

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES**

**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS**

**INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE  
DIAGNOSTICO E INVESTIGACION EN SALUD**



**EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD *in vitro* SOBRE  
TROFOZOITOS DE *Giardia lamblia* FRENTE A TRATAMIENTOS  
CONVENCIONALES Y MEDICINA TRADICIONAL TACANA**

Tesis para optar el título de Especialidad en Diagnóstico de Laboratorio en Salud  
Mención: Microbiología

**Elaborado por:**

Lic. Claudia Condo Montero

La Paz – Bolivia  
2015

# UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS

INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE  
DIAGNOSTICO E INVESTIGACION EN SALUD



## EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD *in vitro* SOBRE TROFOZOITOS DE *Giardia lamblia* FRENTE A TRATAMIENTOS CONVENCIONALES Y MEDICINA TRADICIONAL TACANA

Tesis para optar el título de Especialidad en Diagnóstico de Laboratorio en Salud  
Mención: Microbiología

Elaborado por: Lic. Claudia Condo Montero

Asesores: Efraín Salamanca Capusiri M Sc.  
Alberto Giménez Turba Ph. D.

Co – Asesora: María Luz Soto Sánchez M Sc.

LA PAZ – BOLIVIA  
2015

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS**  
**INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNOSTICO E**  
**INVESTIGACION EN SALUD**

Tesis de posgrado:

**EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD *in vitro* SOBRE**  
**TROFOZOITOS DE *Giardia lamblia* FRENTE A TRATAMIENTOS**  
**CONVENCIONALES Y MEDICINA TRADICIONAL TACANA**

Presentado por: Lic. Claudia Condo Montero

Para optar el grado académico de: Especialidad en Diagnostico de Laboratorio en Salud  
Mención: Microbiología

Nota numeral:.....

Nota literal:.....

Ha sido

Asesor: Efraín Salamanca Capusiri MSc.  
Alberto Giménez Turba Ph.D.

Co-asesora: María Luz Soto Sánchez MSc.

Tribunal: Dra. Willma Strauss Zegada MSc.

Tribunal: Dra. Jacqueline Calla de Magariños Ph.D.

Tribunal: Dr. Luis Fernando Sosa Tordoya Esp.

## AGRADECIMIENTOS

A los Proyectos UMSA – ASDI. “Validación de la Farmacopea tradicional Tacana frente a trofozoítos de *Giardia spp*” y “Biomoléculas” por la beca, el financiamiento de equipos y reactivos para el desarrollo de la presente tesis.

Al CIPTA y a los médicos tradicionales Alcides Serrato y Natalio Marupa, de Buena Vista por su colaboración en la colecta de especies vegetales.

Al Dr. Efraín Salamanca y al Dr. Alberto Giménez, no solo por ser asesores de mi tesis, sino por su constante apoyo, orientación, paciencia y sobre todo por la amistad brindada durante este tiempo de trabajo.

A la Dra. María Luz Soto, por la enseñanza y orientación en el trabajo de laboratorio.

Al Dr. Juan Carlos Ticona y al equipo del departamento de Fitoquímica del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas por la colaboración con los extractos vegetales.

Al Instituto SELADIS.

A mi familia por su apoyo y comprensión.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pag.</b>
<b>RESUMEN</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>5</b>
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS ESPECIFICOS	5
<b>3. JUSTIFICACION</b>	<b>6</b>
<b>4. ANTECEDENTES</b>	<b>10</b>
<b>5. MARCO TEÓRICO</b>	<b>12</b>
5.1 Reseña histórica	12
5.2 Clasificación taxonómica	13
5.3 Morfología	13
5.4 Ciclo de vida	16
5.5 Manifestaciones clínicas	19
5.6 Patogenia de la giardiasis	20
5.6.1 Factores dependientes de <i>G. lamblia</i>	21
5.6.2 Factores dependientes del hospedador	22
5.6.3 Mecanismos de la malabsorción intestinal	23
5.7 Tratamiento	23
5.8 Epidemiología	28
5.9 Medición de la viabilidad celular	29
5.10 Resazurina	30
5.11 Plantas de la Medicina Tradicional Tacana	32
5.11.1 <i>Triplaris</i>	32
5.11.2 Anani pa ( <i>Triplaris poeppigiana</i> )	33
5.11.3 Anani ( <i>Triplaris americana</i> )	33
5.11.4 Evanta ( <i>Galipea longiflora</i> )	34
5.11.5 Tahua Midha ( <i>Pourouma cecropiifolia</i> )	34
5.11.6 Cuabad'u ( <i>Cedrela fissilis</i> )	34
5.11.7 Shaute uja ( <i>Zingiber officinale</i> )	35
5.11.8 Chuchuhuasi ( <i>Mayteanes laevis</i> )	35
<b>6. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>36</b>
6.1 Diseño metodológico	36
6.2 Medio de Cultivo TYIS-33	37
6.3 <i>Giardia lamblia</i> y procedimiento de cultivo celular	38
6.4 Curva de crecimiento de <i>Giardia lamblia</i>	38
6.5 Resazurina	39
6.6 Estandarización de la técnica fluorométrica	40
6.7 Antiparasitarios convencionales	40
6.8 Ensayo para la determinación de la Concentración Inhibitoria Media de drogas control	42
6.9 Recolección de plantas del genero <i>Triplaris</i> y otras especies vegetales	44
6.10 Preparación de extractos crudos de plantas del genero <i>Triplaris</i>	45
6.11 Ensayo para la determinación de la Concentración Inhibitoria Media de extractos crudos de <i>Triplaris</i>	48

6.11.1 Determinación de la Concentración Inhibitoria media de otras especies vegetales	48
6.12 Tipificación parasitaria por PCR-RFLP del gen <i>beta giardina</i>	50
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>51</b>
7.1. Adaptación de trofozoitos al medio de cultivo TYIS-33	51
7.2 Curva de crecimiento de <i>Giardia lamblia</i>	51
7.3 Estandarización de la técnica fluorométrica	52
7.4 Concentración Inhibitoria Media de medicamentos convencionales	55
7.5 Concentración inhibitoria media de <i>Galipea longiflora</i>	56
7.6 Concentración inhibitoria media de fracciones y subfracciones de <i>Triplaris poeppigiana</i> y <i>Triplaris americana</i>	57
7.7 Concentración inhibitoria media de otras plantas pertencientes a la medicina tradicional Tacana	59
7.8 Identificación molecular	61
<b>8. DISCUSION</b>	<b>64</b>
<b>9. CONCLUSIONES.</b>	<b>73</b>
<b>10. RECOMENDACIONES.</b>	<b>75</b>
<b>11. GLOSARIO</b>	<b>76</b>
<b>12. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS</b>	

## INDICE DE TABLAS

	<b>Pag.</b>
<b>Tabla 1.</b> Medicamentos convencionales utilizados en la estandarización	41
<b>Tabla 2.</b> Metodología para llegar a 2 $\mu$ g/mL	41
<b>Tabla 3.</b> Concentraciones de antiparasitarios y CAT	42
<b>Tabla 4.</b> Resumen de plantas evaluadas del género <i>Triplaris</i>	46
<b>Tabla 5.</b> Resumen de plantas evaluadas diferentes al género <i>Triplaris</i> y usos tradicionales Tacana.	49
<b>Tabla 6.</b> Resumen de la IC <sub>50</sub> de antiparasitarios convencionales y su respectiva desviación estándar.	56
<b>Tabla 7.</b> Resultados de IC <sub>50</sub> de Corteza Alcaloides Totales de <i>Galipea longiflora</i> (CAT) obtenidos por el programa Gen5.	56
<b>Tabla 8.</b> Resultados de IC <sub>50</sub> obtenidos por el programa Gen5 de fracciones de extractos vegetales diferentes al género <i>Triplaris</i> .	60
<b>Tabla 9.</b> Tamaño de fragmentos esperados	63

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Trofozoito y quiste de <i>Giardia lamblia</i>	14
<b>Figura 2.</b> Diversas fotografías de <i>Giardia lamblia</i>	16
<b>Figura 3.</b> Ciclo evolutivo	19
<b>Figura 4.</b> Metronidazol	24
<b>Figura 5.</b> Tinidazol	25
<b>Figura 6.</b> Quinacrina	25
<b>Figura 7.</b> Furazolidona	26
<b>Figura 8.</b> Albendazol, mebendazol	27
<b>Figura 9.</b> Conversión de resazurina a resorufina	31
<b>Figura 10.</b> Árbol y flor de <i>Triplaris poeppigiana</i>	33
<b>Figura 11.</b> Árbol y flor de <i>Triplaris americana</i>	33
<b>Figura 12.</b> Retículos de cámara de Neubauer utilizados para el recuento de trofozoitos de <i>G. lamblia</i> .	39
<b>Figura 13.</b> Metodología de sembrado de drogas control	44
<b>Figura 14.</b> Curva de crecimiento de <i>Giardia lamblia</i>	51
<b>Figura 15.</b> Fluorescencia emitida a distintas concentraciones de resazurina	53
<b>Figura 16.</b> Emisión de fluorescencia a diferentes tiempos	54
<b>Figura 17.</b> Curva de IC <sub>50</sub> durante la estandarización del metronidazol	55
<b>Figura 18.</b> PCR-RFLP del gen de la <i>beta giardina</i>	61
<b>Figura 19.</b> Amplicones digeridos con <i>Hae III</i>	62

## RESUMEN

En el presente trabajo se implementó un modelo *in vitro* para evaluar la susceptibilidad de trofozoitos de *Giardia lamblia*, utilizando resazurina como indicador de viabilidad celular determinando la Concentración Inhibitoria Media (IC<sub>50</sub>) de antiparasitarios convencionales (albendazol, mebendazol, metronidazol y tinidazol); posteriormente, bajo las mismas condiciones, se realizó la evaluación de la actividad antiparasitaria de extractos obtenidos de plantas del género *Triplaris* y otras especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional Tacana en casos de diarrea con sangre.

Para la estandarización del método fluorométrico se trabajó con una longitud de excitación y emisión de 540 – 590 nm respectivamente, una población parasitaria de  $7,5 \times 10^5$  trofozoitos/mL, incubados a 37°C por 48 hrs y posterior adición de resazurina 2mM por 4 hrs a 37°C. Con este procedimiento se evaluaron las drogas antiparasitarias control, obteniendo la IC<sub>50</sub> de mebendazol (0.012 ±0.0028 µg/mL), albendazol (0.021 ±0.002 µg/mL), tinidazol (0.161 ±0.085 µg/ml), metronidazol (0.354 ±0.058 µg/mL), como control antiparasitario natural se utilizaron Alcaloides Totales de Corteza de *Galipea longiflora*, CAT, (57.3 ±7.0 µg/mL).

El estudio químico–biodirigido de las 2 especies vegetales antiparasitarias Tacana, Anani (*Triplaris americana*) y Anani Pa (*T. poeppigiana*), mantuvieron valores de IC<sub>50</sub> mayores a 100 µg/mL.

Posteriormente se evaluaron 27 extractos etanólicos de plantas de la farmacopea Tacana, dando un total de 14 extractos (52%) sin actividad, con IC<sub>50</sub> mayor a 200 µg/ml, 8 extractos (30%) presentaron valores de IC<sub>50</sub> entre 150 y 200 µg/ml, 3 extractos (11%) presentaron valores entre 100 y 150 µg/ml y 2 extractos (7%) con valores entre 50 y 100 µg/ml, demostrando la utilidad del método para la búsqueda de nuevos agentes antiparasitarios.

El trabajo se realizó gracias al proyecto “Validación de la Farmacopea Tacana frente a trofozoitos de *Giardia spp*” financiado por el programa de la cooperación Sueca en Bolivia UMSA-ASDI, realizado en los laboratorios de la Unidad de Evaluaciones Biológicas del área de Química Farmacéutica del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas.

## ABSTRACT

In this work, an *in vitro* model was implemented to evaluate the susceptibility of trophozoites of *Giardia lamblia* using resazurin as an indicator to determinate the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of conventional antiparasitic (albendazole, mebendazole, metronidazole and tinidazole); then was performed, under the same conditions, evaluation of antiparasitic activity of extracts obtained from *Triplaris* plants and other plant species used in traditional medicine Tacana.

Standarization of the fluorometric method was with a length of excitation and emission of 540-590 nm. respectively, a parasitic population of  $7,5 \times 10^5$  trophozoites /mL, incubated at 37 ° C for 48 hrs and subsequent addition of resazurin 2 mM for 4 hrs at 37 ° C. With this procedure the antiparasitic drug control was evaluated, obtaining the IC<sub>50</sub> of mebendazole ( $0.012 \pm 0.0028 \mu\text{g} / \text{mL}$ ), albendazole ( $0.021 \pm 0.002 \mu\text{g} / \text{mL}$ ), tinidazole ( $0.161 \pm 0.085 \mu\text{g} / \text{ml}$ ), metronidazole ( $0.354 \pm 0.058 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) as natural antiparasite control was used Bark total alkaloids from *Galipea longiflora*, CAT ( $57.3 \pm 7.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ ).

The chemical – bioassay of 2 antiparasitic plants Tacana, Anani (*Triplaris americana*) and Anani Pa (*T. poeppigiana*) maintained IC<sub>50</sub> values greater than 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$ .

Subsequently 27 ethanol extracts of plants also of the Tacana pharmacopoeia were evaluated, giving a total of 14 abstracts (52%) without activity, with IC<sub>50</sub> greater than 200  $\mu\text{g} / \text{ml}$  8 extracts (30%) had IC<sub>50</sub> values between 150 and 200  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , 3 extracts (11%) had values between 100 and 150  $\mu\text{g} / \text{ml}$  and 2 extracts (7%) with values between 50 and 100  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , demonstrating the utility of the method for the research of new antiparasitic agents.

The work was done thanks to the project " Pharmacopoeia Tacana Validation against trophozoites of *Giardia spp*" project funded by the Swedish cooperation program in Bolivia UMSA-ASDI, in the Biological Evaluations Area of the Institute of Pharmaceutical and Biochemical Research from the Biochemical and Drug Sciences School.

## 1. INTRODUCCIÓN.

*Giardia lamblia*, es un protozooario flagelado que infecta el tracto superior del intestino delgado de muchos vertebrados incluido el hombre, siendo la causa más frecuente de infección gastrointestinal humana producida por parásitos protozoarios. Las enfermedades parasitarias intestinales son un problema de salud pública siendo más frecuentes en países de escasos recursos afectando mayormente a niños ya sea por la inmadurez inmunológica, hábitos higiénicos ó ambos. (Atias 1998)

*G. lamblia*, es un protozooario entérico patógeno capaz de vivir en el ser humano y otros mamíferos domesticos cuando es ingerido en su forma infectante denominado quiste. Una vez en el intestino del huésped pasa a la forma metabólica activa conocida como trofozoito, la cual se multiplica por fisión binaria en la superficie de la mucosa intestinal. Las manifestaciones clínicas pueden ir desde un estado con diarrea aguda o crónica, pérdida de peso, malabsorción intestinal llevando a una desnutrición propia de la Giardiasis o en algunos casos ser asintomática (Atias 1998).

A nivel mundial cerca de 280 millones de personas están infectadas existiendo unos 500 mil casos nuevos cada año (Barrón, 2012; Ali & Nozaki, 2007) especialmente en países en vías de desarrollo ya que es una enfermedad asociada a la pobreza. En Bolivia no existen datos generales, pero diversos estudios realizados en diferentes poblaciones parasitadas muestran datos de presencia de *G. lamblia* que van de 15% a 25% de la

población en estudio, tal es el caso del trabajo realizado en el Hospital Del Niño Manuel Ascencio Villarroel de Cochabamba en agosto del 2007, el cual muestra que la población infectada con *G. lamblia* es del 15% (Ajllahuanca et al., 2008). Otro trabajo publicado sobre parasitosis en dos unidades educativas de la zona Ticti Norte de Cochabamba realizado por Barrientos et al, 2008, muestra resultados de infección con giardiasis en 24% de la población estudiada.

El tratamiento para esta parasitosis es importante desde el punto de vista económico y social, entre los medicamentos utilizados comprende nitroimidazoles, quinacrina, benzimidazoles y furazolidona; las drogas de elección son el metronidazol y tinidazol. Sin embargo, los efectos adversos asociados al tratamiento incluyen problemas gastrointestinales, náuseas, dolor de cabeza, leucopenia (Tracy et al., 1991). La inaccesibilidad a estas drogas en ciertas comunidades y la necesidad de probar nuevos compuestos antiparasitarios impulsa a probar terapias alternativas que ayuden a erradicar este problema, planteándose la hipótesis de que ciertas plantas (semillas, hojas o tallos) contienen principios activos capaces de inhibir el crecimiento de *G. lamblia*, tales son los estudios hechos a *Curcubita pepo* (Barrón, 2012), *Achyrocline satureioides*, *Eugenia uniflora*, *Feoniculum vulgare*, *Psidium guajava* (Costa et al., 2009), *Lippia spp.* (Ponce - Macotela et al., 2006), *Geranium niveum* (Calzada et al., 1999), *Hovenia dulcis* (Gadelha et al., 2005) que muestran resultados prometedores de nuevas sustancias terapéuticas anti giardiasicas.

La búsqueda de antiparasitarios se realiza a través de métodos que ayuden a determinar la viabilidad celular *in vitro* logrando el desarrollo de técnicas de tamizaje de nuevos componentes antiparasitarios (Martínez - Barrios, 2011).

La técnica espectrofotométrica de DPPH que emplea el radical 1,1-difenil-2-picrilhidracrilos puede dar variables dispersas, en algunos casos puede ser inerte y reaccionar lentamente (Barrón, 2012). Otra es la técnica de recuento celular utilizando colorantes vitales, consume tiempo, es laboriosa, poco sensible además de ser un proceso subjetivo (Marrero-Ponce et al., 2009). Los métodos basados en la reducción de la sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromide (MTT) de cristales de formazan por las deshidrogenasas mitocondriales de células viables, son ampliamente utilizados sin embargo, el producto final de esta sal es insoluble en agua por lo que requiere solventes orgánicos para solubilizarlo (Calzada et al., 1999). También está el uso de análogos de MTT como el XTT sodio (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2-h-tetrazolium-5-carboxanilide) esta técnica es realizada en el Instituto de Investigaciones Fármaco – Bioquímicas (I.I.F.B.) la cual pese a ser soluble en agua, no permite tener resultados satisfactorios con *G. lamblia* debido a la oxidación del medio de cultivo TYIS-33.

La mayoría de los métodos presentan desventajas por ser de punto final, imposibilitando continuar con el monitoreo del comportamiento celular después de ser sometidas a un tratamiento traumático.

La resazurina es un colorante redox que permite cuantificar la proliferación y observar la citotoxicidad en diferentes tipos celulares (Skehan, 1990), exhibe cambios colorimétricos y fluorométricos relacionados a la actividad celular metabólica (Zhang H, 2004). Esta técnica se basa en la capacidad de células metabólicamente activas que reducen la forma oxidada, resazurina, a resorufina por la actividad enzimática mitocondrial de las células viables (Makiuchi et al, 2013).

La comunidad indígena Tacana, es un pueblo originario de la amazonia cuyas creencias y prácticas tradicionales aún continúan ejerciendo influencia muy importante en la vida cotidiana de su gente, utilizando diversos tipos de plantas como tratamientos medicinales algunos ejemplos son las plantas del género *Euterpe precatoria* las cuales son utilizadas para tratar la anemia, en casos de fiebre utilizan plantas como ser *Costus*, *Brugmansia*, *Mansoa*, *Jessenia* entre otras, mientras que especies vegetales del género *Triplaris*, *Achyrocline*, *Zingiber*, *Carica*, *Anacardium*, *Mussatia* son utilizadas cuando existen molestias estomacales e intestinales. En el presente estudio se trabajó principalmente con especies vegetales pertenecientes al género *Triplaris*, debido a que esta planta en la actualidad es de mayor uso al momento de tratar enfermedades diarreicas.

Para desarrollar el trabajo se estandarizó la técnica fluorométrica con resazurina, posteriormente se evaluó la Concentración Inhibitoria Media (IC<sub>50</sub>) de los extractos crudos de 2 variedades de plantas del género *Triplaris* utilizadas tradicionalmente como

antiparasitario dentro de la farmacopea Tacana frente al trofozoito del protozoario *Giardia lamblia*. Finalmente se evaluaron 27 extractos etanólicos de plantas también pertenecientes a la farmacopea Tacana, demostrando la utilidad del método fluorométrico estandarizado y validando la utilidad *in vitro* de algunas especies vegetales.

## **2. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la susceptibilidad *in vitro* sobre trofozoitos de *Giardia lamblia* de tratamientos convencionales y medicina tradicional Tacana.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Estandarizar el método fluorométrico (Resazurina) para determinar la actividad antiparasitaria *in vitro* de productos convencionales y extractos naturales.
- Determinar la IC<sub>50</sub> de tinidazol, albendazol, mebendazol y metronidazol sobre trofozoitos de *Giardia lamblia*.
- Determinar la IC<sub>50</sub> de los extractos acuosos y etanólicos de Anani (*Triplaris americana*), Anani Pa (*Triplaris poeppigiana*), Alcaloides Totales de Corteza de *Galipea longiflora* (CAT) y otras especies vegetales pertenecientes a la medicina tradicional Tacana sobre trofozoitos de *Giardia lamblia*.

