar la cuenta de trofozoítos (50,000 trofozoítos/mL) no alcanzó significancia y fue igual a todos los demás grupos.

En los resultados obtenidos, se observaron las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) en la cuenta de trofozoítos en duodeno y proximal en el grupo de jerbos hembras al compararlo con los machos. Igualmente la cantidad de jerbos por grupo en el experimento realizado con hembras fue bajo ($n=7$), pero fue suficiente para alcanzar significancia. Aunque un número mayor de jerbos por grupo hubiera sido lo mejor para este tipo de experimentos.

Al aumentar la concentración de saponinas en el segundo experimento, redujo de una manera más eficiente la cuenta de trofozoítos, pero cabe señalar que durante el experimento 11 jerbos murieron y otros se veían enfermos, débiles y perdían pelo. Situación que no paso en los jerbos tratados con el antiparasitario comercial (Metronidazol) y el grupo no tratado. Metronidazol fue

100% efectivo en ambos experimentos, eliminando en su totalidad a los trofozoítos tanto en duodeno como intestino proximal.

McAllister y colaboradores en el 2001, sometieron a jerbos a tratamientos con extractos butanólicos de *Y. schidigera*, una vez al día por tres días, que equivalía a un total de 18.3 mg/mL del extracto. Pero al incrementar la dosis tres veces al día por tres días (50 mg del extracto), tuvieron que omitirlas a partir del segundo día (quinta dosis) ya que los jerbos se veían apáticos y posiblemente enfermos. Aunque se observó una reducción total de trofozoítos en yeyuno e íleon.

Además giardiasis parece tener un impacto negativo en la ganancia de peso del jerbo. Al comparar el grupo tratado con el antiparasitario comercial y los grupos tratados con los extractos butanólicos, estos últimos mostraron pérdidas de peso significativas (Sidhu y Shukla 2011; Quihui et al., 2012).

Este estudio demuestra que los extractos butanólicos de *Y. baccata* tienen un efecto positivo para combatir giardiasis en jerbos, pero la administración de este extracto parece afectar negativamente su salud. Por lo tanto los estudios sobre la purificación, toxicidad y la exposición a largo plazo de este tratamiento deben ser investigados.

CONCLUSIONES

El presente estudio constituye uno de los primeros para evaluar la actividad anti-giardiasis de saponinas obtenidas a partir de extractos de *Y. baccata*.

Se puede concluir que el jerbo (*Meriones unguiculatus*) de pesos entre 52-58 gramos y de 6-12 semanas de edad, es un excelente modelo experimental para trabajar con giardiasis; ya que como se pudo observar, es muy susceptible a esta infección.

La parte de *Yucca baccata* que contiene mayor cantidad de saponinas es el tallo.

Las saponinas de los extractos butanólicos de *Y. baccata* disminuyen en una buena cantidad a los trofozoítos de *G. lamblia* en jerbos en intestino delgado (duodeno e intestino proximal). Se propone investigar más sobre la administración de saponinas y el efecto que tienen a diversas concentraciones, además de estudios sobre su toxicidad y exposición a largo plazo.