### 3. JUSTIFICACION

Las infecciones parasitarias hoy en día son uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo, especialmente en países en vías de desarrollo debido a la pobreza, causando diarrea, disentería llevando a una deshidratación que puede causar la muerte si no se administra tratamiento a tiempo (Almeida et al., 2007).

Más de cinco millones de niños menores de cinco años mueren anualmente a causa de enfermedades diarreicas graves, siendo *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum*, entre otros, los responsables de infecciones parasitarias (Rani, 2011).

A nivel mundial, *G. lamblia* es el protozooario entérico encontrado con mayor frecuencia en exámenes coproparasitológicos (Thompson, 2008) se ha estimado una frecuencia de 280 millones de individuos infectados, con unos 500 mil casos nuevos por año (Barrón, 2012). En Bolivia diferentes trabajos muestran una elevada frecuencia de enteroparásitos (helminfos y protozoarios); Condori et al., 2008, publica un estudio realizado en una población de Santa Cruz, donde el 65% de esta se encontraría multiparasitada. Estudios de parasitosis intestinales en poblaciones del área rural tropical del departamento de La Paz (Giménez et al., 2009-2014) así como en el área urbana (Patiño, 2002; Calami. 2006) evidencian que hasta el 21% de una población de niños comprendidos entre 0-15 años están infestados por *G. lamblia*, datos que

muestran la gravedad de esta infección en la población infantil, constituyéndose en el sector poblacional más vulnerable.

*G. lamblia*, afecta el tracto superior del intestino delgado, causando la giardiasis, existiendo disminución en la retención de grasas, dificultando la absorción de vitaminas A y C dado que estas necesitan disolverse en lípidos para ingresar al organismo al igual que otros nutrientes, produciéndose esteatorrea por giardiasis. Cuando la enfermedad se vuelve crónica no permite asimilar otras moléculas vitales como la vitamina B<sub>12</sub>, el ácido fólico, algunos carbohidratos (D-xilosa, lactosa) y proteínas, manifestando una sintomatología similar a la de una pancreatitis (De la Guardia, 2006; Bussati et al., 2007). Es importante también señalar que la giardiasis impide el crecimiento, aunque el niño no presente síntomas como la diarrea (Prado et al., 2004).

Los tratamientos actuales como el metronidazol pueden llegar a causar efectos secundarios graves los que incluyen náuseas, dolor de cabeza, leucopenia y problemas gastrointestinales, además se han descrito efectos mutagénicos y carcinogénicos (Escribano et al., 2012); en muchos pacientes, se ha observado hasta un 20% de resistencia a los medicamentos tanto por factores de huésped o la resistencia del parásito conduciendo al fracaso terapéutico (Hahn et al., 2013, Tejman-Yarden et al, 2013), por lo que la búsqueda de nuevos agentes antiparasitarios de origen sintético, semisintético o natural es muy importante.

Desde hace más de 30 años no se mejoran de manera sustancial los fármacos antiparasitarios que existen en el mercado, aunque a la fecha hay mejor entendimiento sobre la patología de la enfermedad, existe poca atención de parte de las compañías farmacéuticas en el desarrollo de nuevos medicamentos debido a que la mayor parte de los enfermos por parasitosis, viven en la pobreza, razón por la cual han sido clasificadas dentro de las Enfermedades Desatendidas por la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) (Becerril, 2011).

La búsqueda de nuevos tratamientos eficaces con baja toxicidad es muy importante, el uso de productos naturales con propiedades terapéuticas es tan antiguo como la civilización humana, por lo que la mayoría de las personas que viven en países en vías de desarrollo utilizan la medicina tradicional como principal fuente para tratar sus enfermedades (Echevarria et al., 2001). La O.M.S. estima que aproximadamente el 80% de la población mundial hace uso de remedios tradicionales para el cuidado de su salud (Bueno et al. 2005).

La continua contribución de la naturaleza, no solo como fuente de potenciales agentes quimioterapéuticos, sino también como compuestos líderes que aportan para semisíntesis o la síntesis total de nuevos fármacos, se encuentra bien documentada en publicaciones desde la década de los 80 (Newman & Cragg, 2012). Por esto los productos naturales constituyen, un buen punto de partida para el descubrimiento de

nuevos fármacos o aportando compuestos que pueden ser modificados con el objeto de tener principios activos más efectivos y menos tóxicos.

Es por esto que las medicinas tradicionales constituyen una alternativa expectante sin embargo, pocas especies han sido estudiadas en forma científica y validadas en el laboratorio en nuestro medio.

Por todas estas causas es necesario que se abra la oportunidad de encontrar nuevas estructuras químicas con potencial antiparasitario, a partir del estudio de especies de la medicina local, como es la medicina tradicional Tacana, grupo étnico se halla asentado en la Provincia Abel Iturralde, norte del Departamento de La Paz.

#### 4. ANTECEDENTES

En nuestro país existen pocos estudios relacionados con *Giardia lamblia* y la susceptibilidad a los medicamentos convencionales para su tratamiento. Desde un punto de vista económico y social, el tratamiento para esta enfermedad es importante, la droga de elección es el metronidazol, aunque existen otras alternativas como el albendazol, sin embargo los efectos adversos que pueden producir incluyen problemas gastrointestinales, náuseas, dolor de cabeza y leucopenia (Tracy et al., 1991).

La inaccesibilidad a estas drogas en ciertas comunidades y la necesidad de probar nuevos compuestos antiparasitarios, impulsa a probar terapias alternativas que ayuden a erradicar este problema, planteándose hipótesis de que ciertas plantas (semillas, hojas o tallos) contienen principios activos capaces de inhibir el crecimiento de *G. lamblia*. Tales son los estudios hechos a *Curcubita pepo* (Barrón, 2012), quienes reportan una IC<sub>50</sub> de 0.29 mg/mL de dicha planta, conocida en términos comunes como pepa de zapallo frente a trofozoitos de *G. lamblia*.

Un estudio realizado en Brasil el 2009 a *Achyrocline satureioides*, *Eugenia uniflora*, *Feoniculum vulgare*, plantas utilizadas como antiparasitarios de la farmacopea tradicional de la población Guaraní, señala que *Achyrocline satureioides* presenta la mejor IC<sub>50</sub> de 0.313 mg/mL de los antiparasitarios probados frente a *Giardia* (Brandelli et al., 2009).

En 1999 Calzada y colaboradores, realizaron el estudio de extractos etanólicos de *Geranium niveum*, probando sobre trofozoitos de *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, determinando una IC<sub>50</sub> de 92.7 y 138.1 µg/mL respectivamente.

Además otros estudios realizados con *Hovenia dulcis* (Gadelha et al., 2005), *Lippia spp.* (Ponce - Macotella et al, 2006), entre otros, sostienen resultados prometedores a nuevas sustancias terapéuticas anti giardiasicas a partir de extractos etanólicos y acuosos de dichas plantas.

En lo que respecta al tratamiento natural o uso de extractos de plantas contra *G. lamblia*, Mc Allister et al., 2005, demostró en experimentos *in vitro* con *Yucca schidigera* que la concentración del extracto requerida para disminuir la adherencia de trofozoitos un 50% varia de 62 a 250 µg/mL según el tipo de extracto con el que se trabaja.

Una publicación de Harris y colaboradores el 2000, indica que el extracto del ajo completo presenta efectos inhibitorios sobre trofozoitos de *G. lamblia* con IC<sub>50</sub> de 300 µg/mL.

## 5. MARCO TEÓRICO

*Giardia lamblia* es un protozoo entérico flagelado que reside en el intestino humano y de otros mamíferos, es el causante de la enfermedad diarreica conocida como Giardiasis, una patología que se presenta con manifestaciones clínicas que varían desde la infección asintomática a la enfermedad aguda o crónica asociada con diarrea, malabsorción de nutrientes y pérdida de peso.

### 5.1 Reseña histórica

En 1681 *Giardia* fue identificada inicialmente por Anton Van Leeuwenhoek en sus propias heces.

En 1859 El microorganismo fue descrito con mejor detalle por Wilhelm Duszán Lambl, que encontró al protozoo en las heces diarreicas de niño y las denominó “*Cercomas intestinalis*”. (Adam, 2001)

En 1882, Kunstler estableció el género “*Giardia*” luego de observar la forma flagelar en el intestino de renacuajos y lo denominó *Giardia agilis* (Thompson, 2008).

En 1888 Blanchard propuso el nombre de *lamblia* para el género, en homenaje al médico Wilhelm Lamb recibiendo el nombre de “*Lambliia intestinalis*”.

En 1915, Stiles creó la designación de *Giardia lamblia*, como se conoce actualmente. (Heresi, 1997).

Entre 1930 y 1940 se demostró que es un agente causal de enfermedad esporádica o epidémica (Botero, 1998).

En 1952, en base a criterios morfológicos del trofozoito, la posición de cuerpos mediales, forma parasitaria y la relación del disco suctor con el tamaño total del trofozoito, se dividió al género en tres especies:

1. *Giardia agilis* (anfibios)
2. *Giardia muris* (de roedores y aves)
3. *Giardia lamblia, intestinalis o duodenalis* (mamíferos)

## 5.2 Clasificación taxonómica

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

**Phylum:** *Protozoa*

**Clase:** *Zoomastigophorea*, (flagelos como medios de locomoción)

**Orden:** *Diplomonadida*

**Familia:** *Hexamitidae*

(Martínez 1982; Campos & Vázquez, 1999).

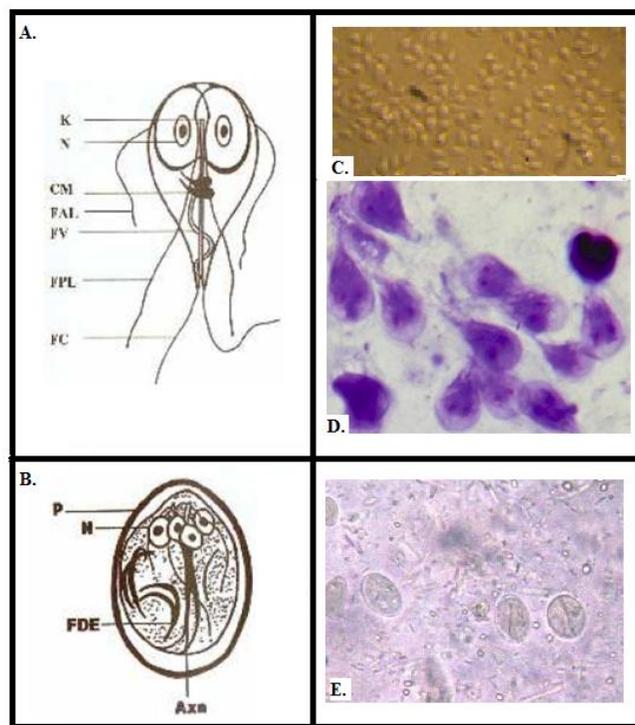
## 5.3 Morfología

En la naturaleza, *G. lamblia* adopta dos formas evolutivas:

- Quiste o forma infectante
- Trofozoito o forma móvil

El quiste constituye la forma de resistencia al medio ambiente, permite que el parásito sobreviva y resista el paso a través del estómago de un nuevo hospedero además de contribuir en la diseminación del parásito.

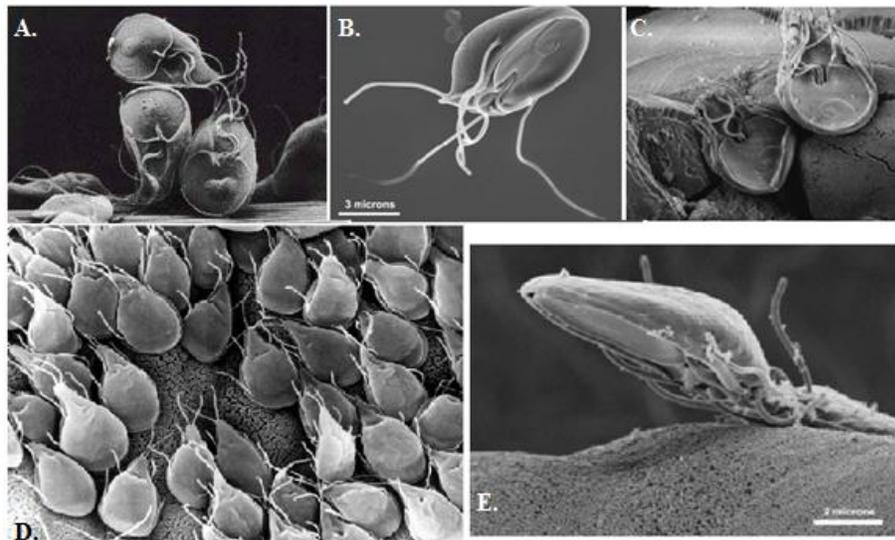
Son de forma ovalada, miden de 8 a 12  $\mu\text{m}$  de ancho y de 7 a 10  $\mu\text{m}$  de largo, observados al microscopio son refringentes con una membrana quística de doble pared en cuyo interior se observan de dos a cuatro núcleos y una serie de filamentos que constituyen los restos flagelares y cuerpos parabasales. Constituyen la forma infectante que transmite la enfermedad ya sea a través de agua o alimentos contaminados luego que el hospedero ingiere los quistes (Atias, 1998), acceden al duodeno donde cada quiste da lugar a dos trofozoítos, que comienzan a multiplicarse (figura 1).



**Figura 1.** Trofozoito de *Giardia lamblia* (A). Donde se puede observar las siguientes estructuras: Cuerpo basal o kinetosomas (K), núcleos (N), cuerpos medios (CM), flagelos antero-laterales (FAL), flagelos ventrales (FV), flagelos postero – laterales (FPL) y flagelos caudales (FC). Imágenes tomadas de cultivo celular (C) y de un frotis a partir de cultivo de trofozoítos (D). Quiste de *Giardia lamblia* (B), donde se observa la pared quística (P), núcleo (N), los fragmentos de disco (FD) y axostilos. Imagen tomada de una muestra de heces fecales con quistes de *G. lamblia*.(E).

El trofozoito es la forma móvil del parásito y produce los síntomas de la giardiasis, se desarrollan en la superficie de la mucosa del duodeno y en la parte alta del yeyuno donde se multiplican por fisión binaria, es piriforme observado de frente, mide aproximadamente 12-15  $\mu\text{m}$  de largo y 5-9  $\mu\text{m}$  de ancho (figura 2). Presenta un cuerpo medio denominado axostilo, siendo este un engrosamiento citoplasmático compuesto por microtúbulos, donde destacan las proteínas que conforman: la tubulina y la giardina, dos núcleos ovalados con una masa de cromatina central, cuatro pares de flagelos que nacen de estructuras denominadas blefaroblastos, se designan en relación a su disposición como: anterior, posterior, caudal y ventral, permitiéndole la motilidad característica, presenta un disco ventral o suctor que es de gran importancia en el desarrollo de invasión al hospedero y en la viabilidad de los parásitos ya que permite permanecer firmemente unidos a las microvellosidades (Gillin et al., 1996). En su membrana expresa Proteínas Variantes de Superficie (VSP), las cuales han sido ampliamente estudiadas debido a que son los principales antígenos que reconoce el hospedero (Luján et al., 2009). No contiene algunos organelos típicos y característicos de los eucariotes, como citosoma, por lo que tiene que absorber los nutrientes mediante endocitosis y tampoco presentan peroxisomas, lo que hace que se incluya dentro de los eucariotes más primitivos, dentro del grupo *Arqueozoa*, tampoco poseen mitocondrias pero presentan mitosomas las cuales realizan una función similar, la diferencia es que estas no contienen genes propios (Lujan et al., 2009; Díaz de la Guardia R. 2006).

De manera distinta al quiste, los trofozoitos necesitan condiciones anaeróbicas para sobrevivir y multiplicarse, además de condiciones específicas de temperatura, pH y salinidad.



**Figura 2.** Diversas fotografías tomadas de trofozoitos de *Giardia lamblia*.  
Imagen modificada de: [http://bioinfomtica.upf.edu/2010/projectes10/Dy/resultados\\_intestinalis.html](http://bioinfomtica.upf.edu/2010/projectes10/Dy/resultados_intestinalis.html) (A).  
<https://blogclinicacuatropatas.wordpress.com/2011/11/03/giardiasis-canina-y-felina/> (B,C).  
<http://web.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2006/Giardiasis/> (D, E).

#### 5.4 Ciclo de vida

El quiste inicia el proceso de desenquistamiento, cuando sus envolturas se disuelven debido a la acción de los jugos digestivos. Este proceso consta de dos etapas: la primera en la que está en contacto con el pH ácido del estómago y la segunda donde se encuentra con un ambiente rico en proteasas y ligeramente alcalino en la parte alta del

intestino delgado. Durante la primera etapa el quiste detecta los estímulos a través de la pared, lo cual lleva a una respuesta altamente coordinada en la que se dan cambios en los niveles de RNAm, hay ligeros cambios del pH intracelular y se da la aparición de pliegues de membrana que podrían ser importantes para determinar la polaridad de los trofozoitos (Hetsko et al., 1998). Durante esta etapa también se ha encontrado que las vesículas periféricas almacenan una fosfatasa, la cual es liberada al espacio periplásmico y es importante para que se dé el desenquistamiento (Touz et al., 2002).

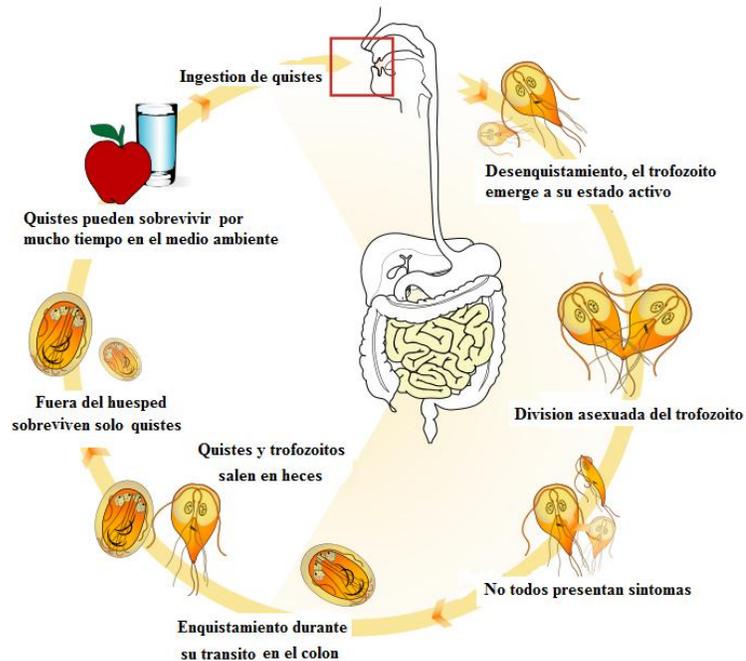
En la segunda etapa de desenquistación hay variaciones en los niveles de mRNA, se da el rompimiento de la pared por la acción de proteasas tipo cisteína (Hetsko et al, 1998). El proceso se completa cuando del quiste emerge el trofozoito activo el cual se divide por fisión binaria y así coloniza el duodeno y yeyuno, adhiriéndose a la superficie del epitelio intestinal mediante el disco ventral, multiplicándose activamente envueltos en el moco que recubre la pared intestinal. (Bernarder et al., 2001).

Cuando los trofozoitos alcanzan la parte media del intestino delgado y el yeyuno, se da un proceso conocido como enquistación, este proceso se ve estimulado por el exceso de sales biliares y la disminución en colesterol disponible en el ambiente.

A lo largo de la enquistación se dan cambios bioquímicos y morfológicos importantes que se pueden dividir en tres etapas:

- a) Recepción de estímulos para la formación del quiste y la consecuente activación de genes específicos.
- b) Biogénesis de organelos secretores y la síntesis, empaquetamiento, transporte y liberación de materiales de la pared celular.
- c) El ensamble de la pared extracelular (Luján HD et al., 2009).

Durante la enquistación se expresan las proteínas de la pared celular (Cellular Wall Proteins CWP1, CWP2 y CWP3) que se caracterizan por tener regiones con alto porcentaje de identidad. Estas proteínas son transportadas en vesículas secretoras (ESVs) donde sufren modificaciones importantes, como el clivaje del extremo C-terminal de la CWP2 por parte de una proteasa cisteína (ESCP), que al parecer es vital para el proceso de formación de la pared celular (Luján HD et al., 2009; Touz MC, et al. 2002). En esta etapa también se observan dos rondas sucesivas de replicación de los cromosomas sin un evento de citoquinesis (Bernarder R, et al. 2001), el desensamblaje y empaquetamiento de organelos como el disco ventral y los flagelos (Gillin et al., 1996). Cuando se completa la enquistación los quistes son expulsados a través de las heces y pueden empezar un nuevo ciclo en el mismo hospedero o en otro. Se observa un resumen del ciclo biológico en la figura 3.



**Figura 3.** Ciclo evolutivo de *Giardia lamblia*  
 Imagen modificada de <http://www.zazzle.com/giardi228095492605466283?lang=es>

### 5.5 Manifestaciones clínicas

Los estudios indican que el periodo de incubación tiene un promedio de 1 a 2 semanas. La infección puede causar diversas manifestaciones clínicas, los síntomas varían según las características del huésped y de los parásitos. (Heresi, 1997).