BIBLIOGRAFÍA

- ADAM, R. 1991. The Biology of *Giardia spp.* Clinical Microbiology Reviews. 55:706-732.
- ADAM, R. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. Clinical Microbiology Reviews. 14:447-75.
- AL-WAILI, N, 1990. Mebendazole in *Giardia* infection; inappropriate doses. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 84:753-754.
- AL-WAILI, N., Hasan, N. 1992. Mebendazole in *Giardial* infection; a comparative study with mebendazole. Journal of Infectious Diseases. 165:1170-1171.
- ANNAN, K., Houghton, P. 2007. Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of aqueous extracts of *Ficus asperifolia* Miq. and *Gossypium arboreum* L., Wound-healing Plants of Ghana. Journal of Ethnopharmacology. vol. 119, pp. 141-144.
- ASTIAZARÁN, H., Espinosa M., Castañon, G., Chavez, B., Martínez, A. 2000. *Giardia lamblia*: Effect of infection with symptomatic and asymptomatic isolates on the Growth of Gerbils (*Meriones unguiculatus*). Experimental Parasitology. 95:128-135.
- BARBOSA, E., Calzada, F., Campos, R. 2006. Antigiardial activity of methanolic extracts from *Helianthemum glomeratum* Lag. And *Rubus coriifolius* Focke in suckling mice CD1. Journal of Ethnopharmacology. 108: 395-397.
- BARRERAS, M., Ontiveros, A. 2002. Efecto de la giardiasis aguda sobre el metabolismo del retinol en jerbos con desnutrición proteica y de vitamina A. Tesis de licenciatura del departamento de Ciencias Químico Biológicas. Universidad de Sonora.
- BOMFORD, R. 1998. Will adjuvants be needed for vaccines of the Future?. Brown F., Haaheim R., Editors. Modulation of the immune response to vaccine antigens. Vol. 92. Basel, Karger: Development in Biological Standardization. pp. 13–17.
- BURET, A., Gall, D., Nation, P., Olson, M. 1990. Intestinal protozoa and epithelial cell kinects, structure and function. Parasitology today. 6:375-80.
- CAÑETE, R., González, M., Almiral, P., Figueroa, I. 2004. Infección por *Giardia* y Giardiosis. Revista Panamericana de Infectología. 6(3):41-48.

- CAMPANITI, L., Monteiro-Leal, L. 2002. The effects of the antiprotozoal drugs metronidazole and furazolidone on trophozoites of *Giardia lamblia* (P1 strain). *Parasitology Research*. 88:80-85.
- CHEEKEE, P. 2000. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. *Journal of Animal Science*. 77:1-10
- CIFUENTES, E., Suarez, L., Espinosa, M., Juarez, L., Martinez, A. 2004. Risk of *Giardia intestinalis* infection in children from an artificially recharged groundwater area in Mexico City. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 71: 65–70
- CLARK, A. 1996. Natural products as a resource for new drugs. *Pharmaceutical Research*. pp. 1133-1141.
- CONABIO. 2010. Estrategia Mexicana para la conservación vegetal. Diversidad biológica de México: estudio de país. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- CONNOR, T., Stoeckel, M., Evrard, J. y Legator, M. 1977. The contribution of metronidazole y two metabolites to the mutagenic activity detected in urine of treated humans y mice. *Cancer research*. 37:629-633.
- DeREGNIER, D., Cole, L., Schupp, D., y Erlandsen, S. 1989. Viability of *Giardia* cysts suspended in lake, river, and tap water. *Applied and Environmental Microbiology*. 55:1223-1229.
- DIMMITT, A. 2000. A natural history of the Sonoran desert. Arizona – Sonora Desert Museum. ASDM press California. Tucson, Az. pp. 129-251.
- ECHEVERRÍA A., Torres D. 2001. Efecto de un extracto de *Petiveria alliacea* Linn. sobre el crecimiento de *Giardia lamblia* in vitro. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 30(3): 161-165.
- EGGER, R., Hofhuis, E., Bloem, M., Chusilp, K., Wedel, M., Intarakhao, C., Saowakontha, S., Schreurs, H. 1990. Association between intestinal parasitoses and nutritional Status in 3-8 year old children in northeast Thailand. *Tropical & Geographical Medicine*. 42:312-328.
- ESCOBEDO, A., Álvarez, G., González, M., Almirall, P., Cañete, R., Cimerman, S., Ruiz, A. y Pérez, R. 2008. The treatment of giardiasis in children: single-dose tinidazole compared with 3 days of nitazoxanide. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. April. vol. 102, no. 3. pp. 199-207.
- ESCOBEDO, A., Nuñez, F., Moreira, I., Vega, E., Pareja, A., Almirall, P. 2003. Comparison of chloroquine, albendazole, and tinidazole in the treatment of