Aproximadamente 60 a 80% de los casos permanecen como portadores asintomáticos (Sullivan et al., 1992). Las formas leves se caracterizan por dolor epigástrico de poca intensidad, alteraciones en el ritmo de las evacuaciones, náuseas, vómitos, astenia, anorexia, molestias abdominales tipo cólico, malestar general, fiebre.

Las formas moderadas pueden presentar cuadros de duodenitis con dolor en epigastrio, náuseas, flatulencia y un rasgo característico de la giardiasis es la duración prolongada de la diarrea con heces líquidas, explosivas, borborismo y distensión abdominal que puede causar una pérdida importante de peso. (Brodsky et al., 1974).

El paciente con giardiasis grave, además de duodenitis, presenta esteatorrea, flatulencia, alteración en la consistencia de las heces que pueden ser abundantes o líquidas y en los casos crónicos presentan síndromes de malabsorción de grasas y de vitaminas, diarrea crónica, retardo del crecimiento y alteraciones en el estado nutricional, con pérdida de peso (Botero, 1998). En personas sanas, los síntomas de giardiasis pueden durar 2 a 6 semanas, aunque el tratamiento puede acortar la duración de los síntomas.

## **5.6 Patogenia de la Giardiasis**

El mecanismo patogénico específico por el que el protozoo *G. lamblia* causa enfermedad no ha sido identificado. Se habla de una patogenia multifactorial y se han implicado a factores dependientes tanto del parásito como del hospedador (Olsen et al., 1977).

La respuesta clínica a la infección puede atribuirse a la virulencia de la cepa y/o a factores del huésped (respuesta inmunológica).

### **5.6.1 Factores dependientes de *Giardia lamblia***

En primer lugar, ciertas alteraciones histoquímicas de la mucosa intestinal, debidas a la adherencia del trofozoito activando los linfocitos T por la presencia de VSP, esta obstrucción mecánica interfiere en la absorción de grasas y vitaminas liposolubles produciendo una irritabilidad de la mucosa por el disco suctorio, traduciéndose en una atrofia de las microvellosidades intestinales, lo que lleva consigo a una pérdida o disminución de la actividad digestivo absorbente de las disacaridasas (lactasa, maltasa, sacarasa), con la consiguiente diarrea osmótica. Una disminución de la absorción de hidratos de carbono, vitamina B12, vitamina A, ácido fólico, alteración en el transporte de glucosa-sodio y en la absorción de D-xilosa.

También hay factores ligados a la virulencia del gen infectante que depende, por un lado, de las VSP expresadas por el parásito mediadas por las proteasas intestinales, y por otro, por la secreción de una cistein-proteasa IgA1 por los trofozoítos que elimina la respuesta secretora local (IgA) del hospedador. Por el momento no se ha descrito la presencia de citotoxinas ni enterotoxinas. (Rada & Aranda, 2002; Takahashi et al., 2001).

Los reportes de la invasión intestinal por *G. lamblia* no son aceptados universalmente ya que se ha encontrado superpoblación bacteriana en pacientes con giardiasis y malabsorción intestinal por lo que se ha propuesto que también pueden causar diarrea (Tomkins et al, 1978).

### 5.6.2 Factores dependientes del hospedador

Para resistir la infección se requiere un sistema inmune mediado por células competentes. Uno de los factores más importantes dependientes del hospedador es la inmunodeficiencia humoral, como la hipogammaglobulinemia (congénita, común variable, ligada al cromosoma X) o el déficit selectivo de IgA (afecta al 10% de la población), cuyos pacientes están en mayor riesgo.

Otros factores son los antígenos de histocompatibilidad (HLA): HLA-A1, A2, B8 y B12. La malnutrición calórico-proteica aumenta la gravedad de la giardiasis por disminución de la producción de enterocitos en las vellosidades intestinales. Por último, habría que citar la microflora intestinal, imprescindible para la expresión de la patogenicidad de *G. lamblia* (Alcaraz & Soriano, 2009).

En pacientes sin tratamiento la duración promedio de la enfermedad es aproximadamente 6 semanas. Se diferencia de las enfermedades virales o bacterianas por la diarrea crónica. (Perlmutter et al, 1985; Ljungstrom IC, 1992). Los cambios patológicos son más marcados en los inmunodeficientes observando que la microvellosidad puede variar de normal a anormal marcadamente y la hiperplasia linfoide es común. Luego de un tratamiento, la vellosidad vuelve a su estado normal y la malabsorción se resuelve (Taylor & Wenman, 1987).

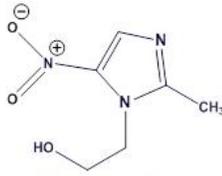
### **5.6.3 Mecanismos de la malabsorción intestinal**

Los mecanismos por los que *G. lamblia* causa diarrea y malabsorción intestinal siguen siendo polémicos y probablemente multifactoriales. Se sugirió la barrera mecánica de los trofozoitos y la competencia de nutrientes entre el parásito y el hospedador, pero la enorme superficie del intestino delgado y la pequeña masa metabólica relativa del parásito hacen de esta hipótesis insostenible. Existen indicios de que *G. lamblia* produce varios grados de lesión en la mucosa, al mismo tiempo que influye en las condiciones del lumen intestinal e interfiere tanto en la digestión como en la absorción.

### **5.7 Tratamiento**

Existe un rango limitado de drogas efectivas permitidas para el tratamiento de giardiasis, que incluyen nitroimidazoles, quinacrina, benzimidazoles y furazolidona, el metronidazol, es la droga de elección, pero existen otras alternativas como albendazol (Romero-Cabello et al., 1995). Algunos reportes clínicos sugieren una aparente resistencia a las drogas lo que explican la falla al tratamiento de giardiasis (Nash et al., 2001).

Los nitroimidazoles tienen un amplio espectro de actividad contra bacterias anaeróbicas y protozoarios como resultado de su reducción a radicales metabolitos aniónicos a través de moléculas de ferredoxina o proteínas de transporte de electrones (Phillips et al, 2010).

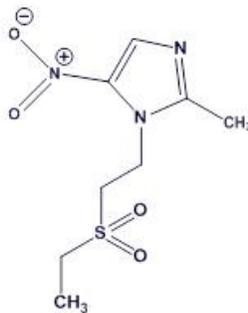


**Figura 4.** Fórmula química del Metronidazol  
Imagen modificada de <http://www.info-farmacia.com/microbiologia>

El mecanismo de acción consiste en difundirse al interior del trofozoito, una vez dentro, las ferredoxinas del sistema de transporte electrónico del parásito donan electrones al grupo nitro de la estructura 5-nitroimidazólica. El metronidazol reducido se enlaza al DNA y éste pierde su estructura de doble hélice, interrumpiéndose su duplicación, produciendo la inhibición rápida de respiración causando muerte celular (Ings et al, 1988).

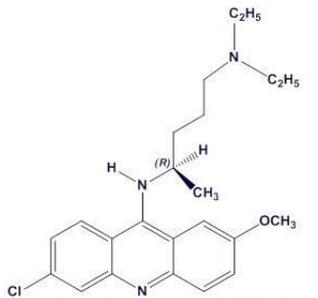
Las formas quísticas del parásito apenas se ven afectadas debido a la escasa penetración del fármaco a través de la pared celular del quiste. (Adam, 2001).

Puede llegar a causar efectos secundarios como náuseas, dolor de cabeza, leucopenia y problemas gastrointestinales, además se han descrito efectos mutagénicos y carcinogénicos (Escribano et al., 2012) siendo no muy bien tolerados por muchos pacientes, también se ha observado para todos los tratamientos de giardiasis hasta un 20% de resistencia a los medicamentos, dándose el fracaso terapéutico debido a factores de huésped o la resistencia del parásito (Tejman-Yarden et al, 2013). Los nitroimidazoles incluyen: Metronidazol, Tinidazol, Ornidazol y Secnidazol.



**Figura 5.** Estructura química del Tinidazol  
Imagen modificada de <http://www.info-farmacia.com/microbiologia>

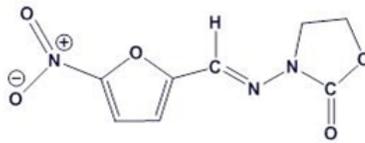
Quinacrina es un agente antimalarico efectivo para el tratamiento de Giardiasis cuando se da en un periodo de 5 a 10 días (Davidson, 1984) y es considerado como el agente de elección. Sin embargo sus efectos colaterales son en el sistema gastrointestinal, a veces causando complicaciones en algunos casos, incluye psicosis toxica y hemolisis en pacientes con deficiencia de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa. El mecanismo de acción de la quinacrina es posiblemente sobre los componentes de flavoproteina y quinona de la respiración. (Parkin et al., 1972).



**Figura 6.** Estructura química del Quinacrina  
Imagen modificada de <http://www.info-farmacia.com/microbiologia>

Quinacrina interfiere con la duplicación del ADN en los trofozoitos, aunque se han evidenciado casos de resistencia debida a una reducida absorción del fármaco por los trofozoitos.

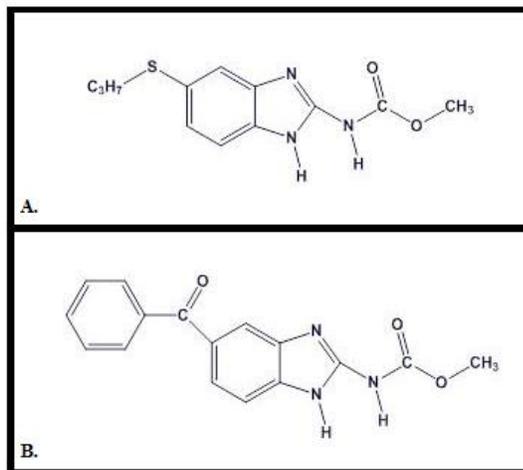
Furazolidona es frecuentemente usado en niños pero puede ser menos efectiva que quinacrina y metronidazol. (Davidson, 1984).



**Figura 7.** Fórmula química del Furazolidona  
Imagen modificada de <http://www.info-farmacia.com/microbiologia>

El mecanismo de acción consiste en que furazolidona sufre una reducción. Los equivalentes de reducción proceden del NADH. La actividad electrofílica de furazolidona reducida interfiere con un sinnúmero de moléculas del parásito, entre ellas el ADN.

Los dos benzimidazoles terapéuticos son Albendazol y Mebendazol, los cuales ejercen su acción farmacológica uniéndose a la  $\beta$ -tubulina del citoesqueleto de *G. lamblia*. Esta unión se traduce en: la inhibición de la polimerización del citoesqueleto y la interferencia con la captación de glucosa.



**Figura 8.** Fórmula química de A. Albendazol y B. Mebendazol  
Imagen modificada de <http://www.info-farmacia.com/microbiologia>

Una ventaja del Albendazol es que también resulta útil en el tratamiento simultáneo de diversas helmintosis intestinales que suelen coexistir junto a la giardiasis. Es difícil cultivar *G. lamblia* de muestras de pacientes y probar la susceptibilidad *in vitro* de cada uno, por eso es difícil documentar la resistencia a la droga.

Se ha visto una disminución de susceptibilidad *in vitro* a los diferentes fármacos utilizados para el tratamiento de la giardiasis (Taylor & Wenman, 1987; Gutiérrez et al. 2008) y desde hace más de 30 años no se han mejorado de manera sustancial los fármacos antiparasitarios que existen en el mercado, sin embargo aunque a la fecha hay mejor entendimiento sobre la patología de esta enfermedad, existe poca atención de parte de las compañías farmacéuticas en el desarrollo de nuevos medicamentos debido a que la mayor parte de los enfermos, por parasitosis, viven en la pobreza, la búsqueda de nuevos agentes antiparasitarios sean de origen sintético (Sousa et al., 2006, Tian et al.

2010, Arguello-Garcia et al., 2004) o natural (Ponce-Macotela et al., 2006) es importante ya que permitiría continuar con la investigación en la bioprospección.

## **5.8 Epidemiología**

La giardiasis es una enfermedad parasitaria intestinal de distribución mundial, está asociada a la pobreza, constituyéndose como Enfermedades Desatendidas según la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) (Savoli et al., 2006).

Se estima que afecta a cerca de 280 millones de personas cada año a nivel mundial (Upcroft & Upcroft, 2001; Ali & Nozaki 2007), especialmente en países en vías de desarrollo de Asia, África y América Latina. Es la causa de diarrea en hasta un 20% de los casos en países en vías de desarrollo, pero sólo de un 3-7% en países desarrollados (O.M.S., 2009).

En Latinoamérica existen cerca de 50 mil casos nuevos/año de giardiasis, observándose un mayor grado de riesgo en la población infantil. Las más altas prevalencias se presentan en regiones tropicales y subtropicales, en zonas rurales donde es frecuente la contaminación de agua o alimentos con materia fecal de estos países (Ponce – Macotela et al., 2006).

Bolivia al ser un país en vías de desarrollo, presenta una elevada prevalencia de parasitosis intestinales, ya sean producidas por protozoarios o helmintos, alcanzando cifras entre 25% y 90% respectivamente (Condori, 2008; Alvaro I., 2005; Barrientos et

al., 2008). En la región altiplánica del país, se observa mayor prevalencia, a nivel de enteroparasitos, encontrándose valores de hasta 25% especialmente en poblaciones marginales y rurales que tienen condiciones precarias de higiene individual y familiar, además de hábitos de alimentación propicios a esta infección por la contaminación de manos, agua y alimentos. Los principales protozoarios reportados en este medio son *Entamoeba coli*, *Blastocystis hominis*, *Giardia lamblia*, siendo este último el patógeno más comúnmente hallado en procesos diarreicos, sobre todo en los niños.

### **5.9 Medición de la viabilidad celular**

Una prueba *in vitro* ideal para evaluar la proliferación celular y la citotoxicidad debe tener como características principales: ser simple, rápida, eficiente, económica, reproducible, sensible, segura, efectiva en la media de la población celular viable y que no muestre interferencia con el compuesto a evaluar (Anoopkumar., 2005).

Se han descrito diferentes métodos que permiten determinar la viabilidad celular *in vitro* facilitando el desarrollo de técnicas de tamizaje a nuevos componentes antiparasitarios (Martínez – Barrios, 2011). La técnica espectrofotométrica de DPPH que emplea el radical 1,1-difenil-2-picrilhidracrilos puede dar variables dispersas debido a que es un radical nitrogenado de larga vida, en algunos casos puede ser inerte y reaccionar lentamente (Barrón, 2012). La técnica de recuento celular utilizando colorantes vitales es laboriosa, consume tiempo, no es sensible y es un proceso subjetivo (Marrero-Ponce et al., 2009). Los métodos basados en la reducción de la sal

3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromide (MTT) por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables de cristales de formazan, presentes en los cultivos. Estos métodos son ampliamente utilizados, sin embargo el producto final de esta sal (formazan) es insoluble en agua, por lo que se utiliza solventes orgánicos para solubilizarlo (Calzada et al., 1999). El uso de análogos de MTT como el XTT sodio (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2-h-tetrazolium-5-carboxanilide) técnica realizada en el I.I.F.B. no presenta resultados satisfactorios debido a la oxidación del medio de cultivo (TYIS-33).

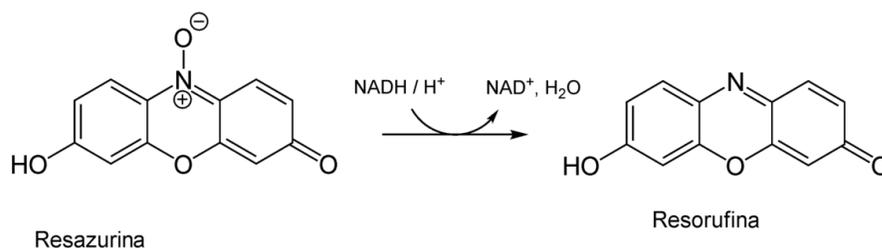
La mayoría presentan desventajas por ser de punto final, imposibilitando seguir el comportamiento celular después de ser sometidas a un tratamiento traumático.

### **5.10 Resazurina**

La resazurina es un colorante que ha sido utilizado desde 1950 para evaluar la contaminación en fluidos biológicos y leche por bacterias y hongos (Erb et al., 1950), también se utiliza para cuantificar la proliferación y observar la citotoxicidad en diferentes tipos celulares. Últimamente se han desarrollado técnicas colorimétricas de oxido reducción en base a la resazurina para monitorear la sensibilidad parasitaria frente a drogas patrón, tal es el caso de promastigotes de *Leishmania* (Kulshrestha et al., 2013), amastigotes de *T. cruzi* (Bowling et al., 2012) y trofozoitos de *Trichomona vaginalis* (Ibañez et al., 2012).

La resazurina es un colorante redox, que exhibe cambios tanto colorimétricos como fluorométricos relacionados a la actividad celular metabólica (González & Tarloff, 2001; Ahmed et al., 1994). La técnica se basa en la capacidad de células activas metabólicamente que reducen la resazurina a resorufina y dihidroresorufina. Esta conversión ocurre intracelularmente en la mitocondria de las células viables donde la forma oxidada de resazurina ingresa al citosol y es convertida a la forma reducida por la actividad enzimática mitocondrial aceptando electrones del NADPH, FADH, GMNH, NADH, como se observa en la figura 9 (Makiuchi et al., 2013), la reducción por el crecimiento produce que la resazurina oxidada o no fluorescente (color azul) la reduzca o cambie a la forma fluorescente (color rosado).

La resorufina es excretada al medio permitiendo el continuo monitoreo de la proliferación y/o la citotoxicidad de sustancias sobre células humanas, animales, bacterias, hongos. Este colorante es poco tóxico para las células y permite la continuidad de estudios en las mismas células, economizando tiempo y dinero, especialmente en cultivos primarios donde las células son escasas.



**Figura 9.** Conversión de resazurina a resorufina (fluorescente), por acción metabólica de células viables. Imagen modificada de: [http://www.pharmacelsus.de/resazurin\\_assay/](http://www.pharmacelsus.de/resazurin_assay/)

## **5.11 Plantas de la Medicina Tradicional Tacana**

El conocimiento de propiedades curativas de plantas medicinales, permite identificar y aislar compuestos químicos con actividad biológica o propiedades farmacológicas, el grupo étnico Tacana presenta una variedad de plantas utilizadas para tratar males y enfermedades de todo tipo, a continuación se resumen algunas de importancia en el trabajo.

### **5.11.1 *Triplaris*.**

*Triplaris* es un árbol de la familia de las *Polygonáceae* nativo de los bosques de Centro y Sudamérica. El tronco alcanza hasta 25 m de altura y 40 cm de diámetro. Las flores dioicas pueden ser de color blanco, rojo o naranja.

**Usos Tacana:** La madera es utilizable en la construcción de viviendas y muebles. Las flores rojas se utilizan como adorno en las iglesias, haciendo arreglos en forma de cruz.

Mientras que en la medicina tradicional se utiliza la corteza para hacer infusiones contra la diarrea y en casos de lombrices intestinales (*Áscaris spp.*), también utilizan en mujeres que no pueden dar a luz al momento del parto. Debido a los antecedentes antiparasitarios descritos, se probó contra *Leishmania*, sin embargo no se obtuvieron resultados positivos *in vitro* contra este parásito (Bourdy et al., 2000).

### 5.11.2. Anani pa (*Triplaris poeppigiana*)

Presenta hojas lanudas, se caracteriza por tener flores de color rojo dioicas, (figura 10) aunque presenta mutualismo con las hormigas, existen pocas dentro del tronco



**Figura 10.** Árbol y flor de *Triplaris poeppigiana*  
Imagen recuperada de los viajes de campo San Buenaventura 2014

### 5.11.3 Anani (*Triplaris americana*)

A diferencia de *Triplaris poeppigiana*, tiene las hojas lisas, sin pelos y su tronco está lleno de hormigas rojas, la flor dioica de esta especie es color naranja (Bourdy et al., 2000).



**Figura 11.** Árbol y flor de *Triplaris americana*  
Imagen recuperada de los viajes de campo San Buenaventura 2014

#### **5.11.4 Evanta (*Galipea longiflora*)**

*Galipea longiflora* Krause es conocida como Evanta entre las etnias Amazonicas, Tacana, Mosen y Tsimane, la emplean como fortificante en niños y adultos, además se utiliza en el tratamiento de diarreas causadas por parásitos intestinales, como en el tratamiento de *Leishmania* (Bourdy et al., 1999).

Algunos autores han demostrado que los alcaloides de esta planta tienen una amplia gama de actividad biológica *in vitro*, como antitripanosoma, antirretroviral, antiplasmodial, nematocida, trichomonacida y antimycobacterium además de un efecto gastro-protector (Aguinaldo et al., 2007; Campos et al., 2010; Salamanca et al., 2008)

#### **5.11.5 Tahua Midha, Tahua Pa (*Pourouma cecropiifolia*)**

Conocido también como ambaibillo, los Tacana designan la especie con dos nombres diferentes, Tahua midha para el individuo macho y Tahua pa para el árbol hembra que da frutos comestibles. Utilizan para la pesca, el tronco como leña, su uso medicinal es en casos de infección urinaria.

#### **5.11.6 Cuabad'u (*Cedrela fissilis*)**

El pueblo indígena lo utiliza en caso de diarrea con o sin fiebre, también cuando hay hemorragias en mujeres después de dar a luz, ayuda a limpiar la matriz después del parto y como antiinflamatorio luego de golpes fuertes.