- children with giardiasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 97:367-371.
- FARTHING, M. 1997. The molecular pathogenesis of giardiasis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 24:79-88.
- FAUBERT, G., Belosevic, M. 1990. Animals models for *Giardia duodenalis* type organisms. In: Meyer EA. Human parasitic diseases. Volume 3, Giardiasis. Amsterdam: Elsevier Science Publishers Biomedical Division. p. 77-90.
- FAUBERT, G. 2000. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clinical Microbiology Reviews*. 13:35-54.
- FAUST, E., Rusell, P. 1961. *Parasitología clínica de Craig y Faust*. Ed. UTEHA.
- FERGUSON, L. 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*. 475: 89-111.
- FERNÁNDEZ-CALIENES, A., Mendiola M., Monzote F., García, P., Sariego, R., Acuña, R., Scull, L., Gutierréz G. 2009. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 61:3.
- FIGUEROA, O., Granados, L., 2003. Evaluación de la respuesta immune humoral sistémica durante la infección por *Giardia lamblia* en un modelo murino. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora.
- FURNESS, B., Beach, M., Roberts, J. 2000. Giardiasis surveillance - United States, 1992-1997. *CDC Surveillance Summary*. 49:1-13.
- GARDENER, T., Hill, R. 2001. Treatment of giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 14:114-128.
- GEE, J., Johnson, I, 1988. Interactions between hemolytic saponins, bile salts and small intestinal mucosa in the rat. *Journal of Nutrition*. 118:1391–1397.
- GOTO, R., Panter, C., Northrop C., Manahdhar, R. 2002. Poor intestinal permeability in mildly stunted Nepali children: associations with weaning practices and *Giardia lamblia* infection. *British Journal of Nutrition*. 88:141-149.
- GUERRA, J., Meneses, A., Simonet, A., Macías, F., Nogueiras, C., Gómez, A., Escario, J. 2008. Steroidal saponins from the plant *Agave Brittoniana* with activity against the parasite *Trichomona vaginalis*. *Revista de Biología Tropical*. 56(4):1645-52.
- GUPTA, Y., Gupta, M., Aneja, S., Kohli, K. 2004. Current drug therapy of protozoal diarrhoea. *The Indian Journal of Pediatrics*. 71:55-58.

- HAUSEN, M., Oliveira R., Gadelha A., Campanati, L., de Carvalho, L. 2009 *Giardia lamblia*: a report of drug effects under cell differentiation. Parasitology Research. 105(3):789-96.
- HERNÁNDEZ, R., Lugo, E., Días, L., Villanueva, S. 2005. Extracción y cuantificación de las saponinas de agave Lechuguilla Torrey. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, México.
- HEUMAN, D., Scott, M. 1997. Gastroenterology.
- HILL. 1993. Giardiasis: Issues in management and treatment. Infectious Disease Clinics of North America. 7:503-525.
- HRISTOV, A., McAllister, T., Van Herk, F., Cheng, K., Newbold, C., Cheeke, P. 1999. Effect of *Yucca schidigera* on ruminal fermentation and nutrient digestion in heifers. Journal of Animal Science. 77:2554–2563.
- JIMÉNEZ, E.; Córtes, C. 2002. Evaluación de la capacidad inmunogénica de la vacuna *Giardia-vax*, utilizando un modelo experimental de giardiasis en gerbos (*Meriones unguiculatus*). Veterinaria México. 33(1):49-54.
- JOHNSON, I., Gee, J., Price, K., Curl C., Fenwick, G. 1986. Influence of saponins on gut permeability and active nutrient transport in vitro. Journal of Nutrition. 116, 2270–2277.
- MATULA, T. 1990. Validity of in vitro testing. Drug Metabolism Reviews. 22:777-787.
- McALLISTER, T., Annett, C., Cockwill, C., Olson, M., Wanga, Y., Cheeke P. 2001. Studies on the use of *Yucca schidigera* to control giardiasis. Veterinary Parasitology. pp. 85-99.
- McALLISTER, T., Wang, Y., Hristov, N., Olson, M., Cheeke. 1998. Applications of *Yucca schidigera* in livestock production. Proc. 33rd. Pacific Northwest Animal Nutrition Conference. pp. 109-119
- McCLURE, C., and Nolan, L. 1996. Herb extracts as potential antiprotozoal agents. Acta Horticulturae. 426:91-103.
- MIELKE, J. 1993. Native plants for southwestern landscape. pp. 272-275.
- MUDRY, M., Carballo, M., Labal de Vinuesa, M. y Larripa, I. 1994. Mutagenic bioassay of certain pharmacological drugs: III Metronidazole (MTZ). Mutation Research. 305: 127-132.