### **5.11.7 Shaute uja (*Zingiber officinale*)**

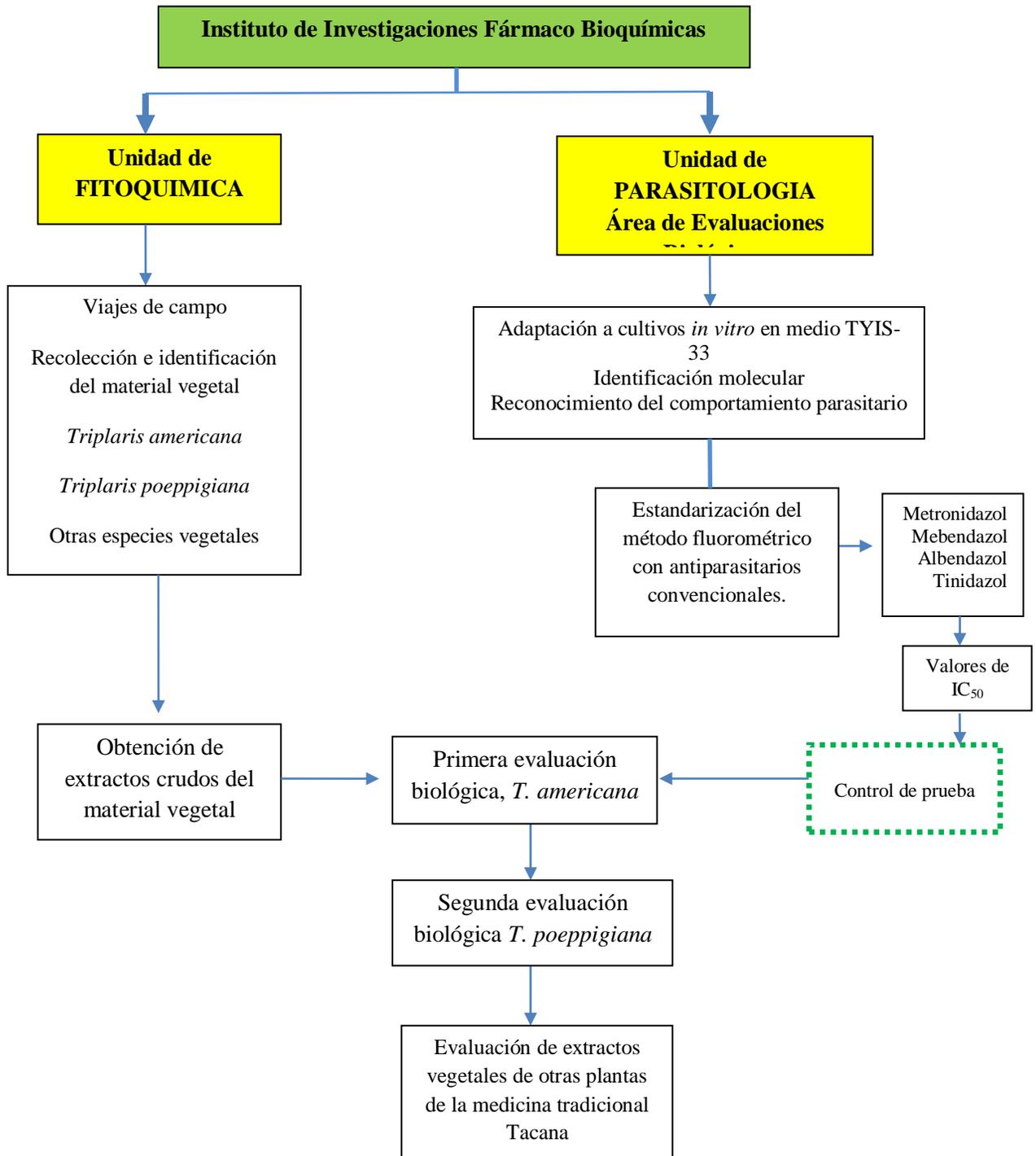
Denominada también como Picantillo dentro de la comunidad Tacana, *Zingiber officinale* es una planta medicinal que se ha utilizado ampliamente en diferentes culturas alrededor del mundo, las principales acciones farmacológicas del jengibre y sus compuestos aislados incluyen acciones de inmunomodulación, antiinflamatorias, antiapoptóticas, antihiperlipemiantes, antilipídicas y antieméticas. También es conocido por ser un buen antioxidante pudiendo mitigar o prevenir la generación de radicales libres (Bradeldin et al., 2007). El pueblo Tacana recomienda el uso de esta planta para diarrea, resfrío, disentería y reumatismo.

### **5.11.8 Chuchuhuasi (*Maytenus laevis*)**

Sirven para tratar infecciones e inflamaciones, otras muestran actividad analgésica y antiulcerosa, al mismo tiempo que reportan actividad antiplasmodica (Fonseca et al., 2009; Estevam et al., 2009).

## 6. MATERIALES Y METODOS

### 6.1 Diseño metodológico



## 6.2 Medio de Cultivo TYIS-33

El medio de cultivo utilizado en el estudio fue TYIS-33 modificado enriquecido con 15% de Suero Bovino Fetal (Sigma-Aldrich), el cual permitió mantener la viabilidad de los trofozoitos de *G. lamblia*. Cada 100 mL de medio contiene los siguientes reactivos:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.06	g
NaCl	0.1	g
Extracto de levadura	3	g
Bilis bovina deshidratada	0.05	g
Glucosa	1	g
L-cisteina HCl	0.2	g
Ácido ascórbico	0.02	g
Citrato férrico amónico	2.2	mg

El medio de cultivo se ajustó a pH 7.0 con NaOH 0.1 N.

Una vez preparado se esterilizó filtrándolo a través de una membrana de 0.22 µm Millipore (Thomas Scientific), se suplementó con 15 % de Suero Bovino Fetal (SBF) y 3% de solución de vitaminas (Sigma - Aldrich). El medio se alicuota en tubos de 50 mL estériles para ser utilizados por 7 – 15 días, almacenándolos a -20°C para su conservación. Todo se realizó en condiciones estériles, trabajando en campana de flujo laminar.

### **6.3 *Giardia lamblia* y procedimiento de cultivo celular**

Los trofozoitos de *G. lamblia* se obtuvieron por donación de la doctora María Auxiliadora Dea Ayuela, profesora en Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, España (2009).

La forma parasitaria fue crioconservada resuspendida en una solución de Suero Bovino Fetal (SBF) al 15% utilizado como protector del Dimetil Sulfoxido (Sigma - Aldrich) (DMSO), almacenada a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  en un congelador (Nuair) del I.I.F.B.

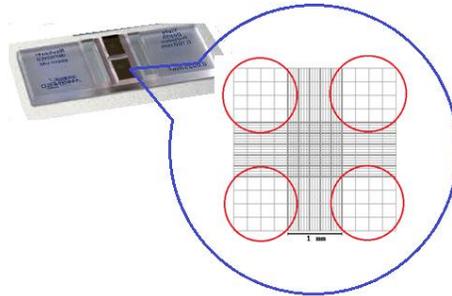
El descongelamiento consistía en llevar los tubos crioconservados a  $37^{\circ}\text{C}$  en baño maría y centrifugar por 5 minutos a 2500 r.p.m., desechar el sobrenadante, transferir los trofozoitos del precipitado a un tubo de 1,5 mL. estéril con medio TYIS-33 previamente atemperado. Se llenó por completo el tubo con el medio de tal forma que no hubo presencia de aire debido a que estos parásitos son anaerobios facultativos, los tubos fueron incubados en una estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  (Faeta), colocados de manera inclinada puesto que existe mayor superficie, permitiendo mejor crecimiento.

### **6.4 Curva de crecimiento de *G. lamblia***

Para conocer el comportamiento biológico del parásito se realizó la curva de crecimiento, el proceso consistió en la inoculación de  $2 \times 10^4$  trofozoitos *G. lamblia*/mL

en 10 tubos eppendorf de 1,5mL saturados con medio TYIS-33 que se incubaron a 37°C.

El recuento celular se realizo diariamente a la misma hora utilizando los retículos de glóbulos blancos en una cámara de Neubauer, haciendo diluciones 1/10 con glutaraldehido 2.5% para evitar la motilidad durante el conteo. (Figura 12).



**Figura 12.** Retículos utilizados para el recuento de trofozoitos de *G. lamblia*

El cálculo del recuento parasitario se hizo mediante la fórmula:

$$\text{Trofozoitos contados} \times 10 \times 2.5 \times 1000 = \text{Trofozoitos/mL}$$

El recuento se realizó por triplicado.

## 6.5 Resazurina

La resazurina (Sigma - Aldrich) fue almacenada a 4°C protegida de la luz.

Se preparó una solución madre al 1% p/v con concentración equivalente a 4 M, a partir de la cual se realizaron diluciones de 4, 2, 1, 0.5, 0.25 mM con Buffer Fosfato

Salino (pH 7.4). Esto se realizó con el fin de determinar la concentración ideal para la lectura fluorométrica del trabajo.

## **6.6 Estandarización de la técnica fluorométrica**

A partir de un cultivo *in vitro* de trofozoitos de 48 horas de crecimiento se hicieron cálculos y se realizaron diluciones seriadas  $\frac{1}{2}$ , utilizando concentraciones entre  $1,5 \times 10^6$  hasta  $2,5 \times 10^5$  trofozoitos/mL, estos fueron distribuidos en placas de cultivo de 96 pozos (Cellstar) por duplicado en diferentes días, a cada pozo se añadió 10 $\mu$ L de la solución de resazurina a diferentes concentraciones (4, 2, 1, 0.5, 0.25 mM).

Se probaron tiempos de incubación de 2, 3, 4, 5, 6 y 7 horas. Las placas fueron leídas en un lector de Fluorescencia (Synergyht, Biotek) a una longitud de excitación y emisión de 540 y 590 nm respectivamente. A partir de los datos, se obtuvo curvas de fluorescencia en función a las concentraciones de parásitos y concentración de resazurina, para los diferentes tiempos de incubación.

## **6.7 Antiparasitarios convencionales**

Para la estandarización de la técnica se utilizaron los siguientes antiparasitarios adquiridos en la farmacia institucional:

- Albendazol 400 mg
- Mebendazol 100 mg
- Metronidazol 500 mg
- Tinidazol 1000 mg

Como control antiparasitario natural se utilizaron Alcaloides Totales de Corteza de *Galipea longiflora* (CAT), los cuales se obtuvieron de la Unidad de Fitoquímica del I.I.F.B. (Bourdy et al., 2000, Salamanca 2008, Giménez et al., 2009- 2014)

Tanto los medicamentos convencionales como CAT se disolvieron en DMSO al 96%, obteniéndose una concentración de 10 000 µg/mL respectivamente, como se resume en la tabla 1. Se puede observar que los antiparasitarios presentan una gran cantidad de excipientes que pueden interferir al momento de hacer las diluciones.

	Peso teórico mg	Peso real mg	Principio activo %	Cantidad pesada de cápsula para obtener 2 mg de principio activo	Principio activo	DMSO µL	[c] µg/mL
<b>Albendazol</b>	400	742	53.9	3.71 mg	2 mg	200	10000
<b>Mebendazol</b>	100	258	39	5.16 mg	2 mg	200	10000
<b>Metronidazol</b>	500	791	63	3.16 mg	2 mg	200	10000
<b>Tinidazol</b>	1000	1217	82	2.43 mg	2 mg	200	10000

**Tabla 1.** Resumen de la obtención de la disolución madre de antiparasitarios convencionales utilizados en el tratamiento contra *G. lamblia*.

Para llegar a la concentración de 2 µg/mL a partir de la cual se hicieron diluciones seriadas de 1µg/mL hasta 0,007 µg/mL, las cuales engloban la IC<sub>50</sub> establecida de medicamentos convencionales, se procedió de la siguiente manera (citamos como ejemplo el albendazol):

	Principio activo	DMSO µL	[c] µg/mL	Dilución en medio TYIS-33		[c] µg/mL
<b>Albendazol</b>	2 mg	200	10000	1/100	1/50	2

**Tabla 2.** Metodología para llegar a la concentración de 2 µg/mL

Mientras que de CAT se hicieron diluciones igualmente seriadas utilizando concentraciones de 100 µg/mL hasta 12,5 µg/mL como se indica en la tabla 3.

### Concentraciones utilizadas de antiparasitarios convencionales y CAT

Diluciones de antiparasitarios convencionales con DMSO µg/mL	Diluciones del control natural, CAT con DMSO µg/mL
1	100
0.5	50
0.25	25
0.125	12,5
0.06	
0.03	
0.015	
0.007	

**Tabla 3.** Concentraciones de antiparasitarios convencionales (albendazol, mebendazol, metronidazol, tinidazol) y CAT como control natural, utilizados para la estandarización del método fluorométrico.

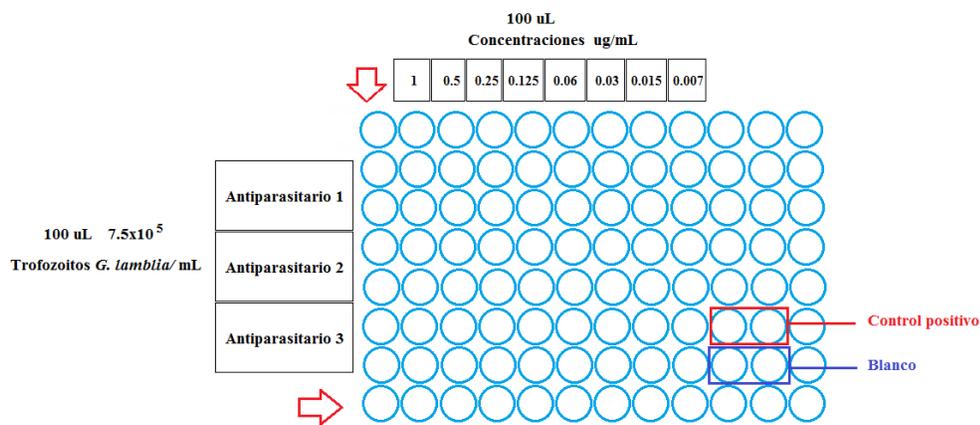
### 6.8 Ensayo para la determinación de la Concentración Inhibitoria Media de drogas control

Se hizo una dilución 1/10 del cultivo de trofozoitos con glutaraldehído 2.5% para fijar los parásitos y realizar el recuento en cámara de Neubauer. Se ajustó la población a  $7,5 \times 10^5$  trofozoitos/mL con medio TYIS-33 modificado, distribuyéndolos en placas de 96 pozos (Cellstar) en un volumen de 100 µL. A continuación se procedió a añadir las

distintas concentraciones de las drogas control a evaluar en volumen similar al de los parásitos, se realizó un control de crecimiento parasitario, es decir 100 µL de parásitos ajustados a  $7,5 \times 10^5$  trofozoitos/mL mas 100µL de antiparasitario convencional diluido en medio TYI-S-33. Como blanco se utilizo el medio de cultivo. Como control positivo de crecimiento se utilizaron los trofozoitos en medio TYIS-33 sin ninguna droga, se detalla el procedimiento en la figura 13.

Se incubó por 48 horas a 37°C dentro de un CandleJarr, un recipiente cerrado de vidrio con una llave de paso en la tapa y una vela encendida en su interior de tal modo que permita la salida del oxígeno y la saturación en el interior de anhídrido carbónico requerido para el crecimiento de los trofozoitos de *G. lamblia*. Pasado este tiempo, a la placa se añadió (10µL/pozo) de una solución de resazurina 2mM en Buffer Fosfato Salino (pH 7.4). Las placas se incubaron durante 4 horas a 37°C, en el CandleJarr con el mismo procedimiento, fueron reveladas y leídas en un lector de fluorescencia Synergyht BioTek.

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



**Figura 13.** Metodología de sembrado de drogas control en la placa de 96 pozos.

## 6.9 Recolección de plantas del género *Triplaris* y otras especies vegetales

Las especies vegetales fueron recolectadas en la localidad de Buena Vista ubicada en el municipio Abel Iturralde del departamento de La Paz a una altura de 214 m.s.n.m. En la comunidad Tacana ubicada a 14°22' 11.65" S y 67°34'01.12" O. Durante los meses de julio, septiembre y octubre del año 2014.

Las plantas recolectadas fueron pertenecientes al género *Triplaris* y otras especies vegetales señaladas en la tabla 5.

### **6.10 Preparación de extractos crudos para plantas del género *Triplaris***

Una vez identificado el material vegetal, se dejó secar protegiendo de la luz solar, en un ambiente cerrado y seco. Se trabajó con la corteza de las dos especies de *Triplaris*, una vez molido el material vegetal se realizó la maceración en etanol 96%, 4 veces, cada una de 24 hrs. El residuo obtenido al evaporar el disolvente se resuspendió en agua y extrajo tres veces con diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), obteniendo una subfracción soluble en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fracción orgánica se llevó a sequedad, obteniéndose una fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fracción acuosa se extrajo tres veces con acetato de etilo (AcOEt), obteniéndose una fracción soluble en AcOEt y una fracción acuosa. La fracción orgánica se llevó a sequedad, obteniéndose así una fracción de AcOEt y una fracción acuosa que fue congelada a  $-80^\circ\text{C}$  y liofilizada, el procedimiento se describe en Anexos II. Se obtuvieron un total de 10 fracciones y subfracciones de cada especie vegetal como se indica en la tabla 4.

<b><i>Triplaris poeppigiana</i>, Anani Pa rojo</b>	
<b>Extracto obtenido</b>	<b>Abreviación</b>
Extracto etanólico	Are
Fracción acetato de etilo	Ara
Fracción acuosa	Arq
Fracción diclorometano	Ard
Subfracción CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Ard1
Subfracción CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Ard2
Subfracción CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Ard3
Subfracción CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Ard2-1
Subfracción CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Ard2-2
Subfracción CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Ard2-3

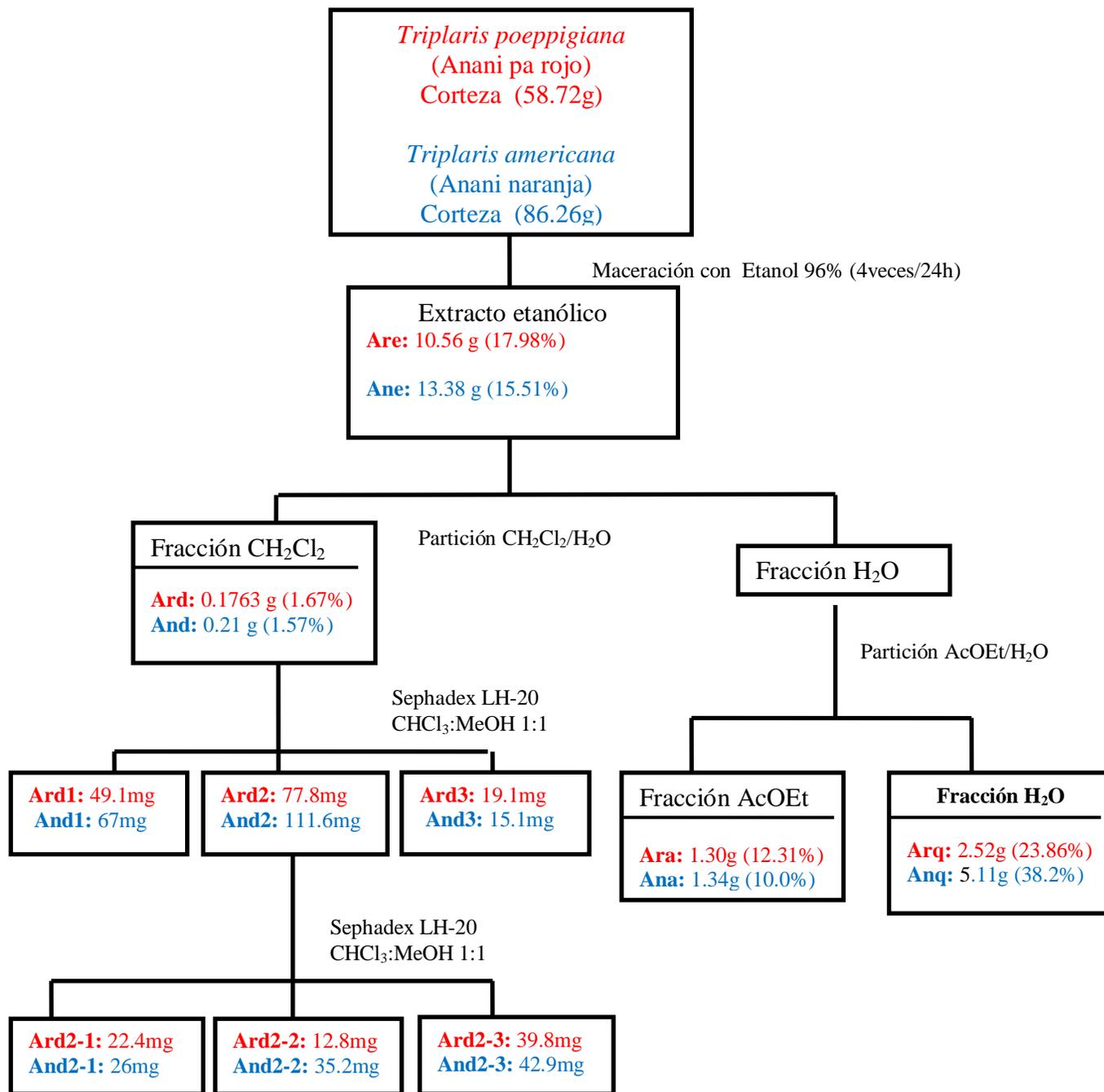
<b><i>Triplaris americana</i>, Anani naranja</b>	
<b>Extracto obtenido</b>	<b>Abreviación</b>
Extracto etanolico	Ane
Extracto acetato de etilo	Ana
Fracción acuosa	Anq
Fracción diclorometano	And
Subfracción CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	And1
Subfracción CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	And2
Subfracción CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	And3
Subfracción CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	And2-1
Subfracción CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	And2-2
Subfracción CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	And2-3

**Tabla 4.** Fracciones y subfracciones obtenidas en el proceso de maceración y partición de cada especie vegetal de *Triplaris*.

Los porcentajes de rendimiento, las fracciones y subfracciones obtenidas de los extractos de *T. poeppigiana* y *T. americana* se resumen en el esquema 1.

Una vez obtenidos los extractos y pesados se diluyeron en DMSO al 96% obteniendo una concentración de 10 000 µg/mL, se hicieron las diluciones para utilizar a una concentración de 100 µg/mL y el DMSO termino en una concentración de 1%, no tóxica para las células.

**Fracciones y subfracciones obtenidas de extractos de *T. poeppigiana* y *T. americana***



**Esquema 1.** Porcentaje de rendimiento del extracto y fracciones obtenidas de la corteza de *Triplaris poeppigiana* (rojo) y *Triplaris americana* (azul) durante el estudio químico biodirigido.

## **6.11 Ensayo para la determinación de la Concentración Inhibitoria Media de extractos crudos de *Triplaris* .**

Se hizo una dilución 1/10 del cultivo de trofozoitos con glutaraldehído 2.5% para fijar los parásitos y realizar el recuento en cámara de Neubauer. Se ajustó la población a  $7,5 \times 10^5$  trofozoitos/mL con medio TYIS-33 modificado, se los distribuyó en placas de 96 pozos (Cellstar) en un volumen de 100  $\mu$ L. A continuación se procedió a añadir las distintas concentraciones de los extractos, fracciones y subfracciones de *T. americana* y *T. poeppigiana* a evaluar (100-50-25-12,5-6,2-3,1-1,5-0,7  $\mu$ g/mL), en volumen similar al de los parásitos, se utilizó controles de crecimiento parasitario, el blanco fue el medio de cultivo, de igual manera que en la estandarización.

Las placas se incubaron en el CandleJarr de la misma manera descrita en la estandarización, luego de 48 horas fueron reveladas y leídas en el lector de fluorescencia Synergyht BioTek para determinar la IC<sub>50</sub>.

### **6.11.1 Determinación de la Concentración Inhibitoria Media de otras especies vegetales**

Para la determinación de IC<sub>50</sub> de otras especies vegetales de la farmacopea tradicional, se realizó el mismo procedimiento, con la diferencia que la concentración de los extractos etanólicos evaluados fueron 200-100-50-25  $\mu$ g/mL. Los nombres genéricos y utilidad de las plantas se resumen en la tabla 5.

N°	Nombre genérico	Órgano	Fecha de colecta	Usos medicinales Tacana
1	Ambaibillo	Hojas	Septiembre 2014	Infección urinaria
2	Ambaibillo	Tallo y ramas	Septiembre 2014	Infección urinaria
3	Cawasha	Hojas	Octubre 2014	Infecciones fuertes
4	Cawasha	Raíz	Octubre 2014	Infecciones fuertes
5	Cedro	Corteza	Octubre 2014	Antiparasitario
6	Cepa caballo	Raíz	Septiembre 2014	Diarrea con sangre
7	Chiori de otro tipo	Hojas y tallo	Octubre 2014	Anti leishmania
8	Chiori de otro tipo	Raíz	Octubre 2014	Anti leishmania
9	Chiwama	Raíz	Septiembre 2014	Verrugas
10	Chuchuhuasi	Corteza	Septiembre 2014	Reumatismo
11	Chuchuhuasi	Raíz	Septiembre 2014	Reumatismo
12	Corazón de Jesús (liana)	Hojas	Octubre 2014	Diarrea con sangre
13	Corazón de Jesús (liana)	Tallo y raíz	Octubre 2014	Diarrea con sangre
14	Manzano silvestre	Corteza	Octubre 2014	Diarrea y Tetanos
15	Patujusillo tallo	Tallo	Octubre 2014	Diarreas
16	Patujusillo	Raíz	Octubre 2014	Diarreas
17	Picantillo jengibre	Raíz	Septiembre 2014	Diarrea y antiparasitario
18	Ribaribay planta entera	Planta entera	Octubre 2014	Diarrea con sangre
19	Toronjil	Hojas	Octubre 2014	Dolor estomacal
20	Toronjil	Tallo	Octubre 2014	Dolor estomacal
21	Toronjil	Inflorescencia	Octubre 2014	Dolor estomacal
22	Toronjil	Raíz	Octubre 2014	Dolor estomacal
23	Vira vira	Tallo	Octubre 2014	Diarreas y hongos
24	Vira vira	Raíz	Octubre 2014	Diarreas y hongos
25	Yondilla	Hojas	Septiembre 2014	Acné
26	Yondilla	Tallo	Septiembre 2014	Acné
27	Yondilla	Raíz	Septiembre 2014	Acné

**Tabla 5.** Resumen de plantas evaluadas diferentes al género *Triplaris* y usos tradicionales Tacana.

## 6.12 Tipificación parasitaria por PCR-RFLP del gen *beta giardina*

A los trofozoitos se realizó la tipificación molecular para determinar si la especie con la que se trabajaba era similar a la especie circulante en nuestro medio, es por eso que se comparo con ADN de quistes extraídos de muestras circulantes en nuestro medio.

Se utilizó el kit de extracción PureLink DNA<sup>®</sup> (Invitrogen). Se adiciono 200 µl de buffer de lisis y mezcló en vortex para homogeneizar la solución. Se incubo a 55°C por 10 minutos, luego se adicionó 200 µl de etanol 96% al lisado. De acuerdo a las instrucciones del kit, la muestra de ADN fue almacenada a 4°C hasta su análisis.

Se amplificó del gen *beta giardina*, un fragmento de 753 pb usando los cebadores:

G7 (5'-AA GCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC- 3')

G759 (5'-G AGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3')

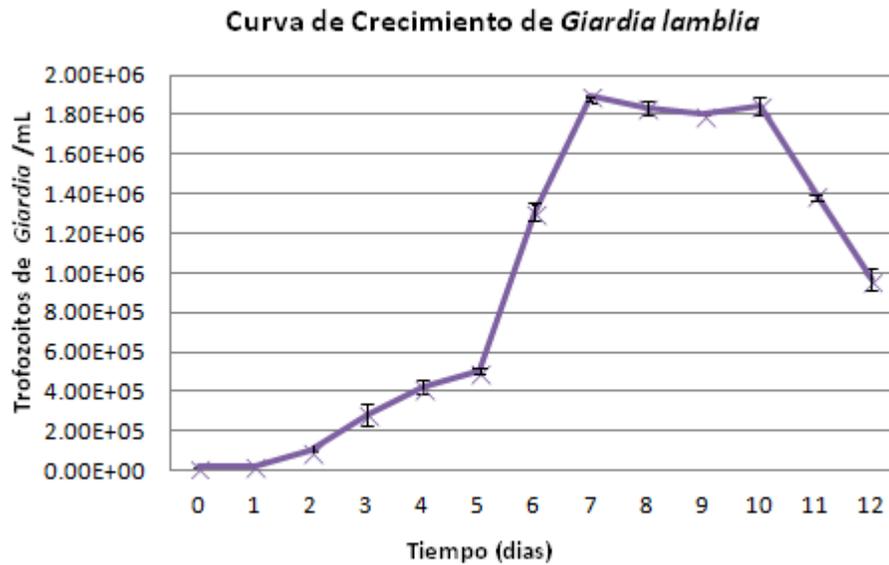
La concentración de los reactivos utilizados fue: solución tampón de la DNA Taq polimerasa 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 0,2 mM de la mezcla de dNTP, 1 µM de cada cebador, 0,2U de Taqpolimerasa y 2 µL de DNA, para un volumen final de 20 µL. La reacción se efectuó en un termociclador Minicycler con una temperatura de desnaturalización de 94 °C durante cinco minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, 65 °C por 30 segundos, 72 °C por un minuto y un ciclo de extensión final a 72 °C por siete minutos. Además, se incluyó un control de corrida sin muestra de ADN.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Adaptación de trofozoitos de *G. lamblia* al medio de cultivo TYIS-33

La adaptación al medio TYIS-33 modificado luego del descongelamiento de los trofozoitos criopreservados se observó diariamente bajo microscopio notando diferencias en la capacidad de adherencia al tubo, motilidad y división de los mismos.

### 7.2 Curva de crecimiento de *Giardia lamblia*



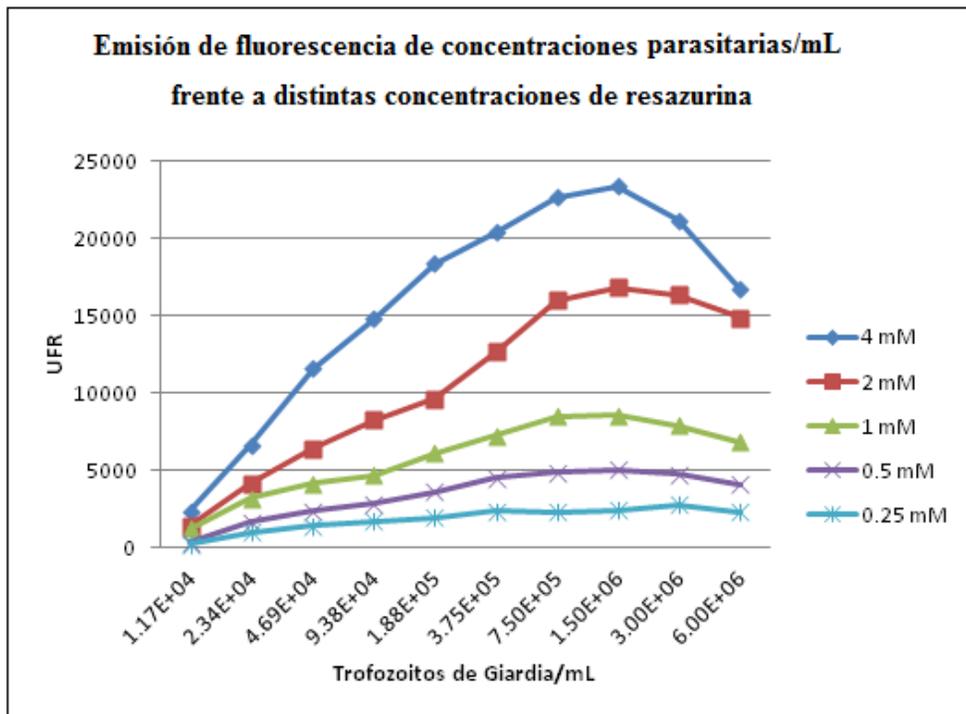
**Figura 14.** Curva de crecimiento de *Giardia* realizada por triplicado.

Las poblaciones obtenidas nos permitieron hacer una gráfica del crecimiento parasitario por mL. Se puede observar una fase de adaptación durante el primer día, a partir del segundo día hay crecimiento con un aumento significativo durante los días 5, 6 y 7, la fase estacionaria dura hasta el decimo día a partir del cual la cifra de trofozoitos fue decreciendo hasta el día 12 en el que se interrumpe el proceso.

### **7.3 Estandarización de la técnica fluorométrica**

Durante la estandarización del método fluométrico, se observó que las concentraciones de resazurina 2mM y 4mM emitían mayor fluorescencia; para obtener la  $IC_{50}$  de los medicamentos convencionales y extractos crudos sería necesario leer la fluorescencia emitida por la mitad de la población parasitaria sobreviviente.

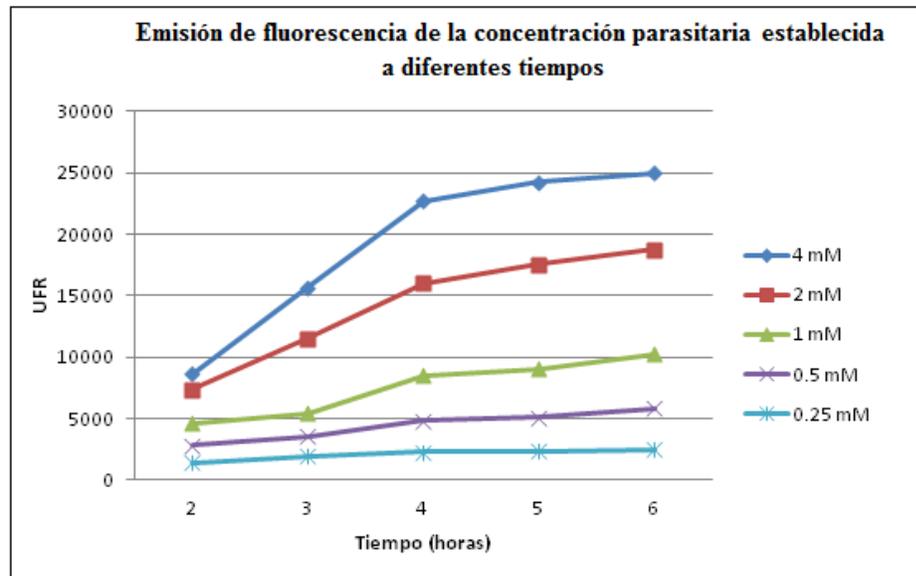
Los resultados mostraron que con una concentración de resazurina 2mM la diferencia de emisión de fluorescencia entre una población y la mitad de la misma era alrededor de 6000 UFR, las cuales permitirían discriminar de mejor manera los resultados de  $IC_{50}$ , a diferencia de la fluorescencia emitida por la mitad de la población con resazurina 4mM (3000 URF), que podrían ser considerados como parámetros positivos, lo que no permitiría hacer una discriminación al momento de calcular la  $IC_{50}$ .



**Figura 15.** La fluorescencia (U.F.R.) emitida entre las concentraciones parasitarias/mL y las diferentes concentraciones de resazurina.

Una vez establecidas las concentraciones de resazurina y trofozoitos/mL, se procedió a determinar el tiempo de incubación, observando que a las 4 horas era el tiempo donde la emisión de fluorescencia era mayor, para lo cual hizo la comparación respectiva de la emisión de fluorescencia (UFR) por la resazurina a distintas concentraciones en diferentes tiempos con una concentración parasitaria de  $7.5 \times 10^5$  trofozoitos de *Giardia* /mL.

La mejor correlación lineal ( $R=0.96$ ) se obtuvo con la concentración de resazurina 2mM a las 4 horas y se observó que a partir de este periodo la emisión de fluorescencia no aumentaba en niveles significativos (Figura 16).



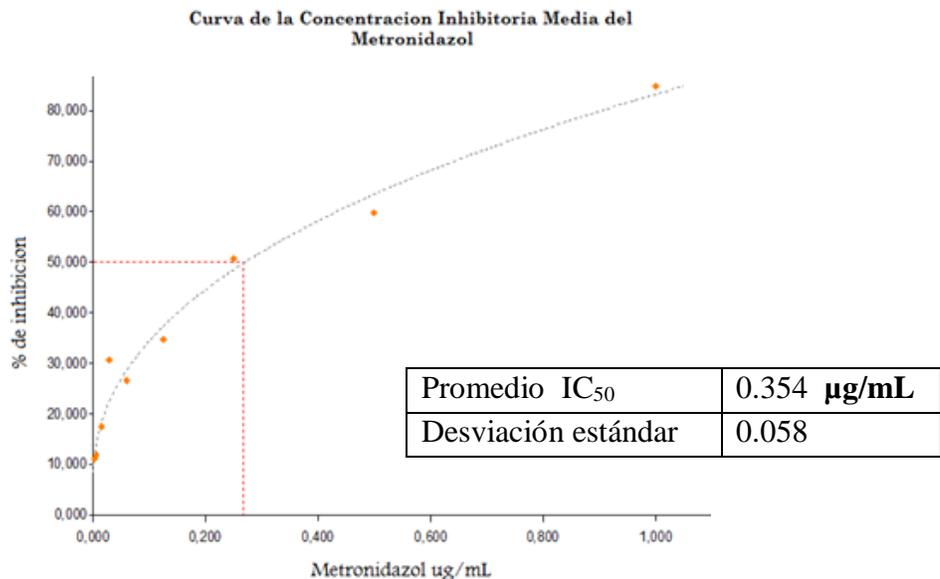
**Figura 16.** Comparación de la emisión de fluorescencia (UFR) por la resazurina en diferentes tiempos con una concentración de  $7.5 \times 10^5$  trofozoitos de *G. lamblia* /mL.

Por lo tanto, para el procedimiento se tomó trofozoitos de un cultivo en crecimiento de 48 hrs., llevándolos a una concentración parasitaria de  $7.5 \times 10^5$  trofozoitos/mL, se alicuotó 100  $\mu$ l en cada pocito de la placa, además de 100  $\mu$ l de medio de cultivo con: extractos a evaluar, los controles y el blanco, se incubaron a 37°C por 48 hrs. en un CandleJarr sacando el oxígeno de manera descrita anteriormente. Pasado ese tiempo, se añadió 10  $\mu$ l de resazurina 2mM en cada pocito y se incubaron a 37°C por 4 hrs. Finalmente se leyó la placa en el lector de fluorescencia.

#### 7.4 Concentración Inhibitoria Media de medicamentos convencionales

La  $IC_{50}$  obtenida de las drogas convencionales en el presente trabajo fueron: mebendazol  $0.012 \pm 0.0028 \mu\text{g/mL}$ , albendazol  $0.021 \pm 0.002 \mu\text{g/mL}$ , tinidazol  $0.161 \pm 0.085 \mu\text{g/mL}$ , metronidazol  $0.354 \pm 0.058 \mu\text{g/mL}$ , estos resultados se asemejan a resultados obtenidos por estudios previos que nos permiten validar la técnica. (Cedillo-Rivera, 1992; Gadelha 2005; Calzada et al., 2003) Los resultados indican que trofozoitos de *G. lamblia* presentan mayor sensibilidad tanto al albendazol como al mebendazol, sin embargo las drogas utilizadas como gold estándar son el metronidazol y el tinidazol.

En la figura 17 se observa la curva de Concentracion Inhibitoria Media obtenida del metronidazol, la curva de los demás antiparasitarios se observan en Anexos I.



**Figura 17.** Curva obtenida por el programa Gen5 que muestra la  $IC_{50}$  del metronidazol.

Los resultados obtenidos indican que la técnica fluorométrica con resazurina tiene un buen potencial para ser utilizado en pruebas de tamizaje a los medicamentos antiparasitarios, productos sintéticos y extractos naturales, ya que los resultados con los antiparasitarios comúnmente utilizados se asemejan a resultados obtenidos en otros trabajos que serán discutidos más adelante. En la tabla 6 se resumen las IC<sub>50</sub> obtenidas de los antiparasitarios convencionales con su respectiva desviación estándar.

<b>Medicamento</b>	<b>IC<sub>50</sub> µg/mL</b>
<b>Albendazol</b>	0,021 ±0.002
<b>Metronidazol</b>	0.354 ±0.058
<b>Tinidazol</b>	0.161 ±0.085
<b>Mebendazol</b>	0.012 ±0.0028

**Tabla 6.** Resumen de la IC<sub>50</sub> de antiparasitarios convencionales utilizados para *G. lamblia* y su respectiva desviación estándar.

### **7.5 Concentración Inhibitoria Media de *Galipea longiflora***

Se vio efecto con los alcaloides totales de la Corteza de *Galipea longiflora*, especie vegetal utilizada como antiparasitario y como control natural en el estudio, con una concentración de 57.3 ± 7.0 µg/mL como se observa en la tabla 7.