- MUDRY, M., Labal de Vinuesa, M. y Larripa, I. 1990. Mutagenic bioassay of certain pharmacological drugs: II Mebendazole (MBZ). *Acta Physiologica et Pharmacologica Latinoamericana*. 40:99-112.
- MURPHY, T., Nelson, J. 1983. Five vs ten days therapy with furazolidone for giardiasis. *American Journal of Diseases of Children*. 137: 267-270.
- NEWBOLD, C., El Hassan, J., Wang, M., Ortega E., Wallace R. 1997. Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. *Br. J. Nutr.* 78:237-249.
- NICHOLS, G. 2000. Food-borne protozoa. *British Medical Bulletin*. 56:209–235.
- NYGARD, K., Schimmer, B., Sobstad, O., Walde, A., Tveit, I., Langeland, N., Hausken, T., Aavitsland, P. 2006. A large community outbreak of waterborne giardiasis: delayed detection in a non-endemic urban area. *BMC Public Health*. 6:141–150.
- OLESZEK, W. 2001. Chromatographic determination of plant saponins. *Journal of Chromatography A*. pp. 147-162.
- OMS. 2002. Página web. <http://apps.who.int/medicinedocs/fr/d/Js2299s/10.2.html>
- ORTEGA, Y., Adam, R. 1997. *Giardia*: overview and update. *Clinical Infectious Disease*. 25:545-50.
- OVERTRUF, G., 1994. Endemic giardiasis in the United States. Role of the day care center. *Clinical Infectious Diseases*. 18:764-765.
- PEN, B., Sar, C., Mwenya, B., Kuwaki, K., Morikawa, R., Takahashi M. 2006. Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts on in vitro ruminal fermentation and methane emission. *Animal Feed Science and Technology*. 129:175–186
- PIACENTE, S., Pizza, C., Oleszek, W. 2005. Saponins and phenolics of *Yucca schidigera* Roetzl: Chemistry and bioactivity. *Phytochemistry Reviews*. 4:177–190.
- PONCE, M., Martínez, G., Bermúdez, C., Salazar, P., Ortega, G., Ey, P. 2002. Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. *International Journal of Parasitology*. 32: 1201-2.
- PRESSMAN A. 2001. *Medicina Alternativa fácil*. Pearson, Education. México.
- QUIROGA, E., Sampietro, A., Vattuone, M. 2001. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 74(1): 89-96.

- QUIROGA, E., Sampietro, A., Vattuone, M. 2004. In vitro fungitoxic activity of *Larrea divaricata* Cav extracts. Letters in Applied Microbiology. 39(1):7-12.
- QUIHUI, C., Valencia, M., Crompton S., Phillips, P., Hagan, S., Díaz Camacho, A. 2003. Prevalence and intensity of intestinal parasitic infections in relation to nutritional status in Mexican schoolchildren. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 98:653-659.
- QUIHUI, C., Méndez E., Astiazarán G., Morales F., Moreno R., Cuadras R., Canett R. 2012. Changes in serum zinc levels associated with giardiasis and dietary zinc intake mice. Biological Trace Element Research. 145(3):396-402
- ROMERO, C. 2008. Microbiología y parasitología humana. Ed. Medicina Panamericana de México. Tercera edición.
- RUSTIA, M. y Shubik, P. 1972. Induction of lung tumors y malignant lymphomas in mice by metronidazole. Journal of the National Cancer Institute. 48:721-729.
- SADJJADI, S., Alborzi A., Mostovfi H. 2001. Comparative clinical trial of mebendazole and metronidazole in giardiasis of children. Journal of Tropical Pediatrics. 47:3. pp. 176-178.
- SÁNCHEZ, V., Tay J., Aguilar A., Ruiz D., Malagon F., Rodriguez C., Ordonez J., Calderon L. 2006. Cryptosporidiosis and other intestinal protozoan infections in children less than one year of age in Mexico City. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 75:1095–1098.
- SANTOSO, B., Mwenya, B., Sar, Ch., Gamo, Y., Kobayashi, T., Morikawa, R., Takahashi, J. 2004. Effect of *Yucca Schidigera* with or without nisin on ruminal fermentation and microbial protein synthesis in sheep fed silage – and hay – based diets. Animal Science Journal. 75:6, 525-531.
- SATALAYA, J., Rojas, J., Ríos, B., Grandez, M., Rengifo, E., Ruíz, G., Gutierrez, D., Flores, N. 2009. Actividad antiparasitaria de plantas medicinales de la Amazonía Peruana. BIOFARBO. La Paz.
- SECRETARÍA DE SALUD. 2009. Informe de casos nuevos de enfermedades en el Estado de Sonora. Departamento de estadística y evaluación. Dirección de planeación y desarrollo. Gobierno del Estado de Sonora. México
- SECRETARÍA DE SALUD. 2010. Informe de casos nuevos de enfermedades en el Estado de Sonora. Departamento de estadística y evaluación. Dirección de planeación y desarrollo. Gobierno del Estado de Sonora. México.
- SIDHU, G., Oakenfull, D. 1986. A mechanism for the hypocholesterolaemic activity of saponins. British Journal of Nutrition. 55(3):643-9.