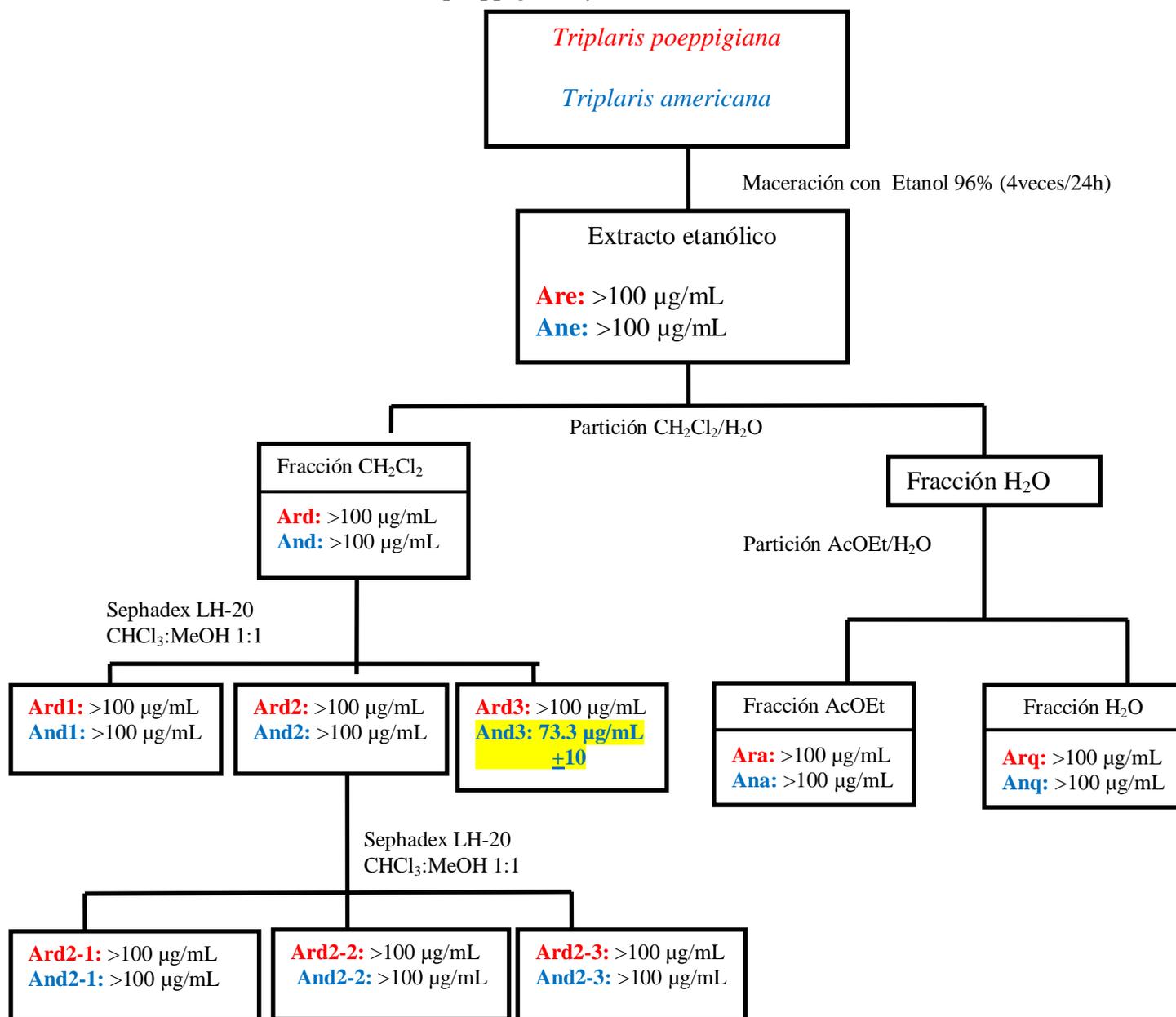
<b>Corteza Alcaloides Totales de <i>Galipea longiflora</i> IC<sub>50</sub> µg/mL</b>	
<b>CAT</b>	57.3 ± 7.0

**Tabla 7.** IC<sub>50</sub> de Corteza Alcaloides Totales de *Galipea longiflora* (CAT) cuya actividad antiparasitaria es menor a 100 µg/mL. Resultados obtenidos por el programa Gen5.

## **7.6 Concentración Inhibitoria Media de fracciones y subfracciones de *Triplaris poeppigiana* y *Triplaris americana*.**

Una vez estandarizada la técnica, se realizaron las pruebas para determinar la IC<sub>50</sub> de las fracciones y subfracciones de las especies vegetales. Los resultados muestran una actividad antiparasitaria baja, mayor a 100 µg/mL, las concentraciones de rendimiento de los extractos de *Triplaris* se resumen en el esquema 2. La subfracción **And3** del *T. americana*, Anani naranja, muestra una IC<sub>50</sub> de 73.3 ±10 µg/mL, en las demás fracciones y subfracciones no se observan resultados que puedan tener un efecto antiparasitario *in vitro* con concentraciones menores a 100 µg/mL.

**Rendimiento de las Fracciones y subfracciones obtenidas de los extractos de *T. poeppigiana* y *T. americana***



**Esquema 2.** Rendimiento de las fracciones y subfracciones obtenidas de la corteza de *Triplaris poeppigiana* (rojo) y *Triplaris americana* (azul).

### **7.7 Concentración Inhibitoria Media de otras plantas pertenecientes a la medicina tradicional Tacana.**

El propósito de este estudio fue evaluar el efecto antiparasitario *in vitro* sobre trofozoitos de *G. lamblia*, de extractos de plantas medicinales utilizadas por el pueblo Tacana para el tratamiento de diarrea, de manera que el estudio contribuya a mejorar la bioprospección de plantas y sus efectos, por este motivo se recolectaron diferentes plantas de la medicina tradicional Tacana, distintas a las del género *Triplaris* y se evaluaron sus extractos sobre trofozoitos de *G. lamblia*. Dentro de este grupo de plantas, los resultados muestran que al menos 13 presentan actividad antiparasitaria menor a 200 µg/mL de las cuales 2 fracciones, raíz de Chuchuhuasi (*Maytenus laevis*) y Jengibre (*Zingiber officinale*), tienen buena actividad antiparasitaria con una IC<sub>50</sub> próxima al antiparasitario natural, CAT. Los resultados se observan en la tabla 8.

N°	Nombre genérico de la planta	Órgano	IC <sub>50</sub> µg/mL
1	Ambaibillo	Hojas	>200
2	Ambaibillo	Tallo y ramas	180.35 ± 5.14
3	Cawasha	Hojas	>200
4	Cawasha	Raíz	>200
5	Cedro	Corteza	>200
6	Cepa caballo	Raíz	>200
7	Chiori de otro tipo	Hojas y tallo	175.3
8	Chiori de otro tipo	Raíz	164.05
9	Chiwama	Raíz	144.3 ±15.2
10	Chuchuhuasi	Corteza	182.73 ±14.95
11	Chuchuhuasi	Raíz	67.77 ±21.09
12	Corazón de Jesús (liana)	Hojas	>200
13	Corazón de Jesús (liana)	Tallo y raíz	>200
14	Manzano silvestre	Corteza	>200
15	Patujusillo tallo	Tallo	150.83 ± 4.47
16	Patujusillo	Raíz	174.6 ±9.89
17	Picantillo jengibre	Raíz	64.89 ±11.45
18	Ribaribay	Planta entera	>200
19	Toronjil	Hojas	>200
20	Toronjil	Tallo	>200
21	Toronjil	Inflorescencia	>200
22	Toronjil	Raíz	175.4 ±3.11
23	Vira vira	Tallo	>200
24	Vira vira	Raíz	>200
25	Yondilla	Hojas	144.05 ±12.43
26	Yondilla	Tallo	185.3 ±12.72
27	Yondilla	Raíz	188.9 ±9.61
28	Metronidazol*		0.302 ± 0.072
29	Tinidazol*		0.190 ± 0.018
30	CAT**		53.62 ± 9.56

**Tabla 8.** IC<sub>50</sub> de fracciones de extractos vegetales diferentes al género *Triplaris* donde se observa que las fracciones de raíz de Chuchuhuasi y Picantillo tienen una IC<sub>50</sub> menor a 100 µg/mL. Resultados obtenidos por el programa Gen5

\*Antiparasitario convencional utilizado como control positivo

\*\*Control antiparasitario natural

## 7.8 Identificación molecular

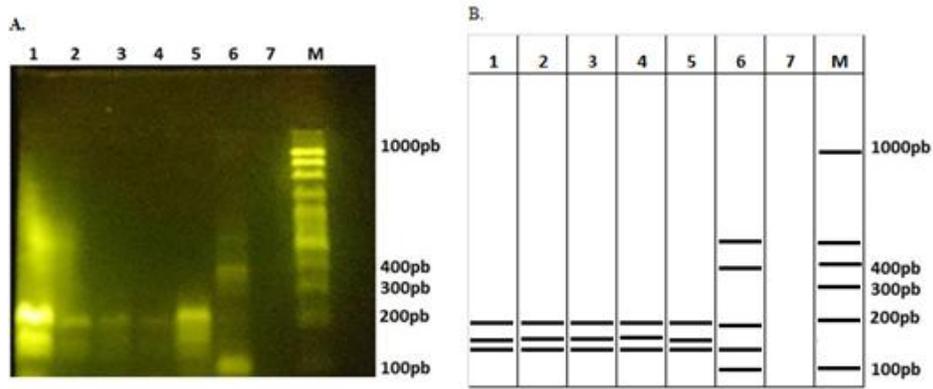
Los productos amplificados se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% revelados con SybrGreen (Invitrogen) como se observa en la figura 18.



**Figura 18.** Gel de agarosa al 2% teñido con SybrGreen, muestra bandas amplificadas de 1: trofozoitos de cultivo; 2, 3, 4 y 5: muestras de quistes; 6: muestra de *Leishmania*; 7: Control de corrida blanco; M: marcador de peso molecular. Se usaron cebadores G7 y G759 para amplificar gen *beta giardina* (753pb).

Los amplicones fueron digeridos con la enzima de restricción *HaeIII* (para el fragmento de 753 pb) utilizando 0,2 U de la enzima en un volumen final de 20  $\mu$ l durante una hora a 37°C, posteriormente fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% y se revelaron de igual manera, los perfiles de restricción permitieron discriminar los genotipos. Se han descrito ocho genotipos de *G. lamblia*, del A al H. Los genotipos A y B se han aislado de humanos y algunos mamíferos. En nuestro trabajo, las muestras de quistes de pacientes de nuestro medio, mostraron que todas eran del genotipo A como se observa en la figura 19.

### Amplicones digeridos con *Hae*III.



**Figura 19.** Gel de agarosa al 2% teñido con Sybrgreen muestra los fragmentos de restricción del producto de 753 pb del gen de la *beta giardina* con la enzima de restricción *Hae* III.

- A. 1: Trofozoitos de cultivo (genotipo A: 200, 150, 130 pb); 2: M22 (genotipo A: 200, 150, 130 pb) 3: M27 (genotipo A: 200, 150, 130 pb); 4: M40 (genotipo A: 200, 150, 130 pb); 5: M80 (genotipo A: 200, 150, 130 pb); 6: *T. cruzi* 7: control de corrida blanco, M: marcador de peso molecular de 100 pb. B. Diagrama en que se reproducen los fragmentos apreciados en la corrida electroforética

La cepa de *G. lamblia* cedida por la Universidad Complutense de Madrid, España, correspondió al genotipo A de acuerdo con el perfil de restricción descrito por Cacciò, *et al.*2002.

Genotipo	Tamaño del Fragmento del gen amplificado	Enzima (numero de sitios de restriccion)	Tamaño de los fragmentos esperados (pb)	Perfil de las bandas para el diagnostico de los genotipos (pb)
A	Beta giardina	<i>Hae</i> III (4)	202, 201, 150, 126, 74	200, 200, 150, 130
B	Beta giardina	<i>Hae</i> III (5)	202, 176, 150, 117, 84, 24	200, 180, 150, 120, 80
C	Beta giardina	<i>Hae</i> III (6)	286, 150, 126, 102, 70, 15,4	290, 150, 130, 100, 70
D	Beta giardina	<i>Hae</i> III (3)	346, 286, 117, 4	350, 290, 120

**Tabla 9.** Tamaño de los fragmentos esperados (pb) y perfil de bandas para diagnostico (pb) de los genotipos de *G. lamblia* sometidos a PRC –RFLP a partir de un fragmento de 753 pb del gen de la beta giardina digerido con *Hae* III.

El tamaño de los fragmentos de restricción esperados se muestra en la tabla 9. Se designó un perfil de diagnóstico para cada enzima redondeando el tamaño de los fragmentos para simplificar el análisis de los geles. Los fragmentos de menos de 50 pb no se incluyeron, dado que no migran fuera del gel y porque los genotipos se pueden distinguir sin necesidad de analizar las bandas de menos de 50 pb, según los reportes de Cacciò, et al. 2002; Lebbad, et al., 2008.

## 8. DISCUSION

Existen estudios que indican el aumento de la resistencia por parte de *Giardia lamblia* a los medicamentos convencionales (Ortega & Adam 1997; Gardner & Hill 2001; Upcroft & Upcroft, 2001), además que estas enfermedades parasitarias son un problema de salud pública en todo el mundo por lo que el estudio de la sensibilidad a extractos de plantas alternativos a la medicina convencional es necesario para el desarrollo de nuevas sustancias, agentes o entidades químicas antiparasitarias que tengan un mínimo de efectos adversos.

Hacer la curva de crecimiento permitió conocer el comportamiento de división parasitaria y comparar los resultados de adaptación parasitaria al medio de cultivo frente a datos obtenidos en otros trabajos. Karapetyan en 1963 cultivando *G. lamblia* en un medio de cultivo compuesto de suero humano, tripticasa, extracto de embrión de pollo y solución de Hank, señaló que el máximo de crecimiento se conseguía en los días 5, 6 y 7; mientras que Gonzales et al en 1986, utilizaron medio HLELSB y TC-199 para realizar una curva de crecimiento de *G. lamblia* teniendo los mayores crecimientos durante los días 4, 5 y 6 indicando un descenso del crecimiento en los días sucesivos. El hallazgo en nuestro trabajo fue similar al de ambos autores ya que el máximo de crecimiento fueron los días 5, 6 y 7 (Fig. 14).

Respecto a la estandarización, nuestros resultados muestran una respuesta lineal de la fluorescencia al incremento del número de parásitos. La concentración parasitaria

donde la fluorescencia tuvo valores significativos fue  $7.5 \times 10^5$  trofozoitos/mL, por lo tanto se estableció esta concentración para el trabajo. Se observó que la concentración de resazurina 4mM daba mayor fluorescencia y para obtener la  $IC_{50}$  de los medicamentos convencionales y extractos vegetales sería necesario leer la fluorescencia emitida por la mitad de la población parasitaria sobreviviente, los resultados indicaban que la fluorescencia emitida con resazurina 4mM de dicha mitad, daba datos que podrían ser considerados como parámetros positivos, lo que no permitiría hacer una discriminación al momento de obtener la  $IC_{50}$ , ya que los datos obtenidos seguirían siendo elevados, además la mejor correlación lineal ( $R = 0.9$ ) se dio con la concentración de 2mM por lo que utilizamos esta última para realizar el trabajo.

Se descartaron las concentraciones menores a 2mM de resazurina debido a que los resultados muestran una baja emisión de fluorescencia por parte de estas, como se puede ver en la figura 15.

Si bien existen trabajos donde utilizan concentraciones bajas de trofozoitos  $2 \times 10^4$  trofozoitos/mL (Barrón, 2012),  $5 \times 10^4$  trofozoitos/mL (Cedillo – Rivera, 1992) estas no serían significativas para determinar cambios de población buscados ya que no mostrarían rangos URF significativos; según Arguello-García et al., 2004, trabajó con poblaciones de alrededor de  $1 \times 10^6$  trofozoitos/mL y (Ponce - Macotela et al., 2006)  $1,5 \times 10^6$  trofozoitos/mL con estas concentraciones en nuestro caso, tampoco podríamos trabajar ya que producirían saturación en la emisión de fluorescencia.

Por otro lado, en base a los resultados obtenidos de población parasitaria y concentración de resazurina se determinó el tiempo de incubación (figura 16), pudiendo observar un buen coeficiente de correlación lineal ( $R=0,96$ ) a 2 mM y 4 horas de incubación.

Mediante estos parámetros se confirmó la eficacia antiparasitaria *in vitro* de varios compuestos usados para el tratamiento de esta enfermedad obteniendo resultados de  $IC_{50}$  de albendazol ( $0.021 \pm 0.002 \mu\text{g/mL}$ ), metronidazol ( $0.354 \pm 0.058 \mu\text{g/mL}$ ), tinidazol ( $0.161 \pm 0.085 \mu\text{g/mL}$ ), mebendazol ( $0.012 \pm 0.0028 \mu\text{g/mL}$ ) acercándose nuestros resultados a resultados obtenidos anteriormente por estudios de susceptibilidad. (Cedillo-Rivera, 1992; Gadelha 2005; Calzada et al., 2003) permitiéndonos confirmar la validez de la técnica, verificando que la mejor respuesta está dada por el albendazol y mebendazol frente a trofozoitos de *G. lamblia*.

En el trabajo utilizamos CAT como control antiparasitario natural ya que según la farmacopea tradicional, se utiliza esta planta como vermífugo, antiemético, amebicida y en el tratamiento de diarreas causadas por otros parásitos intestinales (Bourdy et al., 2000). Existen estudios que demuestran que el extracto de esta planta es efectiva frente a protozoarios como *Acanthamoeba castellani* y *A. polyfaga* reportando una  $IC_{50}$  de  $12.01 \mu\text{g/mL}$  y  $27.34 \mu\text{g/mL}$  respectivamente (Salamanca 2008). En el proyecto Desparasitación de Niños en Escuelas Rurales I y II (Giménez et al., 2009- 2014) muestra una disminución de la población infantil infectada con *G. lamblia* de 35% en

niños tratados con extracto de *Galipea longiflora*, en un margen de 2 años (2010 - 2012). De la manera esperada confirmamos en el trabajo que CAT tienen efecto anti-giardiasico dando una concentración inhibitoria media de  $57.3 \pm 7.0 \mu\text{g/mL}$  como se observa en la tabla 7.

La estandarización de este método fluorométrico permite que sea una herramienta sensible y cuantitativa de evaluación, no solo de drogas antiparasitarias sino que además sirve para iniciar la búsqueda de una bioprospección de plantas medicinales en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, demostrando que la determinación de fluorescencia emitida por la resazurina es un método rápido, sensible, confiable para realizar pruebas de tamizaje a diferentes productos que se quieran probar de manera *in vitro* contra trofozoitos de *G. lamblia*.

En el estudio se evaluó la actividad anti-giardiasica de extractos de 2 plantas del género *Triplaris*, utilizados para el tratamiento de diarrea por la comunidad indígena Tacana, reportamos la actividad anti-giardiasica de las distintas fracciones de los extractos, obteniendo resultados mayores a  $100 \mu\text{g/mL}$  en las fracciones y subfracciones de *T. poeppigiana*, mientras que en el caso de *T. americana*, solamente una de las fracciones, And3, presenta una actividad antiparasitaria con una  $\text{IC}_{50}$  de  $73.3 \mu\text{g/mL}$ , siendo las demás fracciones similares a las de *T. poeppigiana*, en las cuales no se observan resultados que puedan tener un efecto antiparasitario *in vitro* con concentraciones menores a  $100 \mu\text{g/mL}$ .

Existen muy pocos trabajos publicados acerca del estudio antiparasitario de plantas del genero *Triplaris*, Inocente 2009, habla de compuestos fenolicos de *Triplaris americana*, los taninos y flavonoides, quien en su trabajo evaluó la actividad antioxidante del extracto hidroalcoholico, obteniendo una IC<sub>50</sub> de 9.54 µg/mL así mismo indico que extractos de la corteza de *Triplaris americana* tenían actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* utilizando concentraciones de 600 µg/disco, 800 µg/disco y 1 mg/disco, demostrando que hubo inhibición del crecimiento menores al 20% que no son niveles significativos. También existen estudios los cuales destacan que *Triplaris americana* presenta actividad antimalárica contra una cepa de *Plasmodium falciparum* resistente a la cloroquina *in vivo* en roedores infectados con *Plasmodium vinckei petteri* 279. (Desmarchelier Alonso, 2005; Mostacero et al., 2002).

En lo que respecta al tratamiento natural o uso de extractos de plantas contra *G. lamblia*, Mc allister et al. 2005, con el uso de extractos con acetona, cloroformo y butanol de *Yucca schidigera* demuestra en experimentos *in vitro* que la concentración del extracto requerida para disminuir la adherencia de trofozoitos un 50% es de 62, 135 y 250 µg/mL respectivamente, definiendo que el mejor resultado fue con el extracto de acetona, 62 µg/mL. En nuestro trabajo la fracción And3 es obtenida con diclorometano, en el trabajo de Mc allister el solvente cuya composición y propiedades químicas son similares, es el cloroformo, pudiendo comparar nuestros resultados de 73.3 ±10 µg/mL

con el de 135  $\mu\text{g}/\text{mL}$  confirmando que nuestro extracto tiene mayor efectividad antiparasitaria que otros.

Una publicación de Harris et al. 2000, demuestra que el extracto del ajo completo presenta efectos inhibitorios sobre *G. lamblia* con  $\text{IC}_{50}$  de 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 3 veces mayor al que presentan las fracciones de *Triplaris*. Gadhella et al., 2005, demuestra en su estudio con *Hovenia dulcis* una  $\text{IC}_{50}$  de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , reportando un mejor resultado de la fracción extraída con clorometano a 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Brandelli et al., 2009 reporta datos de *Achyrocline satureioides* capaces de inhibir 47% de población parasitaria de trofozoitos de *G. lamblia* a una concentración de 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mayores a los que presenta la fracción And3 de *T. americana*. Estos resultados permiten pensar en la presencia de un principio activo con efecto antiparasitario sobre *G. lamblia*.

Comparando los datos podríamos concluir que la  $\text{IC}_{50}$  obtenido en nuestro trabajo puede ser considerada más efectiva que los extractos de otras plantas, los cuales pueden ser empleados a futuro para el desarrollo de investigaciones en el ámbito de la farmacología, ofreciendo una opción alternativa de origen natural para el tratamiento de la giardiasis sin que presente efectos adversos indeseables.

Estos resultados revelan información importante para tener en cuenta al examinar las técnicas biodirigidas para identificar los compuestos responsables de la actividad en los extractos de estas especies vegetales.