- SIDHU, G., Shukla G. 2011. Effect of *Giardia duodenalis* in protein malnourished and renourished mice. Central European Journal of Medicine. 6: 762-769.
- SING, K., Bhasin, K., Rana, S., Vaiphei, K. 2000. Effect of *Giardia lamblia* on duodenal disaccharidase levels in humans. Tropical Gastroenterology. 21(4):174-6.
- SULAIMAN, I., Fayer, R., Bern, C., Gilman, R., Trout, J., Schantz, P., Das, P., Lal, A. 2003. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. Emerging Infectious Diseases. 9: 1444-1452.
- SULAIMAN, I., Jiang, J., Singh, A., Xiao, L. 2004. Distribution of *Giardia duodenalis* genotypes and subgenotypes in raw urban wastewater in Milwaukee, Wisconsin. Applied and Environmental Microbiology. 70:3776-3780.
- SZÉNÁSI, Z., Marton, S., Kucsera I., Tánzos, B., Horváth. 2007. Preliminary investigation of the prevalence and genotype distribution of *Giardia intestinalis* in dogs in Hungary. Parasitology Research. Volume 101, Supplement 1. pp. 145-152.
- TAGBOTO, S., Townson, S. 2001. Antiparasitic properties of medicinal plants and other naturally occurring products. Advances in Parasitology. 50-199-295.
- TAY, J., Ruiz, A., Schenone, H., Robert-Guerrero, L., Sánchez, J. 1994. Frecuencia de las protozoosis intestinales en la República Mexicana. Boletín Chileno de Parasitología. 49:9-15
- TAY, J., Velasco, O., Lara, R. y Gutiérrez, M. 1996. Giardiasis. Parasitología Médica. 6ta. ed., México: Méndez Cervantes, pp. 73-79.
- THOMPSON, R. 2000. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and it's zoonotic potential. International Journal for Parasitology. 30: 1259-67.
- THOMPSON, R., Walters, R. 2002. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhea. International Journal for Parasitology. 32: 229-31.
- THOMPSON, R. 2008. Giardiasis: modern concepts in control and management. Annales Nestlé. 66: 23-24.
- TRACY, J., Webster, L. 1996. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections. The pharmacological basis of therapeutics. 9th ed. New York: McGraw-Hill Book. pp. 987-1008.

- VÁZQUEZ, T., Campos, R. 2009. Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial. Revista del Centro de Investigación. Universidad La Salle, México. Vol. 8, Núm. 31, enero-junio. pp. 75-90.
- VILLAR, L., Mendocilla, R. 2007. Farmacología de plantas medicinales. Universidad Nacional de Trujillo.
- WANG, Y., McAllister, T., Cheeke, P., Cheng, K. 1999. Assessment of the inhibitory effects of ruminal fluid on biological activity of steroidal saponins using a hemolytic assay. Canadian Journal of Animal Science. 79: 561–564.
- WANG, Y., McAllister, T., Newbold, C., Rode, L., Cheeke, P., Cheng, K. 1998. Effects of *Yucca schidigera* extract on fermentation and degradation of steroidal saponins in the rumen simulation technique. Animal Feed Science and Technology. 74: 143–153.
- ZONTA, M., Navone, G., Oyhenart, E. 2007. Parasitosis intestinales en niños de edad preescolar y escolar: Situación actual en poblaciones urbanas, periurbanas y rurales en Brandsen, Buenos Aires, Argentina. Parasitología Latinoamericana. 62(1-2):54-60.
- ZUTEL, A. 1978. Síndromes prenatales por drogas. Revista Hospitalaria Niños. Vol. XIX, N 77.

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de medio TYI-S-33 y cultivo de *G. lamblia*

Materiales

- Tubos 13x100 estériles con tapón
- Pipetas serológicas estériles (5 y 10ml)
- Pipetor
- Sistema de filtración (Steril aseptic sistem, Milipore corporation, Bredfor, MA 01730) Filtro de 0.45µm
- Campana de flujo laminar (Purifier Class II Biosafety Cabinet, Delta Series, LABCONCO)
- Incubadora (Thermolyte, type 41900)

Reactivos

Componentes para 200ml de medio

Peptona Biotriptasa (BD BIOXON 2305).....	4.0g
Extracto de Levadura (BD 11929).....	2.0g
Dextrosa (J.T. Baker 1916-01).....	2.0g
Cloruro de Sodio (SIGMA S-7653).....	0.4g
L-Cisteína (SIGMA C-8277).....	0.4g
Fosfato de Sodio Dibásico (J.T. Baker 3252-01).....	0.2g
Fosfato de Potasio Monobásico (J.T. Baker).....	0.1g
Bilis (SIGMA B-8331).....	0.1g
L-Ascórbico (Spectrum A1317).....	0.02g
Citrato Férrico Amoniacal (J.T. Baker 3246-01).....	0.0046g

Preparación

Aforar a 200ml con agua bidestilada y ajustar el pH a 6.9 con NaOH 10N. Agregar 0.4ml de antibiótico Rosephin y complementar con suero bovino (Bovine Adult FERUM, SIGMA B2771) al 10%.

Metodología

1. Colocar 7.5ml de medio TYI-S-33 suplementado al 10% con suero bovino, en tubo de ensayo 13x100.
2. Agregar 0.5ml de cultivo confluyente de *G. lamblia* GS/M-83-H7 (1×10^6) trofozoítos/ml).
3. Realizar la transferencia del parásito en condiciones estériles con la ayuda de una campana de flujo laminar.

Anexo 2. Preparación del inóculo

Materiales

Jeringa para insulina (BD PlastipakR)	Cánula para alimentación forzada
Tubos cónicos Eppendorf 1.5 ml	Tubos cónicos Falcon 50ml
Micropipietas (10-100, 100-1000µl)	Micropuntas 1ml

Equipo

Centrifuga (Termo IEC Maraton 3000R, Fisher Scientific)
Camara de Neubauer (Hausser Scientific)
Potenciómetro (Termo Orion)

Reactivos

Solución reguladora de fosfatos pH 7.2

Componentes: PBS GIBCO BRI (cat. 21300-0017) Sobre con 9.6g

Preparación:

Re-suspender el contenido del sobre en 1L de agua deionizada

Ajustar el pH a 7.2

Durante su uso en todo el proceso de infección el PBS debe mantenerse a 4°C.

Azul de Tripano (Trypan Blue Solucion al 4%, SIGMA cat. T8154)

Metodología

1. Mantener el cultivo de trofozoítos de *G. lamblia* en agua-hielo durante 20 minutos para liberar los trofozoítos adheridos a la pared del tubo.
2. Lavar los trofozoítos 3 veces en solución PBS usando centrifuga a 2700 rpm por 10 minutos a 4°C.

3. Posterior al último lavado, re-suspender el sedimento de trofozoítos en 500µl de solución de PBS y realizar una dilución 1:2 con azul de tripano.
4. Ajustar a 5×10^6 trofozoítos en 200µl de solución.