Ante los resultados obtenidos de *Triplaris* se evaluaron otras plantas de la farmacopea Tacana como se muestran en la tabla 8, sin embargo de los 27 extractos etanólicos de plantas de la farmacopea Tacana evaluados, se vio que 14 extractos (52%) no presentaban actividad antiparasitaria, obteniéndose un  $IC_{50}$  mayor a 200  $\mu\text{g/ml}$ , 8 extractos (30%) presentaron valores de  $IC_{50}$  entre 150 y 200  $\mu\text{g/ml}$ , 3 extractos (11%) presentaron valores entre 100 y 150  $\mu\text{g/ml}$  y 2 extractos (7%) Jengibre (*Zingiber officinale*) y la raíz de Chuchuhuasi (*Maytenus laevis*), con valores entre 50 y 100  $\mu\text{g/ml}$ , demostrando la utilidad del método estandarizado.

Los resultados obtenidos con extractos de Jengibre (*Zingiber officinale*) y de la raíz de Chuchuhuasi (*Maytenus laevis*) muestran la mayor actividad anti-giardiasica con una  $IC_{50}$  de 64.89 y 67.77  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.

Se hicieron estudios sobre *Zingiber officinale* frente a *G. lamblia* *in vivo* en ratones. Mahmoud et al, 2014, confirma el efecto antiparasitario de extractos de dicha planta a dosis de 10 y 20mg/kg/día por 7 días, evaluando los quistes presentes en las heces, el recuento intestinal de trofozoitos, revisando la histopatología y haciendo exámenes microscópicos de la mucosa intestinal, se encontró una disminución en las lesiones e infección parasitaria.

*Zingiber officinale* es una planta medicinal que se ha utilizado ampliamente en diferentes culturas alrededor del mundo, las principales acciones farmacológicas del jengibre y sus compuestos aislados incluyen acciones de inmunomodulación,

antiinflamatorias, anti apoptoticas, antihiperglicemiantes, antilipidémicas y antieméticas. También es conocido por ser un buen antioxidante pudiendo mitigar o prevenir la generación de radicales libres (Bradeldin et al., 2007).

Por otra parte, *Maytenus laevis* conocida en los pueblos Tacana como Chuchuhuasi, pertenece a la familia *Celastraceae*, estudios relacionados a los géneros de esta familia presentan varias aplicaciones biológicas, entre ellas actividad antioxidante, algunas especies sirven para tratar infecciones e inflamaciones, otras muestran actividad analgésica y antiulcerosa, al mismo tiempo que reportan actividad antiplasmodica (Fonseca et al., 2009; Estevam et al., 2009).

Otros estudios demuestran que el género *Maytenus* presenta actividad antimicrobiana *in vitro* contra *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y el hongo *Candida albicans* (Rodrigues et al., 2012).

Alvares et al. el 2014 demuestra que el género *Maytenus imbricata* posee actividad contra *Trichomona vaginalis* con una  $IC_{50}$  mayor a 34  $\mu\text{g/mL}$  y menor a 68  $\mu\text{g/mL}$ , tomando en cuenta que *T. vaginalis* es un protozooario al igual que *G. lamblia*, los resultados se asemejan pero se deberían estudiar con mayor profundidad ya que con los resultados obtenidos de los productos vemos que son un área prometedora para el descubrimiento en la innovación de sustancias bioactivas.

Se han descrito ocho genotipos de *G. lamblia*, del A al H. Los genotipos A y B han sido aislados de humanos y algunos mamíferos. La cepa de *G. lamblia* cedida por la Universidad Complutense de Madrid, España, correspondió al genotipo A de acuerdo con el perfil de restricción descrito por Cacciò, *et al.*2002, descrito en la tabla 9.

El DNA de los quistes aislados de muestras de pacientes también pertenece al perfil del genotipo A. En Bolivia no existen estudios de prevalencia de giardiasis, pero la persistencia del parásito está relacionada con las condiciones higiénicas y el manejo inocuo de alimentos.

## 9. CONCLUSIONES.

- Se determinó la Concentración Inhibitoria Media de albendazol, mebendazol, metronidazol y tinidazol, drogas utilizadas para el tratamiento de giardiasis, las cuales nos permitieron validar la técnica fluorométrica estandarizada con resazurina; los datos obtenidos son similares al de varios autores, permitiéndonos constatar la técnica.
- Se determinó la IC<sub>50</sub> de las fracciones y subfracciones obtenidas de los extractos crudos de las plantas en estudio, obteniéndose 10 subfracciones de *Triplaris poeppigiana* y de *Triplaris americana*. La IC<sub>50</sub> de los productos a determinar no presentaron actividad antiparasitaria hasta 100 µg/mL, sin embargo la subfracción And3 del *T. americana*, dio una IC<sub>50</sub> menor a 100 µg/mL, con un resultado muy similar a CAT, haciéndonos pensar que esta fracción de *Triplaris* presenta una actividad antiparasitaria, ya que CAT se ha utilizado anteriormente como antiparasitario teniendo buenos resultados.
- Los resultados de esta evaluación a las fracciones de los extractos vegetales pertenecientes a la medicina tradicional Tacana permitirán, que la comunidad Tacana discrimine entre familias de plantas con actividad antiparasitaria *in vitro* de aquellas que no presentan dicha propiedad frente a posibles parásitos causantes de diarrea. Así mismo éste es un primer reporte que demuestra la eficiencia de Chuchuhuasi (*Maytenus laevis*) y Jengibre (*Zingiber officinale*)

contra un protozoo patógeno anaerobio facultativo, lo cual nos hace pensar que también tiene actividad contra otros parásitos gastrointestinales.

- Se estandarizó el método fluorométrico por oxidación-reducción de la resazurina *in vitro* que permitirá determinar estudios de susceptibilidad de *Giardia lamblia* frente a diferentes drogas, productos sintéticos, semisintéticos o naturales como indicador directo de la supervivencia parasitaria. El estudio nos ayudó en la determinación de IC<sub>50</sub> de especímenes vegetales de la Farmacopea Tacana *Triplaris americana*, *Triplaris poeppigiana* y otras plantas teniendo buenos resultados con raíces de Chuchuhuasi (*Maytenus laevis*) y Jengibre (*Zingiber officinale*) en el I.I.F.B

## **10. RECOMENDACIONES.**

- Un estudio de citotoxicidad de los extractos de plantas que mostraron mejor actividad antiparasitaria para entender de mejor manera si estas, como tratamiento antiparasitario natural son o no dañinas para el organismo.
- La axenización de quistes y obtención de una población parasitaria que permita trabajar con los extractos de plantas que mostraron mejor actividad antiparasitaria.
- La genotipificación parasitaria de muestras de pobladores infectados, ayudaría no solo en la determinación de un tratamiento específico, sino además de la instauración de políticas de salud en la comunidad para una convivencia mejor con los animales.

## 11. GLOSARIO

**Farmacopea** Se refiere a libros recopilatorios de recetas de productos con propiedades medicinales reales o supuestas, en los que se incluyen elementos de su composición y modo de preparación editados.

**Validación** Es la acción y efecto de validar, hace referencia a aquello que tiene un peso legal o que es rígido y subsistente.

**TYIS-33:** Trypticase-Yeast Extract-Iron-Serum, con sus siglas en ingles, medio utilizado inicialmente para cultivos axenicos de *Entamoeba gingivalis*, *Giardia lamblia*, etc.

**Fluorometría:** Medida de la fluorescencia que emiten los compuestos cuando se exponen a la energía ultravioleta u otras energías radiantes intensas.

**Bioprospección:** Es la búsqueda de información a partir de especies biológicas para su uso posterior en procesos de producción en diversos sectores.

**Axenización:** Proceso de aislamiento de un organismo en particular.

**Susceptibilidad:** probabilidad de producir una respuesta significativamente superior a la medida a una exposición específica a una sustancia.

## 12. BIBLIOGRAFIA

- Adam RD. (2001). The biology of *Giardia* spp. *Microbiol Rev.* (55) 706-32.
- Aguinaldo A, Dalangin-Mallari V, Macabeo A, Linsay T, Fumiko A, Tatsuo Y, Scott G. (2007). Quinoline alkaloids from *Lunasiaamara* inhibit *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv *in vitro*. *Antimicrobial Agents J* (29): 738-748.
- Ahmed SA, Gogal RM, Jr, Walsh JE. (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods.*;170:211–24
- Ajllahuanca C., Aguilar Valdez, J.R ; Alcon Luna, D. R. ; Alcon Luna, F. ; Alcon Mayta, P. ; Calla Arnez, E.J. (2008). "Prevalencia de parásitos intestinales en niños y adolescentes pertenecientes a la iglesia luterana getzemani de la zona Tilata.
- Alcaraz Soriano MJ. (2009) *Giardia* y giardiosis. *Sociedad Española de Inmunología y Microbiología Clínica Rev.*
- Ali V, Nozaki T. (2007). Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by “Amitochondriate” protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev* 20:164–187
- Almeida, I., Alviano, D., Vieira, D., Alves, P., Blank,A., Lopes, A., Alviano,C., Rosa,C.(2007). Antigiardial activity of *Ocimum basilicum* essential oil. *Parasitol Res*, 101,443-452.
- Alparo I., (2005). Giardiasis y desnutrición. *Bol.ped.* 44(3), 163-173.
- Álvares C., FonsecaT. , Rodrigues V. , Sousa G., Chacon M , Vieira S , Duarte L. y Gomes M, (2014) Trichomonocidal activity of *Maytenus imbricata* (Celastraceae) *African Journal of Pharmacy and Pharmacology Full Length Research Paper* 8(19), 502-506
- Anoopkumar-Dukie, S. (2005). Resazurin assay of radiation response in cultured cells *Br J Radiol* (78) 945-7.
- Arguello-García R., Cruz-Soto M., Romero-Montoya L. y Ortega-Pierres G. (2004). Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles *in vitro*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (54), 711-721
- Atias, A., (1998), *Parasitología Médica*. Chile: Mediterráneo.
- Barrientos Galarza PO, Torrico MC, Suárez Barrientos E, (2008) Detección de *Cryptosporidium spp* y *Giardia larnblia* en niños inmunodeprimidos del Hospital del niño Ascencio Villarroel de Cochabamba en agosto de 2007. *Gaceta Médica Boliviana*.

- Barrón González M., (2012). Inhibición del crecimiento de *Giardia lamblia* por acción del extracto acuoso y metanólico de semillas de *Curcubita pepo*. Rev. Iberoamericana para la investigación del Desarrollo Educativo. (9). 1-17.
- Becerril, A. (2011). Parasitología Médica. Tercera Edición,(42), 333-344.
- Bernander, R., Palm, J., & Svärd, S. (2001). Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. Cell Microbiol, 3 (1), 55 - 62
- Botero David. Restrepo M.(1998) Conceptos generales sobre parasitosis humana. Medellin colombia.(3) 150-158, .64-7.
- Bourdy, G., Giménez, A., Quenevo, C. (1999). Tacana: Ecuánasha aquí, ecuanashaid'renecua, me schanapaque (Tacana: Conozcan nuestros árboles, nuestras hierbas).UMSA: IIFB-IIQ-IBBA; FONAMA-EIA; IRD. Plural. La Paz, Bolivia, 28-31.
- Bourdy G, De Walt S J, Chavez de Michel LR., Roca A, Deharo E, Muñoz V. (2000). Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. Ethnopharmacology J (70): 87-109.
- Bowling T., Don,R., Jacobs R., Nare B. (2012). Application of a resazurin-based high-throughput screening assay for the identification and progression of new treatments for human African trypanosomiasis Int J Parasitol Drugs Drug Resist; 2: 262–270.
- Bradreldin H. Ali<sup>a</sup>, G. Blunden<sup>b</sup>, Musbah T, Abderrahim N. (2007). Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research in vitro anti-giardial activity of plants used in the treatment of diarrhea. Parasitol Res, 104, 1345-1349
- Brandelli, C., Giordani,R., Carli, G., Tasca, T. (2009).Indigenous traditional medicine:
- Brodsky, R. E., H. C. Spencer, Jr., and M. G. Schultz. (1974). Giardiasis in American travelers to the Soviet Union. J. Infect. Dis. 130:319-323
- Bueno, N., Castilho, R., Costa, R., Pott, A., Pott, V., Scheidt, G., Batista, M. (2005). Medicinal plants used by the Kaiowá and Guarani indigenous populations in the Caarapó Reserve, MatoGrosso do Sul, Brazil. Acta Bot Bras, 19, 9–44
- Busatti H., Vieira A., Viana J., Silva H., Souza-Fagundes E., Martins O., Alves R. y Gomes M. (2007). Effect of metronidazole analogues on *Giardia lamblia* cultures, Parasitol Res. 102, 145-149.
- Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E. (2002). Sequence analysis of the *beta-giardin* gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. Int J Parasitol.;32:1023-30.
- Calamani, C. (2006). Frecuencia de parásitos intestinales en escolares comprendidos entre los 5 a12 años de edad de la unidad educativa 16 de Noviembre de la ciudad de El Alto mayo- Agosto 2006. Tesis de Licenciatura

- Calzada F, Cerda García C., Mecks M., Cedillo Riveravera R., Mata R. (1999). *Geranins A and B new antiprotozoal A type proanthocyanidins from Geranium niveum*. *J. Nat. Prod.* 1999 (62), 705 – 709.
- Calzada F, Velázquez C, Cedillo-Rivera R, Esquivel B (2003) Antiprotozoal activity of the constituents of *Teloxys graveolens*. *Phytother Res* 17: 731-732
- Campos B, Fracasso M, Clasen BK, Ticona JC, Gimenez A, Cechinel-Filho V. (2010). Evaluation of antinociceptive effects of *Galipea longiflora* alkaloid extract and major alkaloid 2-fenilquinoline. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* (10): 707- 711.
- Cedillo – Rivera R. y Muñoz O. (1992). *In vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *J Med. Microbiol.* 37. 221-224.
- Condori S., (2008). Frecuencia de *Giardia lamblia* en niños de 0 – 15 años de edad que acuden al Hospital La Paz durante los meses de junio- agosto 2007. 1.
- Costa Brandelli C., Brandt R., Attilio G., Tasca T. (2009). Indigenous traditional medicine: *In vitro* anti-giardial activity of plants used in the treatment of diarrhea. *Parasitol Res* 2009 (104), 1345-1349.
- Davidson R. A. (1984) Issues in clinical parasitology: the treatment of giardiasis. *Am. J. Gastroenterol.* 79:256–261
- Díaz De la Guardia, R. (2006). Aislamiento y caracterización de proteínas capaces de ligar ácidos grasos en *Giardia lamblia*: Tesis Doctoral Universidad de la Granada, España.14-17.
- Desmarchelier, C.; Alonso, J. (2005) Plantas Medicinales para la atención primaria en la salud. *Vademécum de Fitoterapia – 2005*. PRODAPP. Lima.
- Echevarria, A., Torres, D.(2001)Efecto de un Extracto de *Petiveria alliacealin* sobre el crecimiento de *Giardia lamblia in vitro*, *Cubana deMed Milit*,30,161-165.
- Erb, R.E., Ehleks, M.H. (1950). Resazurin Reducing Time as an Indicator of Bovine Semen Fertilizing Capacity. *J. Dairy Sci.* 33:853–864
- Escribano, A., Marcel, A., Tugores, Y., Ruiz, J., Redo, V., Garcia-Trevijano, J., Barrio, A. (2012).Validation of a modified fluorimetric assay for the screening of trichomonacidal drugs MemInst Oswaldo Cruz,107,637-643.
- Estevam CS, Cavalcanti AM, Cambui EVF, Araújo Neto V, Leopoldo PTG, Fernandes RPM, Araujo BS, Porfírio Z, Sant'Ana AEG (2009). Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rigida*Mart. (Celastraceae). *Rev Bras Farmacogn* 19: 299-303
- Fonseca AM, Bizerra AMC, Souza JSN, Monte FJQ, Oliveira MCF, Mattos MC, Cordel GA, Braz-Filho R, Lemos TLG (2009). Constituents and antioxidant activity of two varieties of coconut water (*Cocos nucifera* L.). *Rev Bras Farmacogn* 19: 193-198.

- Gadelha A.P.R., Vidal F., Castro T., Lopes C.S., Albarello N., Coelho MGP. YCeU Figueiredo SFL. (2005). Susceptibility of *Giardia lamblia* to *Hovenia dulcis* extracts, *Parasitol Res* (97), 399-407.
- Gardner TB, Hill DR. (2001). Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev*; 14 (1):114-28.
- Gillin, F. D., D. S. Reiner, and J. M. McCaffery. (1996). Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:679-705.
- Giménez Turba Alberto, Responsable. Proyecto IDH-2009-2014, Desparasitación de niños de Escuelas Rurales I-II, La Paz, Bolivia.
- González Castro, J., Bermejo Vicedo, M. T y Palacios González, F. (1986). Desenquistamiento y cultivo de *Giardia muris*. *Rev Ibérica de Parasitología*, 46 (1),21-25
- Gonzalez RJ, Tarloff JB. (2001). Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicol In Vitro.* ;15:257-9
- Gutierrez, V., Gonzáles, A., Garcia, M., Romero, C. (2008). Giardiasis resistente a metronidazol: a propósito de un caso. *Revista pediátrica de atención primaria*,38,261-266.
- Hahn, J., Seeber, F., Kolodziej, H., Ralf, I., Laue, M., Aebischer, T., Klotz, C. (2013). High Sensitivity of *Giardia duodenalis* to Tetrahydrolipstatin (Orlistat) *In Vitro*,8,1-10
- Harris, J., Plummer, S., Turner, M., Lloyd, D. (2000). The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: *Allium sativum* (garlic) is an effective anti-giardial. *Microbiology*, 146, 3119-3127.
- Heresi G, Cleary TG. (1997) *Giardia*. *Pediatr in Rev*;18:243-249
- Hetsko, M., McCaffery, J., Svärd, S., Meng, T., Que, X., & Gillin, F. (1998). Cellular and transcriptional changes during excystation of *Giardia lamblia* in vitro. *Exp Parasitol*, 88 (3), 172 – 83.
- Ibáñez A. Meneses A., Machado Y., Nogal JJ., Arán VJ., Escario G, Gómez A. (2012). Validation of a modified fluorimetric assay for the screening of trichomonacidal drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 107(5): 637-643
- Ings PMG, Edson CM, Farthing MJG. (1988). Attachment of *Giardia lamblia* to rat intestinal epithelial cells. *Gut* ;29:795-801
- Inocente , 2009 Actividad antioxidante y antimicrobiana de los compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de la corteza de *Triplaris americana* L. (Tangarana colorada).
- Jokipii, L, Jokipii, A.M.M. (1980). In vitro susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites to metronidazoles and tinidazole. *J. Infect. Dis.* (141) 317-325.
- Karapetyan A.E. (1963). Determination of growth rate of *Lamblia intestinalis* cultivation in vivo, *Acta Protozool*, 1:321-326.

- Kulshrestha A, Singh R, Kumar D, Negi NS, Salotra P. (2013). Antimony-resistant clinical isolates of *Leishmania donovani* are susceptible to paromomycin and sitamaquine. *Antimicrob Agents Chemother.*;55:2916–2921
- Lebbad M, Ankarklev J, Téllez A, Leiva B, Andersson JO, Svärd S. (2008). Dominance of *Giardia* assemblage B in León, Nicaragua. *Acta Trop.*;106:44-53
- Ljungström I, Castor B. (1992). Immune response to *Giardia lamblia* in a waterborne outbreak of giardiasis in Sweden. *J Med Microbiol.* 36:347-352
- Lujan HD, Mowatt MR, Conrad JT, Bowers B, and Nash TE (2009). Increased expression of the molecular chaperone Bip/GRP78 during the differentiation of a primitive eukaryote. *Biol Cell* 86:11-18
- Mahmoud a. 2014 Ginger and Cinnamon: Can This Household Remedy Treat Giardiasis? *Parasitological and Histopathological Studies*
- Makiuchi T, Nozaki T. Highly (2013) Divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. *Biochimie.* (13) 427- 460.
- Marrero-Ponce, Y., Torrens, F., Alvarado, Y.J., Rotondo, R. (2009). Bond-Based Global and Local (Bond, Group and Bond-Type) Quadratic Indices and Their Applications to ComputerAided Molecular Design. 1. QSPR Studies of Diverse Sets of Organic Chemicals. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 20, 685–701
- Martínez - Barrios E. (2011). Prevalencia de Giardiasis en guarderías infantiles de Tiabaya- Arequipa, Perú. *Neotrop. Helminthol., Asociación Peruana de Helminología e Invertebrados Afines (APHIA)*, 5(2), 257-263.
- Martínez, M. (1982). Las parasitosis humanas. *Manual de Parasitología Médica*. México: Prensa Médica Mexicana, PMMSA, (2) 15-23
- McAllister T. A., Olson M E., Fletch A, Wetzstein M, Entz T. (2005). Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in beef cows in southern Ontario and in beef calves in southern British Columbia *The Canadian veterinary journal*, Jan; 46(1): 47–55
- Mostacero, L.; Mejía, F.; Gamarra (2002), O. Taxonomía de las Fanerógamas útiles del Perú. CONCYTEC. Volumen I. Editora Normas Legales S.A.C. Trujillo. 2002.
- Nakayama H, Ferreira ME, Rojas A, Vera Bilbao N, Torres S, (2001). Experimental treatment of chronic *Trypanosoma cruzi* infection in mice with 2-n-propylquinolina. *Phytother Res.* (15): 630-2.
- Nash, T. E., Ohl, C. A., Thomas, E., Subramanian, G., Keiser, P. & Moore, T. A. (2001). Treatment of patients with refractory giardiasis. *Clinical Infectious Diseases* 33, 22–8.
- Newman, D., Cragg, G. (2012). Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Nat Prod*, 75, 311–335.
- Olsen ME, Guselle NJ, O’Handley RM (1977). *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in British Columbia. *Can Vet J.* 38:703–706.

- Organización Mundial de la Salud. (2009). The World Health Report. Changing history. Geneva, WHO.
- Ortega YR, Adam RD. (1997). *Giardia*: overview and update. Clin Infect Dis. ;25(3):545-9.
- Parkin DM, McClelland DB, O'Moore RR, Percy-Robb IW, Grant IW, Shearman DJ. (1972). Intestinal bacterial flora and bile salt studies in hypogammaglobulinaemia. Gut. Mar;13(3):182–188.
- Patiño, B. (2002). Frecuencia de Amebiasis asociada a *Giardia lamblia* en niños comprendidos entre los 2 a 5 años de edad de la guardería Jerusalén de la zona los andes de la ciudad de El Alto durante Julio-Octubre de la gestión 2002, Tesis de Licenciatura
- Perlmutter, D. H., A. M. Leichtner, H. Goldman, H. S. Winter. (1985). Chronic diarrhea associated with hypogammaglobulinemia and enteropathy in infants and children. Dig. Dis. Sci. 30:1149-1155
- Phillips M., García García A., Ellis Yard M. (2010). Evaluación de diferentes regímenes terapéuticos empleados en el tratamiento de la giardiasis en niños. POLICLÍNICO DOCENTE DE GASPAR “MARIO PÁEZ INCHAUSTI” *MedCiego*; 16(2).
- Ponce-Macotela, M.; Peralta-Abarca, G.; Martínez-Gordillo, M. (2006). *Giardia intestinalis* and other zoonotic parasites: prevalence in adults dogs from the southern part of Mexico City. *Vet. Parasitol.*, 131:1-4.
- Prado, M., Cairncross, S., Strina, A., Barreto, M., Oliveira-Assis, A., Rego, S. (2004). Asymptomatic giardiasis and growth in young children; a longitudinal study in Salvador, Brazil. *Parasitology*, 131, 51-56.
- Rada J. Aranda E. (2002). Parasitosis intestinal 1° ed. La Paz – Bolivia p 120-130
- Rani, D. (2011). Plant Extracts with Antiamoebic Properties: A Theoretical Study with reference to *Entamoeba histolytica*. *International Journal of Pharm Tech Research*, 2,1113-1117.
- Romero-Cabello, R., Robert, L., Munoz-Garcia, R. & Tanaka, J. (1995). Randomized study comparing the safety and efficacy of albendazole and metronidazole in the
- Rodrigues VG, Duarte LP, Silva GDF, Silva FC, Góes JV, Takahashi JA, Pimenta LPS (2012). Evaluation of antimicrobial activity and toxic potential of extracts and triterpenes isolated from *Maytenus imbricata*. *Quim. Nova* 35(7):1375-1380
- Salamanca Capusiri Efrain. (2008). Actividad antiparasitaria múltiple de Alcaloides Totales de corteza de *glikea longiflora* krause Kallunki (Evanta). [Tesis de Maestría] UMSA. La Paz-Bolivia.

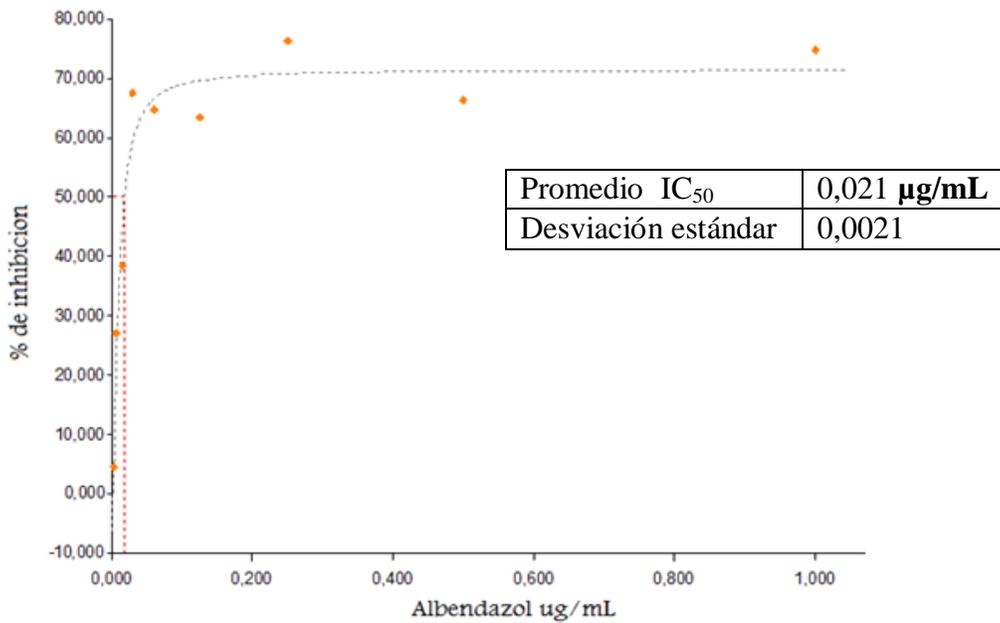
- Savioli L, Smith H, Thompson A (2006) *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. Trends Parasitol; (22)203–208
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. PUB MED; J Natl Cancer Inst. Jul 4;82(13):1107-12
- Sousa, M.C., Morais, J.B., Machado, J.E., Poiaraes-da-Silva, J., 2006, Genotyping of *Giardia lamblia* human isolates from Portugal by PCR-RFLP and sequencing. J eukaryot Microbiol 53 Suppl 1, S174-176
- Sullivan PB, Lunn PG, Northrop-Clewas CA, Farthing MJ (1992). Parasitic infection of the gut and protein losing enteropathy. J Pediatr Gastroenterol Nutr (15):404-7.
- Takahashi M, Katayama Y, Takada H, Hirakawa J, Kuwayama H. (2001). Silent infection of *Giardia lamblia* causing bleeding through vitamin K malabsorption. J of Gastroenterology and Hepatology;16:1171-2
- Taylor GD, Wenman WM. (1987). Human immune response to *Giardia lamblia* infections. *J Infect Dis*;155:137-140.
- Tejman-Yarden, N., Miyamoto, Y., Leitsch, D., Santini, J., Debnath, A., Gut, J., McKerrow, J., Reed, S., Eckmann, L. (2013)..A Reprofiled Drug, Auranofin, Is Effective against Metronidazole-Resistant *Giardia lamblia*, American Society for Microbiology, 57, 2029-2035.
- Thompson RCA. (1990). Genetic variation in *Giardia*, Kunstler 1882: Taxonomic and epidemiological significance. Protozoology abstracts, 14:1–28
- Thompson, A. (2008) Giardiasis: Conceptos modernos sobre su control y tratamiento. Anales Nestlé, 63, 26-29.
- Tian, X., Shen, H., Li, J., Chen, Y., Yang, Z., Lu, S. (2010). The effects of dihydroartemisinin on *Giardia lamblia* morphology and cell cycle in vitro. Parasitol Res, 107, 369-375.
- Tomkins, A. M., S. G. Wright, B. S. Drasar, W. P. T. James. 1978. Bacterial colonization of jejunal mucosa in giardiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72:33-36.
- Touz, M., Nores, M., Slavin, I., Carmona, C., Conrad, J., Mowatt, M., y otros. (2002). The activity of a developmentally regulated cysteine proteinase is required for cyst wall formation in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. J Biol Chem, 277 (10), 8474 - 81
- Tracy, J.W., Catto, B.A., Webster, Jr., L.T. (1991). Formation of N-(5-nitro-2-thiazolyl)- N'-carboxymethylurea from 5-hydroxyniridazole: Role of aldehyde dehydrogenase in the oxidative metabolism of niridazole. Drug Metab. Dispos. 19: 508-515.
- Upcroft, P. & Upcroft, J. A. (2001). Drug targets and mechanisms of resistance In the anaerobic protozoa. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 150–164

- Wright C., Anderson M., Allen D., Phillipson J.D., Kirby G., Warhurst D. Y Chang H. (1993). Quassinoids Exhibit Greater Selectivity Against *Plasmodium Falciparum* Than Against *Entamoeba Histolytica*, *Giardia Intestinalis* Or *Toxoplasma Gondii In Vitro*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 40(3), 244-246.
- Zhang H., Du G., (2004). Assay of mitochondrial functions by resazurin *in vitro*. *Acta Pharmacol Sinica*, 25, 385-389.

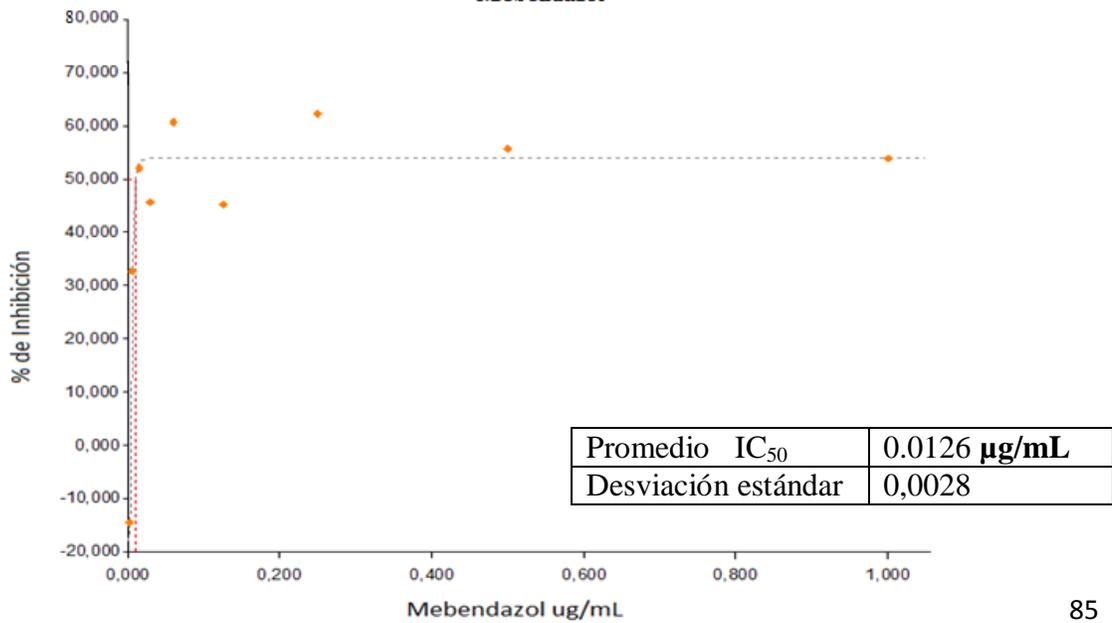
## ANEXO I

### Curvas de IC<sub>50</sub> obtenidas en el programa Gen5 para los medicamentos convencionales

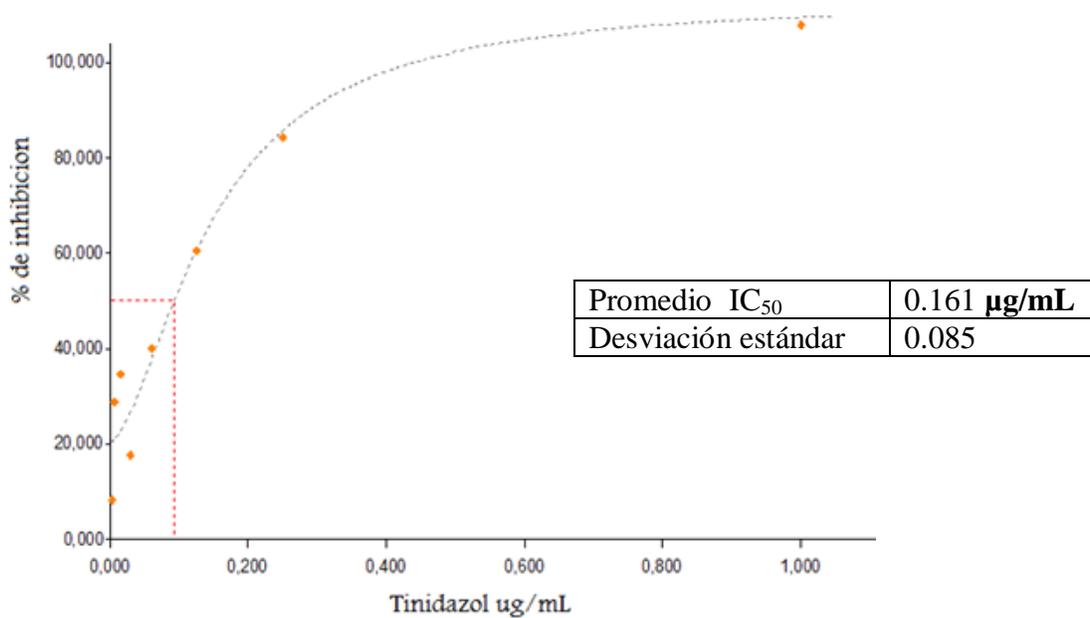
Curva de la Concentración Inhibitoria Media del Albendazol



Curva de Concentración Inhibitoria Media del Mebendazol

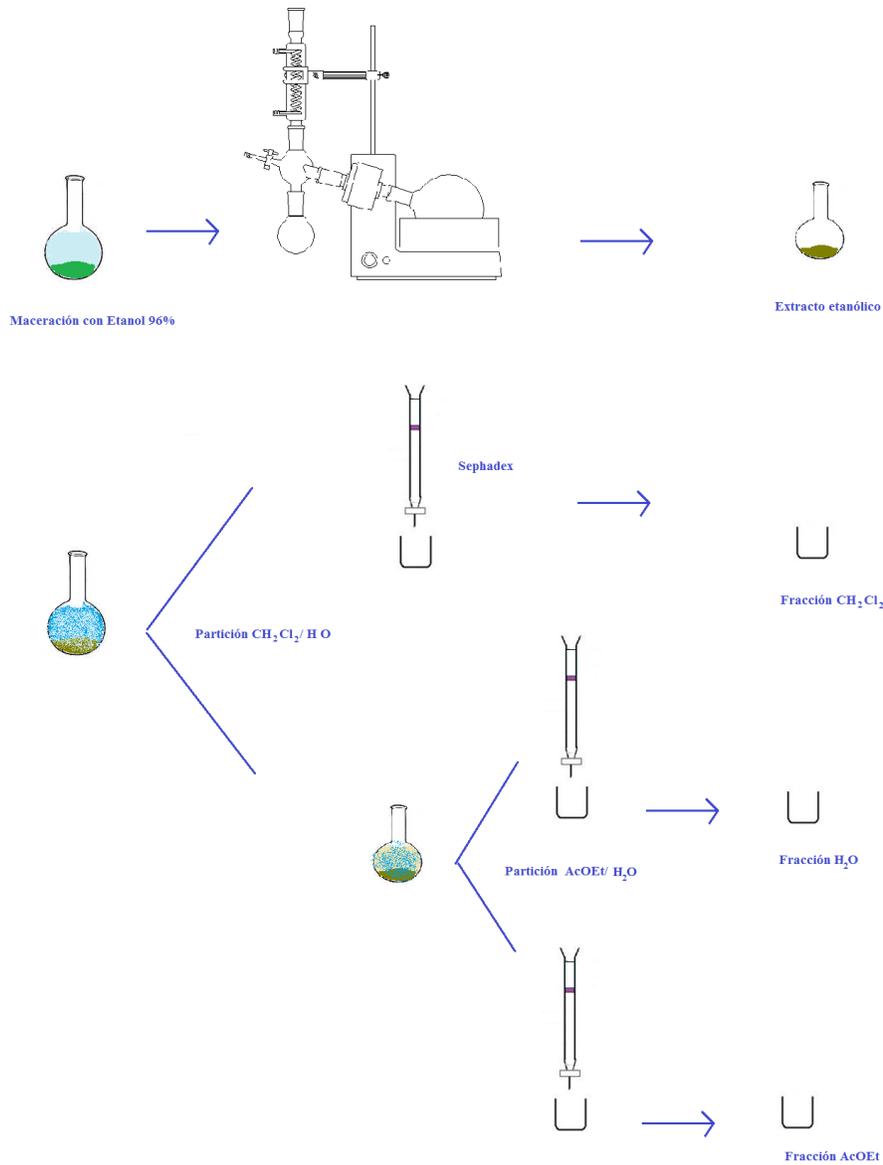


Curva de Concentración Inhibitoria  
Media del Tinidazol



ANEXO II

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS PARA PLANTAS DEL GÉNERO  
*TRIPLARIS*



## ANEXO III

### OBTENCION DE TROFOZOITOS AXENICOS A PARTIR DE QUISTES DE MUESTRAS FECALES

Se intento trabajar con trofozoitos aislados de muestras de heces fecales de personas infectadas previamente diagnosticadas por microscopia. Se realizo el siguiente procedimiento:

#### 1. Recolección de muestras

Las muestras recolectadas fueron heces fecales de niños de la Escuela Rural Charcas II con infección diagnosticados previamente por microscopia, por la técnica de concentración de Richie, en los 2 viajes de campo del proyecto a la comunidad de Charcas II durante los meses de junio y octubre del año 2014.

Una vez comprobada la infección por *Giardia*, por microscopia y la tinción de lugol, la concentración de quistes y purificación se realizo de la siguiente manera:

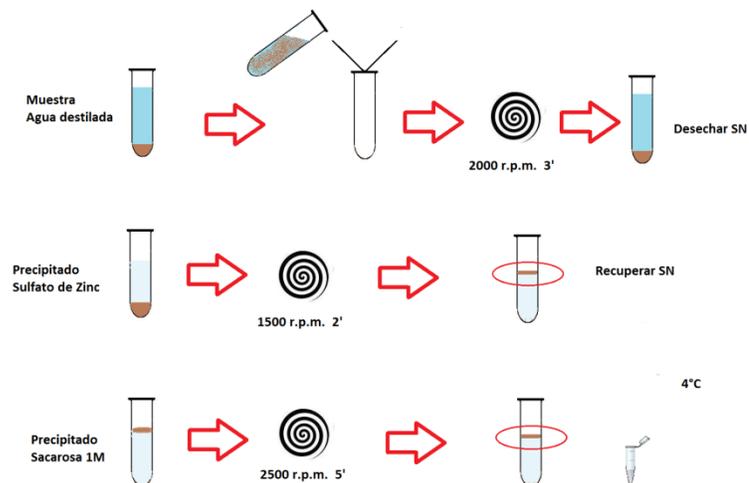
Se hizo una dilución 1/10 de la muestra con agua destilada, homogeneizando y filtrando en 3 capas de gasa, posteriormente se centrifugo el filtrado a 2000 r.p.m. 3 min desechando el sobrenadante, realizando la misma operación hasta que el sobrenadante este claro.

El precipitado se centrifugo en una solución de sulfato de Zinc 1.180 mg/mL de densidad, a 1500 r.p.m. 2 min. recolectando el sobrenadante, donde se encontraban los quistes, centrifugándolo posteriormente en una solución de sacarosa 1M a 2500 r.p.m. 5 min. Para eliminar impurezas y detritus, colectando la interfase agua – sacarosa y lavando lo obtenido en solución fisiológica.

Durante el proceso de concentración se utilizo soluciones combinadas de antibióticos y anti fúngicos para eliminar contaminantes de las muestras. Haciendo una batería de los siguientes antimicrobianos:

Ciprofloxacina 10mg/mL
Cloranfenicol 5mg/mL
Trimetoprim/sulfametoxazol 20/80mg/mL
Nistatina 50 mg/mL

Los cuales fueron adicionados y resuspendidos junto con el concentrado de quistes en agua destilada conservados a 4 °C hasta el momento de desenquistamiento.



## 2. Desenquistamiento

Los quistes aislados y concentrados de las muestras de heces fueron sometidos a un proceso de desenquistamiento, utilizando el método de Bingham y Meyer, que propone

el uso de una solución de HCl pH 1.0 o jugo gástrico para lograr el desenquistamiento de los trofozoitos.

### 3. Cultivo axenico

El desenquistamiento de una muestra se logro observando a las 24 horas trofozoitos libres de contaminantes tanto bacterianos como fúngicos y levaduras, pero no pudieron establecerse los cultivos axenicos de esta forma parasitaria, existen tres posibles razones principales para esto:

- Hubo desenquistamiento luego del proceso para el cultivo axenico, pero no fue lo suficientemente viable para mantenerse en el cultivo.
- La contaminación microbiana persistió reproduciéndose en el medio de cultivo.
- Incapacidad de los trofozoitos de establecer y formar una capa ya que morían pasadas las 24 horas.
- El método de desenquistamiento simula el paso de los quistes a través del intestino, lo que incluye la disminución de pH seguido de la neutralización y la incubación en medio de cultivo, todo realizado a 37°C.



Desenquistamiento de *Giardia*, liberación de flagelos.

Fuente: I.I.F.B./ U.M.S.A.